

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KONJENİTAL KALP HASTALARINDA MLPA YÖNTEMİ
KULLANILARAK 22q11.2 DELESYON SIKLIĞININ
ARASTIRILMASI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali VAHABİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

İZMİR

2011

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KONJENİTAL KALP HASTALARINDA MLPA YÖNTEMİ
KULLANILARAK 22q11.2 DELESYON SIKLIĞININ
ARASTIRILMASI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali VAHABİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

İZMİR

2011

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimimin her aşamasında destek olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Cihangir Özkınay'a,
Desteğini her zaman hissettiğim ve araştırma şevkini bizlere de aşıladığı Sayın Prof. Dr. Ferda Özkınay' a,
Bilimsel katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Özgür Çoğulu ve Sayın Yrd. Doc. Dr. Haluk Akın'a,
Tezimin moleküler genetik analizi süresince desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Onay' a,
Tezime olan destekleri ve yardımları için Sayın Prof. Dr. Ruhi Özyürek'e,
Her zaman olduğu gibi tezim konusunda da samimi yardımlarını gördüğüm çok sevgili dostlarım ve doktor arkadaşım Sayın Dr. Filiz Hazan'a,
Doktora eğitimim boyunca huzurlu bir çalışma ortamının oluşmasını sağlayan bütün Tıbbi Genetik AD uzman, asistan, biyolog, teknisyen ve sekreter arkadaşlarıma,
Hayatımın her aşamasında bana desteğini esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili aileme, teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ali VAHABİ

İzmir, 2011

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMALAR.....	1
TABLO VE ŞEKİL DİZİNİ.....	2
GİRİŞ VE AMAÇ.....	3

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 KKH Sıklığı ve Sınıflandırılması	6
2.2 KKH Etiyolojisi.....	6
2.3 Konotrunkal Kalp Anomalileri.....	7
2.3.1 KTKD'nin Genetik Temeli	7
2.3.2 KTKD'nin 22q11DS ile İlişkisi.....	9
2.4. 22q11.2 Delesyon Sendromu.....	10
2.4.1 Tanım.....	10
2.4.2 Prevalans	11
2.4.3 Gelişim biyolojisi.....	11
2.4.4 Etiyoloji	15
2.4.5 Genetik ve Kalıtım	16
2.4.6 Klinik Bulgular.....	16
2.4.6.1 Karakteristik yüz görünümü.....	17
2.4.6.2 Timüs hipoplazisine bağlı immün yetmezlik.....	17
2.4.6.3 Yarık damak ve/veya velofarengeal fonksiyon bozukluğu.....	18
2.4.6.4 Hipoparatiroidizme bağlı hipokalsemi.....	18
2.4.6.5 Gelişimsel ve psikiyatrik problemler.....	18

2.4.7 Sınıflandırılma.....	18
2.4.7.1 DiGeorge Sendromu.....	19
2.4.7.2 Velokardiyofasiyal Sendrom.....	19
2.4.7.3 Konotrunkal Anomali Yüz sendromu.....	20
2.4.7.4 Cayler Kardiyofasiyal Sendrom.....	20
2.5 Tanısal Metodlar.....	21
2.5.1 Kromozom Analizi.....	21
2.5.2 Yüksek Resolüsyon Bantlama Tekniği	21
2.5.3 Floresan In Situ Hibridizasyon.....	21
2.5.3.1 FISH Tekniğinin Kullanım Alanları.....	22
2.5.3.2 FISH tekniğinde izlenen başlıca basamakları.....	22
2.5.3.3 FISH Tekniğinde Kullanılan Problar.....	23
2.5.3.4 FISH Tekniğinde Kullanılan Probların İşaretlenmesi.....	23
2.5.3.5 FISH Tekniğinde Kullanılan Prob Çeşitleri.....	23
2.5.3.5.1 Lokusa Özgü Problar.....	24
2.5.3.5.2 Tekrarlayan Dizi (Satellit) Probları.....	24
2.5.3.5.3 Kromozomun Tümünü Boyayan (Painting) Problar.....	24
2.5.3.5.4 22q11.2 Delesyon Probları ve Tanısal Değeri.....	24
2.5.4 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Yöntemi.....	25
BÖLÜM III	
3.1. Gereçler.....	30
3.1.1. Hastaların Seçimi.....	30
3.1.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	30
3.1.3. Kullanılan gereçler.....	30
3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	31

3.2. Yöntemler.....	32
3.2.1 FISH ÇALIŞMASI.....	32
3.2.1.1 PROB UYGULAMASI VE HİBRİDİZASYON.....	32
3.2.1.2 YIKAMA VE ZIT BOYAMA.....	32
3.2.1.3 DEĞERLENDİRME.....	33
3.2.2 Qiagen manuel DNA izolasyon kiti ile DNA elde etme protokolü.....	33
3.2.3 MLPA ÇALIŞMASI.....	34
3.2.3.1 DNA denatürasyonu ve MLPA kit P250DiGeorge kiti ile Hibridizasyon...34	
3.2.3.2 Ligasyon ve Enzim Kesim Reaksiyonu.....	34
3.2.3.3 PCR.....	34
3.2.3.4 ABI 3100 cihazına yükleme.....	35
3.2.3.5 Değerlendirme.....	36
BÖLÜM III	
BULGULAR.....	33
BÖLÜM IV	
TARTIŞMA.....	45
BÖLÜM V	
SONUÇLAR.....	56
BÖLÜM VI	
ÖZET.....	57
ABSTRACT.....	58
BÖLÜM VII	
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	

KISALTMALAR

KKH	:Konjenital Kalp Hastalığı
VSD	:Ventriküler Septal Defekt
PS	:Pulmoner Stenoz
PA	:Pulmoner Atrezi
FT	:Fallot Tetralojisi
DORV	:Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül
TA	:Trunkus Arteriosus
TGA	:Büyük Arterlerin Transpozisyonu
IAA tip B	:Aortik Ark İnterrüpsiyonu Tip B
KTKD	:Konotrunkal Kalp Defektleri
DGS	:DiGeorge Sendromu
VCFS	:Velocardiofacial Sendrom
CAFS	:Konotrunkal Anomali Yüz Sendromu
22q11.2DS	:22q11.2 Delesyon Sendromu”
HRBT	:Yüksek Rezolüsyonlu Bantlama Tekniği
MLPA	:Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification
FISH	:Floresans İnsitu Hibridizasyon
UFD1L	:Ubiquitin Füzyon Degradasyon 1
PTH	:Paratiroid Hormon
CTAF	:Konotrunkal Anomali Anormal Yüz Sendromu
DAOM	:Depresör Anguli Oris Kasının
ISH	:In Situ Hibridizasyon
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMVSD	:Posterior yerlesimli ventriküler septal defekt

TABLO VE ŞEKİL DİZİNİ

Tablo 1. Bazı sendromlar ve birlikte görülen kalp hastalıkları

Tablo 2. 22q11DS'de görülen konotrunkal kalp anomalilerinin dağılımı

Tablo 3. 22q11DS'de görülen konotrunkal kalp anomalilerinin dağılımı

Tablo 4. SALSALPA MLPA kit P250 DiGeorge kiti içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerinin listesi

Tablo 5. Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı

Tablo 6: Çalışma grubu klinik ve genetik bulguları

Tablo 7. Bir numaralı olgunun klinik ve genetik bulguları

Tablo 8: MLPA problemleri ve lokalizasyonları

Tablo 9: Üç numaralı olgunun klinik ve genetik bulguları

Şekil 1. 22q11DS'deki ortak delesyon bölgesi ve bulunan genler

Şekil 2. MLPA Reaksiyonunu

Şekil 3. Normal bir erkek olguya ait pik görüntüleri

Şekil 4. (A) Kontrol MLPA Analizi Görüntüsü (B) Olgu 1 MLPA Analizi Görüntüsü

Şekil 5. (A) Kontrol MLPA Analizi Görüntüsü (B) Olgu 3 MLPA Analizi Görüntüsü

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

Konjenital kalp hastalığı (KKH) mültifaktöryel olarak kalıtılan etiyolojide birden fazla geni ve çevresel faktörlerin birlikte etki ettiği hastalıklardır. KKH doğumsal anomaliler içinde en sık görülen doğumsal anomalilerin başında gelmektedir. Yeni doğanların yaklaşık %1'inde görülmektedir. Bu kadar sık görülen bir hastalık olmasına rağmen KKH'ların etiyolojisi hala net olarak açıklanmamaktadır.

KKH'larından, ventriküler septal defekt (VSD), pulmoner stenoz (PS)/ subpulmoner darlık, pulmoner atrezi (PA), fallot tetralojisi (FT), çift çıkımlı sağ ventrikül (DORV), trunkus arteriosus (TA), büyük arterlerin transpozisyonu (TGA), aortik pulmoner kollateral arterler, aort koarktasyonu/ subaortik darlık ve aortik ark interrüpsiyonu tip B (IAA tip B)'yi kapsayan anomaliler konotrunkal kalp defektleri (KTKD) başlığı altında toplanmaktadır (1-3).

KTKD'lere minör ve majör malformasyonlar eslik edebileceği gibi, izole olarak da görülebirlirler.

KTKD'li hastalarda yapılan çalışmalar sonucunda 22q11.2 bölgesindeki mikrolelesyon ile ilişkili olduğu görülmüştür (4,5). Geniş serilerde, 22q11.2 bölgesi delesyon prevalansı yaklaşık %12-30 arasında bildirilmistir (6-7).

Kromozom 22q11.2 bölgesinin mikrolelesyonu sonucunda birçok değişik fenotip ortaya çıkmaktadır, bunlar DiGeorge Sendromu (DGS), Velocardiofacial Sendrom (VCFS), Konotrunkal anomali yüz Sendromu (CAFS), otozomal dominant Opitz G/BBB Sendromu ve Cayler kardiofacial Sendromu şeklinde sayılabilir (8-12).

DGS, timus ve paratiroid bezinin konjenital yokluk sendromu olarak 1959'da bildirilmiştir. A.M. DiGeorge 1965 yılında immünite de timusun önemli bir rolü olduğunu göstererek, hipoparatiroidizm, timik hipoplazi ve tekrarlayan enfeksiyon geçiren olgularını bildirmiş,

böylece timik aplazi ve konjenital hipoparatiroidizm birlikteliği 'DiGeorge Sendromu' olarak adlandırılmıştır (13,14). VCFS, yarık damak, doğumsal kalp hastalığı, belirgin yüz görünümü ve öğrenme güçlükleri ile 1978'te (15,16); CAFS ise, konotrunkal doğumsal kalp hastalığı, belirgin yüz görünümü ve hiper-nazal ses ile 1976 yılında karakterize edilmiştir (17).

İlk kez 1990'lı yılların başlarında, 22q11.2 delesyonunun DGS, VCFS ve CTAFS ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. 22q11.2 delesyonlarının neden olduğu klinik spektrum "CATCH 22 fenotipi" (cardiac anomaly, abnormal facies, thymic hypoplasia, cleft palate, hypocalcemia) olarak adlandırılırken, son yıllarda "22q11.2 delesyon sendromu" (22q11.2DS) olarak tanımlanmaya başlamıştır (18-20).

DGS, VCFS veya diğer 22q11.2 mikrodelesyon sendromu fenotipine sahip olan hastalarda yaklaşık %90'ı 3 Mb , %8'i 1.5 Mb büyüklüğünde olan 22q11.2 delesyonunu klasik bantlama teknikleriyle hatta yüksek rezolüsyonlu bantlama tekniği (HRBT) ile görüntülemek oldukça zordur (21). Bu nedenle günümüzde kolay ve hızlı tanı için, moleküler sitogenetik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler sitogenetik yöntemlerden FISH (Floresans insitu hibridizasyon) yöntemi Floresan in Situ Hibridizasyon tekniği, hedef DNA'nın floresan işaretli DNA dizileri ile işaretlenmesine bir yöntemdir(25,26). FISH tekniği ile klasik bantlama yöntemleri ile tanımlanamayan 3Mb'fan küçük kromozomal değişikliklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. FISH yöntemi günümüzde her ne kadar en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olsa da, kantitatif olmaması, bazı küçük kromozomal yeniden düzenlenmelerde başarısız olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle günümüzde mikrodelesyonun büyüklüğü ve yerini gösteren kantitatif moleküler genetik yöntemlerden Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) giderek yaygın olarak kullanılma girmektedir (22,23).

MLPA yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tanımlamışlardır. İlk olarak 2008 yılında Jalali ve ark. tarafından 22q11.2 delesyon

sendromu tanısı alan 363 hastada FISH yöntemi ile tespit edilemeyen 22 adet yeniden düzenleme gösterilmiştir (23,24).

Bu çalışmanın amacı;

Konjenital kalp hastalığı tanısı almış olan çocuklarda ilk olarak FISH yöntemi ile 22q11.2 delesyon sıklığının saptanması, delesyon saptanamayan olguların MLPA analizi ile FISH yöntemi ile gözden kaçabilecek delesyonlar açısından MLPA analizi ile değerlendirilmesi ve her iki yöntemin birbirleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 KKH Sıklığı ve Sınıflandırılması:

Çocuklarda mortalite ve morbiditenin en sık nedenlerinden olan KKH, ortalama olarak 8/1000 oranında görülsede, doğum öncesi ve sonrasında ölüm ile sonuçlana çok ağır anomaliye sahip ve yaşam boyu sessiz kalabilecek kadar hafif durumların varlığı nedeniyle bu rakamın çok üstünde olduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde gerek doğum öncesi gerek doğum sonrası gelişmekte olan tanı yöntemleri nedeni ile her geçen gün KKH prevalansı değişim göstermektedir (27).

KKH sınıflandırılması etiyoloji, anatomik patolojinin yeri veya gelişimi gibi birden fazla şekilde yapılabilir. Clark'ın (28) KKH'nın gelişimine göre yaptığı sınıflamada başlıca 6 ana gruba ayırmıştır.

2.2 KKH Etiyolojisi:

KKH etiyojisinin büyük kısmını multifaktoriyel kalıtım ile açıklanırken, yaklaşık %30-35'i ise genetik sendromların bir parçası, annede görülen metabolik hastalıklar (diabet, fenilketonüri), prenatal enfeksiyonlar (rubella), ve ilaç (difenilhidantoin, folik asit antagonistleri, lityum, kokain, amfetaminler ve alkol) kullanımı sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Kromozomal anomaliler, doğumsal kalp hastalığı ile doğan bebeklerin yaklaşık % 6-10'unda gözlenir. Bu kromozom anomalilerinden en sık bilineni Down Sendromudur. Down sendromlu çocukların yaklaşık % 40'ı, trizomi 13 ve 18'li hastalarında hemen hemen tümü doğumsal kalp hastalığına sahiptir. Genetik etkenlerden biri de tüm kalp hastalıklarının % 3-4'ünden sorumlu olan mikrolelesyon sendromlarıdır. 22.q.11.2 delesyonu KKH'nın en sık görüldüğü mikrolelesyon sendromudur. Bu sendromda konotrunkal anomaliler (Fallot tetralojisi, büyük arterlerin transpozisyonu, aortik interrüpsiyon tip B, sağ arkus aorta ve

malalignment ventriküler septal defekt) adını sıklıkla görülür. Diğer bazı sendromlarda belli kalp hastalıkları ile birlikte gözlenir (Tablo 1).

Tablo 1. Bazı sendromlar ve birlikte görülen kalp hastalıkları

Sendrom	Kalp Anomalileri
Apert Sendromu	Pulmoner Darlık, Ventriküler Septal Defekt
CHARGE Sendromu	Fallot Tetralojisi, Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül, Ventriküler Septal Defekt, Atriyal Septal Defekt ve Sağ Arkus Aorta
Ellis-van Creveld Sendromu	Common Atriyum ; Atriyal Septal Defekt, Parmak Anomalileri
Holt Oram Sendromu	Sekundum Atriyal Septal Defekt, Başparmak Anormalikleri
Kabuki Sendromu	Aort Koarktasyonu, Biküspit Aortik Kapak, Mitral Kapak Prolapsusu, Ventriküler Septal Defekt, Fallot Tetralojisi
Kartagener Sendromu	Situs İnversus ve Ventriküler Septal Defekt
Lateralite sekansı	Sağ ve Sol Atriyal İsoimerizm, Kompleks Kalp Hastalıkları
Noonan Sendromu	Pulmoner Kapak Darlığı, Hipertrofik Kardiyomiyopati
Radial aplasia-trombositopeni sendromu	Fallot Tetralojisi, Atriyal Septal Defekt
VATER Birlikteliği	Ventriküler Septal Defekt
Williams Sendromu	Supravavular Aort Darlığı, Periferik Pulmoner Stenoz, Pulmoner Kapak Darlığı, Ventriküler ve Atriyal Septal Defekt

2.3 Konotrunkal Kalp Anomalileri:

Çok farklı fenotiplerle karşımıza çıkabilen KTKD tüm KKH'nın yaklaşık %10-15'ini oluşturur (29). KTKD'leri; TA, TGA, DORV, FT, VSD, PS/ subpulmonik darlık, PA, aort koarktasyonu/ subaortik darlık, aortik pulmoner kollateral arterler, IAA tip B'yi içerir (30,31). Bunlar arasında en sık görüleni FT olarak bilinmektedir (31).

2.3.1 KTKD'nin Genetik Temeli:

Her ne kadar gelişen cerrahi düzeltme teknikleri, KKH hastalarının erişkin çağa ulaşarak ebeveyn olmalarına olanak sağlayarak hastalığın kalıtımı hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamızı kolaylaştırırsa da etiyoloji ile ilgili bilgilerimiz halen sınırlı düzeyde bulunmaktadır. Teratojen ajanlar, enfeksiyon ve mikrolezyonlar dışında kalan kromozomal anomaliler etiyolojinin yaklaşık %10'undan sorumlu tutulurken, geri kalan etiyolojiden multifaktöriyel

kalıtım sorumlu tutulsa da son yapılan çalışmalarda tek gen defektlerinin yeri küçümsenmeyecek kadar yüksek olduğu görülmüştür (34,35).

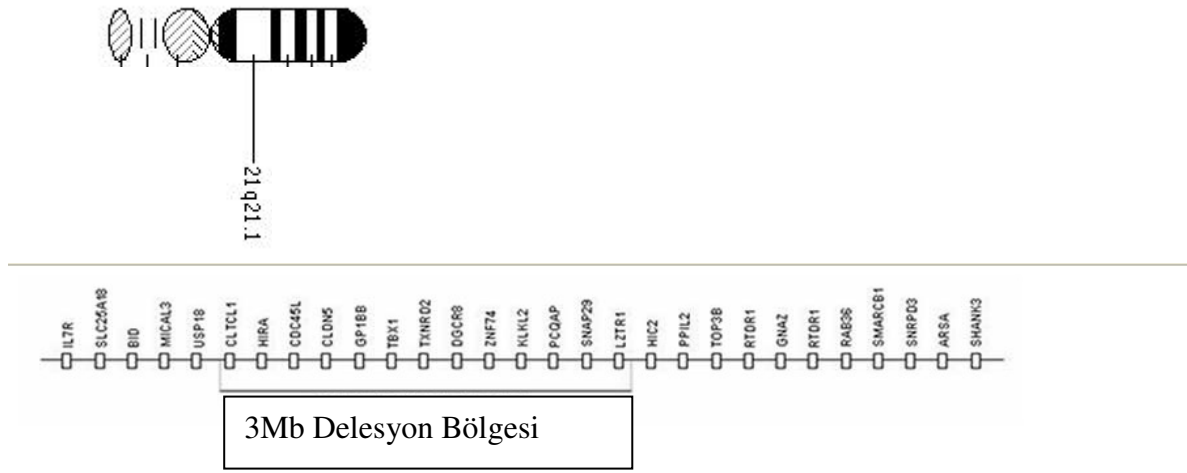
KTKH'lar diğer KKH ile karşılaştırıldığında daha fazla tekraralama riski olduğu görülerek monegenik veya çok az sayıda genin sorumlu olduğu poligenik bir kalıtıma uyma olasılığı üzerinde durulmaktadır (36).

KTKH'lerden FT, DORF, TA ve KAA tanısı alan hastaların yaklaşık %37'sinde kalp dışı semptomlara rastlanırken (28), KTKH'ları aynı zamanda çeşitli sendromlarla birlikteliği gösterilmiştir. En sık olarak DGS, VKFS, CAFS, Genitopaletokardiyak Sendrom ve Koussef Sendromunun bir parçası olarak izlenebilmektedirler. Fenotipik olarak birbirine çok benzeyen DGS, VKFS ve CAFS sendromlarının 22q11 bölgesindeki delesyona bağlı ortaya çıktığı anlaşıldıktan sonra bu sendromların 22q11DS olarak adlandırılması kararlaştırılmıştır (37).

İzole KTKD'lerin etiyolojisinde en sık neden %12–30 oranında değişken bir prevalans gösteren 22q11.2 mikrodelesyonları oluşturmaktadır (2,29, 32,33).

Hastaların büyük çoğunluğunda delesyonlar otozomal dominant kalıtım modeline göre büyüklükleri değişmeden aktarılsa da aynı ailelerde bile fenotipik farklılıklar gözlenebilmektedir. Bu gibi durumlar 22qDS'da fenotip genotip korelasyonunu güçleştirmektedir.

22q11DS'de en sık kardiyak bulgular gözlenirken (%75), bunun yanında, immün yetmezlik, hipokalsemi, otolaringeal bulgular, anormal psikomotor gelişme ve kraniyofasiyal bulgular görülebilmektedir (31).



Şekil 1. 22q11DS'daki ortak delesyon bölgesi ve bulunan genler

2.3.2 KTKD'nin 22q11DS ile İlişkisi:

KKH etiyojisinde 22q11DS, Down Sendromundan sonra görülen en sık ikinci anomalidir. Her ne kadar, Lewin ve ark.'larının (36) 1996 yılında yaptıkları bir çalışmada, 22q11DS'deki kalp anomalilerin başlıca konotrunkal anomaliler ve branchial ark defektleri olmak üzere 2 grupta toplanması gerektiğini belirtse de, aslında burada görülen patolojinin tek olduğu ve ektodermal migrasyon defekti ile açıklanabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar konotrunkal anomalilerin 22q11DS'nun %75-85'indeki kardiyak patolojiyi oluşturduğunu göstermektedir (31, 39). 22q11DS'de görülen konotrunkal anomalilerin alt tiplerinin dağılımını gösteren benzer çalışmalar yapılmıştır (11,31,34). Bu konudaki en kapsamlı çalışmalardan biri olarak kabul edilen çalışmada, Ryan ve ark.(38), 22q11 delesyonu saptanan 508 hastada görülen konotrunkal kalp anomalilerini sınıflayarak, en sık görülen anomalinin %17'lik oranı ile FT olduğunu göstermişlerdir (Tablo 2).

Bütün bunların dışında, 22q11DS tipine göre görülen kardiyak anomalinin değişebileceği bildirilmiştir. Örneğin CTAF tanısı almış grupta en sık FT (%74) görülürken, DGS tanısı alan grupta, birinci sıklıkta KAA (% 41), ikinci sıklıkta FT (% 29) görüldüğü bildirilmiştir (39).

Sendromik veya izole konotrunkal kalp anomalisi saptanan olgularda yapılan 22q11 delesyonu taraması sonucunda çok farklı sonuçlar ortaya konmuştur (40–44). Bunun nedeni olarak, 22q11DS'lerinin değişken bir ekspresiviteye sahip olması, özellikle yeni doğan

döneminde semptomlarının çok siliik olabileceği, doğumda belirgin olmayan, sadece ileriki yaşlarda fark edilebilen konuşma güçlükleri, öğrenme bozuklukları ve ayırıcı yüz bulguları taşıyabildikleri için, konotrunkal anomali saptanan hastalarda yapılan yeniden klinik değerlendirmeler sonucunda tanının konulduğu ifade edilmektedir (40). Bu nedenle, yeni doğan döneminde 22q11DS tanısını atlamamak amacıyla konotrunkal anomali saptanan bütün hastaların 22q11 delesyonu açısından araştırılması gerektiğini belirten araştırmacıların yanı sıra (41-43, 47,49), bu hastaların klinik olarak iyi değerlendirilmesi ve kalp dışı bulguların da eşlik ettiği durumlarda 22q11 delesyonu açısından değerlendirmenin uygun olacağını savunan araştırmacılar da vardır(40,44,46,47). Günümüzde yapılan bildirimler sonucunda varılan genel kanı, 22q11 delesyonunun izole konotrunkal anomalilerin etiyojisinden sorum olamayacağı yönündedir.

2.4 22q11.2 Delesyon Sendromu (22q11DS)

2.4.1 Tanım

22q11.2DS büyük çoğunluğu KTKD olan doğumsal kalp anomalileri (50,51), damak ile ilgili anomaliler, fasiyal dismorfizm, gelişimsel gecikme, bağışıklık sistemi ve kalsiyum homeostazında görülen anormalliklerin farklı şekillerde kombinasyonu ile karşımıza çıkar.Günümüzde 22q11DS bağlı 80'den fazla fenotip bildirilmiştir (37). Bu anomaliler farklı kombinasyonlarda değişken ekspresivite ile karşımıza çıksa da, günümüzde başlıca 4 ana grupta toplanmıştır (27).

- CTAF (Konotrunkal Anomali Anormal Yüz Sendromu)(Kardiyak Tip)
- DGS (DiGeorge Sendromu)
- VCFS (Velo-Kardiyo-Fasiyal Sendrom)
- Asimetrik Yüz Sendromu

İlk kez 1990'lı yılların başlarında, 22q11.2 delesyonunun DGS, VCFS ve CTAF ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (8,9,52). İlk olarak 1965 yılında doğumsal kalp anomalileri, hipoparatiroidizm ve immün yetmezlik bulguları ile DGS, daha sonra 1976 yılında

konotrunkal KKH, belirgin dismorfik yüz bulguları ve hiper-nazal ses ile CTAF, son olarak da 1978 yılında yarı damak, KKH, belirgin dismorfik yüz bulguları ve öğrenme güçlükleri ile VCFS, karakterize edilmiştir (13,15-17).

Önceki yıllarda 22q11 delesyonu sonucu oluşan klinik tabloyu tanımlamak için [Cardiac anomaly(Kalp Anomalisi), Abnormal facies(Anormal Yüz Bulguları), Thymic hypoplasia (Timus hipoplazisi), Cleft palate (Yarı Damak), Hypocalcemia (Hipokalsemi)] teriminin baş harflerinin birleşmesinden oluşan CATCH 22 Sendromu teriminin kullanılması uygun görülmesine rağmen (53) daha sonra yapılan çalışmalarda, Cayler'in önerisi ile kardiofasiyal ve Opitz G/BBB Sendromlu hastalarda da 22q11.2 delesyonunun gösterilmesi ile bu spektrumun "CATCH 22" teriminden daha da geniş olduğu, bu nedenle "CATCH 22" teriminin yetersiz kalabileceği, yerine 22q11DS teriminin kullanılması için görüş birliğine varılmıştır (18, 22,51,54).

İlave bir anomali veya dismorfik yüz bulguları dahil olmayan izole KTKD olgularında nadiren, 22q11.2 delesyonu olduğu gösterilmiştir (6,20,51,55).

2.4.2 Prevalans

Kromozom 22q11DS prevalansı 1/4000–5000 canlı doğumda olarak bilinmektedir (29,56). İnsanlarda görülen en yaygın mikrolelesyon sendromudur (51,57,58). Yeni doğan döneminde görülen KKH'nın ortalama %5'inde 22q11.2 mikrolelesyonu saptanmaktadır.

2.4.3 Gelişim biyolojisi

Nöral krest hücrelerinin migrasyonu 22q11.2 bölgesindeki genlerin kontrolündedir. Bu bölgede meydana gelen delesyon bu genlerin fonksiyon kaybı sonucunda nöral hücre migrasyonunu bozarak KTKH'ye yol açmaktadır (7,59-61).

Nöral krest hücre migrasyonu; normal konotrunkus, kardiyak septa, kranium ve yüz kemikleri ile timus ve paratiroid gelişimi için kritik öneme sahiptir(62,63).

Farengial arklar ön-arka eksen boyunca segmental bölge içinde gelişen ve çok sayıda farklı embriyonik hücre tipinden oluşan bilateral simetrik yapılardır (64). Her ark'ı, dıştan saran bir ektoderm, içten saran bir endoderm ve merkezde farengial ark arterine bitişik paraaksiyal mezoderme sahiptir.

Tablo 3. 22q11DS’de görülen konotrunkal kalp anomalilerinin dağılımı

Kalp Anomalisi		N	%
FT		95	17
VSD		75	14
KAA		74	14
PA-VSD		55	10
TA		51	9
Diğer	Çift Çıkışlı Sağ Ventrikül Pulmoner Kapak Yokluğu Büyük Arter Transpozisyonu Aort Stenozu Aort Kapak Hipoplazisi Pulmoner Kapak Stenozu Vasküler Ring Aberran Subklavian Arter, Patent Duktus Arteriosus, Aort Koartasyonu Major Aortapulmoner Kollateral, Çift Aortik Ark, İzole Sağ Arkus Aorta, Bilateral Duktus Atrieriosus, Servikal Arkus Aorta, Sekondum ASD, Triküspit Atrezi,Parsiyel Anormal Venöz Dönüş, Atrail İzomerizm,	59	11

	Komplet Atrioventriküler Kanal, Dektrokardi, Hipoplastik Sol Kalp		
TOPLAM		409	75

Sefalik nöral krest hücreleri, farengeal ark arterlerini ve mezodermal iç kısmı kuşatan mezenşim tabakasını oluşturmak üzere, kaudal nöral katlantıdan her bir farengeal arka göç eder. Nöral krest kökenli mezenşim, kardiyovasküler ve yüzün iskelet yapılarının oluşumuna katkıda bulunurken, mezoderm de yüz ve boyun kaslarının oluşumunu sağlar. Endoderm kökenli epitelyum katmandan şekillenen farengeal poşlar, timus ve paratiroid bezlerini içeren kraniyofasiyal organları oluşturur. Ektoderm kökenli epitel katmandan şekillenen farengeal

yarıklar ise, epidermis ve gangliyonlarla bağlantılı arkların duyuşal nöronlarını oluşturur (21,22).

Gerek tavuk embriyolarında sefalik nöral krest hücrelerinin nöral katlantıya göçünden önce çıkarılması sonucu, gerekse farelerde nöral krest gelişiminde rolü olan *Pax3* ve *endotelin-1* gibi genlerdeki mutasyonlar sonucunda 22q11.2DS majör fenokopik bulguların gözleendiği bildirilmiştir (21,22). Sonuç olarak, 22q11.2DS'nin başlıca sebebinin, kalbin konoturunkal bölgesinin, farengal arkların ve onların arterlerinin oluşumundan sorumlu nöral krest hücrelerinin anormal gelişimi olduğu sonucuna varılmıştır (22).

2.4.4 Etiyoloji

Üç Mb'lık ortak delesyon bölgesindeki [DGCR(DiGeorge kritik bölgesi)] TBX1 geninin, sendromun fenotipik özelliklerinden geniş ölçüde sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Sekil 1) (64).

Transkripsiyon faktörlerinden T-box ailesi içinde yer alan TBX1 geni farengal arklardaki nöral krest migrasyonu, farengal ark arterlerinin erken gelişimi ile birlikte yeniden düzenlenmesi ve normal kulak gelişimi için gereklidir (57,65).

Homozigot TBX1 mutasyonlu farelerin, KTKH, anormal yüz bulguları, yarık damak, timus ve paratiroid bez hipoplazisi gibi 22q11DS bulguları göstererek perinatal dönemde öldüklerini, heterozigot olanlarda ise 22q11.2DS'nin tüm fenotipik spektrumunu yansıtmalarına karşın, sadece düşük penetranslı aortik ark anomalileri ile sonuçlanan 4. farengal ark arterlerinin yokluğunun saptandığı bildirilmiştir (66). TBX1 geni dışında nöral krest kökenli dokularda eksprese olan hücre siklusuna bağımlı histon gen regülasyonunda görevli Hir1p ve Hir2p proteinlerini kodlayan HIRA geni diğeri bir aday gen olarak dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalar HIRA geni ve DGS etiyojisinde rol oynadığı görüşündedir (67).

Farengial ark ve ekstremitte köklerinde eksprese olan ubiquitin aracılı protein degradasyonuna katılan bir maya geninin ortoloğu olan *UFD1L* (ubiquitin füzyon degradasyon 1 (Ufd1)-like) geni, olur (64,121). Ufd1I, bHLH transkripsiyon faktörünün alt grup geni, 22q11DS etiyojisinden sorumlu tutulan bir başka gendir. Bu genin azalmış regülasyonu sonucunda farengial ark hipoplazisi ve kardiyak çıkış yolu defektleri gösterilmiştir (68).

2.4.5 Genetik ve Kalıtım

22q11DS mikrolelesyonu olan olguların yaklaşık %90'ı, 30 geni kapsayan ve kalıtım ile genotipik değişikliğe uğramayan ~3 Mb'lık delesyona sahiptir. Geri kalan olgularda ise (%8-10) yaklaşık 24 geni kapsayan 1,5 Mb'lık daha küçük bir mikrolelesyon bulunur ancak bu, daha hafif semptomlara neden olacağı anlamına gelmez. Bu durum genotip-fenotip korelasyonunun yapılmasını zorlaştırmaktadır (57, 69,70). Değişken fenotipe fetal gelişim evresinde çevresel faktörlerin yol açtığı düşünülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda A vitaminin insan ve fare embriyolarında DGS benzeri fenotip oluşturdugu ve fetal alkol sendromlu olgularda 22q11.2DS fenotipi görüldüğü bildirilmiştir (71).22q11DS %90-94 oranında de novo mutasyon olarak kendini gösterirken sadece %5-10 oranında otozomal dominant olarak kalıtılır (22).

DiGeorge fenotipi olan 22q11.2 mikrolelesyonu tespit edilen olguların ebeveynlerinde hafif VCFS fenotipi ve ailesel vakalarda, etkilenmiş ebeveyn çoğunlukla anne olduğu bildirilmiştir (72). Bu nedenle, delesyon saptanan olgularda ebeveynlerin kontrolü gerekmektedir (51). Bunun yanında dengeli translokasyon taşıyıcısı ebeveynlerden dengesiz geçiş sonrasında 21q11DS bulguları görülebilmektedir.

De novo delesyonun, bir sonraki çocuk için tekrarlama riski çok düşüktür (51).

2.4.6 Klinik Bulgular

22q11DS fenotipik heterojenite gösteren bir sendromdur. KKH, karakteristik yüz görünümü, timüs hipoplazisine bağlı immün yetmezlik, yarı damakla beraber ve /veya velofarengial

fonksiyon bozukluğu, hipoparatiroidizme bağlı hipokalsemi, davranış problemleri ve yetişkin dönemde görülen psikiyatrik bozukluklar başlıca major klinik bulgularını oluştururken, kısa boy, renal anomaliler, anal atrezi, inguinal herni, hipospadiyas, sitrabismus, fasiyal sinir felci, skolyoz ve trombositopeni gibi 180' in üzerinde minör anomalinin 22q11.2DS ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (22).

2.4.6.1 Karakteristik yüz görünümü

22q11DS karakteristik yüz bulguları;

- Mikrognati
- Küçük ağız,
- Dar palpebral aralık
- İç kantusların lateral yerleşimi
- Deforme kulak memeleri
- Yassı nazal köprü

olarak sıralanabilir. Bu bulgular çocukluk döneminde belirgin iken, yenidoğan ve erişkin döneminde çok belirgin olmayabilir (73).

2.4.6.2 Timüs hipoplazisine bağlı immün yetmezlik

Timus hipoplazisine bağlı olarak, yeterli sayıda fonksiyonel T hücrelerinin olgunlaşmaması, T hücre sayısında ve fonksiyonunda azalma ana patolojilerden biridir (57). 22q11DS 'da şiddetli immün yetmezliklere sadece olguların %5'inden azında rastlanırken, genelde (~ %50) timus hipoplazisi ve kanda azalmış T hücre sayısına bağlı olarak tekrarlayan bronkopnömani ve otitis media ile kendini gösteren klinik bulguları görülmektedir (22,50,74).Tekrarlayan seröz otitis media'ya bağlı olarak işitme kaybı yaygın olarak görülür (50). Ağır olgularda kemik iliği veya timus nakli uygulanabilmektedir.

2.4.6.3 Yarık damak ve/veya velofarengal fonksiyon bozukluğu

22q11DS'li hastaların yaklaşık %10'unda yarık damak, %30'undan fazlasında da Velofarengal yetmezlik, erken çocukluk döneminde beslenme problemine sekonder olarak artmış aspirasyon pnömonisine öncülük ederken, büyük çocuklarda ise nazal konuşma ve konuşma bozukluğuna neden olur (50,75).

2.4.6.4 Hipoparatiroidizme bağlı hipokalsemi

22q11DS'li olguların yaklaşık %70'inde, paratroid bezi gelişim anomalisi nedeniyle düşük serum paratiroid hormon (PTH) seviyeleri ve değişken derecelerde hipokalsemi gözlenir (50,76). Klinik olarak latent hipoparotroidi şeklinde kendini gösterdiği gibi konjenital hipokalseminin görüldüğü ağır formlar da bildirilmiştir. Konjenital hipokalsemi olguları aktif vitamin D ve/veya kalsiyum tedavisi ve düzenli takip gerektirirken, daha yaygın olarak görülen latent hipoparotroidi olgularında ise parathormon bazal düzeyleri çoğu zaman yeterli olmaktadır. Ancak bebeklik, adolesans dönemi ve gebelik gibi stres durumlarında kalsiyum ihtiyacı artarak hipokalsemi kliniği ile başvurabilmektedirler (22,46).

2.4.6.5 Gelişimsel ve psikiyatrik problemler

Kromozom 22q11DS'li olgulardaki IQ düzeylerinin değişken olması öğrenme güçlüklerinden mental retardasyona kadar uzanan geniş bir yelpazede bilişsel gerilikler olarak fenotipe yansımaktadır (50). Olgularda ağır mental retardasyon görülme olasılığı düşükken, ortalama IQ seviyesi 75 olarak bildirilmiştir. (56,77, 78). Erken çocuklukta, yavaş dil gelişimi, öğrenme güçlükleri, dikkat ve konsantrasyon eksikliği yaygın olduğu için tanı alan bütün olgulara özel eğitimin tavsiye edilmesi vurgulanmaktadır (22).

2.4.7 Sınıflandırılma

Bu anomaliler farklı kombinasyonlarda değişken ekspresivite de karşımıza çıksa da, günümüzde 4 ana grupta toplanmıştır. Bunlar, DGS, VCFS, CTAF (Konotrunkal Anomali

Anormal Yüz Sendromu)(Kardiyak Tip), CTAF (Kardiyak Tip), Asimetrik Yüz Sendrom ve Opitz G/BBB Sendromu şeklindedir (27).

2.4.7.1 DiGeorge Sendromu (DGS; OMIM 188400)

İlk olarak 1965 yılında, hipoparatiroidizm ve tekrarlayan enfeksiyonlar görülen bir olgu ile birlikte, timus ve paratiroid bezi aplazisi gösteren otopsi olgusunun bildirilmesi ile tanımlanmıştır (53). İlerleyen yıllarda aynı bulgulara KKH ve dismorfik yüz bulgularının eklenmesi ile DGS adı verilmiştir (20). DGS, üçüncü ve dördüncü farangeal poşun gelişimsel defekti sonucu ortaya çıkan, timus ve paratiroid aplazisi/ hipoplazisi, konotrunkal kardiyak malformasyonlar ve dismorfik yüz bulguları ile karakterizedir (71). Bu sendroma sahip olan hastaların %90-95'inde 22q11.2 bölgesinde heterozigot delesyon vardır (57). DGS fenotipi olan olgularda daha nadir olarak 10p13.14 delesyonu (79-81), 4q21.3-q25 delesyonu (82) gibi kromozom anomalileri de bildirilmiştir. Kardiyak bulgu olarak en sık VSD görülürken, fallot tetralojisi, tip B bölünmüş aortik ark, trunkus arteriosus, sağ arkus aorta, aberan sağ subklavyan arter görülen diğer kardiyak patolojilerdir. Bunun yanında paratiroid bezinin hipoplazisinden kaynaklanan neonatal hipokalsemi, timus bezindeki hipoplazi yada aplaziden kaynaklanan T hücre yetersizliği ve immün yetmezlik görülmektedir. Düşük ve küçük kulaklar, anormal kıvrımlı pinna, kısa palpebral fissürler, telekantus, bulböz burun, kare burun ucu, submüköz veya belirgin damak yarığı sık görülen dismorfik yüz bulgularındandır. Kısa boy ve hafiften ortaya değişkenlik gösteren öğrenme güçlükleri, değişken psikiyatrik bozukluklar ve majör depresif hastalıklar oldukça yaygındır.

2.4.7.2 Velokardiyofasiyal Sendrom (VCFS; MIM 192430)

İlk olarak 1978 yılında Shprintzen ve ark. (102) tarafından tanımlanan, prevalansı 1/4000 olan VCFS olgularının %10-25'i herediter, %75-90'nı ise de novo delesyon sonucunda ortaya çıkmaktadır (37). VCFS, KKH, yarık damak, öğrenme güçlükleri ve dismorfik yüz bulguları ile karakterize bir sendromdur (54,83). Kardiyak bulgu olarak en sık VSD (%62) görülürken,

bunu sağ arcus aorta (%52), FT (% 21) ve aberan sağ subklavian arter takip eder. Uzun yüz, dar palpebral fissür, belirgin burun, geniş ve yüksek burun kökü ve retrognati, dismorfik yüz bulgularının yanı sıra uzun parmaklar karakteristik bulgularındandır (54,83). VCFS'nun klinik bulguları, DGS ile anlamlı derecede örtüşmektedir (13). DGS, VCFS'unun komponentlerini içermekle birlikte DGS' lu hastalar ilave olarak, timus aplazisi veya hipoplazisi ve ağır hipokalsemi bulguları gösterir (15).

2.4.7.3 Konotrunkal Anomali Yüz sendromu

Kinouchi ve arkadaşları tarafından (54), 1976 yılında, fallot tetralojisi, pulmoner atrezi, çift çıkışlı sağ ventrikül, trunkus arteriosus communis ve aortik ark anomalileri gibi çeşitli kardiyak çıkış yolu defektleri ve hipertelorizm, inner kantinin lateral yerleşim bozukluğu, nazal ses, yassı burun kökü, dar palpebral fissürler, şişkin göz kapakları, küçük ağız ve minör kulak anomalileri gibi belirgin yüz bulguları gösteren bir fenotip olarak bildirilmiştir. Bazı olgularda, VCFS'dan ayrı olarak DGS'na benzer neonatal dönemde hipokalsemi ve timus aplazisi veya hipoplazisi bulguları bildirilmiştir (73).

2.4.7.4 Cayler Kardiyofasiyal Sendrom (OMIM;125520)

Alt dudağın hareketin kontrol eden depresör anguli oris kasının (DAOM) konjenital agenesisi veya hipoplazisi sonucunda ağlama sırasında yüzde asimetri oluşmaktadır. Ağlama sırasında yüzde asimetri ve KKH birlikteliği ilk olarak 1969 yılında Cayler (85) tarafından bildirilerek "Kardiyofasiyal sendromu" terimini almıştır. İleriki yıllarda Cayler Kardiyofasiyal Sendrom veya Asimetrik Ağlama Yüzü Sendromu (Asymmetric Crying Facies Syndrome) adlarının kullanılması uygun görülmüştür. Ventriküler septal defekt, atriyal septal defekt, patent duktus arteriyosus, fallot tetralojisi, sağ aortik ark, iki taraflı aortik ark, pulmonik stenoz, aort koarktasyonu, triküspit atrezi, kalpte tek sağ ventrikül, hipoplastik pulmoner arterler ve biküspit aortik valvi bu sendromda görülen kardiyolojik anomalilerdir. Spontan mutasyon son derece nadirdir, daha çok aileseldir ve otozomal dominant kalıtılır.

2.5 Tanısal Metodlar

2.5.1 Kromozom Analizi

Nukleus içeren ve canlı olan tüm hücrelerden kromozom elde edilebilir. Bu amaçla en sıklıkla kullanılan dokular kan, kemik iliği, amniyon sıvısı, trofoblastlar ve deri fibroblast dokusudur (86). Yukarıda belirtilen hücre gruplarına kültür yöntemi uygulanır. Kültür yönteminde kullanılan özel besi yerleri, hücrelerin ihtiyacı olan protein, vitamin, hormon, mineraller gibi maddelere ek olarak, hücreleri bölünmeye uyaran Fitohemaglitülin, L-glutamin gibi maddeleri de içerir (86).

2.5.2 Yüksek Resolüsyon Bantlama Tekniği (HRBT)

Yüksek Resolüsyon Bantlama Tekniği, 1976 yılında Yunis ve ark. ları (87) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, timidin ile lenfosit hücre kültürü senkronize edilmesi ve kromozomların daha az kondanse oldukları, mitozun erken evresinde elde edilmesi temeline dayanır. Bu yöntemde amaç, hücre siklusunun erken bir evresinde DNA sentezinin timidin ile bloke edilmesi, arttırılan hücre sayısını takiben bloğun timidin ilavesiyle kaldırılarak tüm hücrelerin eş zamanlı DNA sentezine girmeleri ve belli inkübasyon süresini takiben, kolsemid uygulamasıyla prometafaz, erken metafaz aşamalarında durdurulması sağlanır. Bu teknik, özellikle, küçük delesyon ve dublikasyonların beklendiği olgularda çok yararlı olabilmektedir. Standart metafaz preparasyonlarında kromozomlar 450 bant gösterirken, yüksek resolüsyon bantlama tekniğiyle kromozomları 850 bant seviyesine kadar görmek mümkün olmaktadır.

2.5.3 Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Direkt veya indirekt olarak işaretlenmiş DNA dizilerinin, sitolojik preparatlarda hedef DNA ile oluşturduğu hibrid ürünlerinin mikroskopta görüntülenmesi in situ hibridizasyon (ISH) tekniği olarak adlandırılır. Teknik, ilk kez 1969'da Gall ve Pardue (88) ve onlardan bağımsız olarak çalışan John ve arkadaşları (89) tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda, problemler radyoaktif izotoplarla işaretlenerek, denatüre edilmiş sitolojik preparatlar üzerindeki hedef

hücre DNA' sını ile hibridize edilmiş ve otoradyografiyi takiben hibridizasyon bölgelerinin gümüş partiküllerle işaretlendiği gösterilmiştir. Bin dokuz yüz seksenli yılların başlarına kadar, DNA problemlerini işaretlemeye radyoizotoplar kullanılmaktaydı. Fakat, radyoaktif maddelerin zararlı olması, işaretli probun raf ömrünün kısa olması gibi sorunlar nedeniyle nükleik asitler, floresan ya da enzimatik tepkimelerle işaretlenmeye başlanmıştır (90). Böylece problemlerin hem enzimatik hem de kimyasal olarak aracı moleküllerle modifiye edilmesi ve hibrid moleküllerin amaca uygun şekilde görüntülenebilmesi sağlanmıştır (91). Otoradyografik tekniklerin yerini non-izotopik işaretleme teknikleri almıştır (92). Klonlama yöntemleriyle elde edilen problemlerin, radyoaktif ve nonradyoaktif moleküllerle işaretlenmesini sağlayan nick translasyon yöntemi 1977 yılında Rigby ve ark. (93) tarafından geliştirilmiştir. 1981'de ise Langer, nick translasyon yöntemi ile biotin kullanarak gerçek anlamda ilk radyoaktif olmayan işaretlemeyi gerçekleştirmiştir (94,95). Hibridizasyon tekniği, 1991 yılında floresanlanmış nükleotid analoglarının kullanılmaya başlanmasıyla FISH Tekniği adını almıştır. FISH tekniğinin duyarlılığı ve etkinliğinin yanı sıra hem interfaz hücrelerinde, hem de metafaz kromozomlarında uygulanabilirliği, bu yöntemin kullanım alanını genişletmiştir.

2.5.3.1 FISH Tekniğinin Kullanım Alanları

- Klinik sitogenetik ve prenatal tanı
- İnterfaz hücrelerinde anöploid tanı
- Mikrodelesyon sendromlarının tanısı
- Kanser Sitogenetiği

2.5.3.2 FISH tekniğinde izlenen başlıca basamakları

- Materyalin fikse edilerek preparatlara yayılması,
- Probu işaretlenmesi,
- Hibridizasyon

- Hedef DNA'nın (metafaz kromozomları veya interfaz nükleusu) denatürasyonu,
- Prob denatüre edildikten sonra hedef DNA ile hibridizasyonu,
- Hibridizasyon sonrası yıkamalar,
- Prob DNA ile hedef DNA' dan oluşan hibrid molekülün Floresan mikroskopla görüntülenmesi.

2.5.3.3 FISH Tekniğinde Kullanılan Problar

Hedef DNA/RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisine prob denir. Belirli bir kromozomal bölgenin veya DNA kesiminin FISH yöntemi ile görünür hale gelebilmesi için o bölgeye özellikli bir probun kullanılması gerekir. Problar özellikli DNA parçasının plazmid, bakteriyofaj, kozmid gibi bir vektör içerisine yerleştirilerek bakteri veya maya gibi konakçı hücrelerde ya da PCR ile çoğaltılması ile elde edilirler (7).

2.5.3.4 FISH Tekniğinde Kullanılan Probların İşaretlenmesi

Problar, non-radyoaktif yöntemlerle direkt ve indirekt olmak üzere iki türlü işaretlenebilir. En sık kullanılan yöntem olan direkt işaretleme de aracı molekül direkt olarak proba bağlanır ve hibridizasyon sonrası mikroskopta görüntülemeye geçilir. Bu yöntemin en önemli kısmı, prob ile aracı molekül arasındaki bağın, sonrasındaki yıkama aşamalarına dayanabilmesidir. (96).

İndirekt yöntemde ise aracı molekül enzimatik ya da kimyasal olarak proba bağlanır ve immünohistokimyasal afinite reaksiyonları ile görünür hale getirilir. (97). İndirekt yöntemde en sık biotinavidin (94), biotin-streptavidin, digoxigenin ve dinitrofenol kullanılır (98).

2.5.3.5 FISH Tekniğinde Kullanılan Prob Çeşitleri

Hedef dizilerine göre problar başlıca 3 sınıfa ayrılırlar;

1. Lokusa özgü problar,
2. Kromozomun belirli bir yapısal bölgesine özgü, tekrarlayan DNA dizilerinden oluşan problar,
3. Kromozomun tümünü veya belirli bir bölgesini boyayan problar (99).

2.5.3.5.1 Lokusa Özgü Problar

İnterfaz nukleusunda ya da metafaz kromozomlarında bir gene veya genin içindeki bir bölgeye ait özgün DNA dizilerinden oluşan problardır (100). Bu problar spesifik DNA dizilerinin faj yada YAC vektörüne klonlanması ve DNA'nın PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılması sonucu meydana gelmektedirler (25). Özellikle mikrolelesyon sendromlarının tanısında kullanılmaktadırlar.

2.5.3.5.2 Tekrarlayan Dizi (Satellit) Problemleri

Total insan DNA'sının büyük çoğunluğu DNA tekrarlayan dizilerinden oluşmaktadır. Kromozomların sentromerik ya da perisentromerik bölgelerinde uzun tekrar dizileri vardır. Bunların büyük bir çoğunluğu her kromozom için spesifiktir (101). Alfa-satellitler 171bp'lik tekrarlar şeklinde tüm insan kromozomlarının sentromer bölgesinde bulunur ve her bir kromozomun boyuna uzunluğunun %2-5'ini kaplamaktadır (102).

2.5.3.5.3 Kromozomun Tümünü Boyayan (Painting) Problemleri

Tek tek izole edilen kromozomların PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen ve kromozomların hem uzun hem de kısa kolunun tamamını işaretleyen problardır (25,99). Bu problar, çoğu zaman marker kromozomların kökeninin belirlenebilmesi için kullanılmaktadırlar.

2.5.3.5.4 22q11.2 Delesyon Problemleri ve Tanısal Değeri

Klasik sitogenetik yöntemlerle submikroskopik delesyonların ancak %15-29'sine tanı konabilmektedir (49,57).

22q11.2 mikrolelesyonunu belirlemek için 1993–1994 yıllarında FISH yönteminin devreye girmesi ile tanı konulan hasta sayısı ve bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (22,26,57). FISH yöntemi ile 22q11.2 delesyonlarının %95'ine tanı konabilir. Hastaların geri kalan %5'ine ise FISH yöntemi ile tanı konamamaktadır. Bunun nedeni ise bu hastalardaki mutasyonun daha küçük olmasından kaynaklanmaktadır (5). Bunun için günümüzde

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Yöntemi (MLPA) moleküler genetik yöntemi geliştirilmiştir.

2.5.4 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Yöntemi (MLPA)

MLPA yöntemini ilk defa 2002 yılında Schouten ve arkadaşları, son haliyle relatif kantitatif PCR yöntemi olarak tariflemişlerdir. (103, 104).

MLPA; 45 taneye kadar spesifik dizinin, bir multiplex PCR'dan sonra eş zamanlı olarak değerlendirilebildiği yeni bir metottur. Amplifikasyon ürünleri bir dizileme cihazı ile ayrıştırılır. En büyük özelliklerinden biri sadece bir tek primer çifti kullanılır. Böylece birden fazla bölgenin PCR ile çoğalmasında kolaylık sağlanmaktadır. Oluşan fragment uzunlukları 130 – 490 bp arasında olduğundan kapiller elektroforez paternine uygundur. Elde edilen sonuçlar mutlaka her defasında kontrol örnekleriyle (en az 2 tane) karşılaştırılmalı, böylelikle hangi dizinin delesyon / insersiyon taşıdığı tespit edilebilmektedir. MLPA reaksiyonunda 45 dizinin amplifikasyonu için sadece mikrolitrede 20 ng/UL, toplamda tüm reaksiyon için 100ng/UL insan DNA sı yeterli olmakta ve tek nükleotid değişimleri bile görülebilmektedir. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında MLPA reaksiyonu uygulanması daha kolaydır ve işlem için gerekli ekipmanlar genetik laboratuvarlarında rahatlıkla bulunabilmektedir (105).

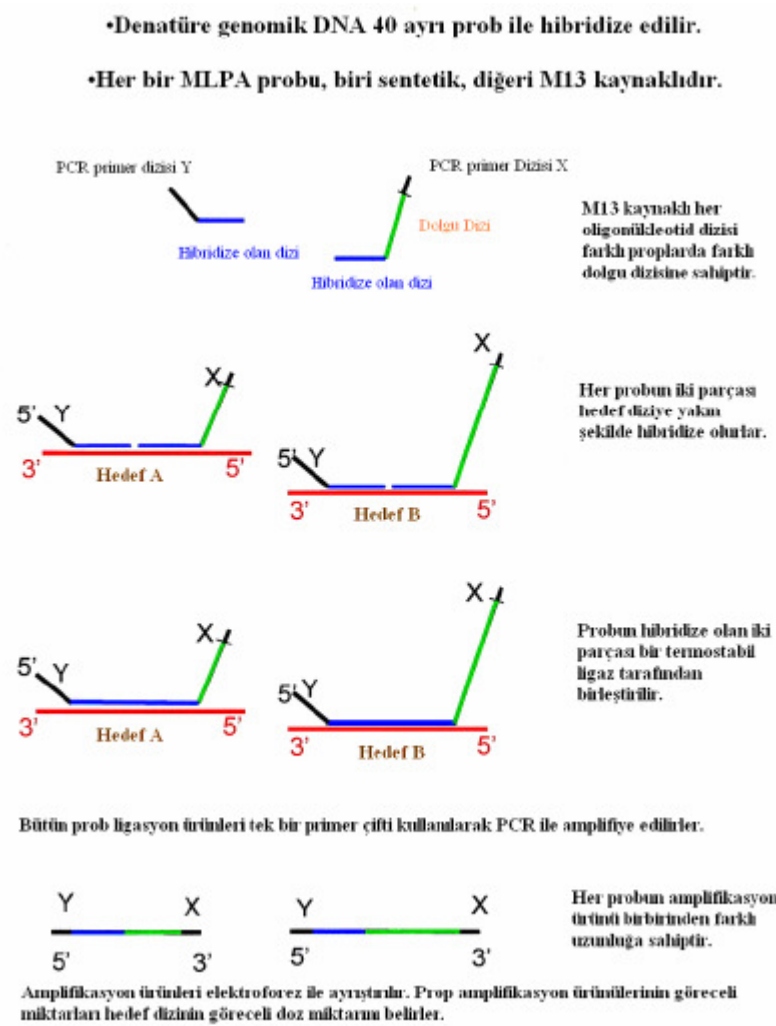
Her bir MLPA probu hedef diziye hibridize olduklarında birbirine eklenebilecek iki oligonükleotid içerir. Bütün bağlanmış problemler 5' ve 3' uçlarında PCR ile sadece tek primer çifti kullanılarak aynı anda amplifiye olmaları için tanımlayıcı dizilere sahiptirler. Her prob uzunlukları 130 ve 480 baz çifti arasında değişmek üzere birbirinden farklı uzunlukta amplifikasyon ürünü verir. Her MLPA probunun iki oligonükleotid parçasından bir tanesi kimyasal olarak sentezlenmiştir ve 5' ucunda PCR ile amplifikasyon için sabit bir dizi ve 3' ucunda hedefe özellikli olan dizi bulunur. Probun diğer oligonükleotidi 5' ucunda 25-43 nükleotid uzunluğunda ve ilk oligonükleotide komşu şekilde hedef diziye hibridize olan diziyi içerir, 3' ucunda ise PCR ile amplifikasyonda kullanılacak olan sabit dizi ve 19-370 nükleotid

uzunluğunda dolgu dizisi bulunur. 80–440 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotidler MLPA kalitesini karşılayacak şekilde ticari olarak bulunmadıklarından kimyasal olarak sentezlenmiştir. Bu oligonükleotidlerinin sentezi için M13 klonlarının tek zincirli DNA sı kullanılmıştır. M13 DNA sı komplementer oligonükleotidlerin bağlanması ile kısmen çift zincirli hale getirilmiştir ve iki restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. Bu enzimlerden bir tanesi DNA yı kendi tanıma bölgesinden, hedef diziyeye mükemmel bir komplementer olacak şekilde fosforile 5' ucundan kesmektedir. 35–42 prob içeren kitler genellikle problar arasında 6 ya da 9 baz çifti uzunluk farkı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Spesifik bir MLPA prob kitinde kullanılan bütün problar farklı M13 kaynaklı vektörlerden elde edilmişlerdir ve farklı dolgu ve hibridizasyon dizileri içerirler. Farklı probların birbirleri ile heterodubleks formasyonunu önlemek için probların sadece uç kısımları ortak dizi içerir. Bunun için 118 farklı dizide ve uzunlukta dolgu dizisi içeren MLPA vektörü hazırlanmıştır. Hedef diziyeye özellikli sentetik oligonükleotidler, gerekli dizi uzunluğunu sağlayacak esneklikte bu vektörlere kolayca eklenebilirler. İki sentetik oligonükleotid parçayı içeren 94-124 baz çifti uzunluğundaki problar amplifikasyonda başarılı şekilde kullanılmıştır. Oligonükleotid problarının hibridize olmayan dolgu dizilerinin farklı uzunlukları bize amplifikasyon ürünlerinin farklı özellikleri sayesinde avantaj sağlamıştır. Hibridize olan hedefe özellikli kısa diziler ise mutasyonları saptamada ve tek nükleotid polimorfizm analizlerinde de hedef diziyeye yarışmalı şekilde bağlanmadıklarından dolayı avantaj sağlamıştır (103).

Hibridizasyon ve ligasyon aşamalarından sonra PCR ile amplifikasyonda bütün problar için tek çift primer kullanılmaktadır. Primerlerden bir tanesi çoğu zaman FAM [N-(3-fluoranthyl) maleimide] ile işaretlenmektedir (104).

Günümüzde 300 den fazla laboratuvarında, MLPA yöntemiyle çeşitli genlerin, delesyon ve amplifikasyonları araştırılmaktadır (105).

Son zamanlarda 22q11 DS'lerin tanısında yaygın olarak kullanıma girmiştir. Özellikle klasik delesyondan daha küçük boyuttaki delesyonların tespitinin yanında kullanılan çok prob sistemi nedeniyle klasik delesyonların genetik lokusunun belirlenerek genotip fenotip korelasyonunun sağlanmasına olanak sağlamıştır. 22q11 bölgesi için ticari olarak en çok kullanılan 4 adet ürün vardır (SALSA MLPA kit P250 DiGeorge, SALSA MLPA kit P324 22q11, SALSA MLPA kit P023 DIGEORGE, SALSA MLPA kit P258 SMARCB1). Bu çalışmada SALSA MLPA kit P250 DiGeorge kiti kullanılmıştır (Tablo 4).



Sekil 2. MLPA Reaksiyonunu

Sekil “Schouten, J.P., McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 2002; 30: e57.” den alınmıştır (103).

Tablo 4. SALSA MLPA kit P250 DiGeorge kiti içinde mevcut olan kontrol problemleri ve incelenecek genlere ait problemlerin listesi

SALSA MLPA P250-A1 DiGeorge probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position other probes	22q11
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	PPIL2 probe 7529-L04870		22q11 D-E
136	Reference (EHMT1) probe 5059-L07380	9q34.3	
142	SLC25A18 probe 5457-L07613		22q11 CES
148 ▣	DGCR8 probe 8475-L08486		22q11 A-B
154	Reference (EHMT1) probe 5058-L07382	9q34.3	
160 ▣†	HIRA probe 1214-L02328		22q11 A-B
166	SNRPD3 probe 8481-L08492		22q11 G-H
172 ▣	TBX1 probe 5408-L07614		22q11 A-B
178	MICAL3 probe 5458-L04861		22q11 CES
184	Reference (KLKB1) probe 1217-L00694	4q35	
190 ▣	CLTCL1 probe 5462-L05809		22q11 A-B
196 ▣	CLDN5 probe 1218-L06270		22q11 A-B
202 ▣	ZNF74 probe 5927-L07395		22q11 B-C
208 ▣	GP1BB probe 5464-L10114		22q11 A-B
214	GNAZ probe 8478-L08489		22q11 E-F
220	SMARCB1 probe 5928-L07969		22q11 F-G
226	USP18 probe 7528-L04863		22q11 CES
232	Reference (SHANK3) probe 6787-L07383	22q13	
238 ▣	TXNRD2 probe 1223-L05814		22q11 A-B
247	RAB36 probe 8486-L09342		22q11 E-F
254	Reference (RPH3AL) probe 1735-L07385	17p13.3	
259	RTDR1 probe 8484-L09139		22q11 E-F
268	Reference (GATA3) probe 1225-L09140	10p15 DGR2	
274	Reference (GATA4) probe 1226-L03944	8p23.1	
283 ▣	KLHL22 probe 1227-L05815		22q11 B-C
292	TOP3B probe 5930-L04871		22q11 D-E
301 ▣	TBX1 probe 7054-L06663		22q11 A-B
310	HIC2 probe 5931-L04869		22q11 D-E
319 ▣	PCQAP probe 1231-L05816		22q11 B-C
330 †	FRG1 probe 6766-L08754	4q35	
337	IL17RA probe 1082-L06660		22q11 CES
343	RAB36 probe 5932-L04872		22q11 E-F
349	Reference (DKFZp566) probe 1232-L07388	10p15 DGR2	
355	BID probe 1767-L07389		22q11 CES
364	Reference (AI651963) probe 1234-L00781	10p15 DGR2	
373 ▣	SNAP29 probe 1235-L00773		22q11 C-D
382	Reference (CUGBP2) probe 1522-L00952	10p15 DGR2	
391 †	Reference (CRK) probe 0444-L00007	17p13.3	
400	SMARCB1 probe 5933-L05812		22q11 F-G
409	Reference (GEMIN1) probe 1238-L07390	17p13.3	
418 ▣	LZTR1 probe 1521-L00951		22q11 C-D
427	Reference (MSRA) probe 1240-L00787	8p23.1	
434	Reference (RPH3AL) probe 4081-L09465	17p13.3	
445	Reference (ARSA) probe 1093-L00661	22q13	
454	RTDR1 probe 8479-L08490		22q11 E-F
463 ▣	CDC45L probe 5463-L05808		22q11 A-B
472	Reference (PPP1R3B) probe 1243-L07392	8p23.1	
481	Reference (NEBL) probe 8480-L08491	10p12 DGR2	

BÖLÜM III

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler:

3.1.1. Hastaların Seçimi :

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kardiyoloji Bilim Dalında Temmuz 2008 - Aralık 2009 tarihleri arasında pediatrik EKO görüntüleme analizi ile KKH tanısı konan 20 hasta (12 erkek, 8 kız) çalışma grubunu oluşturmuştur.

3.1.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Hastalarda 5cc EDTA'lı tüpe kan alındı. Alınan kanlardan izole edilen DNA'larda MLPA yöntemi ile 22q11 delesyonu araştırıldı. Kanlar çalışılman önce -20 derecede saklandı.

3.1.3. Kullanılan gereçler

- Spektrofotometre (Nanodrop)
- Kapiller Elektrophorez Cihazı (ABI Prizm 3100)
- Mikro Pipet takımı (Eppendorf)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Thermal cycler (96 Well GenAmp PCR System 9700 ABI PRISM)
- Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)
- Elektrophorez aleti (Termo)
- Etüv (Heraus)
- Vorteks (Velp)
- Deep-freeze (Beko)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Santrifüj tüpleri
- Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)
- PCR tüpleri (Perkin Elmer)

- Floresan Mikroskop (BX51Olympus)
- Termal Plate (HyBrite-Vysis,US)
- Benmari (Nuve)
- Mikrosantrfuj (Eppendorf)
- ABI 3100 yükleme tüpleri (ABI)
- ABI 3100 50 cm Kapiller (ABI)
- Su banyosu (Nüve)
- Dik Şale
- Civalı Termometre

3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler

- 1-10 µl mikropipet (Eppendorf)
- 18x18 lamel (Isolab)
- Parafilm (3M)
- Qiagen manuel DNA izolasyon kiti (Markası)
- SALSA MLPA kit P250 DiGeorge kiti (MRC Holland)
- Performans Optimize Edici Polimer 4 (POP4 TM) (ABI)
- 10X EDTA lı Buffer (ABI)
- Gene Scan 500 Rox Internal Size Standart (ABI)
- Hi-Di Formamide (ABI)
- Hha1 Restriksiyon enzimi (Sigma)
- Ksilol (Merk-1.08685.2500)
- Etanol (95%) (Tekel)
- 6X Jel yükleme tamponu (Sigma)
- Agoroz (Sigma-Lot: 072K0059)

- Etidyum Bromid (Sigma)
- Distile Su
- 20xSSC
- NP40
- Antifade solüsyon
- Lamel (24x60mm, Isolab)
- 1-10 µl mikropipet (Eppendorf)

3.2. Yöntemler

3.2.1 FISH ÇALIŞMASI

3.2.1.1 PROB UYGULAMASI VE HİBRİDİZASYON

Yöntem

- Fiksatiften geçmiş hücreler lam üzerine tek damla halinde yayılır.
- Problar saklanma koşulu olan -20°C' den çıkarılır.
- Hybrite cihazı nemli ortam sağlamak üzere ıslak kağıt havlu ile desteklenir.
- Hybrite cihazı 37°C' ye getirilir. Hazırlanan lamlar 30 dk 2xSSC' de bekletilir.
- Prob (5 µl) lam üzerindeki işaretli bölgeye mikropipet aracılığıyla yerleştirilir.
- 18x18mm lamel, prob üstüne kapatılır.
- Lam, parafilm ile kapatılır. Probu hava alıp kuruması engellenmelidir.
- Lamlar, Hybrite cihazına yerleştirilir. Her lamın karşısına bir lam gelecek şekilde olmalıdır.
- 73 °C de 5 dakika denatürasyon ve 37 °C de en az 20 saat hibridizasyon programı uygulanır.

3.2.1.2 YIKAMA VE ZIT BOYAMA

Yöntem

Yıkama Solüsyonu I: (0,4xSSC / % 0,3 NP40) pH: 5,3 (NaOH ile ayarlanmalı)

Yıkama Solüsyonu II: (2xSSC / % 0,1 NP40) pH: 5,3 (NaOH ile ayarlanmalı)

- Yıkama solüsyonu I, dik şale içinde 73 °C ye ayarlanmış su banyosu içine yerleştirilip, ısı termometre ile kontrol edilir.
- Lam üzerindeki parafilm uzaklaştırılır ve lam yıkama solüsyonu içinde 5 dakika süreyle bırakılır.

- Ardından, yıkama solüsyonu II içinde 30 saniye bekletilen lamalar, saf sudan geçirilerek kuruması için karanlık ortama bırakılır.
- Kuruyan lamalar üzerinde işaretli bölgeye, 4 µl DAPI solüsyon mikropipet aracılığıyla damlatılır.
- Üstüne lamel (24x60mm) kapatılan lam, mikroskopta izleninceye kadar +4 °C' de bekletilebilir.

3.2.1.3 DEĞERLENDİRME

- Değerlendirme işlemi floresan mikroskopta (Olympus BX50), uygun filtre seti ile (DAPI, FITC, Texas Red) tamamlanır.
- En az 5 interfaz ve metafaz için Görüntü Analiz Sistemi (Applied Imaging System) kullanılarak fotoğraf çekilir.

3.2.2 Qiagen manuel DNA izolasyon kiti ile DNA elde etme protokolü

- 1.5 luk tüpe 300µl kan ve 900 µl RBC Lysis Solüsyonundan konularak, mix yapıp 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 13000 – 16000 rpm de santrifuj edilerek supernatant kısmını atılarak, kalan kısmının üzerine 300 µl Cell Lysis Solution dan koyup, vortekslendi.
- -Bu mix üzerine 1.5 µl RNase A Solution dan ilave edilerek, en az 25 kere alt üst edilip ,ve 15 dakika 37°C inkübe edilerek , sonra 1 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Bu miks üzerine 100 µl Protein Precipitaion Solusyonu ilave edilerek, yüksek hızda 20 saniye vortekslendi.
- 13000 – 16000 rpm 1 dakika santrifuj ile üzerini yeni bir 1.5ml tüpe alınarak üzerine 300 µl isopropanol ilave edip, DNA görülene kadar alt üst edildi.
- 13000 – 16000 rpm de 1 dakika santrifuj yapıp, supernatant atıldı. Üzerine 300 µl %70' lik Ethanol koyulup birkaç defa alt üst edilip tekrar 13000 – 16000 rpm de 1 dakika santrifuj ile üstü atılır.
- Üzerine 100 µl Hibridizasyon solusyonu konularak, DNA'nın çözülmesi için 65°C de 5 dakika inkübe edildi.

3.2.3 MLPA ÇALIŞMASI

3.2.3.1 DNA denatürasyonu ve SALSA MLPA kit P250 DiGeorge kiti ile Hibridizasyon

- Örneklerimizden elde edilen DNA dan 5 µl (100-250 ng DNA) alındı.
- Alınan örnekler 200 µl lik PCR strip tüplerine aktarıldı.
- 98 °C de 40 dk. Thermal Cycler cihazında bekletilerek DNA nın denatürasyonu sağlandı
- Örnekler 25 °C ye soğutuldu.
- 25 °C deki DNA örneğinin üzerine 3 µl prob karışımı (1.5 µl SALSA Prob Mix ve 1.5 µl MLPA Buffer) ilave edilip pipetaj ile homojenize edildi.
- 95 °C de 1 dk. inkübe edilip örnekler 60 °C de 16 saat hibridizasyona bırakıldı.

3.2.3.2 Ligasyon ve Enzim Kesim Reaksiyonu.

- Hibridizasyon süresi bitiminde termal cycler cihazının ısısı 54 °C ye indirildi.
- Örnekler 54 °C ye geldikten sonra hibridizasyon ürününe 31µl Ligaz solusyonu (3µl Ligaz-Buffer A + Ligaz-Buffer B ve 10µl su) ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı.
- Daha sonra 98 °C de 5 dk. bekletilerek ligaz inaktivasyonu sağlandı.

3.2.3.3 PCR

Standart MLPA reaksiyonu yapıp kapiller jel elektroforez cihazında değerlendirilebilmek için PCR uygulandı.

- Ligasyon ve enzim kesim reaksiyonu ürününden 10 µl alınarak ayrı PCR tüplerine aktarıldı.
- Daha sonra ligasyon ve enzim kesim ürünü konmuş her strip tüpüne sırasıyla:
- 2 µl 10XSALSA PCR Buffer
- 2 µl 10XSALSA PCR Enzim dilüsyonu
- 5.5 µl distile su

- 0.5 µl Polimeraz Enzimi , konularak PCR oluşturuldu.
- -PCR Koşulları:

Denatürasyon 30 sn 95 °C

Annealing 30 sn 60 °C 38 döngü

Ekstansiyon 60 sn 72 °C

Final Ekstansiyon 20 dk 72 °C

3.2.3.4 ABI 3100 cihazına yükleme

Amplifikasyonu gerçekleştiren örnekler fragment analizi için kapiller jel elektroforez cihazına yüklendi.

- PCR bitiminde elde edilen ürünlerden 3 µl alınarak ABI 3100 cihazı yükleme tüplerine

aktarıldı.

- Daha sonra üzerlerine:
- 0.5 µl internal size standart (Rox 500)
- 12 µl deiyonize formamid konularak pipetajla homojenize edildi.
- Örnekler 94 °C de 4 dk Thermal Cycler cihazında bekletilerek denatürasyonları sağlandı.
- Devamında örnekler buz üzerine alındı.
- ABI 310 cihazında; 15 kV de 5 saniye injeksiyon zamanı, 60 °C ve 15 kV de 25 dakika yürütme zamanı sağlandı.
- Daha sonrasında örnekler ABI 310 cihazına yüklenilerek, Gene Mapper programında

okutulmaya alındı.

- Her örneğe ait pik görüntüleri elde edildi.

3.2.3.5 Değerlendirme

Normal MLPA çalışmalarının değerlendirme basamağında, okutulan örneklerin pik alanları ve prob uzunlukları excel dosyası formatında kaydedildi. Spesifik olmayan amplifikasyon pik ürünleri kaldırıldı. Normal ve test örneklerine ait sadece beklenen MLPA rnlerinin pik alanları kaldığında problemlerin elde edilen boyut ve pik alanları MLPA analiz programlarıyla değerlendirildi.

MLPA yönteminde hasta değerlendirmede hastalara ait DNA'lardan elde edilen pik alan ve büyüklüğünden çok, pikin varlığı ya da yokluğunun belirlenmesi ile sağlıklı kontrollere ait pik alanlarıyla karşılaştırılması büyük önem taşır. Çalışmamızda her yürütmede kontrol grubu ve hasta grubu birlikte yürütülerek karşılaştırma yapılmıştır.

BÖLÜM IV

BULGULAR

KKH'dan oluşan çalışma grubumuzdan elde edilen bulgular sunulmuştur. Yaş ve cinsiyet dağılımına göre değerlendirildiğinde ay aralığı 6- 172 arası iken (ortalama ay $47,90 \pm 46,70$) bulunmuştur. Çalışma grubu 12 erkek ve 8 kız olmak üzere toplam 20 hastadan oluşmaktaydı.

Tablo 5. Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı

	Çalışma Grubu
Yaş(Ay)	$47,90 \pm 46,70$
Cinsiyet (E/K)	12/8
Toplam	20

Hasta grubu olarak aldığımız KKH ve değişken disomorfik bulgusu olan 20 olgunun yaş(ay), kalp anomalisi, disomorfik bulgular, sitogenetik ve FISH sonuçları Tablo 6' de görülmektedir. GTG bantlaması ile 500 bant düzeyinde yapılan sitogenetik değerlendirmede normal kromozom yapısı saptanan bu olgular önce FISH moleküler genetik tekniği ile analiz edildi. Bu analiz sonucunda tüm olgular 22q11 delesyonu açısından normal olarak değerlendirildi. Sitogenetik ve FISH tetkikleri normal olarak saptanan olgular son olarak MLPA analizi ile değerlendirildi. MLPA analizi sonucunda 2 olguda 22q11.2 delesyonu saptandı. Bu 2 olgudan 1'si de klinik olarak 22q11.2 delesyon sendromlarından DiGeorge sendromu ile uyumlu bulunurken diğeri ek fenotipik bulgularının olmaması nedeniyle izole KKH olarak değerlendirilmiştir.

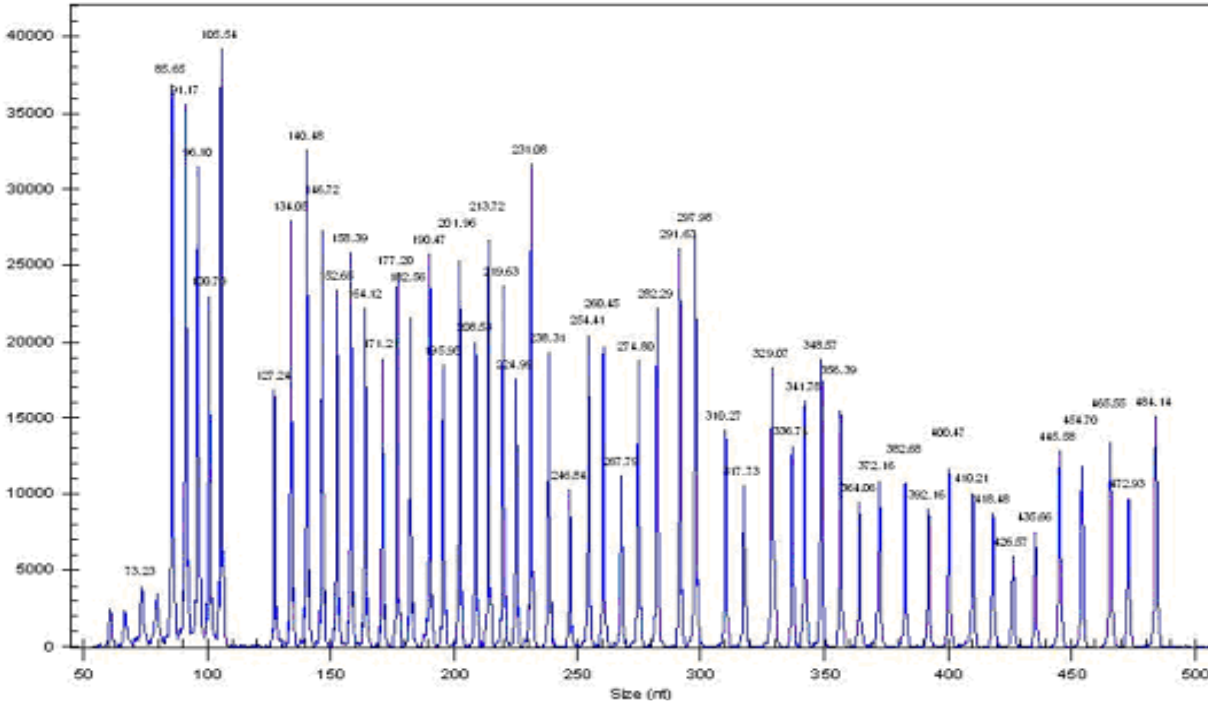
Tablo 6. Çalışma grubu klinik ve genetik bulguları

	YAŞ(AY)	Akrabalık	Kardiyak Bulgular	Ca(mg/dl)	Karyotip	FISH	MLPA
1	51	Ø	ASD,VSD,EYD, MY ve TY	9.86	46,XX	N	Delesyon
2	75	Ø	ASD,VSD,PDA,TDA	9.4	46,XY	N	N
3	44	Ø	AK ve VSD	9.9	46,XY	N	Delesyon
4	40	Ø	TOF,ASD,VSD	8.94	46,XY	N	N
5	123	Ø	ASD,VSD,EYD	9.5	46,XY	N	N
6	144	Ø	AK, PDA,PFO MY ve TY	9.6	46,XY	N	N
7	41	Ø	ASD,VSD	10.7	46,XY	N	N
8	37	2.Derece	TOF,ASD,VSD	9.7	46,XX	N	N
9	51	Ø	ASD,PS,PKA	9.5	46,XX	N	N
10	28	Ø	TOF,ASD,VSD	8.8	46,XY	N	N
11	172	Ø	TOF	9.7	46,XY	N	N
12	14	Ø	ASD,VSD	10.6	46,XX	N	N
13	30	2.Derece	PS, TOF,VSD	10	46,XX	N	N
14	8	Ø	TOF,VSD,PDA	9.2	46,XX	N	N
15	7	Ø	PS, ASD,VSD,	9.2	46,XX	N	N
16	6	Ø	TOF	10.2	46,XY	N	N
17	11	Ø	PKA,TOF	8.7	46,XY	N	N
18	16	Ø	TOF,ASD,VSD	9.3	46,XX	N	N
19	42	Ø	TOF,VSD	8.9	46,XY	N	N
20	19	Ø	TOF,VSD,PDA	10.7	46,XY	N	N

AK: Aort Koartasyonu, ASD:Atrial Septal Defekt , EYD: Endokardiyal Yastık Defekti, MD:Mitral Darlığı, MY: Mitral Yetmezlik, PDA: Patent Duktus Arteriosus, PFO: Patent Foramen Ovale, PKA: Pulmenor Kapak Aplazisi, TD: Triküspit Darlığı, TOF: Fallot Tetralojisi, TY: Triküspit Yetmezlik, VSD:Ventriküler Septal Defekt

Çalışmamızda bulunan olguların periferik kan örneklerinden elde edilen DNA örneklerinde MLPA P250-A1 kiti kullanılarak 22q11 delesyonu araştırılmıştır. ABI 3100 kapiller elektroforez cihazına örnekler yüklendikten sonra ve GeneMapper V3.7 programı ile örneklerin okuması yapılmıştır. PCR ürününün boyuna göre kapiller elektroforezde farklı uzunluklarda fragmentler oluşarak her fragment uzunluğuna göre belli sırayla analiz edilmektedir. Fragmentlerin miktarı ve büyüklükleri GeneMapper V3.7 programında pik olarak

görülebilmektedir (Şekil 3). Programdan elde edilen piklerin büyüklükleri, alanlarına veya boylarına bakılarak o hastalık açısından tamamen sağlıklı olduğu düşünülen kontrol hastaların pikleri ile karşılaştırıldı. Kontrol pikleri ile hasta pikleri oranlandığında oran 0,7'nin altında ise delesyon yönünde, 1,3'ün üstünde ise amplifikasyon yönünde değerlendirilirdi.



Şekil 3. Normal bir erkek olguya ait pik görüntüleri

MLPA tekniğinde görsel olarak değerle yapılabileceği gibi Excel tabanlı programlarla da analiz yapılabilmektedir. Bu çalışmada her ikisi de kullanılarak sonuçlar alınmıştır. Tüm MLPA analizlerinde DNA kalitesi [DQ (DNA Quantity)] ve denatürasyon [DD (DNA Denaturasyon)] değerlendirmelerini yapan pikler bulunmaktadır. Bizim kullandığımız P250-A kitinin DQ kontrol pikleri 64, 70, 76, 82 bp uzunluğunda dört pik ile, DD kontrol pikleri ise 88, 92, 96 bp uzunluğunda 3 pik ile değerlendirilmektedir (Şekil 1). 100bp (X kromozomu) ve 105bp(Y kromozomu)' de çıkan pikler ise cinsiyet kromozomlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 3). DQ ve DD pikleri DNA'nın miktarı ve denatürasyonun efektif bir şekilde yapıp yapılmadığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bu piklerin verileri nokta mutasyon, delesyon ve amplifikasyon değerlendirilmelerinde kullanılmamaktadır.

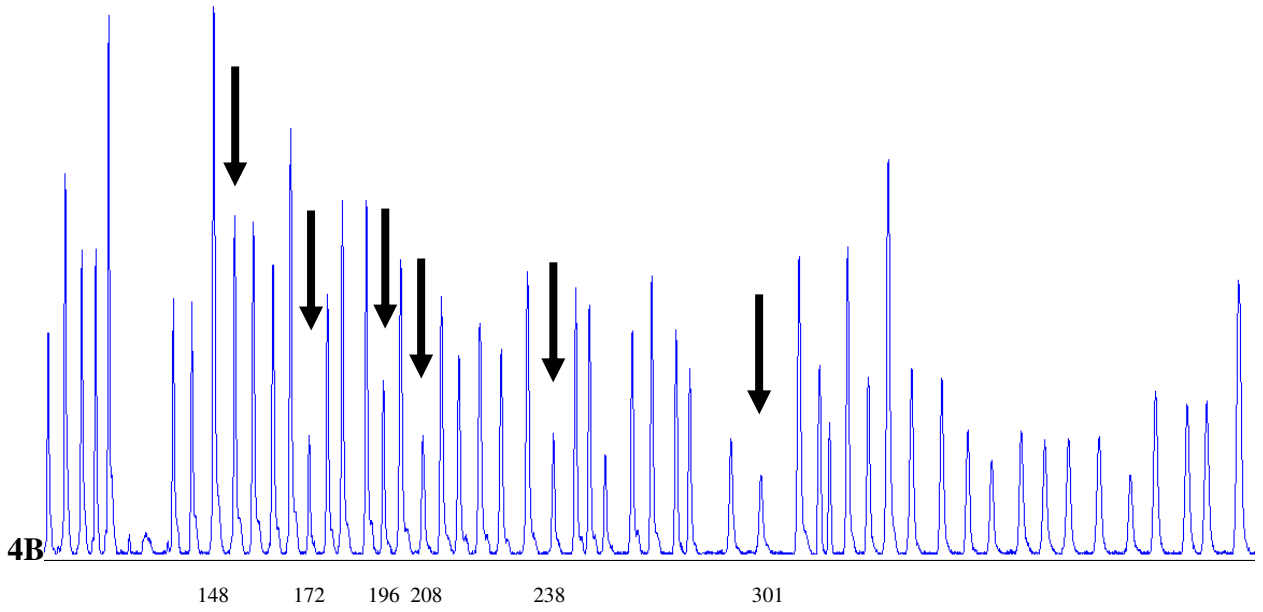
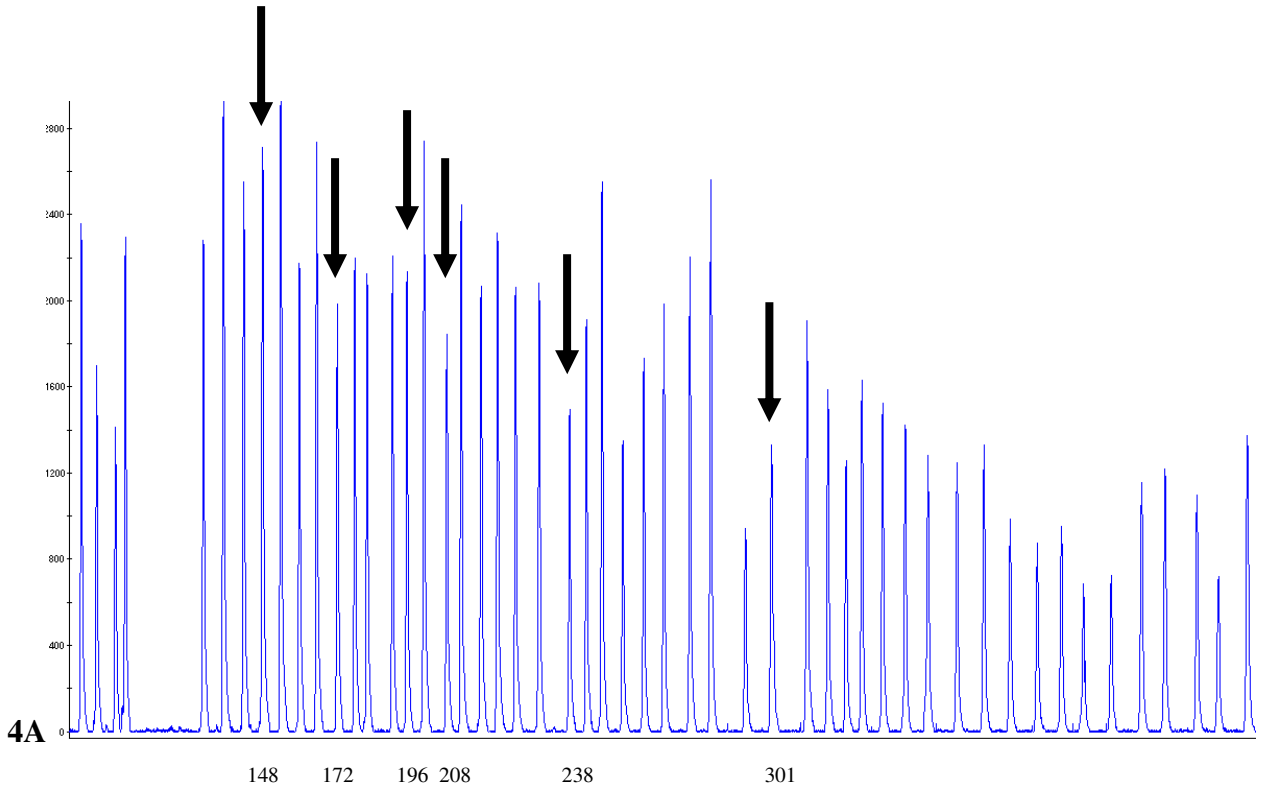
MLPA ile 22q11.2 delesyonu pozitif olan DiGeorge sendromu olarak kabul edilen 1 numaralı olgunun DiGeorge fenotipi ile uyumlu yüz bulguları, (Tablo 7) ve hastaya ait MLPA analizinde analizinde kontrol hasta pikleri ile hasta piklerinin karşılaştırılması sonucu 22q11.2 delesyonu görülmektedir(Şekil 4A,4B).

Tablo 7. Bir numaralı olgunun klinik ve genetik bulguları

YAŞ(AY)	Fenotip	Akrabalık	Kardiyak Bulgular	Ca(mg/dl)	Karyotip	FISH	MLPA
51	Burun kökü basık Mavi sklera Telekantus Epikantus Mikrooftalmi Mikrognati Bulböz burun Uzun filtrum Yüksek damak Dolgun yanaklar Üçgen yüz şekli Ellerde klinodaktili	Ø	ASD,VSD,EYD, MY ve TY	9.86	46,XX	N	Delesyon

ASD:Atrial Septal Defekt , EYD: Endokardiyal, MY: Mitral Yetmezlik, TY: Triküspit Yetmezlik, VSD:Ventriküler Septal Defekt, N: Normal

MLPA problemleri 22q11 bölgesini A, B, C, D, E, F, G olmak üzere 7 bölüme bölmektedir (Tablo 8). Bir numaralı olgumuzda A bölgesine ait (Tablo 8) sırasıyla 148, 172, 196, 208, 238, 301 nükleotid uzunluğundaki problemlerde kontrol hasta pikleri ile oranlandığında oran 0,7'nin altında olduğu için bu bölgeye ait delesyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4A, 4B).



Şekil 4. (A) Kontrol MLPA Analizi Görüntüsü (B) Olgu 1 MLPA Analizi Görüntüsü

Tablo 8: MLPA problemleri ve lokalizasyonları

Uzunluk(nt)	Prob	Gen	Dizi	Bölgesi	Diğer Prob Uzaklığı
LCR22-A					
190	5462-L05809	CLTCL1	TGTTGCCTTGGTGACCGAGACCGC	17.621.630	77 Kb
160 ±	1214-L02328	HIRA	GGAGCTGCTGAAGGAGCTGCTACC	17.699.040	148 Kb
463	5463-L05808	CDC45L	ATGTTTCGTGCCGATTTCGCCAAA	17.847.500	44 Kb
196	1218-L06270	CLDN5	TTCGCCAACATTGTCGTCCGCGAG	17.891.350	200 Kb
208	5464-L10114	GP1BB	CACAACCGAGCTGGTGCTGACCGG	18.091.550	36 Kb
172 ±	5408-L07614	TBX1	CCGGGTGAAGCTTCGCTGGCTGCC	18.127.140	6 Kb
301 ±	7054-L06663	TBX1	TCATGAGCGCCTTCGCGCGCTCGC	18.133.450	133 Kb
238	1223-L05814	TXNRD2	GGAGGGTCAGGAGAGGAGCTGCAG	18.266.250	187 Kb
148	8475-L08486	DGCR8	GGTAATGGACGTTGGCTCTGGTGG	18.453.640	626 Kb
LCR22-B					
202	5927-L07395	NF74	ZCAGGCAGATTATTCCTCGATGCTG	19.079.460	94 Kb
283	1227-L05815	KLHL22	TCTTCGATGTTGTGCTGGTGGTGG	19.173.330	93 Kb
319	1231-L05816	PCQAP	TGGCATTGGATGAAGACACAGGT	19.266.770	305 Kb
LCR22-C					
373	1235-L00773	SNAP29	AGGAGCAAGATGACATTCTTGACC	19.572.050	107 Kb
418	1521-L00951	LZTR1	ATGATGAAGGAGTTCGAGCGCCTC	19.679.220	451 Kb
LCR22-D					
310 ~	5931-L04869	HIC2	AGGAGGCCGAGGACCTGTCAGCAC	20.130.650	249 Kb
130	7529-L04870	PPIL2	GAAGAGCCCTCAACAGTGCCACT	20.379.710	280 Kb
292	5930-L04871	TOP3B	GGTTGCTGAAAAGCCGTCCTTGGC	20.660.040	1074 Kb
LCR22-E					
259	8484-L09139	RTDR1	GGTGTGTCATTTGACGTCATCCC	21.734.080	61 Kb
214	8478-L08489	GNAZ	TCACCATCTGCTTTCCCGAGTACA	21.795.420	17 Kb
454	8479-L08490	RTDR1	CTCCTGGAGCTTCCCATTAACAT	21.812.570	5 Kb
343	5932-L04872	RAB36	AGCTGGATGCTT-GGACGCGCCGCT	21.817.590	16 Kb
247	8486-L09342	RAB36	GCAGTCGGTGCTGCAGGACCTGGA	21.833.130	626 Kb
LCR22-F					
220	5928-L07969	SMARCB1	CTTCGGGCAGAAGCCCGTGAAGTT	22.459.400	47 Kb
400	5933-L05812	SMARCB1	CATCAGCACACGGCTCCCACGGAG	22.506.390	777 Kb
LCR22-G					
166	8481-L08492	SNRPD3	CCGGTGAGGTATATCGGGGGAAGC	23.283.730	

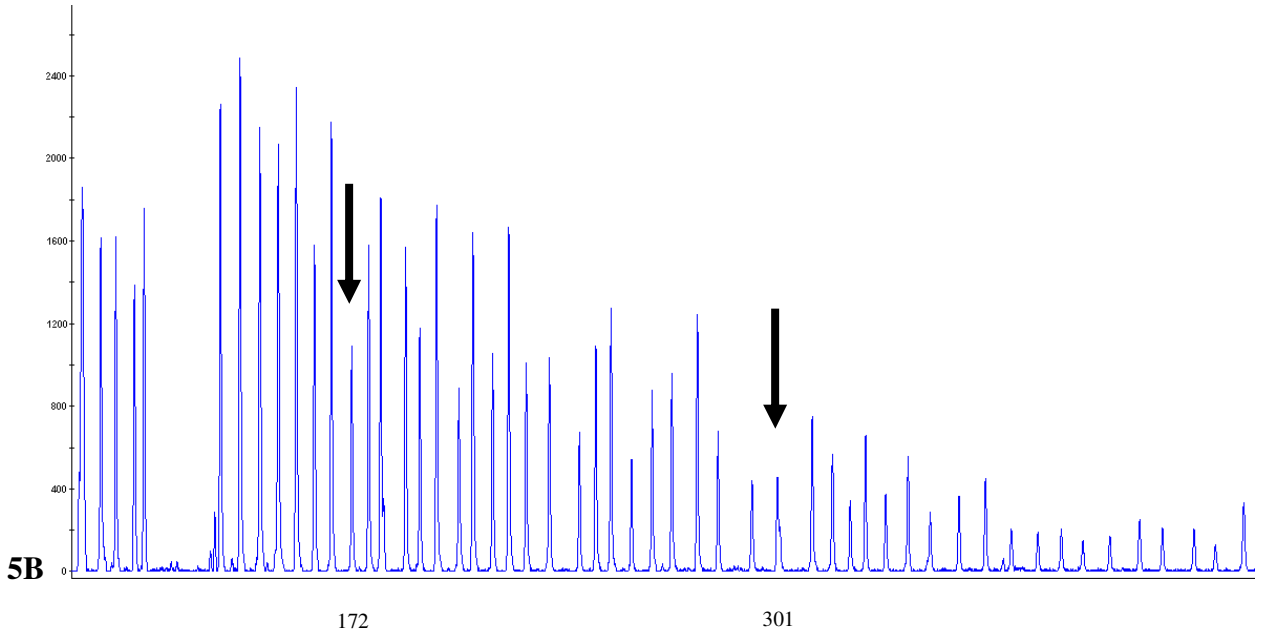
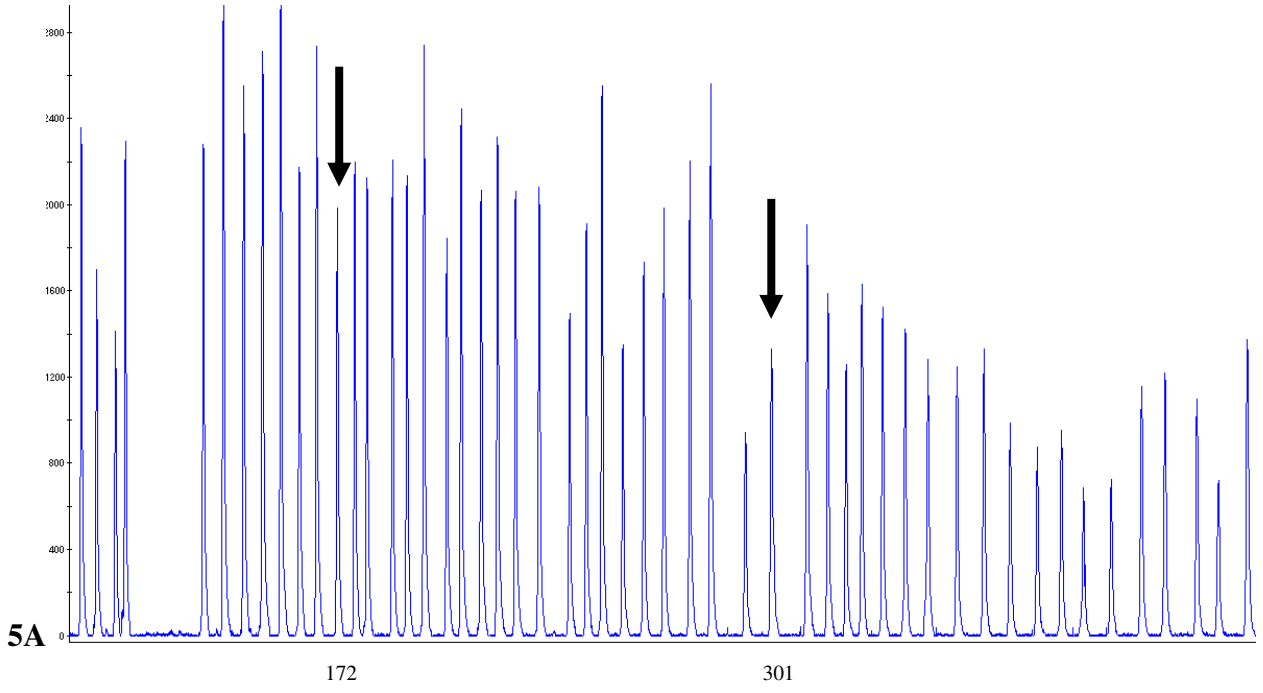
MLPA ile 22q11.2 delesyonu pozitif olan izole KKH olarak kabul edilen 3 numaralı olgunun bulguları Tablo 5’te özetlenmiştir. Olguya ait MLPA analizinde analizinde kontrol hasta pikleri ile hasta piklerinin karşılaştırılması sonucu 22q11.2 delesyonu görülmektedir(Şekil 5A,5B).

Tablo 9: Üç numaralı olgunun klinik ve genetik bulguları

YAŞ(AY)	Fenotip	Akrabalık	Kardiyak Bulgular	Ca(mg/dl)	Karyotip	FISH	MLPA
44	∅	∅	AK ve VSD	9.9	46,XY	N	Delesyon

AK: Aort Koartasyonu, VSD: Ventriküler Septal Defekt, N: Normal

Üç numaralı olgumuzda A bölgesine ait (Tablo 9) sırasıyla, 172 ve 301 nükleotid uzunluğundaki sadece TBX1 genine özgü problemlerde kontrol hasta pikleri ile oranlandığında oran 0,7’nin altında olduğu için bu bölgeye ait delesyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5A, 5B).



Şekil 5. (A) Kontrol MLPA Analizi Görüntüsü (B) Olgu 3 MLPA Analizi Görüntüsü

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Konjenital kalp hastalığı, mültifaktöryel olarak kalıtılan etiolojide birden fazla geni ve çevresel faktörlerin birlikte etki ettiği en sık görülen doğumsal anomalilerden biridir. Çok sık görülmesine rağmen etiyojisi hala net olarak açıklanamamaktadır.

KKH'larından, VSD, PS/ subpulmoner darlık, PA, FT, DORV, TA, TGA, aortik pulmoner kollateral arterler, aort koarktasyonu/ subaortik darlık ve IAA tip B'yi kapsayan anomaliler KTKD başlığı altında toplanmaktadır (1–3).

Konotrunkal kalp defektleri minör ve majör malformasyonlar eslik edebileceği gibi, izole olarak da görülebilirler.

Konjenital kalp hastalığı ve KTKD'lerinde etiolojiden birçok nedenin sorumlu olduğu bildirilse de, bu nedenlerden en önemlisi 22. kromozomun 22q11.2 bölgesindeki mikrolelesyondur. Geniş serilerde, 22q11.2 bölgesi delesyon prevalansı yaklaşık %12–30 arasında bildirilmiştir (6–7).

Bu delesyon, DGS, VCFS, CAFS, otozomal dominant Opitz G/BBB Sendromu ve Cayler Kardiyofasiyal Sendromu gibi birçok değişik fenotip ortaya çıkmaktadır (8–12).

Konjenital kalp hastalığında 22q11.2 mikrolelesyonu olan hastaların yaklaşık %75'inde bulunur ve bunların çoğu konotrunkal kalp defekti tipindedir (5,20,97). Mai ve ark.'nın 22q11.2 delesyonu saptanan olgularda yaptıkları çalışmada olguların %74'ünde kardiyak anomali saptanırken, en sık görülen konjenital kalp defektlerinin sırasıyla TOF, IAA tip B, VSD, TA olduğunu bildirmişlerdir (69).

Yukarıda belirtilen fenotiplerin 22q11.2 delesyonunun ile bağlantılı olduğu ilk kez 1990'lı yıllarda bildirilmeye başlanmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar arttıkça, 22q11.2 delesyonunun izole KKH veya KTKD'li hastalardan ziyade ilave dismorfik bulguları olan olgularda daha sık oranda görüldüğü bildirilmiştir(3, 6, 18). Bu sebeple sadece ilave bulguları olan hastaların genetik olarak analiz edilmesini savunan yayınlar olsa da bazı olguların erken

dönemde konuşma güçlükleri, öğrenme bozuklukları ve dismorfik yüz bulgularının tanımlanmasının zor olacağından dolayı KKH veya KTKD olan olgulara genetik analiz öneren görüşler de bulunmaktadır (6,19, 42, 43, 72).

Goldmuntz ve ark. 1990 yılların sonlarına doğru 251 KTKD olan hasta ile yaptığı çalışmada %17,9 oranında 22q11.2 mikrolelesyonu saptamışlardır. Bu delesyonların IAA tip B'li olguların %50'sinde, TA'lı olguların %34,5'inde, PMVSD'li olguların %33,3'ünde ve TOF'lu olguların %15,9'unda görüldüğünü bildirmişlerdir (42).

Derbent ve ark. ise KTKD olan 30 olgunun 3'ünde (%10) 22q11.2 delesyonu saptamışlar ve bu olgulardan sadece ikisinde minör dismorfolojik yüz bulgularının olduğunu bildirmişlerdir (19).

Trainer ve ark.'nin sadece TOF'lu 33 hastada 22q11.2 delesyonunu araştırdığı çalışmada ise olguların 7'sinde (%21,2) delesyon saptamış ve bu olgulardan sadece 4 tanesinin dismorfik yüz bulgularına sahip olduğunu bildirmişlerdir (106).

Devriednt ve ark.'nin 150 KTKH olan olguda yaptığı araştırma sonucunda 22q11.2 delesyon oranını %12,8 olarak bildirmişlerdir (20).

Khositseth ve ark.'nin KTKD'li 61 olguda yaptıkları çalışmada 22q11.2 delesyonunu yaklaşık olarak %15 oranında saptarken, IAA olgularının tamamında, TA olgularının %50'si, subpulmoner ventriküler septal defekt (SPVSD) ve pulmoner atresi/ventriküler septal defekt PAVSD olgularının 1/3'ünde delesyonun görülmesi dikkat çekiciydi (53).

Bu çalışmaların hepsi FISH moleküler sitogenetik analizi ile bulunan klasik 3mb delesyonlu hastalar olarak bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda olgular KTKD olan veya olmayan olgular olarak ayrılmamıştır. Doğumda KKH olan ve dismorfik bulguları olmayan hastalar olarak gruplandırılmıştır. Bu gruplandırmaya göre, FISH analizi ile hiçbir olguda delesyon saptanmamıştır. Bu şekilde FISH analizi ile hiç delesyon saptanmamasının birden fazla sebebi olabileceği düşünülmüştür. Bunlardan birincisi olgu sayımızdaki kısıtlılık olarak görülebilir. Bir diğer sebep ise literatürde bildirilen çoğu KKH

olan 22q11.2 olgusunda diğerk dismorfik bulgularla birliktelik göze çarpmaktadır. Örneğın Ryan ve ark.'larının 518 22q11.2 delesyonu olan olguda yaptıkları çalışmada, olguların %75'inde ek bir dismorfolojik bulgu olduğunu bildirmişlerdir. Bunlar öğrenme güçlüğü(%62), hipokalsemi (%60), otolarıneal anomaliler (%49), ve genitoüriner anomaliler ve gelişme defektleri (%36), olarak bildirmişlerdir (45). Webber ve ark.'nin TOF'lu 50 hastada yaptıkları çalışmada ise, ilave dismorfik bulguları olmayan grupta delesyon saptamazken, ek dismorfik bulguları olan grupta delesyon saptamışlardır(107).

Ülkemizde bu konu ile ilgili 3 çalışma bulunmaktadır. Bunların arasında en geniş seri, Giray ve ark.'na ait olan 36 hastalık KKH grubunda yaptıkları 22q11.2 delesyonu araştırmasıdır. Hastaların yaklaşık %20'sinde 22q11.2 delesyonu saptanmış ve delesyon saptanan hastaların %30'unu KTKD'li olgular olduğu bildirilmiştir (36). Kasıfıglu ve ark.'ın(2) 32 KKH ve ek dismorfik bulguları olan olguda yapmış oldukları çalışmada buldukları delesyon oranı %6 iken, Derbent ve ark.'nin benzer fenotipe sahip 30 olguda yaptıkları çalışmada ise oran %30 olarak bildirilmiştir(19).

Ülkemizde yapılan bu çalışmalarda ve bizim çalışmamızda ortaya çıkan farklı sonuçlar, hastaların gerek KKH gerekse de ilave dismorfik bulguları yönünden seçiminde farklılıklardan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

22q11.2 mikrodelesyon sendromu fenotipine sahip olan hastalarda yaklaşık %90'ı 3 Mb , %8'i 1.5 Mb ve daha küçük büyüklükte olan 22q11.2 delesyonunu klasik bantlama teknikleriyle hatta yüksek rezolüsyonlu bantlama tekniğı (HRBT) ile görüntülemek oldukça zordur (21). Bu nedenle günümüzde kolay ve hızlı tanı için, moleküler sitogenetik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler sitogenetik yöntemlerden FISH (Floresans insitu hibridizasyon) tekniğı ile klasik bantlama yöntemleri ile tanımlanamayan 3Mb'fan küçük kromozomal değışikliklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. FISH yöntemi günümüzde her ne kadar en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olsa da, kantitatif olmaması, bazı küçük kromozomal yeniden düzenlenmelerde başarısız olması gibi

dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle günümüzde mikrodelsiyonun büyüklüğü ve yerini gösteren kantitatif moleküler genetik yöntemlerden Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) giderek yaygın olarak kullanılmaya girmektedir (22,23). Bu yöntemle 22q11.2 delesyonlarının %90'ından sorumlu olan 3mb'lık delesyonların tespitinin yanında, delesyon uğrayan bölgedeki genlerin tespiti ile genotip fenotip korelasyonu rahatlıkla yapılabilmektedir. Bütün bunların yanında kullanılan delesyonun FISH probunun aşağısında veya yukarısında kalması veya 3Mb'nin altındaki (1.5Mb ve altı) delesyonların FISH ile tespitinin yapılamadığı durumlarda MLPA analizi son zamanlarda kullanılan moleküler genetik yöntem olarak yerini almıştır.

Yöntemin yeni olması nedeniyle bu konuda yapılan çalışmalar Dünya'da sınırlı sayıda kalmıştır. Stachon ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada FISH analizi ile normal olarak değerlendirilmiş DGS ön tanılı 12 olgunun MLPA analizi ile değerlendirilmesi sonucunda 2 olguda (%16,6) delesyon tespit etmişlerdir(yeni1). Diğer bir çalışmada Yang ve ark. izole KKH olan 195 olguda yaptıkları çalışmada olguların 7'sinde (% 0,35) 22q11.2 bölgesinde delesyon saptarken, 8 (%0,4) olguda ise duplikasyon saptamışlardır Yeni 2). Fernandez ve ark. 'nın DGS tanılı 30 olguda, FISH analizi ile delesyon saptanamamasını takiben yaptıkları MLPA analizi sonucunda 1(%3,3) olguda 22q11.2 bölgesinde delesyon saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda, KKH olan (KTKD olarak ayrılmayan) ve FISH analizi ile normal olarak değerlendirilen 20 olgudan 2'sinde (%10) delesyon saptanmıştır. Literatür ile kıyaslandığında bizim çalışmamızda tespit edilen oran biraz yüksek gibi gözükse de, KKH olan olgu grubumuzun büyük çoğunluğunun KTKD'li olgulardan oluşması ve KTKD olgularında 22q11.2 delesyon sıklığının KKH 'ları içinde en yüksek olmasına bağlanmıştır.

MLPA analizi ile delesyon saptanan olgulardan bir tanesinde burun kökü basıklığı, mavi sklera, telekantus, epikantus, mikrooftalmi, mikrognati, bulböz burun, uzun filtrum yüksek damak, dolgun yanaklar, üçgen yüz şekli,ellerde klinodaktili gibi dismorfolojik yüz bulguları

ile birlikte ASD,VSD,EYD,MY ve TY'ni içeren kardiyak bulguları bulunmaktaydı. MLPA delesyonu TBX1, CLDN5, GP1bb, TXNRD2 ve DGCR8 genlerini içeren yaklaşık 600kb'lik bir alanı kapsamaktaydı. Olgulardan diğeri ise literatürde ilk defa tanımlanan izole TBX1 geni delesyonu gösteren bir olguydu. Diğer olgunun aksine bu olgumuzda dismorfik yüz bulguları olmaksızın, AK ve VSD'nin olduğu izole KKH olarak değerlendirilmişti. İki olgu arasındaki bu fenotipik fark, ilk olguda tutulan gen sayısının fazla olmasına nedeniyle daha kalabalık bir fenotipe sahip olduğu düşünüldü.

TBX (T-box proteins) genleri ailesi, embriyonik dönemde doku ve organ gelişiminden sorumlu bir gen topluluğudur. Bu aile TBR1, TBX1–6, 10, 15, 18–23 genlerinden meydana gelmektedir. TBX1 geni bir transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır. Yüz ve boyundaki kas ve kemik dokunun gelişimi, kulak, büyük arterler, timus ve paratroid bezlerin gelişiminde aktif olarak görev aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Vitelli ve ark.'nın farelerde yaptıkları bir çalışmada, TBX geni susturulmuş farelerde intraventriküler septum ve büyük arter oluşum defektleri olduğunu bildirmişlerdir. Bu konuda en kapsamlı çalışma Yagi ve ark.'nin yapmış olduğu çalışmadır. Bu çalışmada FISH analizi ile delesyon saptanmayan 10 aileden 13 olguda TBX1 geni dizi analizi ile değerlendirilmiş DGS fenotipindeki bir hastada 443T→A, CAFS fenotipindeki iki hastada da sırasıyla 928G→A ve 1223delC nokta mutasyonu saptamışlardır. Bu sonuçlarla TBX1 geninin 22q11.2 delesyonların fenotipik bulgularından sorumlu major gen olduğunu bildirmişlerdir. DGS olguda TOF, PA,ASD kardiyak bulguları gözlenirken, CAFS'lı olguların birinde IAA diğeri ise TOF ve sağ aortik ark kardiyak anomalisi mevcuttu. Bizim olgumuzda ise her iki hastada olmayan AK ve VSD kardiyak bulguları mevcuttu. Bunun nedeni olarak, bizim olgumuzda diğer olgularda farklı olarak nokta mutasyonu değil mikrodelesyon görülmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Kromozom 22q11.2 mikrolelesyon sendromu %90-94 de novo olarak görülür, %5-10 oranında otozomal dominant olarak kalıtılır. Bizim çalışmamızın eksik bir yönü olarak olguların 22q11.2 delesyonu açısından de novo veya herediter olduğunun saptanması için ebeveyn çalışmalarının yapılamamış olmasıdır.

Sonuç olarak bu çalışma ile KTKD bulgusu olan hasta grubunda 22q11.2 delesyon sıklığı FISH ile saptanamazken, MLPA analizi ile %10 bulunmuş ve bu oran literatüre göre ile literatüre göre uyumlu bulundu. Olguların ilave dismorfik bulgularının sınırlı olması ve bulguların daha çok ileri yaşlarda belirginleşmesi nedeniyle KTKD bulgusu olan hastalarda öncelikle FISH analizi ile tarama yapılması ve ilave dismorfik bulgusu olan hastalara FISH ile negatif sonuç alınsa bile MLPA analizi ile değerlendirmenin önemli olduğu gösterilmiştir.

BÖLÜM VI

SONUÇLAR

Sonuç olarak çalışmamızda sitogenetik ve FISH genetik yöntemleri ile sonuçları normal olarak saptanan KKH grubunda MLPA yöntemi ile 2 olguda 22q11 delesyonu saptanmıştır. Bu olgulardan birinin kliniği Di-George Sendromu ile uyumlu bulunurken, diğer olguda sadece TBX1 genine özgü delesyonlar saptanmış ve fenotipik bulgular izole konjenital kalp hastalığı ile sınırlı bulunmuştur. MLPA analizi ile FISH ile tanı konamayan %10 olguda mikrodelesyon tespit edilmiştir. Bu oran önceki çalışmalara göre biraz yüksek olsada, bu sonuç çalışmamızda çalışılan olgu sayısının sınırlı olması bağlandı. Bu çalışmada ayrıca ilk kez MLPA yöntemi ile tek başına TBX1 geninde delesyon tespit edilmiştir. Daha geniş hasta gruplarında yapılan çalışmalar ile 22q11 delesyonunun MLPA yöntemi gibi delesyon bölgesi, ve o bölgedeki genler açısından desteklendiği çalışmaların artması, konjenital kalp hastalığının sahip olduğu kompleks etiyojolojiye ışık tutacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM VII

ÖZET

KKH'da MLPA kullanımı 22q11 bölgesindeki delesyonların ve duplikasyonların tespitinde önemli bir moleküler genetik yöntemdir. Yirmibeş tanesi 22q11, 7 tanesi etraftaki (22q13) ve 16 tanesinde başka kromozomlarda olmak üzere toplam 48 probtan oluşan bir set ile 22q11 bölgesindeki delesyon ve duplikasyonlar araştırıldı. 20 KKH ile birlikte dismorfik bulgular olan ve olmayan olgular alındı. Olguların tümünde MLPA öncesi karyotip ve FISH analizi yapıldı. MLPA analizi sonucunda 2 olguda 22q11 delesyonu saptandı. Olgulardan birinde ASD,VSD,EYD, MY ve TY, KKH bulgularının yanında dismorfik yüz bulguları da bulunmaktaydı. Tek başına AK ve VSD gibi KKH olan, başka bir dismorfik bulgusu olmayan olguda ise sadece TBX1 genini içeren delesyon bulundu. MLPA, KKH'da 22q11 delesyon ve duplikasyon tanısında kullanılabilir hızlı, sensitif ve spesifik bir methodtur. 22q11 delesyon ve duplikasyonlarında KKH'larının çok çeşitli olması nedeniyle rutin olarak bu olgularda 22q11 delesyonunun taranmasını uygun görmekteyiz.

ABSTRACT

It is important to use MLPA for detecting 22q11 deletion and duplication in congenital heart disease (CHD) cases and to study the incidence of 22q11 deletion and duplication in different kinds of CHD. Forty eight probes of which 25 located in 22q11 low copy number region (LCR 22s A-H), 7 in 22q11 surrounding region (CES, 22q13) and 16 in chromosomes 4, 8, 10 and 17 were selected to detect 22q11 deletion and duplication in 20 children with CHD and with or without multiple malformations. In these cases, karyotype and FISH analysis was also performed before MLPA analysis. MLPA demonstrated that 2 cases had 22q11 deletion. In one case, the phenotypes of heart defect included ASD, VSD, EYD, MY and TY with dysmorphic facial features. The other case had isolated TBX1 gene deletion with AK ve VSD cardiac features without any dysmorphic features. MLPA is a rapid, sensitive and site specific method for diagnosis of 22q11 deletion and duplication in CHD. 22q11 deletion and duplication may cause various kinds of CHD, suggesting that genetic detection should be performed routinely in CHD patients.

BÖLÜM VII

- 1- Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, et al. Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore- Washington Infant Study. *Am J Epidemiol* 1985; 121: 31–36.
- 2- Alikasifoglu M, Malkoç N, Ceviz N, Özme S, Uludogan S, Tunçbilek E: Microdeletion of 22q11 (CATCH 22) in children with conotruncal heart defect and extracardiac malformations. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2000; 42: 215-218.
- 3- Amati F, Mari A, Digilio MC, Mingarelli R, Marino B, Giannotti A, Novelli G, Dallapiccola B. 22q11 deletions in isolated and syndromic patients with tetralogy of Fallot. *Hum Genet.* 1995;**95**:479-482.
- 4- Wilson DI, Goodship J.A, Burn J, Cross IE and Scambler PJ, Deletions within chromosome 22q11 in familial congenital heart disease. *Lancet* 340 (1992), pp. 573–575.
- 5- Anaclerio S, Ciommo DV, Michielon G, Digilio MC, Formigari R, Picchio MF, Gargiulo G, Donato DR, Ioris MAD, Marino B: Conotruncal heart defects: impact of genetic syndromes on immediate operative mortality. *Ital Heart J* 2004;**5**:624-628.
- 6- Borgmann S, Luhmer I, Arslan-Kirchner M, Kallfelz HC, Schmidtke J. A search for chromosome 22q11.2 deletions in a series of 176 consecutively catheterized patients with congenital heart disease: no evidence for deletions in non-syndromic patients. *Eur J Pediatr.* 1999;158:958-963.
- 7- Bray-Ward P.: FISH probes and labelling techniques in FISH "A practical approach" (Mai S, Beatty BG, Squire JA., edited). Oxford Univ. Press; pp 5-29, 2002.
- 8- Burn J, Takao A, Wilson D, Cross I, Momma K, Wadey R, Scambler P, Goodship J. Conotruncal anomaly face syndrome is associated with a deletion with chromosome 22q11. *J Med Genet* 1993; 30: 822-824.

- 9-** Burn J: Closing time for CATCH22. *J Med Genet* 1999; **36**: 737-738.
- 10-** Carlson C, Papolos D, Pandita RK, Faedda GL, Veit S, Goldberg R, Shprintzen R, et al. Molecular analysis of velo-cardio-facial syndrome patients with psychiatric disorders. *Am J Hum Genet* 1997;60:851-859.
- 11-** Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboah K, Warburton D, et al: Molecular definition of 48 22q11 deletions in 151 velocardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 620–629.
- 12-** Cayler GG. Cardiofacial syndrome: congenital heart disease and facial weakness, a hitherto unrecognized association. *Arch Dis Child* 1969; 44: 69-75.
- 13-** Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE: Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn* 1996; 206: 379–390.
- 14-** De la Chapelle A, Herva R, Koivisto M, et al. A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet* 1981; 57: 253-256.
- 15-** Collins FS, Gelehrter TD, Ginsburg D, Principles of medical genetics. Williams and Wilkins Company, Baltimore, 2nd Edition, 1998.pp:153-162.
- 16-** Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, McDonaldMcGinn D, Chien P, Feuer J, Zackai EH, Emanuel BS and Driscoll DA, Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol* 32 (1998), pp. 492–49
- 17-** Nagasaki K, Itoh M, Naoki O, Kubota M, Kikuchi T, Uchiyama M. Two cases of 22q11.2 deletion syndrome with anorectal anomalies and growth retardation. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24(7-8):585-6.
- 18-** Debrus S, Berger G, De Meeus A, Sauer U, Guillaumont S, Voisin M, Bozio A, Demczuk S, Aurias A, Bouvagnet P. Familial non-syndromic conotruncal defects are not associated with a 22q11 microdeletion. *Hum Genet.* 1996;**97**:138-144.

- 19-** Derbent M, Yılmaz Z, Baltacı V, Saygılı A, Varan B, Tokel K. Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am J Hum Genet* 2003; 116A: 129-135.
- 20-** Devriednt K, Eyskens B, Fryns JP. The incidence of a deletion in chromosome 22q11 in sporadic and familial conotruncal heart disease. *Eur J Pediatr* 1996; **155**:721.
- 21-** Jalali GR, Vorstman JA, Errami A, Vijzelaar R, Biegel J, Shaikh T, Emanuel BS. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum Mutat.* 2008; 29(3): 433-40
- 22-** DiGeorge AM. Discussions on a new concept of the cellular basis of immunology. *J Pediatr* 1965; 67: 907.
- 23-** Digilio MC, Marino B, Capolino R, Angioni A, Sarkozy A, Roberti MC, Conti E, de Zorzi A, Dallapiccola B. Familial recurrence of nonsyndromic congenital heart defects in first degree relatives of patients with deletion 22q11.2. *Am J Med Genet* 2005;134:158-164.
- 24-** Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. A genetic etiology for Di-George syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 924-933.
- 25-** Schouten, J.P., McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G., 2002, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligationdependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 2002; 30: e57.
- 26-** Farrell MJ, Stadt H, Wallis KT, Scambler P, Hixon RL, Wolfe R, Leatherbury L, Kirby ML: HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is required for cardiac outflow tract septation. *Circ Res* 1999; 84: 127–135.
- 27-** Burn J, Goodship J: Congenital Heart Diseases. Principles and Practise of Medical Genetics 4th Edition. Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR. Curchill Livingstone, London, Vol 1 Chapter 2002;47:1239-1326.

- 28-** Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, et al. Congenital heart disease: prevalence at livebirth. *Am J Epidemiol* 1985;121:31-36.
- 29-** Ferencz C, Loffredo CA, Correa-Villasenor A, Wilson PD. Genetic and environmental risk factors of major cardiovascular malformations. The Baltimore- Washington Infant Study 1981-1989. Mount Kisco, NY: Futura Publishing Company 1997.
- 30-** Clark EB. Epidemiology of congenital cardiovascular malformations. In: Moss and Adams' heart disease in infant, children and adolescent 6th edition. Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll DC, D.J. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001:64-7929- Fernhoff PM. The 22q11.2 deletion syndrome: more answers but more questions. *J Pediatr* 2000; 137: 145-147.
- 31-** Fukushima Y, Ohashi H, Wakui K, Nishida T, Nakamura Y, Hoshino K, Ogawa K, Ohishi T. DiGeorge syndrome with del (4) (q21.3q25): Possibility of the fourth chromosome region responsible for DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 1992; 51: A80.
- 32-** Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969 Jun;63(2):378-83.
- 33-** Garabedian M: Hypocalcemia and chromosome 22q11 micro-deletion. *Genet Couns* 1999; **10**: 389–394.
- 34-** Lewin MB, Lindsay EA, Baldini A. 22q11 deletions and cardiac disease. *Ped Cardiology* 1996; 6:19-28.
- 35-** Abushaban L, Uthaman B, Kumar AR; Selvan J. Familial truncus arteriosus: A possible autosomal recessive trait. *Ped Cardiology* 2003; 24:64-66
- 36-** Srivastava D, Baldwin HS. Molecular determinants of cardiac development. In: Moss and Adams' heart disease in infant, children and adolescent 6th edition. Allen HD, Gutgesell HP, Clark EB, Driscoll DC, D.J. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001;Chapter 1:1-23.

- 37-** Scambler PJ. The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet.* 2000;9(16):2421-6.
- 38-** Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A ve ark. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet.* 1997 Oct;34(10):798-80439-
- 39-** Schouten, J.P., McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligationdependent probe amplification. *Nucleic Acids Research,* 2002; 30: e57.
- 40-** Goldberg R, Marion R, Borderon M, Wiznia A, Shprintzen RJ. Phenotypic overlap between velo-cardio-facial syndrome and the DiGeorge sequence. *Am J Hum Genet Suppl* 1985; **37**: A54.
- 41-** Goldberg R, Motzkin B, Marion R, Scambler PJ, Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: a review of 120 patients. *Am J Med Genet* 1993; **45**: 313-319.
- 42-** Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, McDonald- McGinn D, Chien P, Feuer J, Zackai EH, et al: Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol* 1998; **32**: 492-498.
- 43-** Goldmuntz E, Driscoll D, Budarf ML, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Biegel JA, Emanuel BS. Microdeletions of chromosomal region 22q11 in patients with congenital conotruncal cardiac defects. *J Med Genet* 1993; **30**: 807-812.
- 44-** Graham A, Smith A: Patterning the pharyngeal arches. *Bioessays* 2001; **23**: 54–61.
- 45-** Greenberg F, Elder FFB, Haffner P, Northrup H, Ledbetter DH. Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. *Am J Hum Genet* 1988; **43**: 605-611.
- 46-** Greig F, Paul E, DiMartino-Nardi J, Saenger P: Transient congenital hypoparathyroidism: resolution and recurrence in chromosome 22q11 deletion. *J Pediatr* 1996; **128**: 563–567.

- 47-** Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KHA, 2003, Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet*; 40: 907– 912.
- 48-** Gelb BD. Recent advances in the understanding of genetic causes of congenital heart diseases. *Front Biosci* 2000;1(5): 321-333
- 49-** Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE: Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr* 2001; **139**: 715–723.
- 50-** Jerome LA, Papaioannou VE: DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet* 2001; **27**: 286-291.
- 51-** John H, Birnstiel ML, Jones KN. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969; **223**: 582-587.
- 52-** Kenneth J.L. Shprintzen Syndrome. In: Smith's Recognizable patterns of human malformation. WB Saunders Company, 5th Ed., 1997; pp. 266-267.
- 53-** Glover TW. CATCHing a break on 22. *Nat Genet* 1995; **10**: 257-258.
- 54-** Kinouchi A, Mori K, Ando M, Takao A: Facial appearance of patients with conotruncal anomalies. *Shonika (Pediatr Jpn)* 1976; **17**: 84.
- 55-** Kirby ML, Gale TF, Stewart DE. Neural crest cells contribute to normal aortipulmonary septation. *Science* 1983; **220**: 1059-1061.
- 56-** Wilson DI, Goodship J.A, Burn J, Cross IE and Scambler PJ, Deletions within chromosome 22q11 in familial congenital heart disease. *Lancet* 340 (1992), pp. 573–575.
- 57-** Lai MMR, Seriven PN, Ball C, Berry AC. Simultaneous partial monosomy 10p and trisomy 5q in a case of hypoparathyroidism. *J Med Genet* 1992; **29**: 586-588.
- 58-** Lammer EJ, Opitz JM, The DiGeorge anomaly as a developmental field defect. *Am J Med Genet* 1986; **29**: 113-127.

- 59-** Yamagishi C, Hierck BP, Gittenberger-De Groot AC, Yamagishi H, Srivastava D. Functional attenuation of UFD11, a 22q11.2 deletion syndrome candidate gene, leads to cardiac outflow septation defects in chicken embryos. *Pediatr Res.* 2003 Apr;53(4):546-53.
- 60-** Langer Pr, Waldrop AA, Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel Nucleic Acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78n 1981, **11**: 6633-6637.
- 61-** Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC: Immunological method for mapping genes on drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;**79**:4381-4385.
- 62-** Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC. Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. *GATA* 1991; **8**(1): 24-35.
- 63-** Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 1988; **80**: 224-234.
- 64-** Xu YJ, Wang J, Xu R, Zhao PJ, Wang XK, Sun HJ, Bao LM, Shen J, Fu QH, Li F, Sun K.
- 65-** Lindsay EA: Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet* 2001; **2**: 858–868.
- 66-** Mesbah K, Rana MS, Francou A, van Duijvenboden K, Papaioannou VE, Moorman AF, Kelly RG, Christoffels VM. Identification of a Tbx1/Tbx2/Tbx3 genetic pathway governing pharyngeal and arterial pole morphogenesis. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 19.
- 67-** D'Antoni S, Mattina T, Di Mare P, Federico C, Motta S, Saccone S. Altered replication timing of the HIRA/Tuple1 locus in the DiGeorge and Velocardiofacial syndromes. *Gene.* 2004 May 26;333:111-9.
- 68-** Derbent M, Yilmaz Z, Baltaci V, Saygili A, Varan B, Tokel K. Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A.* 2003 Jan 15;116A(2):129-35.

- 69-** Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, McDonaldMcGinn D, Chien P, Feuer J, Zackai EH, Emanuel BS and Driscoll DA, Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol* 32 (1998), pp. 492–498.
- 70-** Manuelidis L: Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. *Chromosoma (Berl.)* **66**:23-32, 1978.
- 71-** Marino B, Digilio MC, Toscano A, et al. Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genet Med* 2001; **3**: 45-48.
- 72-** Marino B, Digilio MC, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B. Congenital heart defects in patients with DiGeorge/velocardiofacial syndrome and del22q11. *Genet Couns.* 1999;**10**:25-33.
- 73-** Marino B, Digilio MC. Congenital heart disease and genetic syndromes: specific correlation between cardiac phenotype and genotype. *Cardiovasc Pathol* 2000;**9**:303-315.
- 74-** Matsuoka R, Kimura M, Scambler PJ, Morrow BE, Imamura S, Minoshima S, Shimizu N, Yamagishi H, Joh-o K, Watanabe S, et al: Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Hum Genet* 1998; **103**:70–80.
- 75-** McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Bason L, Christensen K, Lynch D, Sullivan K, Canning D, Zavod W, Quinn N, Rome J, Paris Y, Wainberg P, Clark BJ, Emanuel BS, Zackai EH. Autosomal dominant “Opitz” GBBB syndrome due to a 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet* 1995; **59**:103-113.
- 76-** McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Solot C, Wang P, Jacobs I, Handler S, Knightly C, Heher K, Wilson M, Ming JE, Grace K, Driscoll D, Pasquariello P, Randall P, Larossa D, Emanuel BS, Zackai EH. The Philadelphia story: 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns* 1999; **10**:11-24.

- 77-** Brunet A, Gabau E, Perich RM, Valdesoiro L, Brun C, Caballín MR, Guitart M. Microdeletion and microduplication 22q11.2 screening in 295 patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet A*. 2006 Nov 15;140(22):2426-32.
- 78-** Lima K, Følling I, Eiklid KL, Natvig S, Abrahamsen TG. Age-dependent clinical problems in a Norwegian national survey of patients with the 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Pediatr*. 2010 Aug;169(8):983-9.
- 79-** Miller JO, Therman E. *Human Chromosomes: In situ hybridization*. 4th ed. Springer-Verlag, New York; 2001.pp. 107-121.
- 80-** Momma K, Ando M, Matsuoka R. Trunkus arteriosus communis associated with chromosome 22q11 deletion. *J Am Coll Cardiol* 1997;**30**:1067-1071.
- 81-** Momma K, Kondo C, Ando M, Matsuoka R, Takao A. Tetralogy of Fallot associated with chromosome 22q11 deletion. *Am J Cardiol* 1995; **76**: 618-621.
- 82-** Reddy KS, Sulcova V, Siassi B. Two sibs with Wolf-Hirschhorn and DiGeorge deletions resulting from an unbalanced chromosome rearrangement, 45,XX/XY, der(4)t(4;22)(p16.3;q11.2) mat,-22. *J Med Genet*. 1996 Oct;33(10):852-5.
- 83-** Goldmuntz E, Clark BJ, Mitchell LE, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, McDonaldMcGinn D, Chien P, Feuer J, Zackai EH, Emanuel BS and Driscoll DA, Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol* 32 (1998), pp. 492–498
- 84-** Monaco G, Pignata C, Rossi E, Mascellaro O, Coccozza S, Ciccimarra F. DiGeorge anomaly associated with 10p deletion. *Am J Med Genet* 1991; **39**: 215-216.
- 85-** Moss EM, Batshaw ML, Solot CB, Gerdes M, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, WangPP: Psychoeducational profile of the 22q11.2 microdeletion: A complex pattern. *J Pediatr* 1999; **134**: 193–198.
- 86-** Muhlegger K, Huber E, von der Eltz H, Ruger R, Kessler C. 1990. Non-radioactive labelling and detection of nucleic acids. IV. Synthesis and properties of digoxigeninmodified

2'-deoxyuridine-5'-triphosphates and a photoactivatable analog of digoxigenin (photodigoxigenin), *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **371**: 953-965.

87- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thompson and Thompson genetics in medicine. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 6th Edition, 2001.pp: 137-140.

88- Gall, J. G., & Pardue, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1969;63, 378–383

89- JOHN. H. A.. BIRNSTIEL, M. L. and JONES, K. W. 1969. RNA- DNA hybrids at the cytological level. -*Nature* 223: 582-587

90- Papaioannou VE, Silver LM: The T-box gene family. *Bioessays* 1998; **20**: 9–19.

91- HESLOP-HARRISON, J. S. The molecular cytogenetics of plants. — *J. Cell Sci.* IW: 1991;15-21

92- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9138-9142.

93- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol.* 1977 Jun 15;113(1):237-51.

94- Rauch R, Rauch A, Koch A, Zink S, Kaulitz R, Girish M, Singer H, Hofbeck M. Laterality of the aortic arc and anomalies of the subclavian artery-reliable indicators for 22q11.2 deletion syndromes? *Eur J Pediatr* 2004;163:642-645.

95- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: Labelling deoxyribonucleic acid to high spesific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I, *J Mol Biol* 1977; **113**: 237-251.

- 96-** Roberts C, Daw SC, Halford S, Scambler PJ: Cloning and developmental expression analysis of chick Hira (Chira), a candidate gene for DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 237–245.
- 97-** Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A ve ark. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 1997; **34**:798-804.
- 98-** Kim KH, Kim BR, Kim JE, Woo KS, Han JY, Kim JM, Lee SW, Chung WT. Correlation between enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence test for high titer of anti-ribosomal-P antibodies. *Clin Chim Acta*. 2011 Nov 29.
- 99-** Ráb P, Rábová M, Pereira CS, Collares-Pereira MJ, Pelikánová S. Chromosome studies of European cyprinid fishes: interspecific homology of leuciscine cytotoxic marker-the largest subtelocentric chromosome pair as revealed by cross-species painting. *Chromosome Res*. 2008;16(6):863-73.
- 100-** Pearce SF, Zadunaisky JA. Fluorescent stilbene (BADS) binding proteins in anion-transporting epithelia. *Am J Physiol*. 1990 Sep;259(3 Pt 1):C439-49.
- 101-** Despons L, Uzunov Z, Louis VL. Tandem gene arrays, plastic chromosomal organizations. *C R Biol*. 2011 Aug-Sep;334(8-9):639-46. Epub 2011
- 102-** Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, Sidoti EJ, Berkman MD, Argamaso RV, Young D: A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J* 1978; **15**:56-62.
- 103-** Srivastava D. Developmental and genetic aspects of congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1999;**14**:263-268.
- 104-** Stottmann RW, Choi M, Mishina Y, Meyers EN, Klingensmith J. BMP receptor IA is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium. *Development* 2004; **131**: 2205-2218.

105- www.mlpa.com

106- Sullivan KE: The clinical, immunological, and molecular spectrum of chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; **4**:505-512.

107- Swillen A, Devriendt K, Legius E, Eyskens B, Dumoulin M, Gewillig M, Fryns JP: Intelligence and psychosocial adjustment in velocardiofacial syndrome: a study of 37 children and adolescents with VCFS. *J Med Genet* 1997; **34**: 453–458