HILAL ÖZGÜR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2011

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MOEBIUS SENDROMLU OLGULARDA *HOXA1, HOXA2, HOXB1* VE *HOXB2* GEN İLİŞKİSİNİN DNA DİZİLEME YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

HİLAL ÖZGÜR

DANIŞMAN
DOÇ.DR.Z.OYA UYGUNER

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Yükseklisans Programında Hilal ÖZGÜR tarafından hazırlanan Moebius Sendromlu Olgularda HOXA1, HOXA2, HOXB1 ve HOXB2 Gen İlişkisinin DNA Dizileme Yöntemi İle İncelenmesi" başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

07 / 09 / 2011-09-07

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı	Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)		İmzası
1.Doç. Dr. Z.Oya UYGUNER	İstanbul Tıp Fak.	Tıbbi Genetik ABD	
2.Prof. Dr. Seher BAŞARAN	İstanbul Tıp Fak.	Tıbbi Genetik ABD	
3.Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ	Cerrahpaşa Tıp Fak.	Çocuk Sağ. ve Hast. A.B.D	
4.Doç. Dr. Esra BATTALOĞLU	Boğaziçi Üniv.	Moleküler Biyoloji ve Genetik	
5.Prof. Dr. Nur BUYRU	Cerrahpaşa Tıp Fak.	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	

BEYAN

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

HİLAL ÖZGÜR

Canım Aileme...

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında çalışmalarımı büyük bir titizlikle yakından izleyen ve beni yönlendiren, değerli zamanını özen ve ilgiyle bana ayıran, bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç.Dr. Z.Oya Uyguner'e;

Eğitimim süresince bilgilerinden yararlandığım, tezimin plan ve yazım aşamasında fikir ve önerileriyle bana yol gösteren değerli hocam Prof.Dr.Seher Başaran'a,

Olguların klinik çalışmalarını gerçekleştiren ve klinik genetik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof.Dr. Hülya Kayserili'ye,

Eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Doç.Dr.Birsen Karaman'a,

Moleküler genetik laboratuar çalışmalarımda deneyimlerinden yararlandığım, yardımları ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Alev Yalın'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Bio. Volkan Karaman'a, Bio. Mutlu Avşar Dülger'e, Uzm. Bio. Bilge Satkın'a ve Bio. Selvi Ergin'e,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda çalışan tüm arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olacağına inandığım sevgili dostum Nurten Akçara'ya,

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim canım ailem'e,

teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 10801) ve TUBITAK-SBAG (CRANIRARE/108S418) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Merkezi Sinir Sistemi Embriyolojisi 3
2.1.1. Beyin Gelişimi 6
2.1.1.1. Prozensefalon 7
2.1.1.2. Mezensefalon 8
2.1.1.3. Rombensefalon 8
2.1.1.3.1. Rombomer Gelişimi 9
2.1.2. Kraniyal Sinir Gelişimi 9
2.2. Moebius Sendromu 18
2.2.1. Tanımı ve Sıklığı 18
2.2.2. Kalıtım şekli 19
2.2.3. Klinik Tanı 19
2.2.4. Etiyolojisi 21
2.2.5. Moebius Sendromu İle İlişkili Olabilecek Aday Genler 24
2.2.5.1. HOX Genleri 24
2.3. Kullanılan Moleküler Teknikler 35
2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 35
2.3.2. Restriksiyon Parça Boyu Polimorfizmi (*Restriction Fragment Length* 36
2.3.3. DNA Dizi Analizi 37
2.3.4. Mikrodizin Tekniği 38

3. GEREÇ VE YÖNTEM 39
3.1. Gereç 39
3.1.1. Çalışma Grubu 39
3.2. Yöntem 39
3.2.1. DNA Eldesi 39
3.2.2. Dizi Analizi 39
3.2.2.1. Aday Genlerin Yapılarının Araştırılması 39
3.2.2.2. Primerlerin Tasarlanması 39
3.2.2.3. Ekson Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması 40
3.2.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması 41
3.2.2.5. DNA Dizi Analizi 41
3.2.2.6. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Yorumlanması 42
3.2.3. Restriksiyon Enzim Kesimi Çalışması 42
3.2.4. Mikrodizin Çalışması 43
3.2.4.1. Kesim, Ligasyon, PCR (Birinci gün) 43
3.2.4.2. Pürifikasyon, Ölçüm, Fragmentasyon, İşaretleme (*labelling*) (İkinci Gün) 44
3.2.4.3. Hibridizasyon (Üçüncü Gün) 46
3.2.4.4. Yıkama ve Veri Analizi (Dördüncü gün) 47
3.2.4.5. Analiz 47
4. BULGULAR 48
4.1. Klinik Bulgular 48
4.2. Dizi Analizi Sonuçları 54
4.2.1. *HOXA1* Geni 54
4.2.2. *HOXA2* Geni 54
4.2.3. *HOXB1* Geni 55
4.2.4. *HOXB2* Geni 58
4.3. Mikrodizin Analiz Sonuçları 60
5. TARTIŞMA 62
FORMLAR 77
ETİK KURUL KARARI 79
ÖZGEÇMİŞ 81

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Primer dizileri 40
Tablo 4-1: Ağır Moebius olgularının klinik bulguları 49
Tablo 4-2: Hafif Moebius olgularının klinik bulguları 50
Tablo 4-3: Hafif Moebius olgularının klinik bulguları (devam) 51
Tablo 4-4: Moebius+Poland olgularının klinik bulguları 52
Tablo 4-5: Tüm olgularda görülen Kraniyal Sinir Paralizisleri 53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Vücut ve embryonik eksenler. A, erişkin insan yan görüntüsü. B, 5 haftalık embriyonun yan görüntüsü. C ve D, 6 haftalık embriyonun ventral görüntüleri. E, 7 haftalık embriyonun yan görüntüsü. 3
Şekil 2-2: Embriyonun dorsal yönden görünümü (Yaklaşık 20 günlük) 5
Şekil 2-3: Nörülasyon aşamaları 6
Şekil 2-4: Beyin veziküllerinin farklılaşması 7
Şekil 2-5: Mezensefalon bölümleri 8
Şekil 2-6: Fare embriyolarında rombomer ve kraniyal sinir görüntüleri 10
Şekil 2-7: Farelerde rombomerlerden kraniyal sinirlerin çıkışı 10
Şekil 2-8: Kraniyal sinirler 12
Şekil 2-9: Okulomotor sinir 13
Şekil 2-10: Troklear sinir 13
Şekil 2-11: Trigeminal sinir 14
Şekil 2-12: Abdusens sinir 15
Şekil 2-13: Fasiyal sinir 15
Şekil 2-14: Vestibulokohlear Sinir 16
Şekil 2-15: Glossofaringeal sinir 16
Şekil 2-16: Vagus siniri 17
Şekil 2-17: Aksesuvar sinir 17
Şekil 2-18: Hipoglossal sinir 18
Şekil 2-19: *HOX* genleri ve anteroposteriyor eksen boyunca ekspresyon paternleri 25
Şekil 2-20: Rombomerlerde eksprese edilen *HOX* genleri 25
Şekil 2-21: *HOXA1* geni NM_005522.4 transkripti 29
Şekil 2-22: *HOXA1* geni NM_153620.2 transkripti 29
Şekil 2-23: STRING veritabanına göre *HOXA1* geninin fonksiyonel ve biyolojik ilişkide olabileceği diğer genler. 31
Şekil 2-24: *HOXA2* geni 32
Şekil 2-25: STRING veritabanına göre *HOXA2* geninin fonksiyonel ve biyolojik ilişkide olabileceği diğer genler. 33
Şekil 2-26: *HOXB1* geni 33

Şekil 2-27: STRING veritabanında göre *HOXB1* geninin fonksiyonel be biyolojik ilişkide olabileceği diğer genler. 34
Şekil 2-28: *HOXB2* geni 34
Şekil 2-29: STRING veritabanında göre *HOXB2* geninin fonksiyonel be biyolojik ilişkide olabileceği diğer genler. 35
Şekil 3-1: AciI Enziminin DNA dizisini kesim bölgeleri 42
Şekil 3-2: Mikrodizin çalışmasında restriksiyon enzim kesimi, ligasyon ve PCR aşamaları 44
Şekil 3-3: Fragmanların agaroz jeldeki görüntüsü 45
Şekil 3-4: Fragmanların agaroz jeldeki görüntüsü 45
Şekil 3-5: Mikrodizin çipi Şekil 3-6: Hibridizasyon fırını 46
Şekil 4-1: rs10951154 ve rs45571645polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramları 54
Şekil 4-2: rs56012816 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı 54
Şekil 4-3: rs2428431 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı 55
Şekil 4-4: rs12939811 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı 55
Şekil 4-5: rs12946855 ve rs7207109 polimorfizleri saptanan olgular, heterozigot ve homozigot örnek dizi kromatogramı 55
Şekil 4-6: rs79792056 polimorfizmi saptanan olgu ve örnek dizi kromatogramı 56
Şekil 4-7: rs35115415 polimorfizmi saptanan olgu ve örnek dizi kromatogramı 56
Şekil 4-8: MBS#4 te görülen heterozigot yeni SNP kromatogramı 56
Şekil 4-9: MBS#26 da görülen homozigot yeni mutasyon kromatogramı 57
Şekil 4-10: c. 619G>A nın PCR+ Restriksiyon enzim kesimi ile gerçekleştirilen kontrol çalışmasından alınan % 2.5 luk agaroz jel görüntüsü 57
Şekil 4-11: *HOXB1* deki p.Arg207 'nın (p.207R) diğer türlerle karşılaştırması 58
Şekil 4-12: *HOXB*1 deki p.Arg207His'in POLYPHEN-2 programındaki değerlendirme sonucu 58
Şekil 4-13: rs9899351 ve rs111401880 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı 58
Şekil 4-14: rs1042815 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı 59
Şekil 4-15: rs1042818 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı 59
Şekil 4-16: rs1042822ve rs2229302 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı 59

Şekil 4-17: ChAS programında *HOXA1* gen bölgesinin görüntüsü, ilişkili OMIM bilgisi, SNP 6.0 kitindeki probları ve yerleri 60
Şekil 4-18: ChAS programında *HOXB1* gen bölgesinin görüntüsü, SNP 6.0 kitindeki probları ve yerleri..... 61

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABDS: Athabaskan Beyinkökü Disgenezi Sendromu (Athabaskan brainstem dysgenesis syndrome)
AVE: Anteriyor Viskeral Endoderm
bç: baz çifti
BPES: Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus-Inversus Sendromu
BSA: Bovine Serum Albumin
BSAS: Bosley-Salih-Alorainy Sendromu
CEPH: Centre de'Etude du Polymorphism Humain (İnsan Polimorfizm Çalışma Merkezi)
CHN: Konjenital Hipomiyelinizasyon Nöropatisi
CLUFT cranial nevre, lower limb, upper limb, face and thorax
CN: Cranial Nerve
CNV: Copy Number Variation (Kopya sayısı değişimi)
CRANIRARE: An integrated clinical and scientific approach for craniofacial malformations
CT: CAT Scan
dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat
ddNTP: Dideoksiribonükleotid trifosfat
DGV: Database of Genomic Variants
DIP: Delesyon/İnsersiyon Polimorfizmi
DMSO: Dimetil sülfoksid
DNA: Deoksiribonükleik asit
dNTP: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asid
gDNA: genomik deoksiribonükleik asit
GSA: Genel Somatik Afferent
GSE: Genel Somatik Efferent
GVA: Genel Visseral Afferent
GVE: Genel Visseral Efferent
HES: Herring Sperm DNA
HGDB: Human Genome Data Base
ICM: Inner Cell Mass
KB: Kilobaz
KS: Kraniyal Sinir
MGI:Mouse Genome Informatics
MR: Mental Retardasyon
MRI: Magnetic Resonance Imaging
NCBI: National Center for Biotechnology Information
OCR: Oligo Control Reagent
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PSMG:Psikososyal motor gerilik
QC: Quality Control
r: Rombomer
RE: Restriksiyon Endonükleaz
RFL: Restriksiyon Parça Boyu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SSA: Özel Somatik Afferent
STR: Short Tandem Repeat (kısa ardışık tekrar dizileri)
SVA: Özel Visseral Afferent
SVE: Özel Visseral Efferent
TBE: Tris-borate EDTA
TdT: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TMACL: Tetramethyl Ammonium Chloride
UCSC: University of California, Santa Cruz
UTR: Untranslated Region

ÖZET

Özgür, H. Moebius Sendromlu Olgularda *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXB1* ve *HOXB2* Gen İlişkisinin DNA Dizileme Yöntemi ile İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2011.

Moebius sendromu, ana bulgusu konjenital fasiyal displazi olan nadir bir nörolojik sendromdur. Bilateral ya da unilateral olarak görülen fasiyal displaziye, olguların fasiyal sinirlerinin (KS VII) etkilenmesi yol açmaktadır. Belirli bir kalıtım modeli olmayan Moebius sendromu ile ilgili araştırmalar aday gen yaklaşımı ile sürmektedir.

Projemizde, Moebius sendromlu olgularda paralizisi görülen KS VII nin gelişiminde ve fonksiyonunda etkin olabilecek olası genler fenotip-genotip ilişkili model organizma çalışmaları araştırılarak belirlendi. Bu genler arasından fetal evrede KS VII nin köken aldığı r4 de eksprese olan *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXB1* ve *HOXB2* genleri seçilerek 25 Moebius sendromlu olguda dizi analizi yöntemi ile araştırılması planlandı.

Biyoinformatik analizler sonucunda, farklı olgularda veritabanlarında tanımlanmış 15 farklı polimorfizm saptandı. Bir olguda, *HOXB1* geninin ikinci eksonunda tanımlanmamış heterozigot bir dizi değişimi saptandı. Bu değişim olgunun annesinde de heterozigot olduğundan yeni bir polimorfizm olduğuna karar verildi.

Bir olguda *HOXB1* geninin ikinci eksonunda homozigot yanlış anlamlı bir değişim saptandı. Olgunun akraba olan anne ve babasında heterozigot olarak taşınan bu değişimin, 160 kontrol kromozomunda taşınmadığı saptandı. Kodlanan farklı aminoasitin veritabanlarında patolojik olarak gösterildiği belirlendi. Bu bulgulara dayanılarak, bulunan değişimin hastalık ile ilişkili bir mutasyon olabileceğine karar verildi.

Literatürde, *HOXA1* dışında diğer genlerin (*HOXA2*, *HOXB1* ve *HOXB2*) Moebius sendromu ile ilişkisini araştıran herhangi bir moleküler inceleme bulunmamaktadır. Çalışmamız, bu genlerle Moebius sendromunun ilişkisini araştıran ilk çalışma olmaktadır. *HOXB1* geninde saptanan yanlış anlamlı homozigot mutasyon, sendromla ilgili yapılan aday gen çalışmalarına katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Moebius sendromu, Kraniyal sinirler, rombomer, Hox genleri, mutasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 10801) ve TUBITAK-SBAG (CRANIRARE/108S418) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Özgür H. Investigation of *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXB1* and *HOXB2* Gene Association with Moebius Syndrome by DNA Sequencing. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Genetics. Master Thesis. İstanbul. 2011.

Moebius syndrome is a rare neurological disorder, primarily characterized by congenital facial palsy. No causative genes are yet known. As most of the cases are isolated, gene identification by conventional tools is not fruitful. Therefore, under the framework of this project, we used candidate gene approach for investigating the causative genes in Moebius.

HOXA1, *HOXA2*, *HOXB1* and *HOXB2* were selected as candidates, since they are important developmental genes of the first clusters of the anteroposterior segmentation of the central nervous system and further they are expressed in rhombomere 4, where the cranial nerve VII arise.

As a result of sequencing of these four genes in 25 Moebius cases, 15 different SNPs and two novel variations were identified. Detailed investigation of one of the novel changes revealed a rare polymorphism running in that family (p.Ala193Gly). The second one (p.Arg207His) was identified in homozygous form in a patient, which is well conserved within homeobox genes. Consanguineous healthy parents were heterozygous carriers. The variation was not identified in 160 control chromosomes, practically excluding the polymorphism status. All these findings led us to conclude that this homozygous alteration can be associated with Moebius Syndrome in our patient.

To our knowledge, except for *HOXA1*, there is no other inquiry in the literature addressing the association of *HOXB1*, *HOXB2* and *HOXA2* genes in Moebius syndrome. We think that our present research is the first one to investigate these genes in Moebius syndrome.

Key words: Moebius syndrome, Cranial nerves, Rhombomere, Hox Genes, Mutation

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: 10801) ve TUBITAK-SBAG (CRANIRARE/108S418)

1. **GİRİŞ VE AMAÇ**

Embriyonik evre, sekizinci haftanın sonuna kadar olan gelişimsel süreci ifade etmektedir (1). Üçüncü haftanın sonunda görülen primer beyin veziküllerinden biri olan rombensefalon, rombomer (r) olarak adlandırılan 7-8 segmente ayrılarak diğer beyin veziküllerinden farklı bir gelişim gösterir (2). Altıncı haftanın sonunda gelişimini tamamlayan rombomerler, anteroposteriyor gelişim sırasında oluşacak yapıların pozisyonunu belirler (3,4,5). Ayrıca, ilk üç kraniyal sinir (KS) hariç tüm kraniyal sinirler, rombomerlere yerleşik olan çekirdeklerinden köken alır.

Kraniyal sinirler, baş ve boyundaki motor (*efferent*) ve duyu (*afferent*) sinir inervasyonunu (donanımlarını) düzenlemekle görevlidirler (1). KS lerin gelişim aşamalarındaki bozukluklar farklı sendromlara yol açabilir. Bu sendromlardan biri, KS VII (fasiyal sinir) ve KS VI (abdusens sinir) nın fonksiyon kaybının yol açtığı Moebius sendromudur (6).

Moebius sendromunun klinik tanıdaki ana kriteri etkilenmiş bireylerde bilateral veya unilateral olarak görülen fasiyel sinir (KS VII) paralizisidir. Çoğunlukla KS VII paralizisine abdusens sinir (KS VI) paralizisi de eşlik etmektedir, diğer sinir paralizisleri daha az sıklıkta görülmektedir (KS XII, KS V, KS VIII) (6).

Hastalığın etyopatogenezi henüz bilinmemekle birlikte, temel olarak KS VI ve KS VII nin hiç oluşmaması ya da gelişimini tamamlayamaması sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir. Sendrom için vasküler, teratojenik, genetik etiyolojiler öne sürülmüş olmasına rağmen henüz yeterli bilgi ve kanıtlar ortaya konulamamıştır. Çoğunlukla sporodik olarak karşılaşılan bu sendromda otozomal dominant, otozomal resesif ve X e bağlı resesif kalıtım şekilleri de bildirilmektedır. Birden fazla etkilenmiş bireyi bulunan ailelerde yapılan sitogenetik incelemelerde saptanan görünüşte dengeli translokasyon bölgeleri ile bazı ailevi olgularda yürütülen bağlantı analizi çalışmalarında belirlenen kromozom lokusları, sendromla ilgili birkaç aday bölgenin tanımlanmasına neden olmuştur. Farklı çalışmalarda farklı kromozom bölgelerinin aday olarak gösterilmesi, sendromun genetik olarak oldukça heterojen olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmalardan yola çıkılarak yapılan aday gen çalışmaları ise henüz sendromla ilişkili herhangi bir gen belirleyememiştir (6).

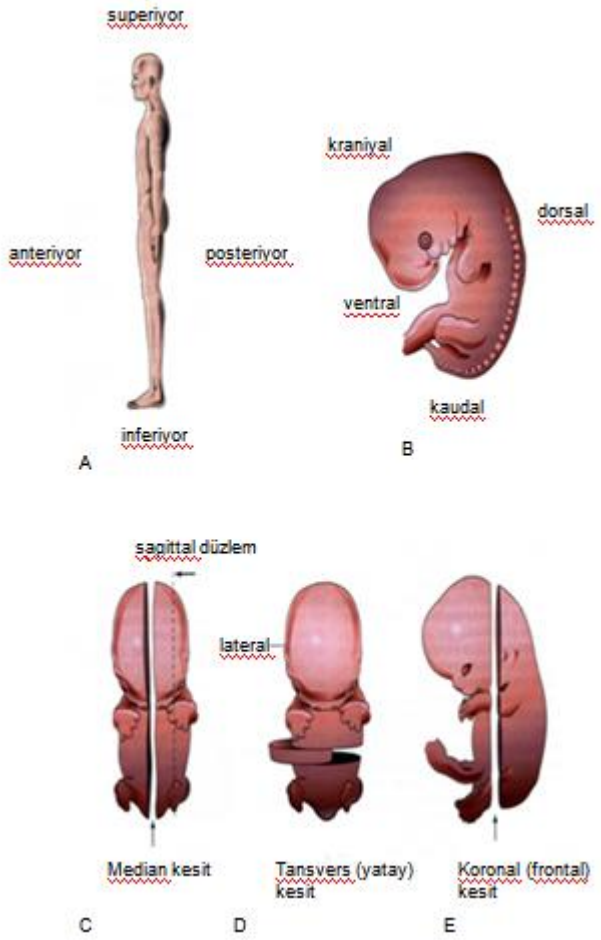
Moebius sendromu ile ilgili çalışmalar, model organizmalar üzerinde aday gen yaklaşımı ile devam etmektedir. HOX genlerinin 4 kümesine ait ilk 10 genin, rombensefalon gelişiminde ekspresyonları görüldüğünden, kraniyal sinir gelişiminde de etkili olabileceğini düşündürmektedir (7). Bu genlerle yapılan fare çalışmaları, genotip-fenotip ilişkili modellerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. *HOXB1 knock out* farelerde Moebius sendromuna benzer bir fenotipin ortaya çıktığı bildirilmiş, ardından yapılan *HOXB2 knock out* fare çalışmaları da benzer sonuçları vermesiyle ilgi çekici olmuştur (8,9).

Bu çalışmada, fare modellerinde yapılan incelemelere göre KS VI ve KS VII nin gelişiminde önemli olduğu gösterilen *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXB1* ve *HOXB2* genlerinin Moebius sendromu ile ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla aday genler DNA dizi analizi yöntemi ile incelendi. Ayrıca, ITF Tıbbi Genetik AD nın, Avrupa Birliği 6 ıncı çerçeve programı olan ERA-NET kapsamında TUBITAK ortaklığı ile yürüttüğü, kısa adı CRANIRARE olan "Kraniyofasiyel malformasyonlara klinik ve bilimsel yaklaşım" başlıklı projede (108S418) Moebius-CNV (copy number variation) ilişkisini araştıran incelemelerden yararlanılarak, Moebius için literatürde aday gösterilen kromozom bölgelerindeki ve aday genlerimizdeki olası delesyon/duplikasyon varlıkları araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Merkezi Sinir Sistemi Embriyolojisi

İnsanda embriyonik evre, fertilizasyondan sonra 5. ile 60. günler arasında, blastosist ve fetal form arasında birbirini takip eden değişim ve gelişim süreçlerini kapsayan dönem olarak tanımlanmaktadır. Değişimin temelinde yatan etmenler, hücrenin polarizasyonu, komşuları ile olan etkileşimleri ve ortogonal eksenin belirlenmesidir. Eksenlerin tanımlanması için anatomi ve embriyolojide bazı terimler kullanılmaktadır. Embriyoyu tanımlarken ön ve arka için dorsal ve ventral; kafa ve kuyruk tanımı için kraniyal ve kaudal terimleri kullanılır (1). Erişkin ve 5 haftalık embriyoda konum, yön ve düzlemleri gösteren çizimler Şekil 2-1 de gösterilmektedir.



Şekil 2-1: Vücut ve embryonik eksenler. A, erişkin insan yan görüntüsü. B, 5 haftalık embriyonun yan görüntüsü. C ve D, 6 haftalık embriyonun ventral görüntüleri. E, 7 haftalık embriyonun yan görüntüsü. (1'den)

İlk bölünmesini meridyonel eksende gerçekleştiren zigot, daha sonraki bölünmelerini meridyonel ve ekvatoryal eksenlerde gerçekleştirir. Morula adı verilen yoğun hücre küresi, dış hücrelerin içeriye sıvı salgılamaları ile blastosist adını alan içi sıvı dolu bir hücre küresine dönüşür (1,10).

Erken memeli embriyosunda gözlenen ilk eksen, henüz blastosist aşamasında iken iki farklı hücre katmanının ayırt edilmeye başlanması ile gözlenir. Bunlardan dışta kalan trofoektoderm "abembriyonik" tarafı oluşturur ki bu bölüm sıvı dolu blastosele komşu olup, primitif endoderm (hipoblast) yapıların bulunduğu bölümdür. İç tarafta kalan katman, *inner cell mass* (ICM) olarak adlandırılır ve "embriyonik" tarafı oluşturur ki buradan da primitif ektoderm (epiblast) oluşur (10).

İnsan embriyosunun 14. gününde gözlenen iki farklı sinyal simetrik gelişimi kırar. Epiblasttan hipoblasta gönderilen sinyaller burada anteriyor viskeral endodermi (AVE) oluşturur. AVE nin sinyalleri, komşu epiblastta anteriyor ektodermi oluşturur. Aynı süreçte, proksimaldeki epiblast hücreleri, daha sonra mesodermi oluşturacak genleri ifade etmeye başlar ve posteriora göç etmesiyle embriyonun kaudal tarafında ve dorsal yüzünde primitif çizgi (*streak*) oluşturur. İnsan gelişiminin 15. gününde primitif çizgi hafif olarak gözlenir. Bunu primitif yarık (*groove*) ve primitif çukur (*pit*) oluşumları izler (1,10).

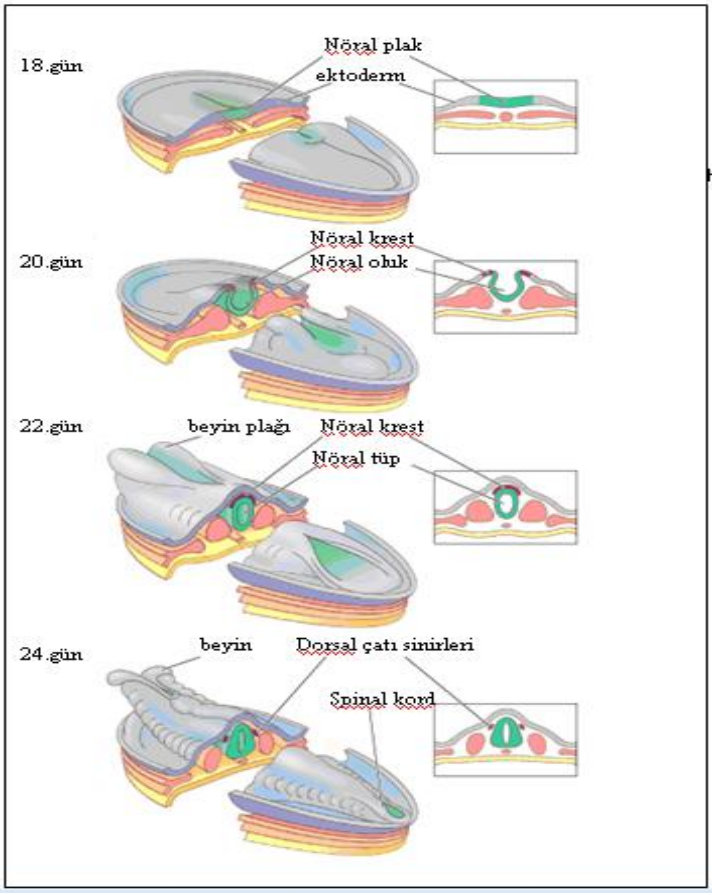
15. günde posterior dorsal yüzeyde beliren primitif çizgi ön ve arkasına eklenen hücrelerle omurilik taslağını (notokordal çıkıntı) oluşturur. Bu yapı sonradan ağız olacak prekordal plağa kadar uzanır. 18. günde gelişmekte olan notokordal çıkıntı üzerindeki epiblast kalınlaşarak daha sonra beyin ve omuriliği oluşturacak olan nöral plakayı oluşturur. Notokordal çıkıntı tüp biçiminden katı bir çubuğa (notokord/omurga) dönüşür (1,10). Yaklaşık 20 günlük embriyonun dorsal yönden görünümü Şekil 2-2 de görülmektedir. Notokord, sefalik uçta prekordal plaktan daha ileriye gidemez, çünkü bu bölgede, endoderm ve ektoderm birbirine sıkıca yapışmış ve orofaringial membranı oluşturmuştur. Aynı şekilde, primitif çizginin kaudal ucunda da, yine endoderm ve ektoderm tabakası sıkıca kenetlenerek, kloaka membranını oluştururlar. Orofaringial membran, gelecekte oluşacak olan ağız bölgesini, kloaka membranı ise anüs bölgesini belirleyecektir.



Şekil 2-2: Embriyonun dorsal yönden görünümü (Yaklaşık 20 günlük) (1' den)

3. haftanın sonlarına doğru, nöral plağın lateral kenarları daha fazla büyüyüp yükselerek nöral katlantıları oluştururlar. Nöral katlantıların oluşumu ilk önce embriyonun servikal bölgesinden başlar, sefalik ve kaudal yönlere doğru devam eder. Nöral katlantılar oluşurken, plağın orta bölgesinde çukurumsu bir yapı oluşur ki bu oluğa da nöral oluk (*neural groove*) adı verilir. Oluşan bu oluk, nöral katlantıların lateralden mediyale doğru yaklaşarak kapanması ile bir silindir şekline dönüşür ve artık nöral tüp (*neural tube*) adını alır. 23. günde meydana gelen nöral tüp, kraniyal uçta 25. günde, kaudal uçta ise 27. günde tamamen kapanır. Nöral plak, nöral katlantı ve nöral tüpün gelişmesi olaylarına nörülasyon adı verilir (11). Nörülasyon aşamaları Şekil 2-3 te gösterilmiştir.

Nörülasyon sırasında nöral katlantıların apikal bölgesinden ayrılan bir kısım hücre topluluğu oluşmaya başlayan nöral tüpün dorsolateral bölgesine yerleşirler. Nöral krest adını alan bu bölgedeki hücreler daha sonra farklılaşarak, spinal ve kraniyal sinirlerin duyu gangliyonlarını ve otonom sinir sistemi gangliyonlarını oluşturacaklardır (11).

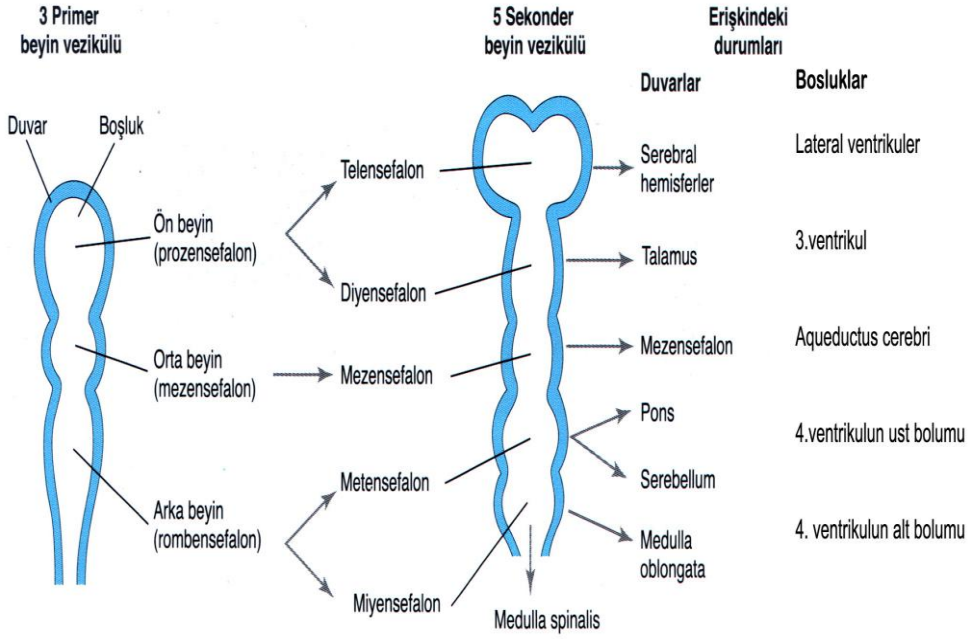


Şekil 2-3: Nörülasyon aşamaları (12'den)

2.1.1. Beyin Gelişimi

Nöral tüpün oluşumundan hemen sonra geniş olan sefalik bölgesinden beyin vezikülleri, daha dar olan kaudal bölgesinden ise medulla spinalis gelişecektir. Üçüncü haftanın sonlarında sefalik bölgede 3 primer beyin vezikülü gözlenir: Ön beyin (Prozensefalon), orta beyin (Mezensefalon) ve arka beyin (Rombensefalon) (1). Beşinci haftadan itibaren bu veziküller farklılaşmaya başlar. Prozensefalon, telensefalon ve diyensefalon olmak üzere iki sekonder beyin vezikülüne ayrılırken, mezensefalon, tek bir vezikül halinde kalır. Rombensefalon ise metensefalon ve miyelensefalon olmak üzere 2 farklı veziküle ayrılır.

Beyin veziküllerinin, duvarlarının ve boşluklarının erişkinde dönüştüğü yapılar Şekil 2-4 te gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Beyin veziküllerinin farklılaşması (1'den)

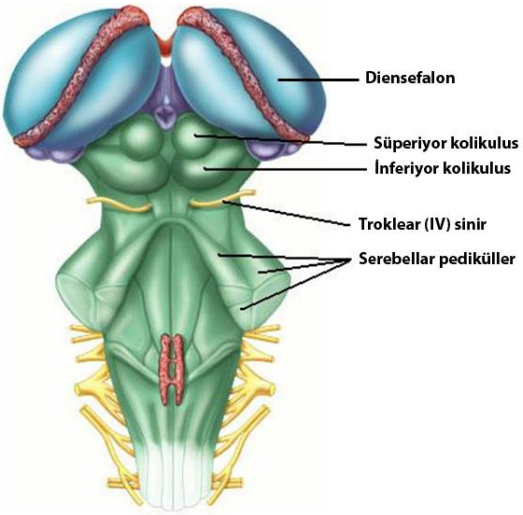
2.1.1.1. Prozensefalon

Prozensefalonun bölümlerinden biri olan telensefalon, bir orta bölüm (*lamina terminalis*) ile serebral vezikül olarak adlandırılan iki lateral divertikülden meydana gelir. Bu veziküller, serebral hemisferlerin ilkel şekilleridir. Telensefalonun orta bölümünün boşluğu, 3. ventrikülün en ön bölümünü oluşturur. Hemisferlerin paryetal, frontal, temporal ve oksipital lobları da burada yer alır. Hemisferlerin üst yüzünün doğumdan kısa süre önce hızla gelişmesi ile giruslar ortaya çıkar (13).

Diyensefalon, prozensefalonun kaudal kısmından gelişir. Bir tavan, iki de alar plak içerir. Diyensefalonun yan duvarlarını oluşturan alar tabakadan talamus, hipotalamus ve epitalamus meydana gelir. Diyensefalonun tavan plağının önünden 3.ventrikülün koroid pleksusu oluşurken, tavan plağının en kaudal kısmı olan epitalamusun divertikül oluşturacak şekilde invajinasyonu ile pineal bez (epifiz) gelişir. Tabanından ise hipofizin arka lobunu yapacak olan infundibulum ve göz taslakları gelişir.

2.1.1.2. Mezensefalon

Mezensefalon en az gelişim gösteren beyin vezikülüdür. Taban plakları tektum ve tegmentum adı verilen bölgeleri oluşturur. Şekil 2-5 de görüldüğü gibi, tektum, görme ve işitme reflekslerini kontrol eden superiyor ve inferiyor kollikulusların bulunduğu; tegmentum ise III. (okulomotor) ve IV. (troklear) kraniyal sinirlerin çekirdeklerinin oluştuğu kısımdır (14).



Şekil 2-5: Mezensefalon bölümleri

2.1.1.3. Rombensefalon

Rombensefalon, miyelensefalon ve metensefalon bölümlerine ayrılır. Miyelensefalonun kaudal bölgesinden, devamı spinal kordu oluşturan medulla oblongata meydana gelir. Medulla oblongata, omurilik ve korteks arasındaki iletim merkezidir, ayrıca kalp ritmi ve solunumun kontrol merkezi olarak görev yapar. VIII. (vestibulokohlear), IX. (glossofaringeal), X. (vagus), XI. (aksesuvar) ve XII. (hipoglossal) KS lerin çekirdeklerinin köken aldığı bölge de medulla oblongatadır (10).

Diğer bir bölüm olan metensefalonun dorsal kısmından serebellum, ventral kısmından ise pons oluşur. Serebellum, denge ve hareket koordinasyon merkezi sayılırken; pons sinir liflerine zemin oluşturan kısımdır. Ponsun bazal plağından; V. (trigeminal), VI. (abdusens) ve VII. (fasiyal) KS lerin çekirdekleri çıkar.

2.1.1.3.1. Rombomer Gelişimi

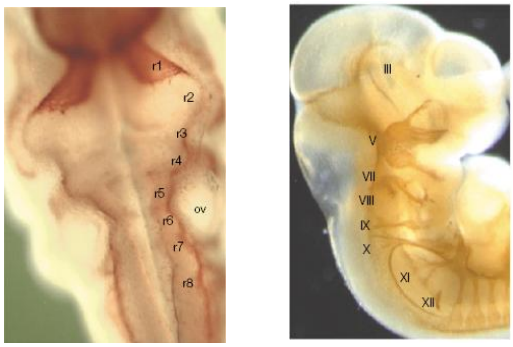
Arka beyin, gelişimi sırasında çok daha fazla segment oluşturması ile diğer beyin bölgelerinden farklılık gösterir. Nöral tüpün kapanmasından hemen sonra rombensefalonda, anteroposteriyor eksen boyunca 7 ya da 8 segment oluşur, 6. haftanın sonunda tamamen belirginleşen bu segmentlere rombomer (r) adı verilir (10). İlk defa 1828 yılında Von Baer tarafından keşfedilen rombomerlerin gelişim sırasındaki rollerinin açıklanması ancak 20. yüzyılın sonlarında olmuştur (15).

Rombomerler geçici embriyonik yapılar olmalarına rağmen, erken gelişim döneminde oynadıkları organizasyon rolü açısından oldukça önemlidirler (3,12). Her bir rombomer, anteroposteriyor gelişim sırasında oluşacak yapıların pozisyonunu belirlemektedir. Bir rombomere ait hücrelerin hepsi aynı fonksiyonel özelliği gösterir ve diğer rombomere ait hücrelerle karışmadan bir sınır oluştururlar. Bu sınır, ileride her bir rombomeri farklı kraniyal sinirlere ve yapılarına köken yapar (5).

2.1.2. Kraniyal Sinir Gelişimi

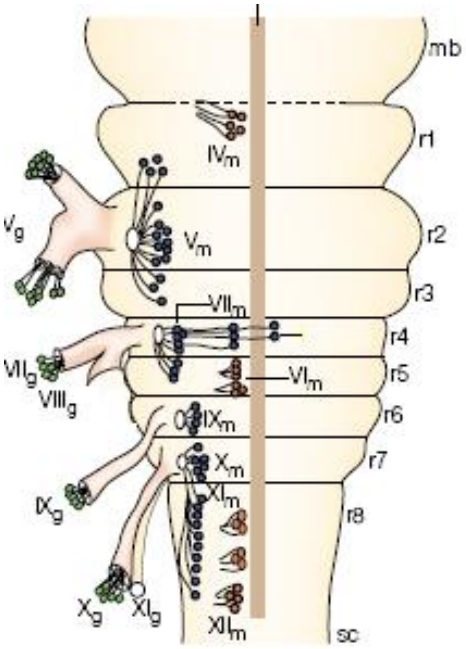
Beynin 12 çift kraniyal siniri, 5- 6. haftalarda gelişimini tamamlayarak baş ve boyundaki motor (*efferent*) ve duyu (*afferent*) sinir donanımlarını (inervasyonunu) düzenlemekle görevlidirler (1). İlk üç KS hariç tüm kraniyal sinirler, rombomerlere yerleşik olan çekirdeklerinden köken alırlar. Kraniyal sinir çekirdekleri, kraniyal sinirlerin aynı işlevi üstlenen liflerine ait hücre gövdelerinin beyin sapında belirli bölgelerde bir araya gelmesi ile oluşan yapılardır. Rombensefalonun gelişimi, fare, tavuk, amfibilerde benzer yapılar ve mekanizmalarla gerçekleşmesine rağmen, kraniyal sinir çekirdeklerinin köken aldığı rombomerler farklılık gösterebilirler. Örneğin tavukta abdusens sinir (KS VI) çekirdeği, r5 ve r6 da yer alırken, farede yalnızca r5 te yer alır (16). Bu farklılığın, rombomer gelişimi sırasında her organizmada farklı genlerin ekspresyonunundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu konudaki çalışmalar, insanlara en çok benzerlik gösteren fareler üzerinde hala devam etmektedir.

Farelerde, farklı embriyolojik gelişim evrelerinde, her bir rombomerde yerleşik kraniyal sinirler görüntülenebilmiştir (16). Şekilde (2-6) 10 günlük fare embriyosunda dorsal yüzünden rombomerlerin, sagital yönünden ise kraniyal sinirlerin yerleşimi görülmektedir.



Şekil 2-6: Fare embriyolarında rombomer ve kraniyal sinir görüntüleri (16'dan)

Fare kraniyal sinirlerinin rombomerlerdeki yerleşimleri Şekil 2-7 de görüldüğü gibidir: KS IV ün çekirdeği ve lifleri *r1* de; KS V in çekirdeği *r2* de, lifleri ise *r1*, *r2* ve *r*3 e yayılmış halde bulunmaktadır. *r3* te herhangi bir kraniyal sinir çekirdeği yer almaz. *r4* te KS VII nin çekirdeği bulunur ve lifleri *r4* ve *r5* e uzanır. *r5* ile *r6* arasında KS VI nın çekirdeği yerleşiktir ve liflerini *r5* e uzatır. *r6* da KS IX un, *r7* de KS X un çekirdeği ve lifleri bulunur. *r7* ile *r8* sınırında KS XI in çekirdeği bulunurken, lifleri *r8* de yer alır. KS XII nin çekirdeği ve lifleri ise *r8* de yerleşik durumdadır (16).



Şekil 2-7: Farelerde rombomerlerden kraniyal sinirlerin çıkışı (16'dan)

Kraniyal sinir lifleri fonksiyonlarına göre 7 tipe ayrılırlar (13) :

1- Genel Somatik Efferent (GSE) lif içeren nöronlar: Beyin sapındaki somatik motor çekirdeklerde (veya medulla spinalis ön boynuzunda) bulunan nöronların çizgili kaslara giden aksonlarıdır. Bütün spinal sinirlerde ve KS III, IV, VI, ve XII. de bulunur.

2- Özel Visseral Efferent (SVE) lif içeren nöronlar: Farinks, larinks, yüzün mimik ve çiğneme kasları gibi embriyolojik olarak brankiyal arktan gelişen kaslara giden liflere bu isim verilir. Bu lifler; KS V, VII, IX, X ve XI. de bulunur.

3- Genel Visseral Efferent (GVE) lif içeren nöronlar: Kalp, iç organ-damar duvarları ve kıl köklerindeki düz kasları, sindirim sistemindeki bezler ve ter bezlerini innerve eden liflerdir. Spinal sinirlerde ve III, VII, IX ve X**.** kraniyal sinirlerde bulunur.

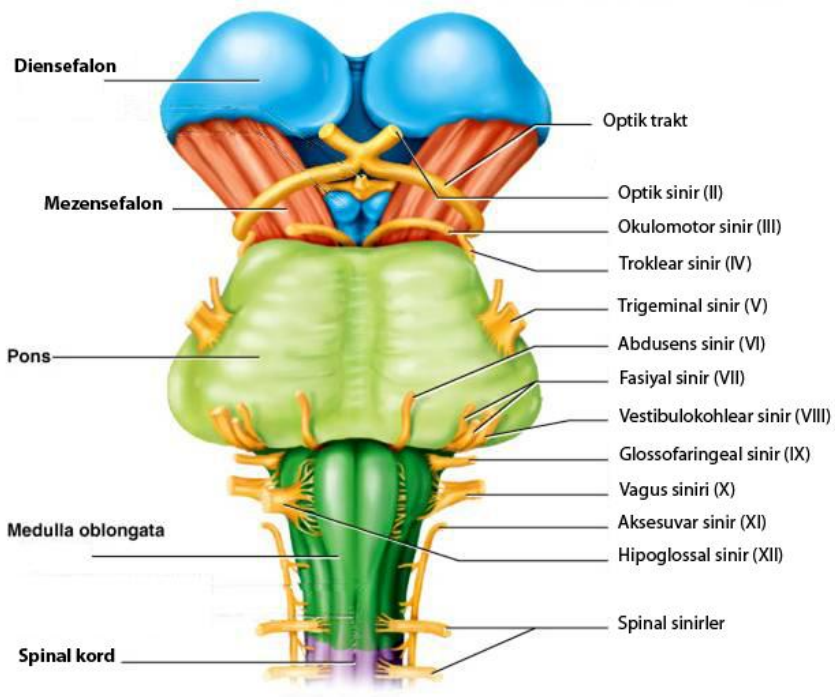
4- Genel Somatik Afferent (GSA) lif içeren nöronlar: Dokunma, basınç, ağrı, ısı gibi genellikle şuura ulaşan duyuyu taşıyan liflerdir. Bütün spinal sinirlerde ve V, VII, IX ve X**.** kraniyal sinirlerde bulunur.

5- Genel Visseral Afferent (GVA) lif içeren nöronlar: Otonom sinir sisteminin kontrolü altında çalışan organ ve yapılardan gelen genel visseral duyuyu taşıyan liflerdir. İç organ duvarlarından, damarlardan ve bez yapılardan ağrı, basınç, açlık, susuzluk, bulantı, tiksinme ve kan basıncı gibi duyuları taşır. Spinal sinirlerde ve VII, IX ve X**.** kraniyal sinirlerde bulunur.

6- Özel Somatik Afferent (SSA) lif içeren nöronlar: İşitme, görme ve denge gibi özel somatik duyuları taşıyan liflerdir. Sadece KS II. ile VIII. de bulunur.

7- Özel Visseral Afferent (SVA) lif içeren nöronlar: Otonom sinir sisteminin kontrolü altında çalışan organ ve yapılardan gelen koku ve tat duyusu gibi özel visseral duyuları taşıyan liflerdir. KS I., VII., IX., X. da bulunur.

Kraniyal sinirler, beynin en üstünden en ucuna doğru çıkış noktalarına göre 1 den 12 ye kadar sırayla isimlendirilmiştir (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Kraniyal sinirler (14'ten)

I. Kraniyal sinir (Olfaktor sinir)

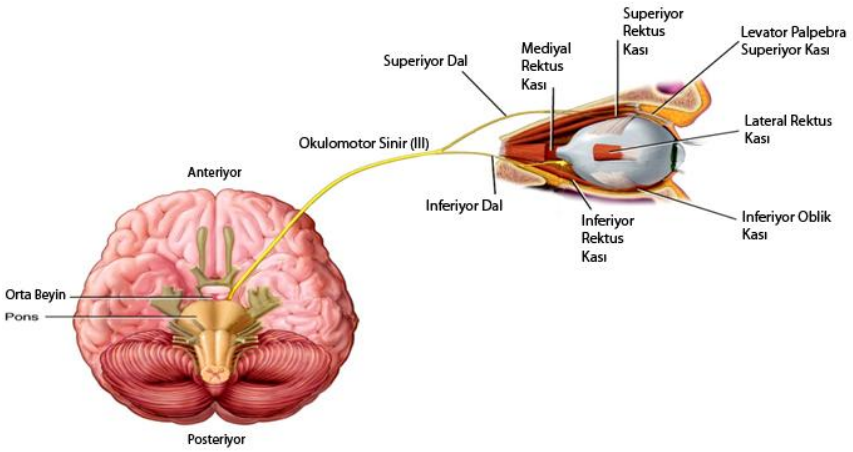
I. kraniyal sinir, çekirdeğinin telensefalonda yer almasından dolayı, tipik bir kraniyal sinir sayılmaz. Özel visseral afferent (SVA) lifler içerir**.** Koku almayı sağlayan sinirdir. Burun boşluğu mukozasından başlayan sinir lifleri etmoid kemikten geçerek *bulbus olfactoriusa* ulaşır. Buradan çıkan aksonlar frontal lobların alt yüzünde *tractus olfactoriusu* oluşturarak arkaya doğru giderler. Koku yollarının anatomik sonlanma bölgesi iyi bilinmemektedir. Genellikle septal bölge ve temporal loba ulaştıkları kabul edilmektedir (1,18,19).

II. Kraniyal sinir (Optik sinir)

II. kraniyal sinir görmeyi sağlayan sinirdir. Özel somatik afferent (SSA) lifler içerir. Retinadaki nöroblastlardan beyine doğru büyüyen bir milyondan fazla sinir lifinden oluşur. Optik sinir, prozensefalonun duvarından geliştiği için beynin bir uzantısı ve sinir yolu olarak kabul edilir (1,18,19).

III. Kraniyal sinir (Okulomotor sinir)

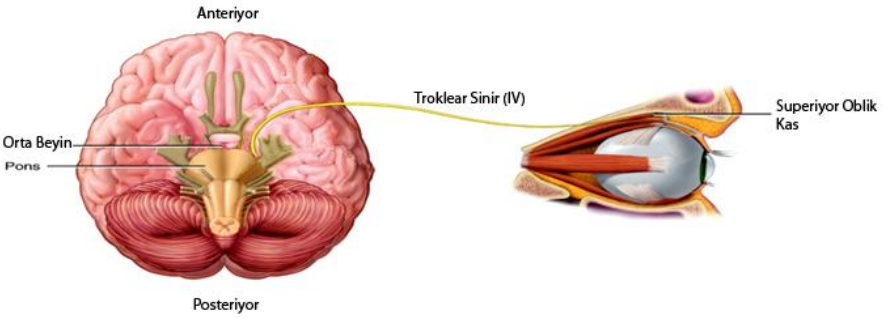
III. kraniyal sinir mezensefalondan gelişen ve genel visseral efferent (GVE) lifleri içeren kraniyal sinirdir. Gözün birçok kası Şekil 2-9 da görüldüğü gibi KS III tarafından innerve edilir.



Şekil 2-9: Okulomotor sinir (17'den)

IV. Kraniyal sinir (Troklear sinir)

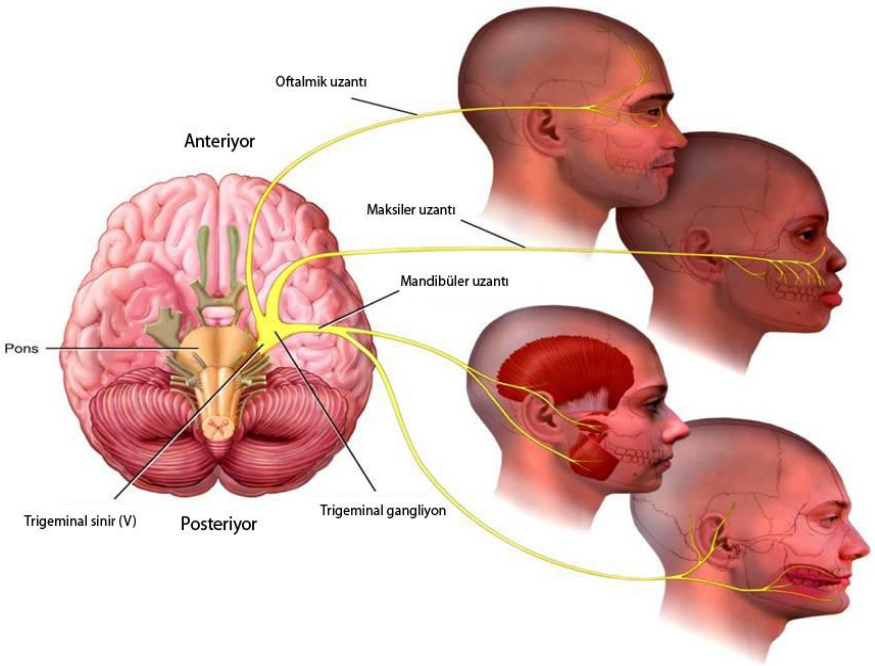
Mezensefalonun arka bölümündeki somatik efferent sinir hücrelerinden oluşur. Bir motor sinir olmasına karşın beyin sapının arkasından çıkarak öne geçer ve gözün superiyor oblik kasını innerve eder (1,19).



Şekil 2-10: Troklear sinir (17'den)

V. Kraniyal sinir (Trigeminal Sinir)

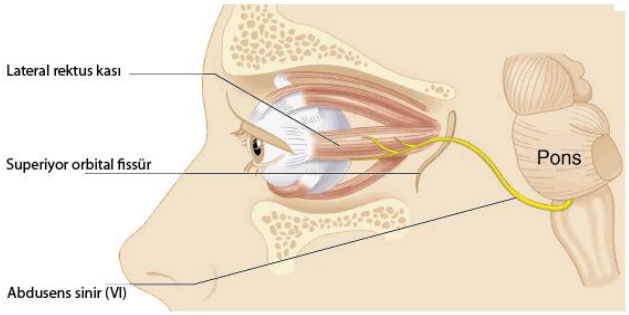
V. kraniyal sinir, hem genel somatik afferent (GSA) hem de özel visseral efferent (SVE) liflerinden oluşan beynin en geniş kraniyal siniridir. Trigeminal sinir çekirdeği, r2 de yerleşiktir. Büyük trigeminal gangliyon ponsun rostral ucunun yanında bulunur ve hücreleri nöral krestin en ön bölümünden kaynaklanır. Gangliyon içindeki nöronların merkezi uzantıları, ponsun lateral kısmına giren V. kraniyal sinirin büyük duysal kökünü oluşturur. Bu gangliyon içindeki nöronların periferik uzantıları Şekil 2-11 de görüldüğü gibi 3 büyük dala ayrılır: Oftalmik, maksiler ve mandibüler. Oftalmik sinir burun, alın, göz kapakları, kornea, iris, göz bebeği ve göz merceğinin sinirlerini oluştururken; maksiler sinir yanak bölgesinde yayılarak, üst dişlerin duyarlılığını sağlar. Mandibüler sinir ise dil ve alt dişlerin duyarlılığını sağlayan lifler ile çiğneme kaslarının düzenli hareket etmesini sağlayan liflerden oluşur (1,19).



Şekil 2-11: Trigeminal sinir (17'den)

VI. Kraniyal Sinir (Abdusens Sinir)

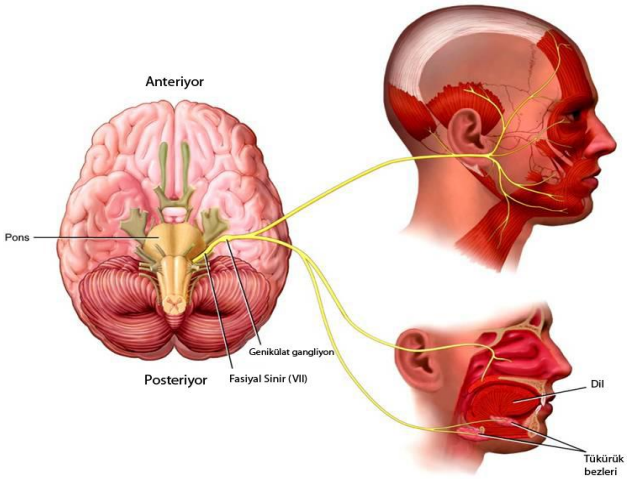
VI. kraniyal sinir, metensefalonun bazal plak sinir hücrelerinden çıkar. Genel somatik efferent (GSE) lifler içerir. Abdusens sinir çekirdeği r5 te yerleşiktir (1,19). Gözün lateral rektus kasını innerve eder (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: Abdusens sinir (17'den)

VII. Kraniyal Sinir (Fasiyal sinir)

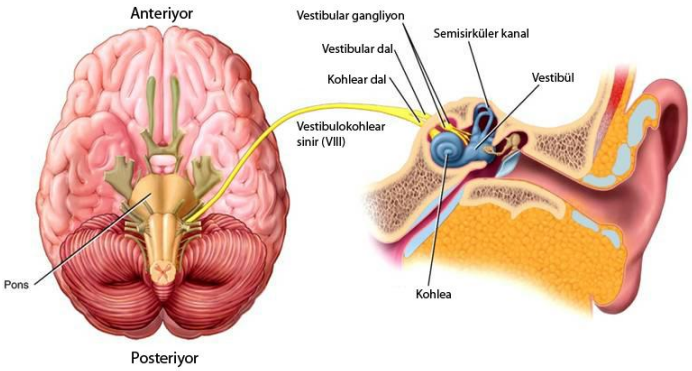
Hem motor hem de duyu lifleri içeren fasiyal sinirin çekirdeği r4 te yerleşik olup, ponsun bazal plağından gelişir. (Şekil 2-13). Ponsun kaudal bölümündeki özel visseral efferent lifleri, yüzün mimik kaslarını innerve ederlerken, duyu lifleri ise dilin ön 2/3 sindeki tat tomurcuklarına ulaşarak tat almada ve tükürük bezlerinin innervasyonunda rol oynarlar (1,18,19).



Şekil 2-13: Fasiyal sinir (17'den)

VIII. Kraniyal sinir (Vestibulokohlear Sinir)

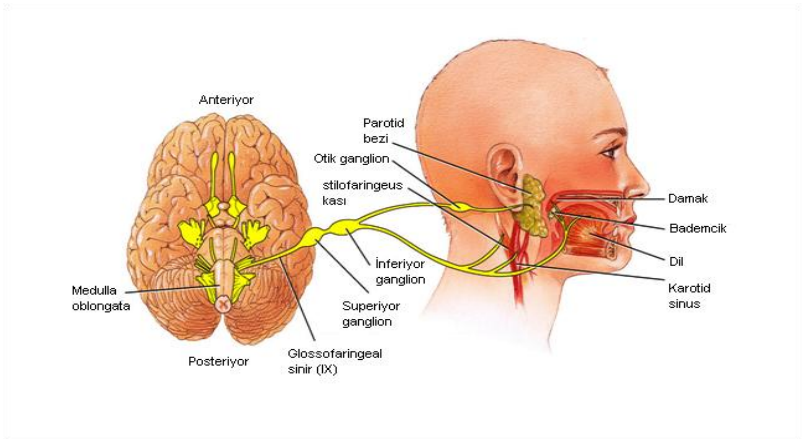
Yalnızca özel somatik afferent (SSA) lifler içeren KS VIII, beynin pons bölümünde yerleşiktir ve iki dala ayrılır (Şekil 2-14): Vestibular sinir, iç kulakta denge ile ilgili impulsları taşırken, kohlear sinir ise duyma ile ilgili impulsları taşır.



Şekil 2-14: Vestibulokohlear Sinir (17'den)

IX. Kraniyal sinir (Glossofaringeal Sinir)

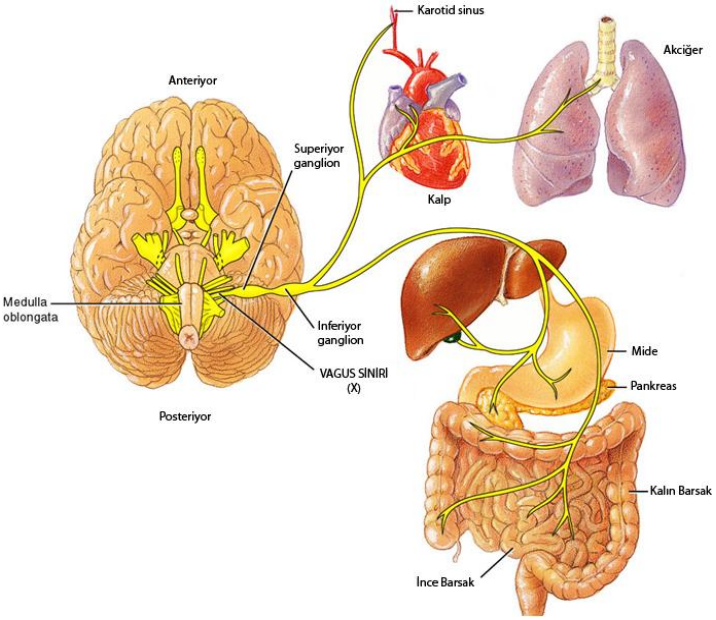
Hem duyu hem de motor sinir lifleri taşıyan IX. kraniyal sinirin çekirdeği medulla oblongatada yer alır (Şekil 2-15). En önemli görevi X. kraniyal sinirle birlikte yutma fonksiyonunu sağlamasıdır. Dilin 1/3 arka kısmının duyusunu ve parotit bezinin sekresyon fonksiyonunu da glossofaringeal sinir sağlar.



Şekil 2-15: Glossofaringeal sinir (17'den)

X. Kraniyal sinir (Vagus Siniri)

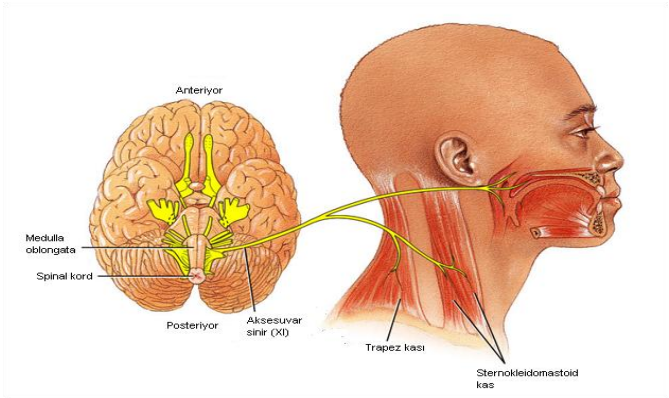
Çekirdeği medulla oblongatada yer alan vagus sinirinin kalp, ön barsak ve ondan köken alan yapılar ile orta barsağın büyük bölümüne yayılan visseral efferent ve visseral afferent lifleri vardır (19). Farinks ve larinks kaslarını da innerve eder (Şekil 2-16).



Şekil 2-16: Vagus siniri (17'den)

XI. Kraniyal Sinir (Aksesuvar Sinir)

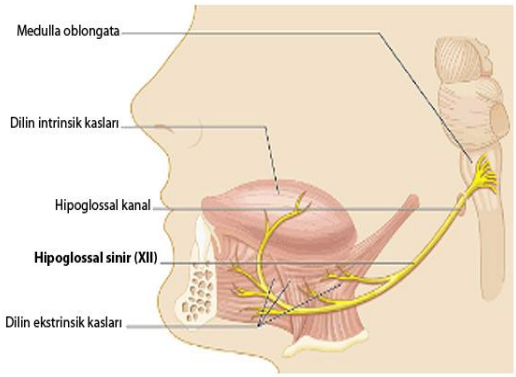
Özel visseral efferent (SVE) lifler içerir (19). Baş hareketlerinde rol oynayan sternokleidomastoid ve trapez kasın üst kısmını innerve eder (Şekil 2-17).



Şekil 2-17: Aksesuvar sinir (17'den)

XII. Kraniyal Sinir (Hipoglossal Sinir)

Genel somatik efferent (GSE) lifler içeren XII. kraniyal sinir, dilin motor siniridir (Şekil 2-18).



Şekil 2-18: Hipoglossal sinir (17'den)

2.2. Moebius Sendromu

2.2.1. Tanımı ve Sıklığı

Moebius sendromu, kardinal bulgusu bilateral konjenital fasiyal displazi olan nörolojik bir sendromdur (20). Konjenital fasiyal displazi ilk defa 1880 yılında Von Graaefe tarafından tanımlanmıştır (21). Daha sonra Paul Julius Moebius (1888), VII. ve VI. kraniyal sinir paralizisinin yol açtığı fasiyal displaziye, çeşitli ekstremite anomalilerinin ve mental retardasyonun (MR) eşlik ettiğine dikkat çekmiş ve bu sendrom Moebius sendromu olarak adlandırılmıştır (22).

Moebius sendromu, bilateral ya da unilateral fasiyal displazinin, yüz kaslarında yol açtığı zayıflık ve dolayısıyla mimiklerde azalma nedeniyle tanısı klinik olarak koyulabilen bir sendromdur (20,21,22,23,24). Olgular doğdukları andan itibaren ifadesiz olan yüz görünümleri nedeniyle maske yüz (*mask-like face)* olarak tanımlanır ve kolaylıkla klinik tanı alabilirler. Tipik olarak görülen KS VII (fasiyal sinir) ve VI (abdusens sinir) nın paralizisine ek olarak (25), diğer kraniyal sinirlerin paralizisleri de görülebilir (26). Paralizise uğrayan kraniyal sinire göre de olguların fenotipleri farklılık

gösterir. Ayrıca Moebius sendromundan etkilenmiş bireylerde, çeşitli ekstremite anomalileri, iskelet-kas güçsüzlüğü ve MR de görülür (22,27,28,29,30).

Moebius sendromu prevelansı 1/1 000 000 dan az olan nadir bir hastalıktır (31). Alman populasyonunda 1996 yılında yapılan bir çalışmada insidansı %0.002 olarak verilmiştir (20). '*Moebius Syndrome Foundation*' ın 2007 yılında yaptığı araştırma sonuçlarına göre dünyada yaklaşık 2000 Moebius sendromlu olgu bulunmaktadır (32).

2.2.2. Kalıtım şekli

Moebius sendromu, sporadik olarak ortaya çıkan bir sendrom olarak kabul edilse de; çeşitli yayınlarda otozomal dominant, otozomal resesif ve X e bağlı resesif kalıtım şekilleri bildirilmektedir (6). Krueger ve Friedrich, 3 kuşağında Moebius sendromu saptanan bir aileye dikkat çekerek otozomal dominant kalıtımın olabileceğini vurgulamıştır (33). Legum ve ark, 2 farklı aile üzerinde etkilenmiş bireylerden yola çıkarak yaptıkları çalışmalarda, ailelerin birinde otozomal dominant, diğerinde ise otozomal resesif kalıtımın olduğunu göstermişler, aile öyküsü olmayan bir olgunun da *de novo* olarak etkilendiğini belirtmişlerdir (34). Ailevi olguların hepsinde fasiyal ve abdusens sinir paralizisi görülmekte, ancak eşlik eden sinir paralizisleri farklılık gösterebilmektedir. Bu durum, Legum ve arkadaşlarına Moebius sendromunun genetik heterojenite gösteren bir sendrom olduğunu düşündürmüştür. Journel ve ark ise erkek çocukları Moebius sendromu tanısı alan iki kız kardeş nedeniyle X e bağlı resesif kalıtımın da görülebileceğini bildirmişlerdir (35).

2.2.3. Klinik Tanı

Moebius sendromundan etkilenmiş tüm bireylerdeki ortak bulgu, fasiyal sinir (KS VII) ve abdusens sinir (KS VI) paralizisinden kaynaklanan bilateral konjenital fasiyal displazidir (6). Yüz kaslarındaki zayıflık sonucunda azalan veya tamamen kaybedilen yüz mimikleri, etkilenmiş bireylerin maske takmış gibi ifadesiz bir yüz görünümüne sahip olmalarına neden olur. Lateral göz hareketlerinin kısıtlanmış olması da abdusens sinir paralizisi sebebiyle çok sık görülür. Olguların klinik bulguları; eşlik eden diğer kraniyal sinir veya sinirlerin paralizisine bağlı olarak da değişiklik gösterir. Fasiyal sinir ve abdusens sinir paralizisini olguların %25 inde görülen hipoglosssal sinir paralizisinin (KS XII) yol açığı dil kaslarındaki zayıflık izler (36,37). Bu durum yeni doğanlarda emme problemlerinin yaşanmasına, ilerideki yıllarda ise çiğneme, yutkunma

ve konuşmada zorluklara yol açmaktadır. Ayrıca okulomotor, troklear, trigeminal, vestibulokohlear ve glossofaringeal sinirlerin paralizisleri de daha nadir olmakla birlikte, çeşitli yayınlarda bildirilmiştir (26,38).

Orofasiyal malformasyonlar, ekstremite ve iskelet-kas anomalileri de klinik tanı kriterleri arasında sayılmaktadır (30). Orofasiyal malformasyonlar arasında *bifid uvula* (küçük dil), hipoplazik ve asimetrik dil, mikroglosi, mikrostomi, mikrognati, çeşitli çene, diş ve kulak anomalileri, aynı zamanda hipertelorizm ve epikantus sayılabilir. *Club foot*, sindaktili, brakidaktili, ektrodaktili ve el-ayak parmaklarının yokluğu, olgularda görülen çeşitli ekstremite anomalilerindendir (6). Sendrom, klinik açıdan gösterdiği bu heterojenlik nedeniyle, farklı gruplar altında sınıflandırılmıştır. Terzis, olguları 3 grup altında toplamıştır (39,40): 'Tam Moebius' olarak isimlendirdiği gruptaki olgular bilateral fasiyal ve abdusens sinir paralizisini bir arada taşırlarken; 'Inkomplet Moebius' grubundaki olgular ise klinik olarak farklı olmamalarına karşın, bazı motor fonksiyonlarını tek taraflı olarak kullanabilmeleriyle 'Tam Moebius' grubundan ayrılırlar. Son olarak da 'Moebius-benzeri' olarak isimlendirdiği bireylerde görülen unilateral fasiyal paralizise, bazen diğer kraniyal sinir paralizislerinin de eşlik edebildiğini bildirmiştir.

Abramson ise sendromu sınıflandırdığı klinik kriterleri, 'CLUFT' akronimi ile tanımlamaya çalışmıştır (36). CLUFT (***c****ranial nevre*, ***l****ower limb*, ***u****pper limb*, ***f****ace* and ***t****horax*) terimi, VII. ve VI. kraniyal sinirlerin tam veya kısmi paralizisi, *club foot*, ankiloz gibi ekstremite anomalileri, yarık damak, mikrognati gibi yüz anomalileri ve pektoral hipoplazi, skolyoz veya diğer göğüs duvarı deformitelerinin tanımlanması için kullanılmıştır.

Klinik bulguların bu çeşitliliğine ilaveten olgularda Moebius sendromuna eşlik eden farklı sendromların varlığına da dikkat çekilmiştir. Pectoralis major kasının yokluğu ve üst ekstremitede değişik deformitelerin görülmesi ile karakterize Poland sendromu, Moebius sendromuna eşlik eden sendromlardan biridir (41,42).

Moebius sendromlu olgularda MR görülme sıklığı ile ilgili çeşitli yayınlarda farklı oranlar verilmektedir. Bu oranlar % 0 ile % 75 arasında değişmektedir (38,43,44,45). Bazı araştırmalar ve olgu sunumları ise Moebius sendromuna eşlik eden otizm spektrum bozukluğunu bildirmektedir. Gillberg ve Steffenburg (46), 17 Moebius sendromlu olgunun 6 sında tipik otistik belirtileri saptarken, Miller ve ark (47) 25

olgunun 6 sında, Johnsson ve ark 25 olgunun 10 ununda saptamışlardır (45). Verzjil ve ark (20) 37 olgunun 2 sinde, Briegel ve ark (48) ise 27 olgunun yalnızca birinde otistik spektrum bozukluğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda oranların değişkenliği, otizm tanı ölçütlerindeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir (49). Ayrıca Moebius sendromlu bireylerin konuşmalarında yaşadıkları zorluklar ve ağlama, gülümseme, sinirlenme gibi duygularını yansıtılamamaları nedeniyle içe kapanık, agresif bireyler olmalarının MR ve otizm değerlendirmesinde yanıltıcı sonuçlara yol açabileceği göz ardı edilmemelidir (49).

Olgulara Moebius sendromu tanısı klinik olarak koyulabilse de, radyolojik görüntüleme teknikleri ile de bu tanı desteklenmelidir. Az sayıda olgu üzerinde yapılan MRI ve CT incelemelerinde pons ve medullanın hipoplazisi, 4. ventrikülde düzleşme, mediyal kollikulus yokluğu, hipoglossal çekirdek hipoplazisi, abdusens çekirdek bölgesinde kalsifikasyon, beyincik hipoplazisi varlığı gösterilmiştir (50,51,52). Pedraza ve ark Moebius sendromu klinik tanısı almış 3 hastanın MRI görüntülerinde, 4. ventrikülde düzleşme ile birlikte, hipoglossal çıkıntının ve mediyal kollikulusun olmadığını saptamışlardır (50). Bu radyolojik sonuçlar, olgulardaki klinik bulguları destekler niteliktedir. Verzjil ve ark ise 6 olgudan 5 inin MRI görüntülerinde KS VII (fasiyal sinir) nin hiç oluşmadığını görmüşlerdir (53). Ayrıca Verzijl çalışmasında, Moebius sendromlu olgularda, beyin sapı hipoplazisinin %32 oranında görüldüğünden bahsederek, sendromu posterior fossa ve rombensefalonun gelişim anomalileri eşliğinde seyreden kompleks konjenital gelişim anomalileri arasında saymıştır. Olgularda çekilen MRI görüntüleri üzerinde yapılan bu çalışmalarda ulaşılan sonuçlar, hastalığın bulguları ve etiyopatogenezi arasındaki bağlantının kurulmasına da yardımcı olabilir.

2.2.4. Etiyolojisi

Moebius sendromunun etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır ancak bu konuda çeşitli görüşler öne sürülmüştür. Towfighi ve ark hastalığın etiyolojisinin aydınlatılmasına yönelik çeşitli patolojik araştırmalar yürütmüşler ve elde ettikleri bulgulara göre olguları dört farklı grup altında toplamışlardır (54);

1. grup: Kraniyal sinir çekirdek aplazisi veya hipoplazisi saptanan olgular,

2. grup: Periferal ve kraniyal sinir çekirdeklerinin dejenerasyonu saptanan olgular,

3. grup: Kraniyal sinir çekirdeklerinde nekroz, gliyoz veya kalsifikasyon görülen olgular,

4. grup: Beyin sapı veya kraniyal sinirlerde herhangi bir lezyon görülmeyen, ancak yüz kaslarında miyopatik bir hastalığın olduğu düşünülen olgular.

Towfighi ve arkadaşlarının, bu gruplardan yola çıkarak hastalığın etiyolojisi ile ilgili sunduğu görüşlerden biri, fetal gelişimin erken evresinde kraniyal sinir çekirdeğinde veya periferal sinirlerde damarlanma yetersizliğine yol açabilecek herhangi bir hipoksik/iskemik durumun Moebius sendromuna yol açabileceği görüşüdür. Kraniyal sinir çekirdeklerinin gelişimi sırasında çevre damarların yetersiz gelişimi, kan akımında azalmaya, dolayısıyla aplazi veya hipoplaziye yol açmaktadır. Vasküler yetersizlik, çeşitli teratojenik olayların etkisinde gelişebilir. Özellikle embriyolojik gelişimin erken evrelerinde misoprostol, prostaglandin-E1 analoğu ve diğer teratojenik maddelerin kullanımı, vasküler yetersizliğe yol açarak Moebius sendromunun ortaya çıkmasına neden olur. Erken embriyolojik dönemde görülen vasküler yetersizlik nedeniyle bazı araştırmacılar Moebius sendromunu subklaviyan disrupsiyon (*subclavian distruption*) sendromu olarak da isimlendirmişlerdir (55,56).

Towfighi nin sunduğu bir diğer görüş ise, vasküler gelişimin normal olmasına rağmen, serebral gelişimin kritik bir anında kan akımında görülen azalmanın, hipoksik bir lezyona neden olarak kraniyal sinir çekirdeklerinin dejenerasyonuna yol açabilmesidir. Bu etiyoloji, aynı zamanda Moebius sendromlu olgularda görülen iskelet anomalilerinin açıklanmasında da aydınlatıcı bir görüş olarak kabul edilmektedir (54).

Kraniyal sinirlerin gelişimi sırasında meydana gelen nörogenez ve anjiyogenez olayları, genetik etmenlerin etkisi altında gerçekleştiğinden, hastalığın etiyolojisi ile ilgili olarak multifaktöriyel teriminin kullanılmasının daha doğru olacağı kabul edilmiştir (57). Yapılan sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalar da hastalığın etiyolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlamaktadır.

Moebius sendromlu olgularda yapılan sitogenetik çalışmalarda elde edilen sonuçlar, hastalıkla ilgili gen veya genlerin lokalizasyonuyla ilgili bazı ipuçları vermiştir. Ziter ve ark (58) 3 jenerasyonda Moebius sendromundan etkilenmiş 7 bireyi bulunan bir ailede yaptıkları sitogenetik incelemelerde etkilenmemiş tüm bireylerde karyotipin normal olduğunu, etkilenmiş bireylerde ise, kırık noktaları 1p34 ve 13q13 olan dengeli bir resiprokal translokasyonun varlığını göstermişler, etkilenmiş tüm

bireylerde görülen translokasyonun kırık noktalarında oluşmuş mikrodelesyonun Moebius sendromu ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Slee ve ark (59) Moebius sendromlu bir kız olguda yaptıkları karyotip analizinde, 13q12.2 bandında saptadıkları delesyon, 13. kromozom üzerinde aynı bölgeye işaret eden 2. olgu olmuştur. Bu sitogenetik bulgular bu bölgedeki genlerin moleküler düzeyde daha yoğun araştırılmasına neden olmuştur.

Tıbbi Genetik Anabilim Dalımızda klinik olarak Moebius sendromu tanısı almış 19 olgu, sitogenetik ve 13q12.11-13q12 bölgesi için moleküler genetik testlerle değerlendirilmiştir. Karyotip analizinde, 18 olguda normal kromozom yapısı saptanırken bir olguda mozaik 46,XX/47,XXX karyotipi saptanmıştı. Olgu, anne ve babada yapılan iki çalışmadan birinde 13q12.11-13q12 bölgesinde yer alan 57 STR (*Short Tandem Repeat*) markörü ile haplotip analizi yapılmış, bu bölgeler için olası mikrodelesyonlar dışlanmış, ayrıca *FGF9, GSH1, CDX2* genleri dizileme ile incelenmiş ancak herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (60). Ayrıca kraniyal sinir gelişiminde rolü olduğu fare modelleri ile gösterilen 5p15.1-p15.2 de lokalize *BASP1* geni ile, bu genin transkripsiyonunda rol oynayan ve kodlama yapmayan RNA oluşturan *TPΨg-BASP1* pseudogeni de dizileme yöntemi ile incelenmiş ve 19 olguda bu genler dışlanmıştır (61).

Donahue ve ark Moebius-Poland sendromlu bir olguda 1p22 ve 11p13 noktaları arasında dengeli bir resiprokal translokasyon saptamışlardır (62). Nishikawa ve ark ise anne ve babası normal karyotipe sahip Moebius-like sendromu tanısı almış bir olguda yaptıkları sitogenetik çalışmalarda 1p22 ve 2q21.1 noktaları arasında resiprokal translokasyon olduğunu göstermişlerdir (63). Bu iki çalışma, ortak kırık noktası olan 1p22 de yerleşik gen veya genlerin Moebius sendromu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Kremer ve ark sayısal veya yapısal bir kromozom anomalisi bulunmayan, Moebius sendromundan etkilenmiş 20 bireyin bulunduğu 5 kuşaklı bir ailede, yaptıkları bağlantı analizi çalışmaları sonucu 3q21–q25.2 noktalarına yönelmişlerdir (64). Bu bölgede bulunan 25 genin ekspresyon paternleri ile ilgili yeterli bilginin olmaması, aday gen seçiminin embriyolojik gelişimde rol aldığı düşünülen 4 gen üzerinde yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Bu genler *ZNF9, CRBP1, CRBP2* ve *PBX2* dir. Bağlantı analizi için kullanılan polimorfik markerlara en yakın bölgede yer alan *CRBP1* geni üzerinde yapılan SSCP mutasyon analiz taramasında hiçbir mutasyona

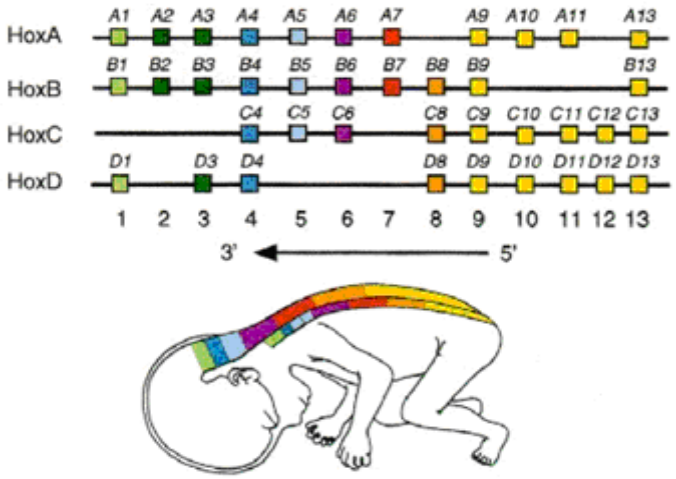
rastlanmamıştır. Kremer ve ark 3q21–q25.2 bölgesini, kraniyofasiyal gelişim malformasyonlarıyla birlikte seyreden Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus-Inversus Sendromu (BPES) için lokalize edilen 3q23 bölgesini içermesinden dolayı, Moebius sendromu için kritik bir bölge olarak tanımlamışlardır. Daha sonraki yıllarda 3q21-q22 de yer alan *PGT* (*SLC21A2*) geni ve r4 ün ile KS VII nin gelişimde rol oynayan G*ATA2* geninde yapılan dizi analizlerinde de mutasyona rastlanmamıştır (65). Kremer ve ark, bağlantı analizi çalışmalarını 19 u etkilenmiş 56 bireyden oluşan ve otozomal dominant kalıtım ile uyumlu bir başka aile üzerinde sürdürmüşlerdir (66). Herhangi bir sayısal ya da yapısal kromozom anomalisi olmayan bireylerde yaptıkları genom boyu bağlantı analizi ile 10q21 bölgesine bağlantı saptamışlar, aday gen olarak *EGR2* genini, farelerde rombomer 3 ve 5 in, dolayısıyla kraniyal sinir çekirdeği V, VI, VII ve IX un gelişiminde rol oynayan *KROX-20* geninin ortoloğu olması nedeniyle seçmişler ve dizi analizi sonucunda herhangi bir mutasyona rastlamamışlardır. Ayrıca daha önce *EGR2* geninde, Konjenital Hipomiyelinizasyon Nöropatisi (CHN) ve Charcot-Marie-Tooth tip 1 sendromuna yol açan mutasyonlar gösterilmiş olduğundan, Moebius sendromu ile allelik heterojenite olabileceği de düşünülmüştür.

Tüm bu sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalara karşın günümüzde halen ilişkili bir genin gösterilememiş olması, Moebius sendromunun yüksek genetik heterojenitesine işaret etmektedir.

2.2.5. Moebius Sendromu İle İlişkili Olabilecek Aday Genler

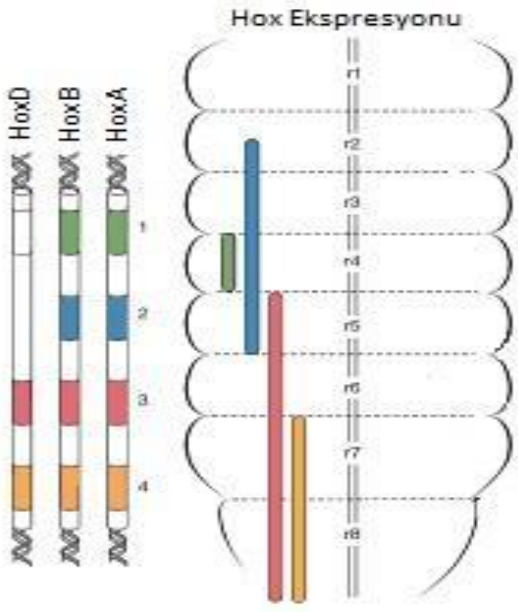
2.2.5.1. HOX Genleri

1983 te keşfedilen Homeobox genlerinin bir alt grubu olan *HOX* genleri, çeşitli türler arasında yapı ve işlev bakımından benzerlik göstermeleri nedeniyle, türler arasında korunmuş genler olarak kabul edilmektedir (7). İlk defa Drosophila da keşfedilen *HOX* genleri, gen kümeleri şeklinde farklı kromozomlarda bulunurlar. Memelilerde bulunan 4 farklı *HOX* gen kümesi ve içerdikleri 39 gen, memeli vücutlarının anteroposteriyor eksen gelişiminde görevli genlerin ekspresyonlarını düzenleyerek, vücut planlarının yapılandırılmasında önemli role sahiptir. *HOX* gen kümeleri, içerdikleri genler ve ekspresyon paternleri Şekil 2-19 da görülmektedir.



Şekil 2-19: *HOX* genleri ve anteroposteriyor eksen boyunca ekspresyon paternleri

Her *HOX* kümesinin ilk 4 geni, merkezi sinir sisteminin beyin bölgesinin gelişiminde etkili iken, 4-13 arasındakiler omurilik gelişiminde görev yapar. Beyin gelişiminde ekspresyonu görülen 12 *HOX* geninden, *HOXD1* ve *HOXC4* genlerinin ekspresyonu, rombensefalon gelişiminde görülmez. Kesin sınırlar göstermemekle birlikte, rombensefalon segmentlerinin oluşumunda *HOX* genlerinin ekspresyonları Şekil 2-20 de gösterilmektedir (7):



Şekil 2-20: Rombomerlerde eksprese edilen *HOX* genleri (7'den)

Kraniyal sinir çekirdeklerinin rombomerlerde yerleşik olmalarından dolayı, rombomer gelişimi sırasında ekspresyonu görülen bu genlerin, kraniyal sinirlerin oluşumuna da etki edeceği düşünüldüğünden, farelerdeki çalışmalar bu genler üzerinde yoğunlaşmaktadır.

HOXA1 geni, rombomerleri oluşturacak hücrelerin hangi pozisyona doğru göç edeceklerinin belirlenmesinde önemli role sahiptir. Lufkin ve ark yaptıkları bir çalışmada, *HOXA1* geninde heterozigot mutasyona (*HOXA1*$^{-/+}$) sahip farelerin normal beyin gelişimine sahip olduklarını, ancak homozigot mutasyona (*HOXA1*$^{-/-}$) sahip olanlarda 7 yerine 5 rombomerin geliştiğini belirtmişlerdir (67). Bu farelerde r5 kısmi olarak oluşur veya hiç oluşmazken, r4 normalden daha küçük yapıya sahiptir. r4 ve r5 ten köken alan fasiyal ve abdusens kraniyal sinir çekirdekleri de oluşmamış, ancak glossofaringeal (IX), vagus (X), troklear (IV), hipoglossal (XII) ve trigeminal (V) sinir çekirdekleri etkilenmemiştir. Moebius sendromu tanısı almış bireylerde en çok etkilenen kraniyal sinirlerin KS VII (fasiyal sinir) ve KS VI (abdusens sinir) olması nedeniyle çalışmamızda inceleyeceğimiz ilk gen *HOXA1* olmaktadır.

Chisaka ve ark *HOXA1* homozigot mutasyona sahip olan farelerin doğduktan sonra en fazla 2 gün yaşayabildiklerini, ama çoğunun anoksi nedeniyle ilk gün öldüğünü gözlemlemişler ve *HOXA1* genindeki mutasyonların, rombensefalon gelişiminde solunumla ilgili bölgenin etkilenmesine sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir (68). Bu çalışma ayrıca homozigot *HOXA1* mutasyonunun yanında *HOXA2* geninde heterozigot mutasyon taşıyan farelerin en fazla 30 dakika nefes alabildiklerini, her iki gende de homozigot mutasyon taşıyanların ise hiç nefes alamadan hemen öldüklerini göstermiştir (67,68). *HOXA2* mutasyonlarının *HOXA1* mutasyonlarına eşlik etmesinin beyinde solunumla ilgili daha fazla bölgenin etkilenmesine neden olması ile açıklanmaya çalışılsa da *HOXA2* geninin solunumla ilgili hangi bölgeyi etkilediği henüz bilinmemektedir (69).

HOXA2 geni, rombomer 2 de eksprese olan tek gendir. Yapılan çalışmalarda *HOXA2* de homozigot mutasyona sahip farelerde r1 ile r2 arasındaki sınırın kaybolarak r1 in genişlediğini gözlemlenmiştir (70,71). Dış kulak gelişiminde önemli rol oynayan birinci brankiyal arkın oluşumunda da *HOXA2* nin rolü vardır. *HOXA2* homozigot mutasyonu olan farelerde (*HOXA2*$^{-/-}$) kulak kepçesinin oluşumunda anormallikler görülmüştür. Bu farelerde r2 den çıkan motor sinirler kaudal tarafa doğru yönelir ve r4

ten çıkış yaparlar; r1, r2 ve r3 arasındaki sınır ise kaybolmuştur. *HOXA1*$^{-/-}$ / *HOXA2*$^{+/-}$ mutasyonlarına sahip farelerde kulak kepçesinde küçülmeler gözükürken, *HOXA1*$^{-/-}$ / *HOXA2*$^{-/-}$ mutasyonlarına sahip farelerde kulak kepçesinin oluşumu hiç olmamaktadır (70,71).

HOXB1 geninde ilginç olarak *knock-out* farelerde rombomerlerin organizasyonunda herhangi bir farklılık gözlenmemiş, sadece r4 teki nöronların gelişiminde bir farklılık göze çarpmıştır. Goddard ve ark (8) iki farklı homozigot mutasyona sahip fare grubunda yaptıkları çalışmalarda farelerde rombomerik segmentasyonun normal olduğunu, ancak r4 te yer alan KS VII nin çekirdeğinin, dolayısıyla gelişiminin olmadığını belirtmişlerdir. Diğer dokularda ve 2.brankiyal arkın oluşumunda bir anormallik gözükmemesi, *HOXB1* in KS VII nin somatik motor nöronlarının oluşumunda primer rolünün bulunmasıyla açıklanmıştır. KS VII nin oluşmaması, farelerin yüz kaslarında paralizislere yol açarak insanlarda görülen Moebius sendromuna benzer bir fenotipin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Ancak bu farelerde, dilin ön 2/3 ündeki tat alma duyusunun kaybolmaması da ilginç bir bulgu olmuştur.

HOXA1 geni ile karşılaştırıldığında *HOXB1* genindeki mutasyonların rombomer oluşumunda bir farklılığa yol açmaması, bu iki genin farklı roller oynadığını gösterse de rombensefalon gelişiminin ilk aşamalarında her iki gen de benzer rollere sahiptir. Her iki genin birbirleri ile örtüşen fonksiyonları vardır. *HOXA1* geninde meydana gelen herhangi bir mutasyon, *HOXB1* in ekspresyonunun da anteriyor bölgede etkilenmesine yol açar. *HOXA1/HOXB1* homozigot mutasyonuna sahip embriyolarda r5 ve r4 ün oluşmaması, aynı zamanda 2. brankiyal arkında oluşumunu da etkilemektedir (72).

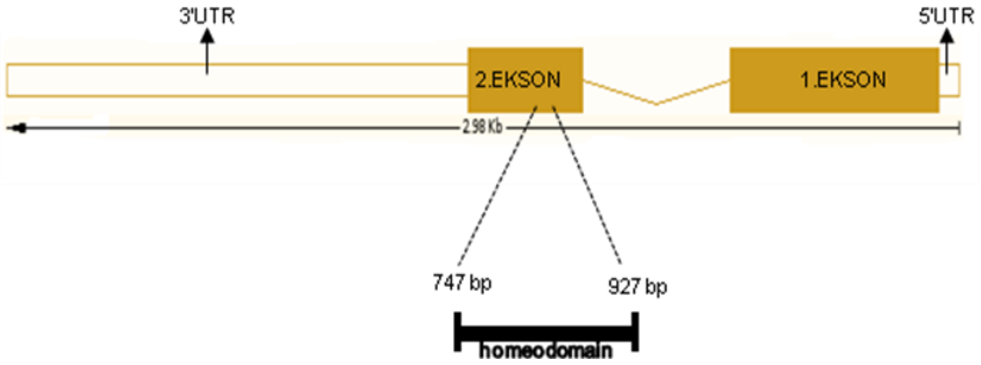
1996 yılında Jeffrey ve ark *HOXB2* geni ile ilgili çalışmalar yapmışlardır (9). *HOXB2* homozigot mutasyonuna sahip farelerde *HOXB1* homozigot mutasyonuna sahip farelere benzer fakat daha ağır olan yüz paralizisleri görülmüştür. Bu fareler, burunlarını ve kulaklarını oynatamamanın yanı sıra, gözlerini kapayamamaktadır. *HOXB2* homozigot mutasyonu taşıyanların % 75 i sternal defektleri sebebiyle solunum sıkıntısı yaşamalarından dolayı ilk 24 saat içerisinde ölmüşler, geri kalanlar ise en fazla 25 gün yaşayabilmişlerdir. *HOXB1* homozigot mutasyonlara sahip farelerde olduğu gibi, r4 te KS VII nin çekirdeği de gözlenememiştir. Bu durum KS VII nin gelişimini de etkilemiş ve farelerde görülen fasiyal paralizislerin nedenini açıklamayı kolaylaştırmıştır.

Goddard ve ark homozigot *HOXB1* mutantlarında *HOXB1* proteininin olmadığını, *HOXB2* ekspresyonunun ise normal olduğunu belirtirken (8), Jeffrey ve ark ları homozigot *HOXB2* mutantlarında *HOXB1* ekspresyonunun başlangıçta normal iken, hızlı bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir (9). Ekspresyon çalışmaları r4 te *HOXB1* proteinin olmadığını göstermiş, bu sonuç *HOXB2* mutantlarında görülen yüz paralizislerinin *HOXB1* proteininin olmamasından kaynaklandığını düşündürmüştür. Goddard ın sonuçları ile birlikte düşünüldüğünde, farelerde görülen fasiyal paralizise neden olarak *HOXB1* proteinin olmaması gösterilebilir. Ancak fasiyal defektlerin *HOXB2* mutantlarında daha ağır görülmesi, KS VII nin gelişiminde *HOXB2* nin de rolünün olduğunun göstergesidir. Bu çalışmalar, *HOXB1* ile *HOXB2* genlerinin örtüşen fonksiyonlara sahip olduğunu kanıtlar niteliktedir. Yine aynı çalışma içerisinde *HOXB1*/*HOXB2* heterozigot mutasyona sahip farelerde, tek bir normal *HOXB2* alelinin bulunması, farelerde sağlıklı sternum gelişimini sağlamıştır.

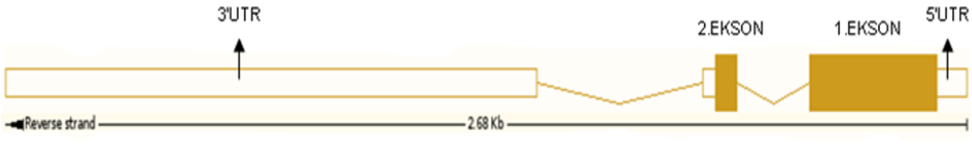
HOXB2 ve *HOXA2* gen mutasyonlarının sonuçları karşılaştırıldığında, benzerlik göstermedikleri de görülür. 2. brankiyal arkın ve buradan gelişecek yapıların etkilenmesinin, yalnızca *HOXA2* geninin ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

2.2.5.1.1.HOXA1 Geni

HOXA1 geni 7p15.3 te lokalize ve yüksek oranda korunmuş diziye sahip bir gendir. Birinci eksonun iki farklı kırpılma biçimi olduğundan, iki transkript varyantı vardır. Bunlar sırasıyla 335 ve 137 aminoasitten oluşan (NM_005522.4, NM_153620.2) yapılardır (Şekil 2-21, Şekil 2-22). Homeobox domaini içeren transkripti, 2 ekson ve 2517 baz çiftinden oluşur; 747. baz ile 927. baz arasındaki bölge homeobox domaini içeren kısmıdır.



Şekil 2-21: *HOXA1* geni NM_005522.4 transkripti (73'den).



Şekil 2-22: *HOXA1* geni NM_153620.2 transkripti (73'den).

HOXA1 proteini, solunumla ilgili yapıların gelişiminde görevli transkripsiyon faktörü olarak görev yapmanın yanı sıra, anteroposteriyor gelişim paterninin de oluşumunda rol alır.

HOXA1 geninde meydana gelen homozigot mutasyonların, Athabaskan Beyinkökü Disgenezi (*Athabaskan brainstem dysgenesis*) Sendromu (ABDS) ve Bosley-Salih-Alorainy Sendromu (BSAS) na yol açtığı bildirilmektedir (74,75). ABDS, otozomal resesif kalıtım gösteren, konjenital sağırlık, kardiyak anomaliler, hipoventilasyon, oküler paralizisi ve gelişim geriliği ile karakterize bir sendromdur (6). BSAS ise bilateral Duane sendromu, konjenital sağırlık, dış kulak anomalileri ve otizm ile kendini gösterir (6). Allelik heterojenite sonucu *HOXA1* geninin neden olduğu bu iki sendromun klinik bulguları, Moebius sendromu ile örtüşmekte ancak Moebius sendromunda hipoventilasyon ve konjenital sağırlığın görülmemesi önemli bir farklılık olmaktadır. Tischfield ve ark BSAS ve *HOXA1*$^{-/-}$ fare fenotipinin ABDS de örtüştüğünü belirtmişlerdir (74). Bu görüşü destekleyen bulgular BSAS olgularında santral hipoventilasyon ve fasiyal paralizis görülmemesine karşın, tüm ABDS olgularında ve *HOXA1*$^{-/-}$ farelerde bu bulguların göze çarpmasıdır. Görülen bu fasiyal paralizise rağmen, KS VII nin etkilenmemiş olması, ABDS yi Moebius sendromundan ayıran en önemli özelliktir. Bu klinik benzerlikler nedeniyle, Moebius sendromunun da *HOXA1*

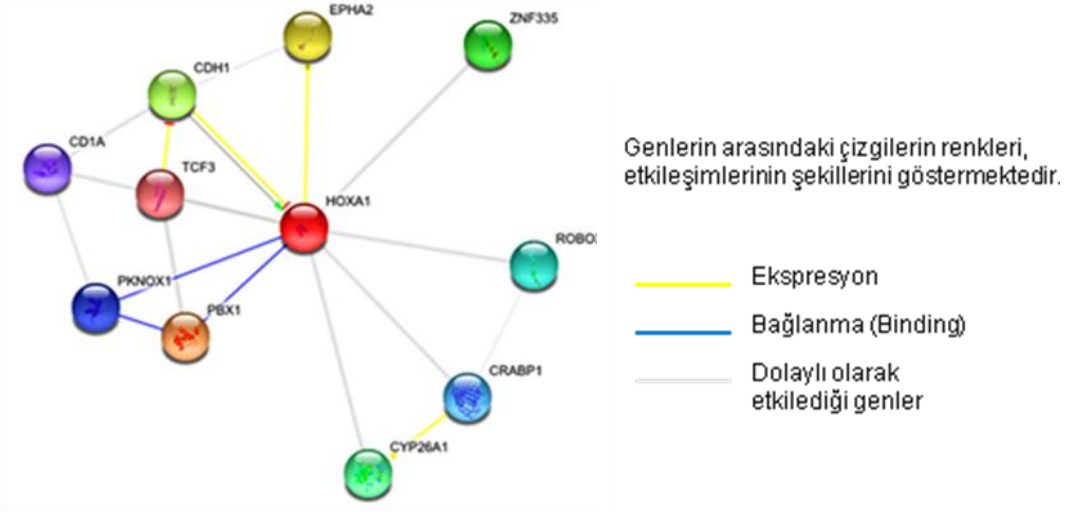
geni ile ilişkili olabileceğini düşünen Rankin ve ark 40 olguda *HOXA1* genini dizileme yöntemi ile incelemişler, ancak polimorfizmler dışında herhangi bir değişime rastlamamışlardır (76). Bu çalışma, klinik benzerlikler nedeniyle *HOXA1* geni ile ilişkili sendromlar arasında sayılabileceği düşünülen Moebius sendromunun bu grup içinde incelenemeyeceğini göstermiştir.

"*Biobase Human Genome Professional 2011.1*" (BIOBASE) veritabanında (77), insanlarda *HOXA1* geninde Athabaskan Beyinkökü Disgenezi Sendromuna neden olan üç homozigot mutasyon bildirilmektedir. Bu mutasyonlar homoebox bölgesi dışında yer almakta olup ikisi erken dur kodonuna (rs104894018 ve rs104894017) biri çerçeve kaymasına neden olmaktadır [NM_00552.4 e ve NP_005513.1 e göre sırasıyla c.76C>T (p.Arg26Term), c.84 C>G (p.Tyr28Term) ve c.175dupG]. Bu gende Bosley-Salih-Alorainy Sendromuna neden olan bir homozigot delesyon mutasyonu (c.185delG) tanımlanmış olup bu mutasyon da homebox bölgesi dışında yer almaktadır.

"*National Center for Biotechnology Information*" (NCBI) (78) veritabanına göre *HOXA1* geninde 30 adet SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) tanımlanmıştır. Bu SNP lerden altısı yanlış anlamlı değişime neden olmaktadır. Bu altı polimorfizmden sadece biri (rs41311763; c.797T>C; p.Leu266Pro) Homeobox domaininde yer almakta olup popülasyon sıklığı konusunda herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Veritabanında bu değişimin 48 CEPH (*Centre de'Etude du Polymorphism Humain*/İnsan Polimorfizm Çalışma Merkezi) örneği üzerinde polimorfizm taraması yapılan bir incelemede heterozigot olarak saptandığı belirtilmektedir. *HOXA1* genindeki mutasyonlar resesif konumda klinik etki gösterdiğinden değişimi heterozigot taşıyan bireylerin sağlıklı olması beklenen bir durumdur. HOXA1 polipeptid zincirinde, yan-zincir polaritesi non-polar ve yükü nötral olan lösin aynı gruptan proline dönüşmüş olmasına karşın, Homeobox bölgelerinin evrimsel olarak çok korunan yapılar olması, bu değişimin de yüksek olasılıkla homozigot ya da Homeobox bölgede bir başka mutasyonla birleşik heterozigot konumunda olması durumunda, klinik etki göstereceği yüksek olasılıkla düşünülmektedir. Bu görüşe ilave olarak, insanlardaki yanlış anlamlı değişimlerin patolojik olup olmadıklarını sanal ortamda değerlendirmeye yarıyan POLYPHEN-2 (79) programı ile incelendiğinde de bu değişimin patolojik olacağı yönünde sonuç elde edilmektedir.

Homeobox domaini dışında kalan ve yanlış anlamlı değişime yol açan bir diğer polimorfizm (rs10951154; c.218A>G; p.His73Arg) otizm spektrum bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, bu polimorfizmin, otizm yatkınlığını yükselttiği bildirilmiş (80), ancak ardından yapılan araştırmalar bu görüşü destekler nitelikte olmamıştır (81). Otizm tanılı bir grup İtalyan olguda, bu polimorfizmin sıklığının % 12, kontrol grubunda ise % 15.5 olarak bulunması, *HOXA1* geni ile otizm yatkınlığı arasında bir ilişki bulunmadığını gösteren çalışmalardan birine örnektir (82).

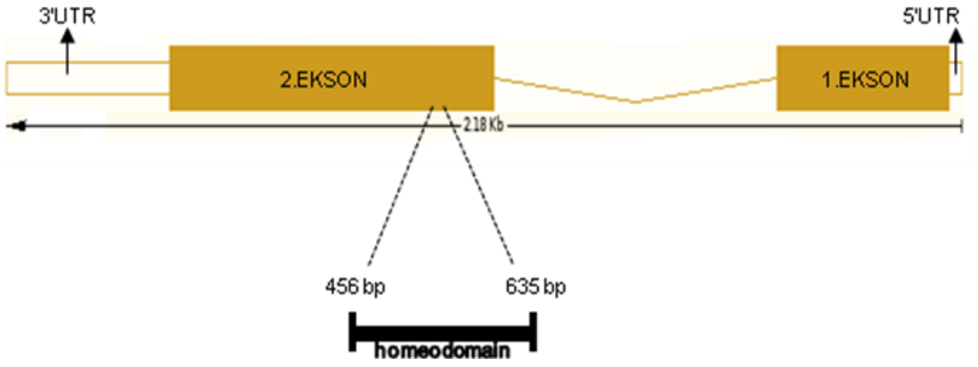
'STRING Version 9.0' (83) veritabanında *HOXA1* geninin primer olarak etkileşim içinde olduğu genler aşağıdaki biçimde şematize edilmiştir (Şekil 2-23).



Şekil 2-23: STRING veritabanına göre *HOXA1* geninin fonksiyonel ve biyolojik ilişkide olabileceği diğer genler (83'den).

2.2.5.1.2.HOXA2 Geni

HOXA2 geni 7p15.22 de lokalize ve yüksek oranda korunmuş diziye sahip bir gendir. 1532 baz çiftinden oluşan tek bir transkripti vardır (NM_006735.3). Bu transkript, Şekil 2-24 te görüldüğü gibi içerdiği 2 ekson ile 376 aminoasit kodlamaktadır (73,78).

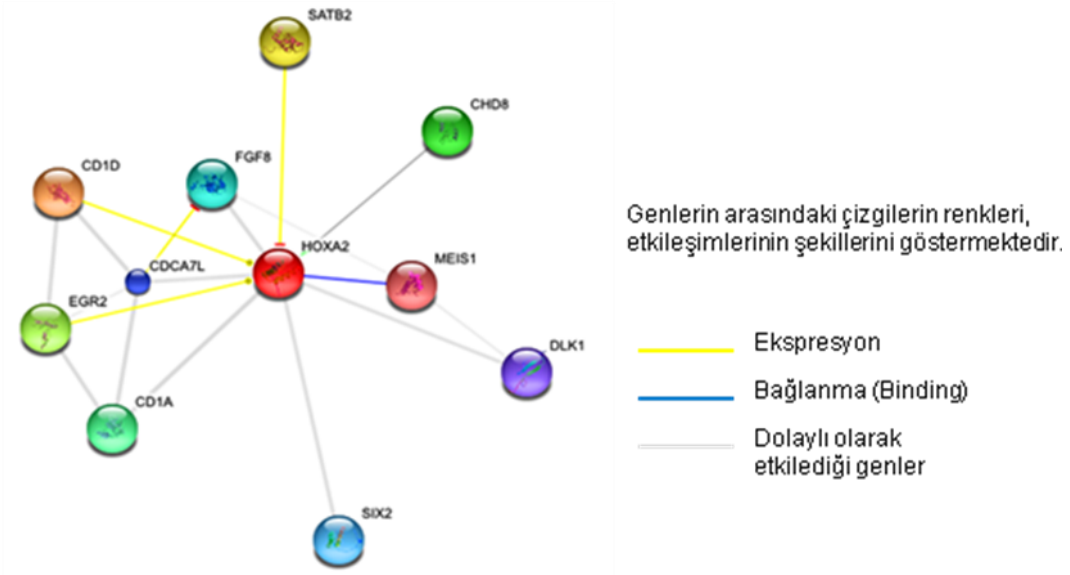


Şekil 2-24: *HOXA2* geni (NM_006735.3) (73'den).

Günümüzde *HOXA2* geninde tanımlanan tek mutasyon homoebox domaininde yer alan homozigot c.556C>A (rs119489104; NP_006726.1 e göre p.Gln186Lys,) olup küçük kulak (mikrotia), duyma problemleri ve yarık damak ile kendini gösteren bir fenotipe yol açtığı bildirilmektedir (84).

HOXA2 geninde, NCBI veritabanına göre tanımlanmış 17 adet SNP bulunmaktadır. Bunlardan ikisi 3' UTR (*Untranslated Region*) bölgesinde, beşi ekson 2 de, dokuzu intron 1 de ve biri ise 5' UTR de yer almaktadır. Bu gende yanlış anlamlı değişime yol açan dört polimorfizm tanımlanmış olup bunlardan birinin (rs941002; c.586A>T; p.Met196Leu) Homeobox domaininde yer aldığı görülmektedir. Bu değişimin popülasyon sıklığı konusunda herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

HOXA2 geni de diğer *HOX* genleri gibi transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. *STRING* (83) veritabanında *HOXA2* geninin primer olarak etkileşim içinde olduğu genler aşağıdaki biçimde şematize edilmiştir (Şekil 2-25).



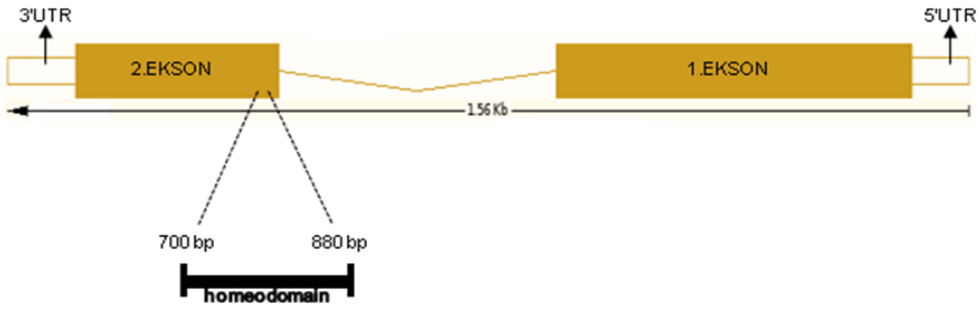
Şekil 2-25: STRING veritabanına göre *HOXA2* geninin fonksiyonel ve biyolojik ilişkide olabileceği diğer genler (83'den).

2.2.5.1.3.*HOXB1* Geni

HOXB1 geni 17q21.3 te lokalize ve yüksek oranda korunmuş diziye sahip bir gendir. 1111 baz çiftinden oluşan tek bir transkripti vardır (NM_002144.3). Bu transkript, içerdiği 2 ekson ile 301 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (73,78). (Şekil 2-26).

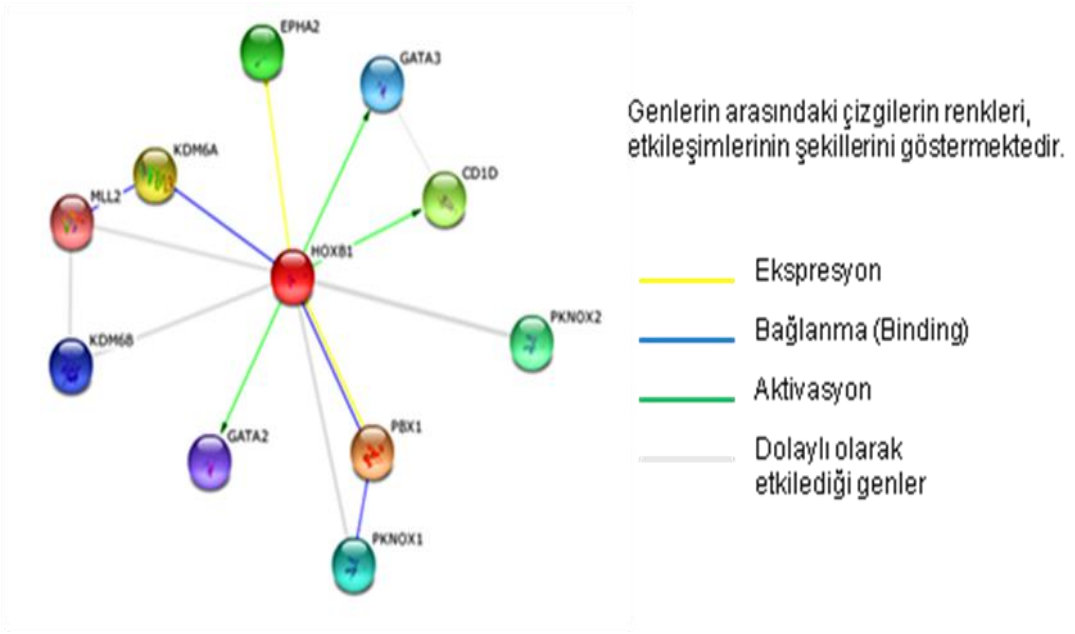
Günümüzde *HOXB1* geninde insan fenotipi ile ilişkilendirilmiş herhangi bir patolojik mutasyon tanımlanmamıştır.

NCBI veritabanına göre, bu gende tanımlanmış dokuz tanesi ekson 1 de, iki tanesi ekson 2 de olmak üzere toplam 11 polimorfizm vardır. Bunlardan beşi yanlış anlamlı değişimler olup genin Homeobox domaini dışında kalmaktadır.



Şekil 2-26: *HOXB1* geni (NM_002144.3) (73'den).

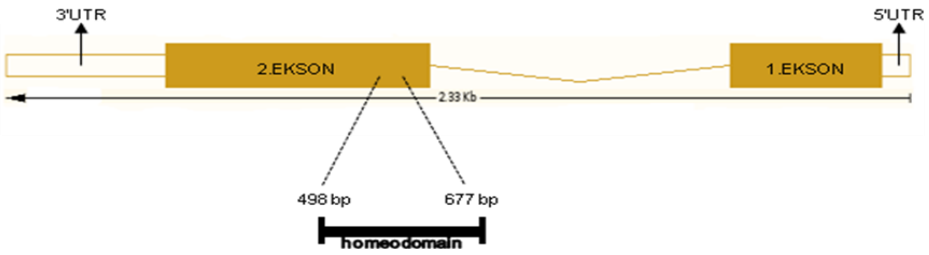
STRING veritabanında *HOXB1* geninin primer olarak etkileşim içinde olduğu genler Şekil 2-27 de şematize edilmiştir (83).



Şekil 2-27: STRING veritabanında göre *HOXB1* geninin fonksiyonel ve biyolojik ilişkide olabileceği diğer genler (83'den).

2.2.5.1.4.*HOXB2* Geni

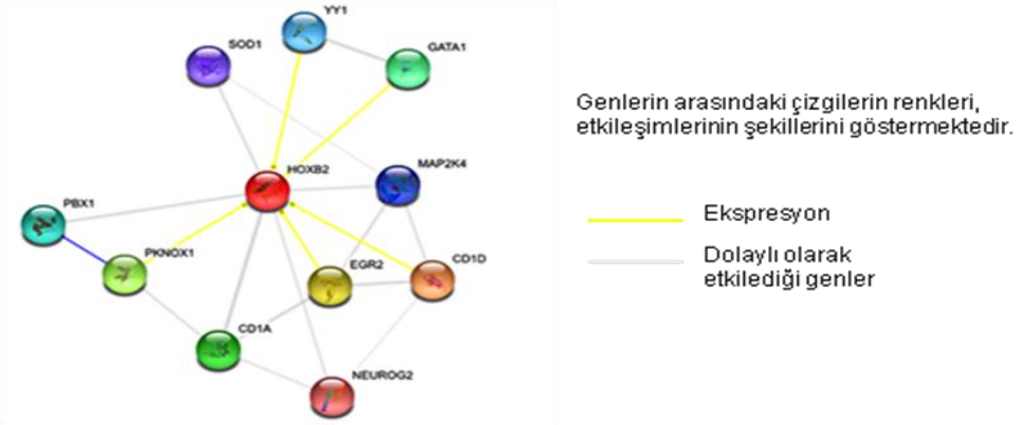
HOXB2 geni 17q21.3 te lokalize ve yüksek oranda korunmuş diziye sahip bir gendir. Şekil 2-28 te görüldüğü gibi 1555 baz çiftinden oluşan ve 356 aminoasitlik bir protein kodlayan transkipte sahiptir (73,78).



Şekil 2-28: *HOXB2* geni (NM_002145.3) (73'den).

Günümüzde *HOXB2* geninde insan fenotipi ile ilişkilendirilmiş herhangi bir patolojik mutasyon tanımlanmamıştır. NCBI veritabanına göre, bu gende 5' UTR bölgesinde dört, ekson 1 de bir, intronda dokuz, ekson 2 de beş ve 3' UTR bölgesinde dokuz adet SNP tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi yanlış anlamlı değişimlere yol açıp homebox domaini dışında yer almaktadır.

STRING veritabanında *HOXB2* geninin primer olarak etkileşim içinde olduğu genler Şekil 2-29 da şematize edilmiştir (83).



Şekil 2-29: STRING veritabanında göre *HOXB2* geninin fonksiyonel ve biyolojik ilişkide olabileceği diğer genler (83'den).

2.3. Kullanılan Moleküler Teknikler

2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmadan izole edilmiş genomik DNA daki özgül bölgelerin uygun primerler yardımıyla çağaltılmasına (amplifikasyonuna) dayanan in-vitro DNA sentezi yöntemidir (85). İlk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olan PCR yönteminin temeli, denatürasyon, bağlanma ve uzama basamaklarına dayanmaktadır. Bu üç basamaktan oluşan her PCR döngüsünde DNA zincirlerinin sayısı 2 katına çıkmakta, 25-30 döngü ile DNA miktarında 1 000 000 kez artma görülmektedir. Aşamalar aşağıdaki biçimde tanımlanabilir:

1.basamak olan denatürasyonda çoğaltılacak olan çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar 95-98°C sıcaklığında 5-10 dakika süresince tutulur.

2. basamak, amplifiye edilecek DNA bölgesine komplementer olan, kısa, tek zincirli oligonükleotidler olan primerlerin 50-70°C arasındaki bir sıcaklıkta DNA ya bağlanma basamağıdır. Bu primerler, çeşitli veritabanları aracılığıyla belirlenebildiği gibi, çeşitli blast programları kullanılarak da isteğe göre tasarlanabilir. Primerler tasarlanırken, uzunluğunun 18-24 nükleotid aralığında AT - CG oranının eşit dağılımlı olmasına, herhangi bir SNP ve tekrarlayan diziler içermemesine, ileri geri oligonükleotidlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla +/- 2-5°C fark) dikkat edilmelidir.

3. basamak olan zincir uzama basamağında ise, polimeraz enzim etkinliği sayesinde ortamda bulunan nükleotidlerin 5' ucundan 3' ucuna doğru eklenmesiyle DNA nın iki zincirli hale gelmesi sağlanmaktadır. Bu aşamada kullanılan polimeraz, ısıya dayanıklı bir bakteri olan *Thermus aquaticus* tan elde edilen *Taq polimeraz* enzimidir. *Taq polimeraz,* aktivitesini serbest magnezyum iyonları ile birlikte, 70°C de gösteren bir enzimdir. Zincir uzaması için A, G, T, C nükleotidlerinden eşit miktarda içeren deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP) kullanılır. Uygun pH ve iyon koşullarının sağlanması için farklı içeriklerde olabilen tampon karışımlarının kullanılması ile PCR reaksiyonu için tüm malzemeler tamamlanmış olur.

2.3.2. Restriksiyon Parça Boyu Polimorfizmi (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) Analizi

Mutasyon taraması ve polimorfik nokta saptanmasında oldukça yaygın olarak kullanılan bir teknik olan RFLP, bakterilerde doğal olarak bulunan enzim türleri olan restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri kullanılarak yapılır (85). RE ler, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve DNA yı bu dizilere yakın bölgelerden veya bu dizilerin içindeki spesifik noktalardan kesen enzimlerdir. Bu enzimler, tip I, tip II ve tip III olmak üzere üç grupta toplanır. Tip I RE ler DNA yı tanıdığı bölgeden 1000 bç.lik uzaklıkta, özgül olmayan yerlerden asimetrik olarak keserler. Tip III RE ler ise DNA yı tanıma bölgelerinden 24- 26 bç uzaklıktan keserek asimetrik parçalar oluştururlar. Tip II RE ler 4, 6, 8 nükleotitten oluşan, genomda iki yönlü simetri oluşturan palindromik bölgelerdeki dizileri tanıyıp keserler. Tip I ve Tip III RE ler kesim sırasında ATP ye ihtiyaç duyarlarken, tip II RE lerin kesim sırasında enerjiye ihtiyaçları yoktur, bu

nedenle moleküler genetik çalışmalarında en çok tercih edilenler bu enzimlerdir. Tip II RE ler kesim sonucunda DNA da oluşturdukları uçların yapılarına göre 2 alt gruba ayrılırlar. Bazıları DNA nın 5' ucunda yapışkan uç oluşturacak şekilde kesim yaparlar. Bu enzimlerin ligasyon etkinlikleri yüksek olduğundan klonlama çalışmalarında kullanılırlar. Bazı RE ler ise küt uçlar oluşturacak şekilde DNA dizisini tanıyıp keserler.

Restriksiyon endonükleazların kesim noktaları, bireylerde görülen polimorfizm ve mutasyonlar ile ortadan kalkabilir. Ya da tam tersi olarak bu polimorfizm ve mutasyonlar yeni kesim noktaları oluşturabilirler. Moleküler çalışmalarda, DNA daki kesim noktalarından yararlanılarak, bilinen mutasyon ya da polimorfizmler saptanabilmektedir. Kesim sonucunda fragmanların boyları, agaroz ya da poliakrilamid jelde değerlendirilerek bilinen mutasyon saptaması kolaylıkla yapılabilmektedir.

2.3.3. DNA Dizi Analizi

DNA nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelen DNA dizi analizinde, iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ve Sanger in dideoksi enzimatik yöntemidir. Maxam-Gilbert yönteminde (86) DNA parçası bir ucundan P32 ile işaretlenir. Bu işaretlenen DNA parçası dört tüpe bölünür. Her örneğe, DNA daki bazlardan birisini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir. Ardından hasarlanmış nükleotidlerin bulunduğu yerlerden kırılması için gerekli kimyasallar kullanılarak DNA yapısı kırılır ve P32 ile işaretlenmiş kısalı-uzunlu parçalar elde edilmiş olur. Boyları gittikçe kısalan DNA dizileri, birbirlerinden jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrılır ve otoradyografi ile bantlar görüntülenir.

DNA dizi analizinde kullanılan bir diğer yöntem olan Sanger ise zincir sonlanma yöntemi ile çalışır (87,88). Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılmaktadır. Yöntemin temeli, DNA polimerazın, dNTP lerin yanı sıra deoksiribozun 3' pozisyonunda -OH grubu taşımayan ddNTP leri de (dideoksiribonükleotid trifosfat) substrat olarak kullanması esasına dayanmaktadır. Sentezlenen DNA ya bir ddNTP nin katılması ile 3' pozisyonunda -OH grubu olmadığı için işlem durur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP lerin dördü ve az miktarda ddNTP lerden birini içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti

meydana gelir. Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP nin tipine göre okunur.

Günümüzde pek çok DNA dizi analizinin aynı anda ve en az hata ile gerçekleştirilebilmesi için otomatik DNA dizileyicileri geliştirilmiştir. Bu dizileyici sistemlerde, ddNTP lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiş olduğundan, tek bir reaksiyon ile farklı uzunluklardaki DNA fragmanları elde edilip, analiz edilebilmektedir (85).

2.3.4. Mikrodizin Tekniği

İlk defa 1980 li yıllarda geliştirilen mikrodizin tekniği, bilgisayar sistemlerinin gelişmesi ile birlikte hızla ilerlemiştir. Mikrodizin teknolojisi, DNA nın bir substrata bağlanıp bilinen bir gen ya da fragment ile prob hazırlanması şeklinde tanımlanabilecek "Southern Blotting" tekniğinden türetilmiştir (85). DNA mikrodizini cam, plastik veya silikon gibi katı bir yüzey üzerine tutturulmuş 20-100 nükleotid uzunluğunda DNA parçaları olarak tanımlanan onbinlerce proptan oluşur. Mikrodizin tekniği, bu propların restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan DNA fragmanları ile hibridizasyonuna dayanır. Hibridizasyonun ardından, bilgisayar tarama sistemi ile veriler toplanarak analiz edilir.

Mikrodizin teknolojisi, en sık olarak gen ekspresyon ve mutasyon analizlerinde, çevresel araştırmalar ve antimikrobiyal gen analizi gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Piyasada bu amaçla geliştirilmiş çeşitli ticari kitlerden biri olan Affymetrix 6.0, 906.600 den fazla SNP ve 946.000 den fazla CNV probu içeren bir platformdur. Bir genomdaki gen kopyalarının tanımlanmasında, tek nükleotid polimorfizmleri ve mutasyonların belirlenmesinde kullanılan bu mikrodizin platformu, geleneksel moleküler genetik araştırmalara üstünlük sağlamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubumuzu 1993-2011 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalına, konjenital fasiyal paralizis nedeniyle başvuran 25 olgu oluşturmaktadır. Yapılan klinik değerlendirmeler sonucu, olgular Moebius sendromu tanısı alarak gösterdikleri paralizislere ve ek anomalilere göre hafif, ağır ve Moebius + Poland olmak üzere sınıflandırıldı.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmaya katılan tüm aile üyeleri ve sağlıklı bireylerden bilgilendirilmiş onam alındı.

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA Eldesi

DNA izolasyonları 5ml K_3EDTA lı tüplere alınan periferik kandan, kit kullanılarak, firma protokolüne uygun olarak elde edildi (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche).

3.2.2. Dizi Analizi

3.2.2.1. Aday Genlerin Yapılarının Araştırılması

HOXA1, HOXA2, HOXB1 ve *HOXB2* genlerine ait tüm varyantlara, genomik DNA dizilerine, eksonlara, intronlara, transkriptlerine, tek nükleotidlik polimorfizmlerine (SNP), tekrar dizilerine, delesyon/insersiyon olarak varolan polimorfik yapılarına (DIP), kodladığı proteinin amino asit dizilerine ve domainlerine, *UCSC Genome Browser* (89), *ENSEMBL Genome Browser* (73), *NCBI Home Page* (78) ve HGDB *Human Genome Data Base* (77) den ulaşıldı.

3.2.2.2. Primerlerin Tasarlanması

Primerler tasarlanırken, seçilen oligonükleotidlerin herhangi bir SNP ve tekrarlayan diziler içermemesine, ileri geri oligonükleotidlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla +/- 2-5°C fark), içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18-24 nükleotid içermesine ve gen bölgesi için

özgün olmasına özen gösterildi. Özgünlük, USCS Genome Browser dan "in silico PCR" interaktif sistemi ile test edildi (89). Tasarlanan primerlerin dizileri Tablo 3-1 de listelenmiştir.

Tablo 3-1: Primer dizileri

GEN	EKSON	İLERİ PRİMER (5'→3')	GERİ PRİMER (5'→3')
HOXA1	1	GTGATCCATCACTGCGGA	CCATGCACTACAACACTAGTCT
	2	CCGATTTGTGCTGAGTTCT	CCCTCTGAGGCATCTGATT
	3'UTR	GTGAGTTTGCTGGTTGAA	CAACAACTTTATACTGGAGCTA
HOXA2	1	CCACGTACTCCGGGACAT	GTCTCATTGTAGAGCGCAGGA
	2	GCCACAGGCATGAATTCGAT	CATGCCGCCTTAATAAATGTA
HOXB1	1	CTTCCTAGGGAAGCGCTT	CCTGACCTGAGACGTAGGTT
	2	GGTCCCTGGGAACTTTGA	TTGACAGGTTCCATGCCTC
HOXB2	1	GTGACCACGAATTCCCTGTA	GTAAGGAACCCCAACAGGC
	2	GGTGATACTGGTTTTGGAGG	GAGGCTTTGCTGCCATATG

3.2.2.3. Ekson Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

Her bir PCR reaksiyonu için, 200 ng gDNA, 1X tampon solüsyonu [10X $(NH_4)_2SO_4$], 2 mM $MgCl_2$, % 4-10 DMSO (Sigma), 200 µM dNTP, 300-800 µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Fermentas) kullanıldı. Reaksiyon karışımı, bidistile su (H_20) ile 50 µl ye tamamlandı. PCR, 95°C de 10 dk denatürasyon, ardından 95°C de 30 sn denatürasyon, 60°C den 54°C ye kadar kademeli olarak düşürülen 30 sn lik bağlanma ısılarında ve 70°C de 60 sn uzama basamaklarından oluşan toplam 40 döngü ve son olarak 70°C de 10 dk lık uzama olacak şekilde, *touch-down* PCR yöntemi kullanılarak, termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası PCR örneklerinden 5 µl alınarak, 500 baz çiftlik merdiven markörü (Sigma) paralelinde 10 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2 lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 80 V da, 20-25 dk yürütülerek boyutlarına göre ayrıldı. Elde edilen bantlar ultraviyole (Omes, Fotodyne) ışık altında görüntülenerek fotoğrafları kayıt edildi.

3.2.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünleri ticari kit kullanılarak, firma protokolüne uygun olarak saflaştırıldı.(Agencourt Ampure PCR Clean–Up Kit; High Pure PCR product purification kit, Roche)

3.2.2.5. DNA Dizi Analizi

PCR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan ekson bölgelerinin bir kısmı hizmet alımı olarak dış laboratuarda (Macrogen,Seoul/Kore), bir kısmı da Tıbbi Genetik A.B. laboratuvarında bulunan ABI310 otomatik tek kapilerli DNA dizileyicisinde (Applied Biosystem/Genomed) gerçekleştirildi.

PCR reaksiyonunda herbirinden 2 µl olmak üzere şu malzemeler kullanıldı:

1. Saflaştırılmış PCR ürünü

2. 5X tampon solüsyonu olan BIGDYE buffer (PCR için gerekli tüm kimyasallarını içerir.)

3. Primer (İlk PCR da kullanılan primerlerden biri kullanılır. Dizilemenin ileri veya geri primerlerin hangisi ile yapılacağı isteğe bağlıdır.)

4. BIGDYE v3.1 (ddNTP leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içerir.)

5. dH_20

Toplam 10 µl olan karışım termal döngü cihazına konuldu.

Protokol 96°C de 10 sn denatürasyon, 50°C de 5 sn bağlanma ve 60°C de 4 dk sonlanma basamakları ile toplam 25 döngüden oluşmakta idi. Döngüler bittiğinde 4°C ye gelen cihazdan ‘sekans PCR’ ürünleri alındı.

Bu PCR ürünleri dizileme cihazına konmadan önce pürifiye edildi. Pürifikasyon aşamasında 1 g sefadeks tartılıp 14 ml distile suda çözüldü. Her bir örnek için bir filtreli tüpe 800 µl konularak 4600 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler temiz toplama tüplerine kondu. PCR ürünlerinin tamamı, pipet ucu değdirilmeden jel haline gelen sefadekse aktarılarak, 4600 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Böylece toplama tüplerinde pürifiye edilmiş ürünler elde edildi.

Saflaştırmadan sonra örnekler cihaz tepsisine yerleştirilirerek başlama komutu verildi.

3.2.2.6. DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Yorumlanması

Dizileme sonuçları Chromas 2.32 (www.technelysium.com.au/chromas.htlm) ve NCBI BLAST (*Basic Local Asligment Search Tool*; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) programları kullanılarak bilgisayar ortamında analiz edildi. Dizi analizi sonucunda saptanan değişimlerin tanımlanmış SNP olup olmadıkları *NCBI Entrez SNP* (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) ve *ENSEMBL GeneSNPView* (www.ensembl.org/genesnpview) veritabanları kullanılarak değerlendirildi.

3.2.3. Restriksiyon Enzim Kesimi Çalışması

Kontrol çalışması için yapılan restriksiyon enzim kesimi çalışmasında 80 sağlıklı bireye ait DNA materyali kullanıldı. Bu DNA larda, pozitif ve negatif kontrol eşliğinde genin ilgili bölgesine ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. Bu amplifikasyon bölgesinin kesimini yapan enzimler ve kesim sonucunda elde edilecek olan bant boyları '*Restriction enzyme digest of DNA*' veritabanında (90) değerlendirilerek, AciI (SsiI) enziminin homozigot mutant, heterozigot mutant ve homozigot normal bantları birbirinden ayırabileceği saptandı. AciI (Fermentas) restriksiyon enzimi sağlıklı bireylerin amplifikasyon bölgesini 48, 50, 78, 92 ve 432 baz çiftlik bölgelere, homozigot değişime sahip olguya ait amplifikasyon bölgesini 48, 78, 142 ve 432 baz çiftlik bölgelere ve bu değişimi heterozigot olarak taşıyan anne ve babasının amplifikasyon bölgesini ise 48, 50, 78, 92, 142 ve 432 baz çiftlik bölgelere ayırmaktadır. Bu enzimin DNA dizisini hangi bölgeden kestiği şekil 3-1 de gösterilmiştir:

5'…C ^ C G C…3'
3'…G G C ^ G…5'

Şekil 3-1: AciI Enziminin DNA dizisini kesim bölgeleri

Enzim kesimi çalışması için 5 µl PCR ürününden, 45 µl AciI tampon karışımından (1X AciI Buffer Tango) ve 0,4 µl AciI enziminden alınarak bir tüpe karıştırıldı ve tüm gece 37°C lik etüve konularak kesim gerçekleştirildi. Ertesi sabah kesimi yapılan ürünler, içerisine 3 µl yükleme boyası konularak %2,5 luk TBE agaroz jelde 50 kb lik markör eşliğinde yürütüldü.

3.2.4. Mikrodizin Çalışması

Moebius sendromu klinik tanısı alan 25 olgunun 13 ünde CRANIRARE projesi kapsamında Affymetrix 6.0 ile mikrodizin çalışması yapıldı (MBS#1, MBS#2, MBS#3, MBS#4, MBS#6, MBS#14, MBS#15, MBS#19, MBS#20, MBS#23, MBS#24, MBS#27, MBS#28).

Toplam 250 ng olacak şekilde 50 ng/µl lik DNA örneklerinden 5 µl alınarak başlanan bu çalışma yaklaşık 4 gün sürdü.

3.2.4.1. Kesim, Ligasyon, PCR (Birinci gün)

Kullanacağımız Affymetrix 6.0 çipine uygun olarak StyI ve NspI enzimleri ile kesim yapılmak üzere 2 ayrı tüpte reaksiyon karışımı hazırlandı:

Birinci tüpe 0.2 µL BSA (100X; 10 mg/mL), 2 µL 10X Sty I tampon solüsyonu (NEBuffer 3), 1 µL Sty I (10 U/µL) ve 11.55 µL su; ikinci tüpe ise 0.2 µL BSA (100X; 10 mg/mL), 2 µL 10X Nsp I tampon solüsyonu (NEBuffer 2), 1 µL Nsp I (10 U/µL) ve 11.55 µL su konuldu.

Bu karışımlar üzerine her iki tüpe 5 er µL genomik DNA eklenerek tüpler, 37°C de 120 dk, 65°C de 20 dk olacak şekilde programlanan termal döngü cihazına konuldu.

Yaklaşık 3 saat süren kesim aşamasından sonra, ligasyon aşamasına geçildi.

Bu aşamada yine farklı tüplerde 2 karışım daha hazırlandı:

Birinci tüpe 2,5 µL T4 DNA Ligase tampon solüsyonu (10X), 0.75 µL Adaptor Sty I (50 µM), 2 µL T4 DNA Ligase (400U/µL); ikinci tüpe ise 2,5 µL T4 DNA Ligase tampon solüsyonu (10X), 0.75 µL Adaptor Nsp I (50 µM) ve 2 µL T4 DNA Ligase (400U/µL) eklendi.

Kesim çalışması tamamlanan StyI enzimli tüpün içeriği StyI adaptörünü içeren 1. tüpe ve NspI enzimli kesim çalışması tamamlanmış tüpün içeriği NspI adaptörü içeren 2. tüpe aktarıldı.

Toplam 25 µL hacime ulaşan 2 tüp termal döngü cihazında 16°C de 180 dk ve 70°C de 20 dk olacak şekilde ligasyon işlemi gerçekleştirildi.

Ligasyonu takiben, ürünler 2000 rpm de 30 sn santrifüj edildikten sonra buz üzerine alındı ve üzerlerine 75 µL dH_20 koyuldu. Böylece 100 µL hacime ulaşan ürünler

bir kez daha 2000 rpm de 30 sn santrifüj edildi. Her iki karışım 10 µL olacak şekilde 7 şer tüpe paylaştırıldı.

Ligasyon aşamasında eklenen adaptörlerdeki dizilerin aynı olması sebebiyle tek bir primer ile yeni bir PCR karışımı hazırlandı.

Her bir tübe 39.5 µL dH_20, 10 µl TITANIUM *Taq* PCR tampon solüsyonu (10X), 20 µL GC-Melt (5M), 14 µL dNTP (2.5 mM each), 4.5 µL PCR Primer 002 (100 µM), 2 µL TITANIUM *Taq* DNA Polimeraz (50X) olacak şekilde hazırlanan karışımdan, 14 tüpe 90 ar µL dağıtıldı ve böylece her bir tüpte 100 µL PCR+ ligasyon ürünü bulunmaktaydı.

Birinci günün son PCR işleminde 94°C de 3 dk denatürasyonun ardından 94°C de 30 sn, 60°C de 45 sn, 68°C de 15 sn döngüsü 30 kez tekrarlandı ve en son 68°C de 7 dk nın ardından ürün 4°C de saklandı (Şekil 3-2).

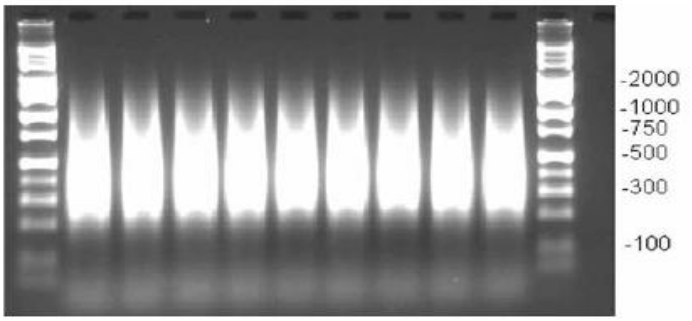


Şekil 3-2: Mikrodizin çalışmasında restriksiyon enzim kesimi, ligasyon ve PCR aşamaları (96'dan)

3.2.4.2. Pürifikasyon, Ölçüm, Fragmentasyon, İşaretleme (*labelling*) (İkinci Gün)

Enzim kesim çalışmasının uygun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla +4ºC de bekletilen PCR ürünlerinden % 2 lik TBE agaroz jele 1 kb lik markör ile birlikte yüklenerek elektroforezde yürütüldü.

Elde edilen fragmanların 200 ile 1100 baz çifti uzunluğunda olup olmadığı kontrol edildi (Şekil 3-3).



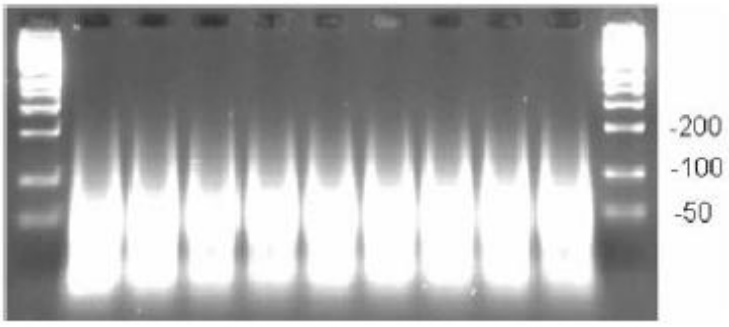
Şekil 3-3: Fragmanların agaroz jeldeki görüntüsü (96'dan)

Fragman boylarının uygun olduğu görüldükten sonra bir olguya ait olan 14 tüp bir ependorf tüpüne alınarak karıştırıldı ve pürifikasyon aşamasına geçildi.

Agencourt Ampure kiti ile yapılan pürifikasyonun ardından, yoğunluk ölçümü yapıldı. Protokole uygun olarak beklenen yoğunluğun 4,5-6 ng/ µL olması durumunda ileri aşamaya geçildi. Bu aralığın dışındaki örnekler çalışma dışı bırakıldı.

Fragmentasyon amacıyla 10X Fragmentation tampon solüsyonu, Fragmentation Reagent ve sudan oluşan yeni bir karışım hazırlandı.

Pürifikasyonu tamamlanmış DNA örneğine bu karışımdan 5 µL ilave edildi. Bu karışım, termal döngü cihazına yerleştirildi ve 37°C de 35 dk ile başlayıp, 95°C de 15 dk ile devam eden kısa bir programla fragmante edildi. 4°C de bir süre kaldıktan (10-15 dk) sonra ürünler alınıp % 4 lük TBE agaroz jele yüklenerek bant boyları kontrol edildi. Bant boyları 200 baz çiftinden daha küçük olan örneklerle çalışmaya devam edildi (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Fragmanların agaroz jeldeki görüntüsü (96'dan)

4. aşama olan işaretleme aşamasında DNA fragmentlerinin 5’ ucundan biotin ile işaretlenmesi için 14 µL Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) tampon solüsyonu (5X), 2 µL DNA Labeling reaktifi (30 mM) ve 3,5 µL TdT enzimi (30 U/µL) kullanılarak hazırlanan 19,5 µL lik karışım, fragmente olan DNA parçaları bulunan 53,5 µL lik karışıma katılarak yeni bir döngüye sokuldu. Bu döngü 37°C de 4 saat, 95°C de 15 dk içermekte idi. Döngü sonunda tüpler +4ºC de bekletildi (2. gün sonu).

3.2.4.3. Hibridizasyon (Üçüncü Gün)

Hibridizasyon için hazırlanan karışım; 12 µL MES (12X; 1.25 M), 13 µL Denhardt solüsyonu (50X), 3 µL EDTA (0.5 M), 3 µL HSDNA (10 mg/mL), 2 µL OCR, 0100, 3 µL Human Cot-1 DNA (1 mg/mL), 1 µL Tween-20 (3%), 13 µL DMSO (100%), 140 µL TMACL (5 M) olmak üzere toplam 190 µL lik bir karışımdır. Bu karışım bir önceki gün işaretli DNA fragmentlerinin bulunduğu tüpe karıştırılarak termal döngü cihazında 95°C de 10 dakikanın ardından, çiplere yükleme yapılana kadar 49°C de bekletildi (10-15 dk).

Çiplerin bilgisayar sistemine tanıtılmasının ardından, hazır olan karışım tüpü termal döngü cihazından alınmadan içinden 200 µL si alınarak çiplerin arka yüzeyindeki küçük açıklıktan içeri aktarıldı (Şekil 3-5). Çipler, 50°C deki hibridizasyon fırınında tüm gece boyunca hibridize edildi (Şekil 3-6).



Şekil 3-5: Mikrodizin çipi (96’dan)



Şekil 3-6: Hibridizasyon fırını (96’dan)

3.2.4.4. Yıkama ve Veri Analizi (Dördüncü gün)

Hibridizasyon fırınından çıkarılan çipler, içindeki karışım mikropipet yardımı ile boşaltıldı ve çipler sisteme bağlı yıkama istasyonuna yerleştirildi. Gün boyu süren otomatik yıkama işlemlerinin ardından veriler alındı ve analize hazır duruma getirildi.

3.2.4.5. Analiz

Affymetirx SNP 6.0 çipleri ile yapılan çalışmalarda firmanın önerdiği kalite kontrol değerleri *QC Call Rate* için > %86, *Contrast QC* için >0.4 ve MAPD değeri için ise <0.4 idi. CRANIRARE projesi kapsamında bu çiplerle reaksiyona sokulan ve kalite değerleri önerilen limitler içinde kalan Moebius olguları (MBS#1, MBS#2, MBS#3, MBS#4, MBS#6, MBS#14, MBS#15, MBS#19, MBS#20, MBS#23, MBS#24, MBS#27, MBS#28), sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalarda daha önce gösterilmiş olan aday bölgelerde (1p34, 1p22, 13q12-q13, 3q21-q25.2, 10q21) ve bizim çalışmamızda seçtiğimiz aday genlerde (*HOXA1, HOXA2, HOXB1 ve HOXB2*) olası delesyon/duplikasyon varlıkları açısından incelendi.

Bu bölgelerde herhangi bir delesyon ya da duplikasyon olup olmadığı *Chromosome Analysis Suite*/ChAS programı ile yapılan analizlerle araştırıldı. Delesyon ve duplikasyonların değerlendirilmesinde, aday bölgeler için filtre ayarı, " ≥200 kb ve ≥20 marker", aday genler için ise , " ≥1 kb ve ≥1 marker" olarak kullanıldı.

Aday genlere ait probların olup olmadığı, varsa tipi (SNP ve CNV) ve genlerin hangi bölgelerinde bulunduğu (ekson, intron, UTR, yakın gen) ayrıntılı olarak araştırıldı (91). Bu ön çalışmalar ve ardından gerçekleştirilen delesyon/duplikasyon incelemesi, *Affymetrix Genotyping Console Version 4.0* da CN5.CNCHP ye dönüştürülen CEL dosyalarının ChAS programında açılması ile yapıldı.

4. **BULGULAR**

4.1. Klinik Bulgular

Kliniğimizde Moebius sendromu ön tanısı alan olgular klinik bulgularına göre ağır Moebius, hafif Moebius ve Moebius+Poland olmak üzere 3 grupta değerlendirildi. Olguların 7 si ağır Moebius, 12 si hafif Moebius, 6 sı ise Moebius + Poland grubunda yer aldı. Bu olguların klinik bulguları Tablo 4-1, 4-2, 4-3 ve 4-4 te ve tüm olguların kraniyal sinir paralizis bulguları ise Tablo 4-5 te gösterildi.

Tablo 4-1: Ağır Moebius olgularının klinik bulguları

	Ağır Moebius Olguları						
	MBS-1	MBS-2	MBS-3	MBS-5	MBS-7	MBS-20	MBS-27
Akrabalık	-	+(2°)	-	+(1°)	-	+(2°)	- (Aynı köy?)
Cinsiyet	F	F	M	M	M	M	F
Yaş(yıl+ay)	4+0	3+3	1+3	2+7	5+10	3+7	4+3
Fasiyal anomaliler							
Hipertelorizm	-	-	-	-	+	-	-
Epikantus (sağ/sol)	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-
Blefarofimoz (sağ/sol)	-/-	-/+	+/+	-	-	-/-	-
Düzleşmiş/geniş burun köprüsü	+	+	+	+	-	-/-	+/+
Dış kulak anomalileri	-	-	-	-	+	+	+
Ağız anomalileri							
Dil hipoplazisi/asimetri	+	-	+	-	-	-	+ + CP
Yüksek damak	+	-	+	+	-	-	(opere)
Retromikrognati	+	+	-	-	-	-	-
Diş çürüğü	-	-	-	-	+	-	-
Ekstremite anomalileri							
Tırnak anomalileri	-	-	+	+	-	-	-
Sindaktili	-	-	-	-	-	-	-
Klinodaktili	+	-	+	-	-	+	-
Polidaktili	-	-	-	-	-	-	-
Külah-şeklinde epifizler	-	-	-	-	-	-	-
Falanks hipoplazisi	-	-	-	-	-	-	-
Mikromeli	-	-	-	-	-	-	-
Ayaklarda parmak anomalileri	-	-	-	-	-	+	-
Talipes ekinovarus (sağ/sol)	-	+/+	+/-	+/+	-	-	+/+
Pes planus (sağ/sol)	-	-	-	-	+/-	-	-

Tablo 4-2: Hafif Moebius olgularının klinik bulguları

	Hafif Moebius Olguları (1)					
	MBS-4	MBS-8	MBS-9	MBS-10	MBS-14	MBS-16
Akrabalık	+(2,5°)	+(1°)	- (Aynı köy?)	-	-	-
Cinsiyet	F	F	F	M	F	F
Yaş(yıl+ay)	2+1	3+0	0+10	0+7	1+6	1+7
Fasiyal anomaliler						
Hipertelorizm	-	-	+	-	+	-
Epikantus (sağ/sol)	+/+	-	+/-	-	-/-	+/-
Blefarofimoz (sağ/sol)	-/+	-	-	+/+	- /-	-/-
Düzleşmiş/geniş burun köprüsü	+	-	-	-	+/+	+/+
Dış kulak anomalileri	-	-	-	-	+	+
Ağız anomalileri						
Dil hipoplazisi/asimetri	-	-	-	-	-	-
Yüksek damak	+	+	+	-	+	+
Retromikrognati	-	-	+	+	-	+
Diş çürüğü	-	+	-	-	-	-
Ekstremite anomalileri						
Tırnak anomalileri	-	-	-	-	-	-
Sindaktili	-	-	+	+	-	-
Klinodaktili	-	-	-	-	-	-
Polidaktili	-	-	-	-	-	-
Külah-şeklinde epifizler	-	-	+	-	-	-
Falanks hipoplazisi	-	-	-	-	-	-
Mikromeli	-	+	-	-	-	-
Ayaklarda parmak anomalileri	-	-	-	-	+	-
Talipes ekinovarus (sağ/sol)	-/+	-	-/+	-	-	-
Pes planus(sağ/sol)	-	-	-	-	-	-

Tablo 4-3: Hafif Moebius olgularının klinik bulguları (devam)

	Hafif Moebius Olguları (2)					
	MBS-17	MBS-18	MBS-21	MBS-22	MBS-25	MBS-26
Akrabalık	-	- (Aynı köy?)	-	-	-	+ (1,5°)
Cinsiyet	F	F	F	F	F	F
Yaş(yıl+ay)	7+0	3+8	9+0	7+7	0+8	1+11
Fasiyal anomaliler						
Hipertelorizm	-	+	-	-	-	-
Epikantus (sağ/sol)	+/+	+/+	+/+	-	+	-
Blefarofimoz (sağ/sol)	-/-	-/-	-/-	-	+	-/+
Düzleşmiş/geniş burun köprüsü	+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/-
Dış kulak anomalileri	-	+	+	-	+	+
Ağız anomalileri						
Dil hipoplazisi/asimetri	-	-	-	-	-	-
Yüksek damak	+	+	-	+	+	+
Retromikrognati	+	-	-	-	+	-
Diş çürüğü	-	-	+	-	-	-
Ekstremite anomalileri						
Tırnak anomalileri	-	-	-	-	-	-
Sindaktili	-	-	-	-	-	-
Klinodaktili	-	-	-	-	-	-
Polidaktili	-	-	-	-	-	-
Külah-şeklinde epifizler	+	-	-	?	?	?
Falanks hipoplazisi	-	+	-	-	-	-
Mikromeli	-	-	-	-	-	-
Ayaklarda parmak anomalileri	-	-	-	-	-	-
Talipes ekinovarus (sağ/sol)	-	-	-	-	-	-
Pes planus(sağ/sol)	-	-	-	-	-	-

Tablo 4-4: Moebius+Poland olgularının klinik bulguları

	Moebius+Poland Olguları					
	MBS-6	MBS-15	MBS-19	MBS-23	MBS-24	MBS-28
Akrabalık	- (Aynı köy?)	- (Aynı köy?)	- (Aynı köy?)	- (Aynı köy?)	-	-
Cinsiyet	M	M	M	M	M	F
Yaş(yıl+ay)	5+7	13+7	8+8	0+10	2+3	9+2
Fasiyal anomaliler						
Hipertelorizm	+	+	-	+	-	-
Epikantus (sağ/sol)	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-
Blefarofimoz (sağ/sol)	-	-/-	-/-	-/-	-	-
Düzleşmiş/geniş burun köprüsü	-	-/-	-/+	+/+	-	+
Dış kulak anomalileri	-	-	-	-	-	-
Ağız anomalileri						
Dil hipoplazisi/asimetri	+	+	-	-	+	+
Yüksek damak	-	+	+	-	-	-
Retromikrognati	+	-	-	+	+	-
Diş çürüğü	+	-	-	-	-	-
Ekstremite anomalileri						
Tırnak anomalileri	-	+	+	+	-	-
Sindaktili	+	+	+	+	-	-
Klinodaktili	-	-	+	-	+	-
Polidaktili	-	-	-	-	-	-
Külah-şeklinde epifizler	-	+	-	+	?	-
Falanks hipoplazisi	-	+	+	+	?	-
Mikromeli	+	+	+	+	Ameli	-
Ayaklarda parmak anomalileri	-	+	-	-	+	-
Talipes ekinovarus (sağ/sol)	-/+	-/+	-	-	?	-
Pes planus (sağ/sol)	-	-	-	-	?	-

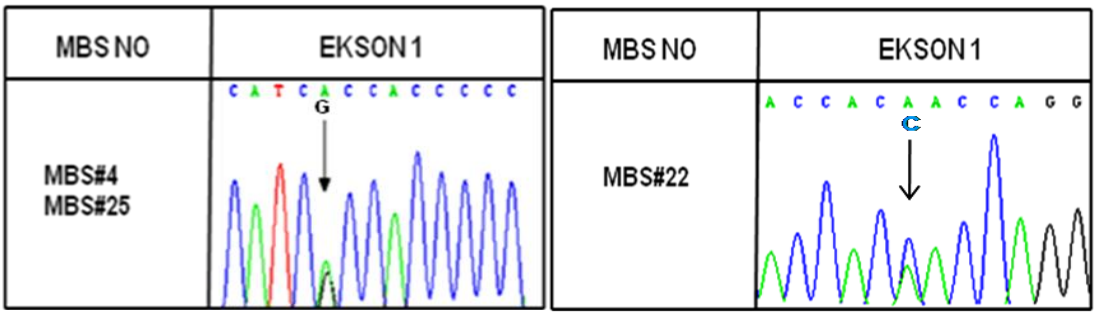
Tablo 4-5: Tüm olgularda görülen Kraniyal Sinir Paralizisleri

MBS No	Kraniyal Sinir Paralizisleri (Sağ/ Sol)						
	KS VII	KS VI	KS XII	KS III	KS IV	KS V	KS IX/X
MBS#1	+/+	+/+	+/+	+/+	-	+	+
MBS#2	-/+	-/+	-	+/-	-	-	-
MBS#3	+/-	+/+	+/-	-	-	+	+
MBS#4	+/-	+/+	-	-	-	-	-
MBS#5	+/+	-	-	+/+	-	-	-
MBS#6	+/+	+/+	-/+	-	-	-	-
MBS#7	+/+	+/+	-	+/-	-	-	-
MBS#8	+/-	+/-	-	-	-	-	-
MBS#9	+/+	+/+	-	+/+	-	-	+
MBS#10	+/-	-	-	+/+	-	-	+
MBS#14	+/+	+/+	-	-	-	-	-
MBS#15	+/+	+/+	+/+	-	-	-	-
MBS#16	+/+	-	-	-	-	-	+
MBS#17	+/+	-	-	-	-	+	-
MBS#18	-/+	-	-/+	-	-	-	-
MBS#19	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-	-
MBS#20	-/+	+/+	-	-	+/+	-	-
MBS#21	-/+	-	-	-	-	-	-
MBS#22	-/+	+/+	-	-	-	-	-
MBS#23	+/-	-	-	-	-	-	-
MBS#24	+/+	+/-	+/+	-	-	-	+
MBS#25	+/+	+/-	-	-	-	-	-
MBS#26	+/+	-/+	-	-	-	-	-
MBS#27	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-	+
MBS#28	-/+	-/+	-	-	-	-	-

4.2. Dizi Analizi Sonuçları

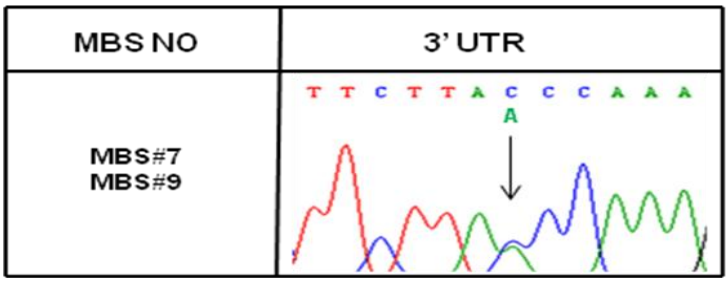
4.2.1. *HOXA1* Geni

HOXA1 geninin birinci eksonunda, 25 olgunun ikisinde (MBS#4 ve MBS#25) heterozigot rs10951154 polimorfizmi (c.218A>G) ve birinde (MBS#22) heterozigot rs45571645 polimorfizmi (c.436C>A) saptandı (Şekil 4-1 ve Şekil 4-2).



Şekil 4-1: rs10951154 ve rs45571645polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramları

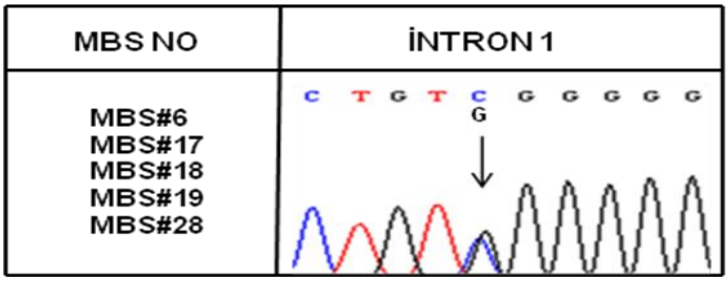
MBS#7 ve MBS#9 olgularında *HOXA1* geninin 3' UTR bölgesinde heterozigot rs56012816 polimorfizmi (c.*56C>A) saptandı (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: rs56012816 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı

4.2.2. *HOXA2* Geni

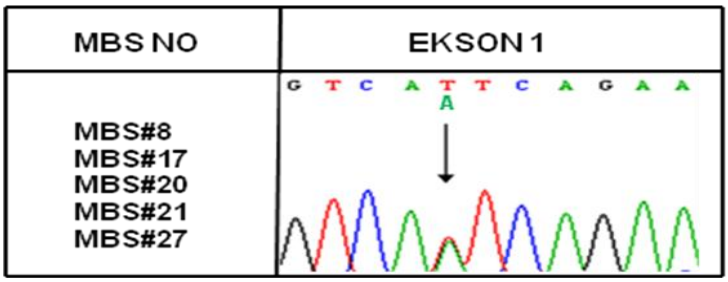
HOXA2 geninin birinci intronunda rs2428431 polimorfizmi (c.391+72G>C) 5 olguda (MBS#6, MBS#17, MBS#18, MBS#19, MBS#28) heterozigot olarak saptandı (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: rs2428431 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı

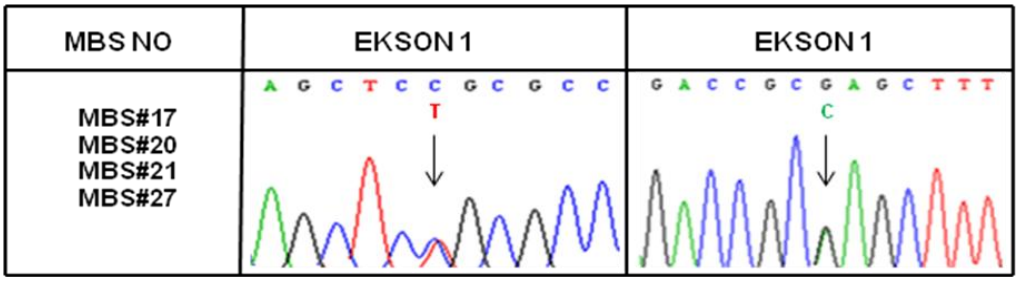
4.2.3. *HOXB1* Geni

HOXB1 geninin birinci eksonunda yer alan rs12939811 (c.309A>T) polimorfizmi 5 olguda (MBS#8, MBS#17, MBS#20, MBS#21 ve MBS#27) heterozigot olarak saptandı (Şekil 4-4).



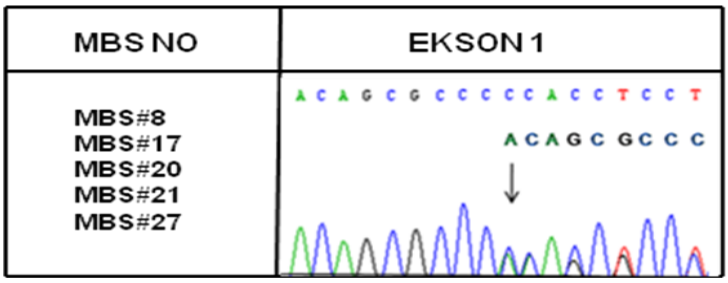
Şekil 4-4: rs12939811 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı

Olguların dördünde (MBS#17, MBS#20, MBS#21 ve MBS#27) birinci eksonda heterozigot rs12946855 (c.237C>T) ve rs7207109 (c.450G>A) polimorfizmleri saptandı (Şekil 4-5).



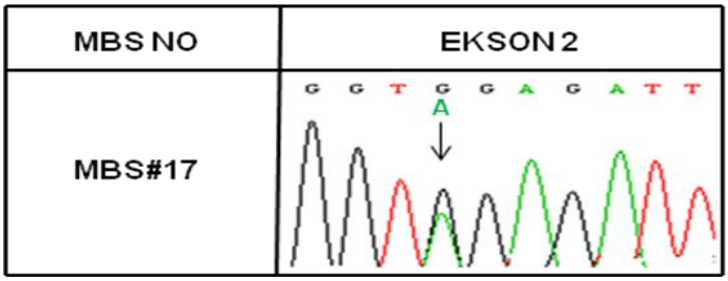
Şekil 4-5: rs12946855 ve rs7207109 polimorfizleri saptanan olgular, heterozigot ve homozigot örnek dizi kromatogramı

Birinci eksonda beş olguda (MBS#8, MBS#17, MBS#20, MBS#21 ve MBS#27) heterozigot rs79792056 polimorfizmi saptandı (Şekil 4-6).



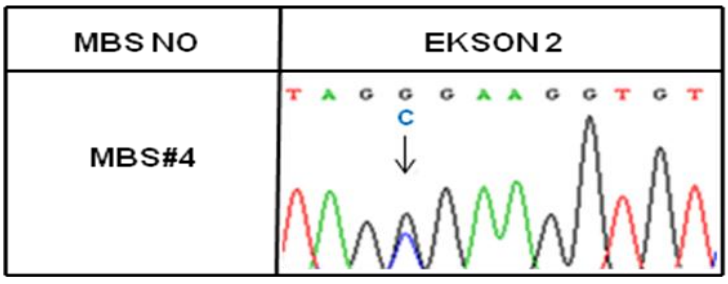
Şekil 4-6: rs79792056 polimorfizmi saptanan olgu ve örnek dizi kromatogramı

MBS#17 olgusunun ikinci eksonunda, rs35115415 polimorfizmi (c.702G>A) heterozigot olarak saptandı (Şekil 4-7).



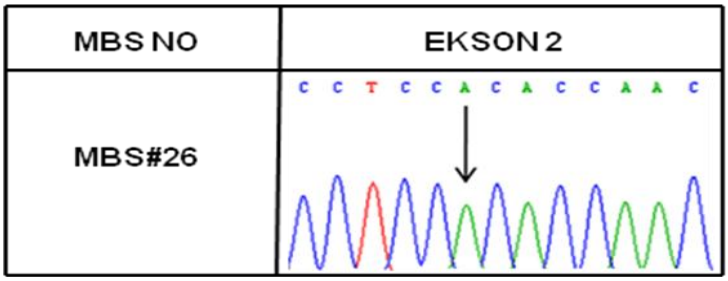
Şekil 4-7: rs35115415 polimorfizmi saptanan olgu ve örnek dizi kromatogramı

MBS#4 olgusunda, *HOXB1* geninin ikinci eksonunda veritabanlarında bildirilmeyen yeni heterozigot c.578C>G değişimi saptandı. Bu değişim için, sağlıklı annenin de heterozigot olduğu belirlendi. Babanın analizleri DNA yetersizliği nedeniyle yapılamadı (Şekil 4-8).

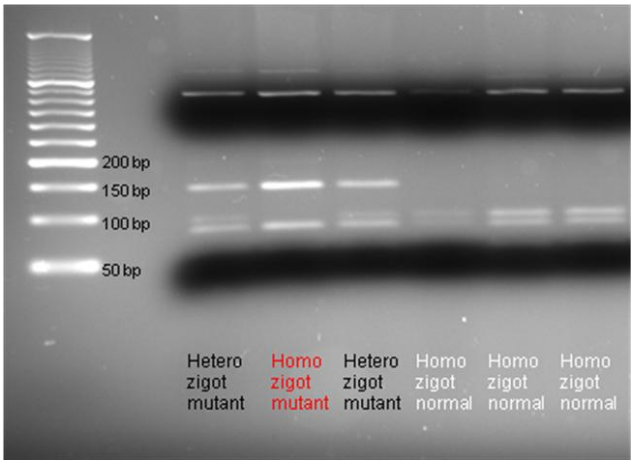


Şekil 4-8: MBS#4 te görülen heterozigot yeni SNP kromatogramı

MBS#26 olgusunda, *HOXB1* geninin ikinci eksonunda veritabanlarında daha önce tanımlanmamış c.619G>A (p.Arg207His) değişimi homozigot olarak saptandı. Anne ve babanın bu değişim için heterozigot taşıyıcı oldukları belirlendi. 80 sağlıklı bireye ait DNA materyalinde yapılan kontrol taramasında bu değişime rastlanmadı. Enzim kesimi görüntüsü Şekil 4-10 da sunulmaktadır.

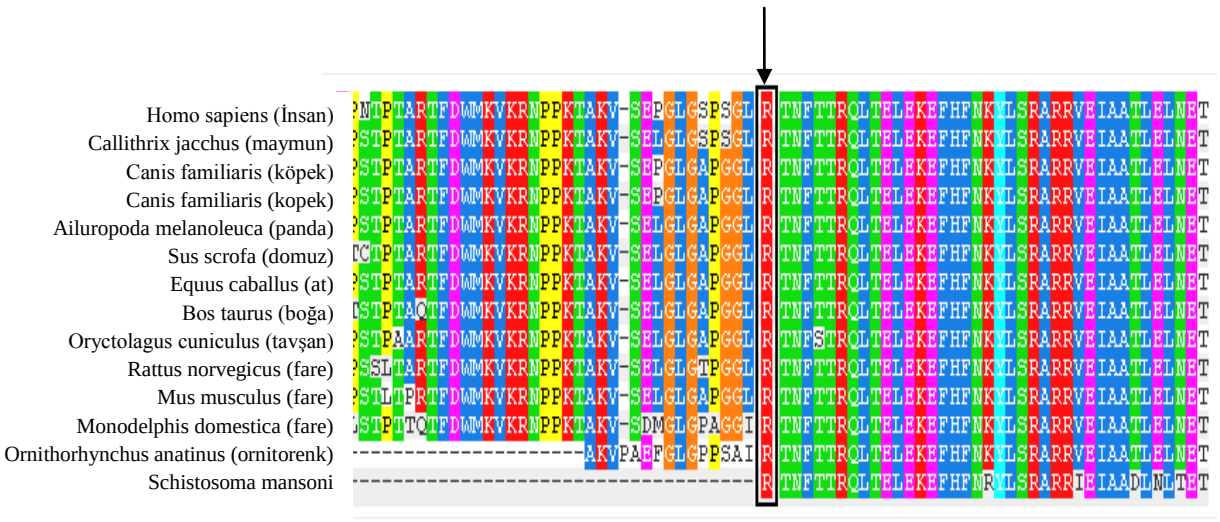


Şekil 4-9: MBS#26 da görülen homozigot yeni mutasyon kromatogramı

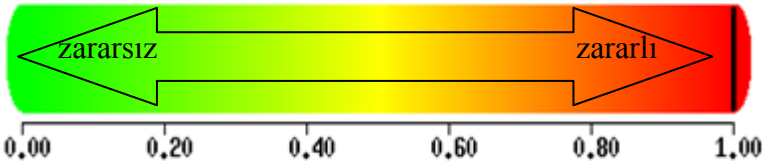


Şekil 4-10: c. 619G>A nın PCR+ Restriksiyon enzim kesimi ile gerçekleştirilen kontrol çalışmasından alınan % 2.5 luk agaroz jel görüntüsü

Saptanan aminoasit değişiminin proteinin yapısını nasıl etkileyeceğini araştırmak için POLYPHEN-2 veritabanında (79) analiz yapıldı. Homeobox domaininde oluşan bu yanlış anlamlı değişimin, genin çok korunmuş bir bölgesinde yer aldığı (Şekil 4-11) ve % 100 patolojik olacağı verisine ulaşıldı (Şekil 4-12).



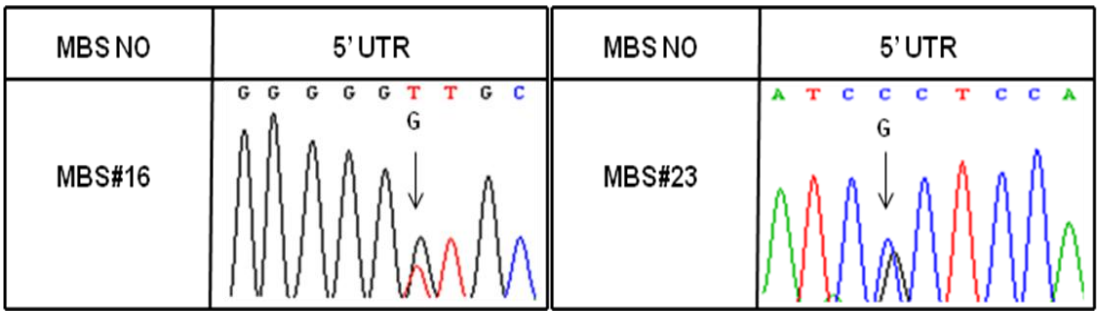
Şekil 4-11: *HOXB1* deki p.Arg207 'nın (p.207R) diğer türlerle karşılaştırması (79'dan)



Şekil 4-12: *HOXB*1 deki p.Arg207His'in POLYPHEN-2 programındaki değerlendirme sonucu (79'dan)

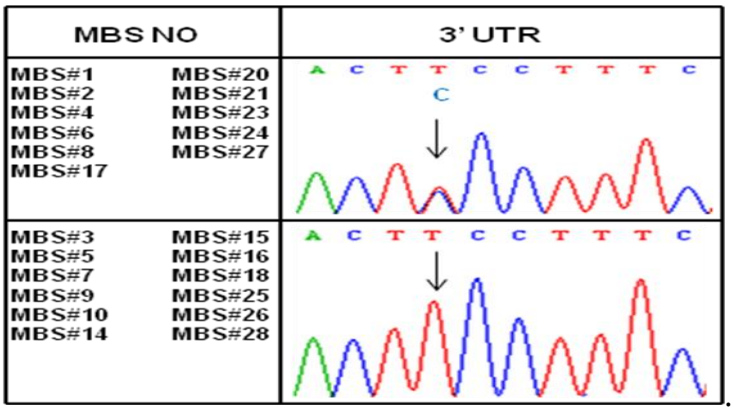
4.2.4. *HOXB2* Geni

Genin 5' UTR bölgesinde MBS#16 olgusunda heterozigot rs9899351, MBS# 23 olgusunda ise heterozigot rs111401880 polimorfizmi saptandı (Şekil 4-13).

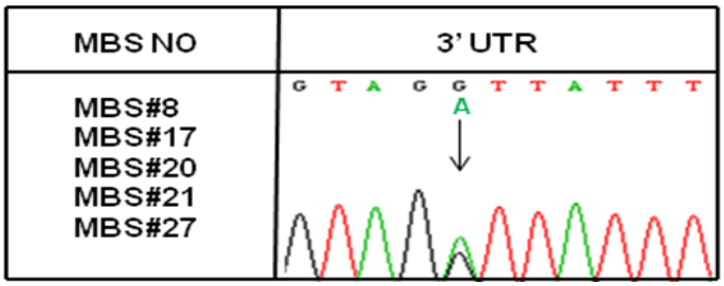


Şekil 4-13: rs9899351 ve rs111401880 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı

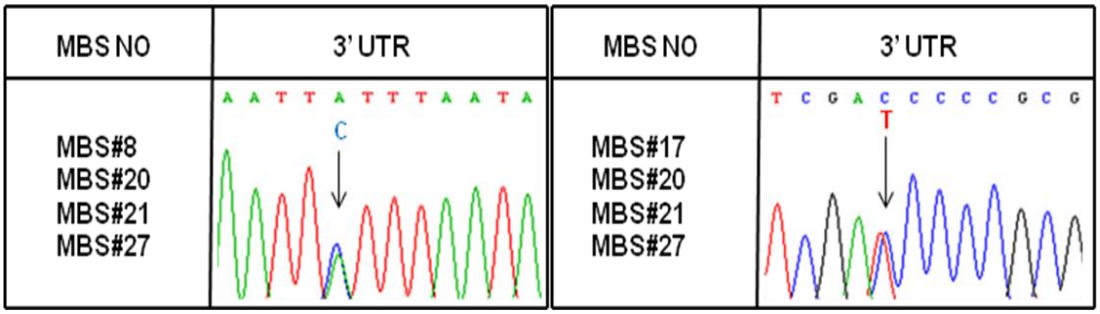
Genin 3’ UTR bölgesinde daha önce veritabanlarında tanımlanmış 4 farklı polimorfizm (rs1042815, rs1042818, rs1042822 ve rs2229302) farklı olgularda homozigot ve heterozigot olarak bulundu (Şekil 4-14, 4-15 ve 4-16).



Şekil 4-14: rs1042815 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı



Şekil 4-15: rs1042818 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı



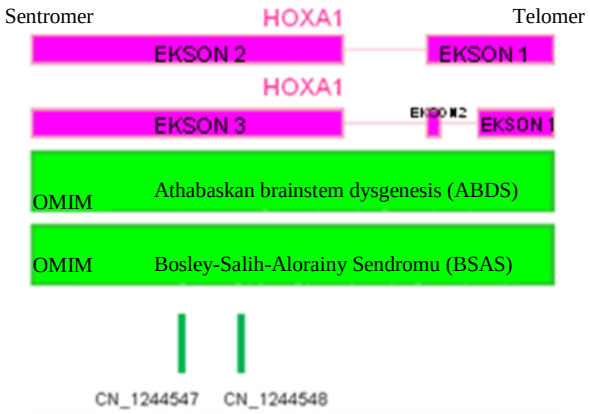
Şekil 4-16: rs1042822ve rs2229302 polimorfizmi saptanan olgular ve örnek dizi kromatogramı

4.3. Mikrodizin Analiz Sonuçları

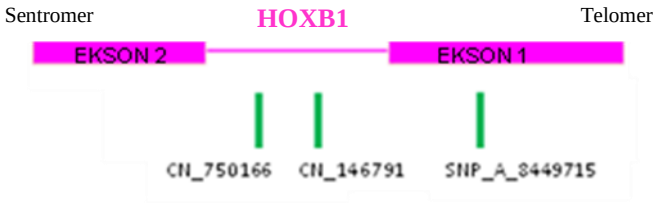
Aday bölgelerin analizinde MBS#2 hariç diğer olguların hiçbirinde herhangi bir delesyon/duplikasyon saptanmadı. MBS#2 olgusunda iki farklı bölgede üç doz artışı olduğu gözlendi. Bunlardan biri 1p22.2 bölgesinde 203 prob ile gösterilen 355 kb lik bir alan, diğeri 3q25.2 de 207 prob ile gösterilen 379 kb lik bir alan idi.

Affymetrix SNP 6.0 çipinde, *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXB1* ve *HOXB2* gen bölgelerinde yer alan CNV ve SNP probları araştırıldığında *HOXA1* ve *HOXB1* genlerinin bulunduğu bölgede SNP ve CNV problarının bulunduğu ancak *HOXA2* ve *HOXB2* gen bölgelerinde herhangi bir prob bulunmadığı belirlendi. *HOXA2* geni için en yakın probun genin 5' yönünde (telomerik) 276 bp ve 3' yönünde (sentromerik) 1340 bp uzaklığında, *HOXB2* geni için ise gene 5' yönünde (telomerik) 2999 bp, 3' yönünde (sentromerik) 714 bp uzaklığında olduğu belirlendi. *HOXA1* geni üzerinde 3' UTR bölgesine yerleşik iki CNV probu bulunduğu (CN_1244547 ve CN_1244548); *HOXB1* geninde ise iki CNV probunun intronda (CN_750166, CN_146791), bir SNP probunun birinci eksonda yer aldığı (SNP_A-8449715) belirlendi (Şekil 4-17, 4-18).

Dizin analiz sonuçları kullanılarak, ≥1 kb delesyon/duplikasyon analizleri *HOXA1* ve *HOXB1* genleri için yapılabildi.



Şekil 4-17: ChAS programında *HOXA1* gen bölgesinin görüntüsü, ilişkili OMIM bilgisi, SNP 6.0 kitindeki probları ve yerleri



Şekil 4-18: ChAS programında *HOXB1* gen bölgesinin görüntüsü, SNP 6.0 kitindeki probları ve yerleri

MBS#1, MBS#2, MBS#3, MBS#4, MBS#6, MBS#14, MBS#15, MBS#19, MBS#20, MBS#23, MBS#24, MBS#27, MBS#28 olgularının hiç birinde *HOXA1* ve *HOXB1* genlerinde delesyon/duplikasyon gözlenmedi.

5. **TARTIŞMA**

Moebius sendromu, bilateral konjenital fasiyal displazi ile kendini gösteren nadir bir nörolojik hastalık olarak tanımlanmaktadır (6). Prevelansı 1/1 000 000 dan az olan sendromun ana klinik bulgusu olarak kabul edilen bilateral ya da unilateral fasiyal paralizis, olguların fasiyal sinirlerinin (KS VII) etkilenmesinden kaynaklanmaktadır (6,31). KS VII nin etkilenmesinin yanı sıra, abdusens (KS VI) ve hipoglossal sinirlerinin (KS XII) etkilendiği olgular da vardır. KS VII paralizisi olguların mimik oluşumunu etkileyerek yüz görünümlerinin maske takmış gibi ifadesiz olmasına sebep olurken, KS VI paralizisi lateral göz hareketlerinin kısıtlanmasına, KS XII paralizisi ise dil kaslarında zayıflığa neden olmaktadır. Diğer kraniyal sinirlerin etkilendiği olgularda, etkilenen sinir çeşidine bağlı olarak farklı klinik bulgular görülmektedir.

Moebius sendromunun etiyolojisi henüz aydınlatılamamış olsa da vasküler, genetik ve teratojenik etmenlerin birbirleri ile örtüşen sonuçlarının bu sendroma yol açtığı düşünülmektedir (51, 52,53-57).

Genel olarak olguların çoğu sporadik olmasına karşın, çeşitli yayınlarda otozomal dominant, otozomal resesif ve X e bağlı resesif kalıtımla giden tiplerin olduğu da bildirilmektedir (6,33,34,35).

İTF, Tıbbi Genetik AD da 1993 yılından 2010 sonuna kadar klinik tanı alan 25 Moebius olgusundan 7 sinde akraba evliliği (%28) olmasına karşın, olguların ailelerdeki etkilenmiş tek birey olmaları kalıtım modeli için yönlendirici bulunmadı. Ayrıca 500-600 bant düzeyinde herhangi bir kromozom anomalisi saptanmamış 19 olgu ve ebeveyninde yapılan bir çalışmada, 13q12.11-12 bölgesinde araları 100-200 kb mesafede yerleşik 57 mikrosatelit markörü ile olası mikrodelesyonlar dışlanmıştır (60,61). Bu nedenle, Moebius sendromunun genetik etiyolojisinin araştırılmasına aday gen yaklaşımı ile devam edilmesine karar verildi.

Bu amaçla KS VII nin gelişiminde ve fonksiyonunda etkin olabilecek olası genler MGI veribankasındaki fenotip-genotip ilişkili çalışmalardan yararlanılarak belirlendi. Bu genler arasından KS VII nin köken aldığı r4 de fetal evrede eksprese olan *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXB1* ve *HOXB2* genlerinin araştırılması amaçlandı. Bilgimiz dahilinde literatürde *HOXA1* dışında diğer genlerin (*HOXA2*, *HOXB1* ve *HOXB2*)

Moebius sendromu ile ilişkisini araştıran herhangi bir moleküler inceleme bulunmamaktadır. Çalışmamız, bu genlerin Moebius sendromu ile ilişkisini araştıran ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. 2010 yılında *HOXA1* geni ile Moebius sendromu ilişkisinin araştırıldığı bir yayında, bu sendrom ile olası *HOXA1* gen mutasyonları dışlanmaktadır (76). Bizim çalışmamız da bu bulguyu desteklemektedir.

CRANIRARE projesi kapsamında yapılan mikrodizin çalışmasında Moebius sendromu için aday gösterilen bölgeler MBS#2 olgusu dışında dışlandı. MBS#2 olgusunda iki farklı bölgede 3 doz artış olduğu gözlendi. Bu bölgelerden biri, 1p22.2 olup 203 marker ve 355 kb lık alanı, diğeri 3q25.2 de olup 207 marker ve 379 kb lik alanı kapsamaktaydı. Her iki artışın görüldüğü bölge DGV (Database of Genomic Variants) veritabanında CNV olarak tanımlanmaktadır. Bu sonuçlar, incelenen 13 Moebius olgusunda, sorumlu gösterilen aday kromozom bölgelerinde olası delesyon/duplikasyon varlığını dışlamaktadır.

HOXA1:

HOXA1 heterozigot farelerde rombomer gelişiminin normal olduğu ancak homozigot olanlarda r4 ve r5 in gelişiminde eksikliklerin yanı sıra, fasiyal ve abdusens kraniyal sinir çekirdeklerinin oluşmadığı bildirilmektedir (67,68). İnsanlarda ise *HOXA1* deki homozigot mutasyonların, Athabaskan Beyinkökü Disgenezi (*Athabaskan brainstem dysgenesis*) Sendromu (ABDS) ve Bosley-Salih-Alorainy Sendromuna (BSAS) yol açtığı bilinmektedir (74,75). Şimdiye kadar *HOXA1* geninde ABDS ile ilişkili iki homozigot anlamsız (p.R26X ve p.Y28X) ve bir tek bazlık homozigot duplikasyon mutasyonu (c.175dup1) tanımlanmış olup bu mutasyonlar genin herhangi özgün bir domain ve motif yapısında yer almamaktadır (77). Bu gende BSAS ile ilişkilendirilen bir adet tek bazlık homozigot delesyon mutasyonu da (c.185del1) proteinin özgün bir domain ve motif yapısında yer almamaktadır (77). *HOXA1* de homozigot/heterozigot p.H73R polimorfizmi ise (rs10951154) polipeptid zincirinin birinci histidin yapısında yer almakta olup bazı çalışmalarda otizm ile ilişkilendirimiştir (80). ABDS ve BSAS lu olguların yaklaşık olarak % 20 sinde fasiyal zayıflık gözlendiğinden, Moebius sendromunun da *HOXA1* geni ile ilişkili olabileceği düşünülerek yapılan bir çalışmada, 40 olguda bu gen dizi analizi ile taranmış ve dışlanmıştır (76).

Bizim çalışmamızda da *HOXA1* de bilinen polimorfizmler dışında herhangi bir mutasyon saptanmadı. 2 olguda (MBS#4, MBS#25) heterozigot olarak görülen rs10951154 polimorfizmi (c.218A>G) 73. kodondaki histidinin arjinine (p.His73Arg) dönüşmesine neden olan yanlış anlamlı bir değişim olup polipeptid zincirinin birinci polihistidin yapısında yer almaktadır. NCBI veritabanında heterozigotluk sıklığı ile ilgili bilgi bulunmamaktadır.Bu polimorfizmin otizm ile ilişkilendirildiği yayınların yanı sıra, böyle bir ilişkinin bulunmadığını bildiren yayınlar da vardır (80,81,82,93). Bu polimorfizmi heterozigot olarak taşıyan olgularımızdan birinde (MBS#4) PSMG (psikososyal motor gerilik) öyküsü olup bu durum yeni doğan dönemindeki uzun yoğun bakım süreci ile ilişkilendirilmektedir. Diğer olgunun (MBS# 25) klinik bulgularında otizm ile ilişkilendirme bilgisi yer almaması nedeniyle bu polimorfizmin otizm ile ilişkili olup olmadığı konusunda kesin bir görüş sunulamamaktadır.

Bir olguda (MBS#22) heterozigot rs45571645 polimorfizmi (c.436C>A), 146. kodondaki histidinin asparajine dönüşmesine neden olup (p.His146Asn), polipeptid yapının ikinci polihistidin zincirinin son aminoasitini kodlamaktadır. Heterozigotluk sıklığı bilinmeyen bu polimorfizmin Afrikalı, Amerikalı ve İspanyol topluluklarında normal görünen (apperently healty) bireylerde gözlendiği bildirilmektedir (78,79). Bu çalışmada 60 olgudaki 120 allelde, 436. pozisyondaki sitozinin (C) görülme sıklığı %98.3, adeninin (A) görülme sıklığı %1.7 olarak verilmiştir. Bizim olgu grubumuzdaki (n=50) allel sıklıkları da bu çalışma ile uyumlu olup, C ve A nükleotidlerinin görülme sıklıkları sırasıyla % 98 ve % 2 olarak hesaplanmıştır.

MBS#7 ve MBS#9 olgularında *HOXA1* geninin 3’ UTR bölgesinde heterozigot olarak saptanan rs56012816 polimorfizmi (c.*56C>A) için NCBI da heterozigotluk sıklığı % 0.242 olarak bildirilmektedir (78).

Mikrodizin çalışması yapılan olgularda, *HOXA1* geninin 3’ UTR bölgesinde yerleşik olan 2 CNV probunda herhangi bir doz artışı ya da azalışı görülmemiştir. Dizindeki probların *HOXA1* genini tam olarak kapsamaması nedeniyle, heterozigot SNP saptanmayan Moebius olgularında heterozigot ekson delesyonu dışlanamamaktadır.

Olgu grubumuzda *HOXA1* geninde yapılan inceleme, literatürde bu konuda yapılmış ikinci çalışma niteliğinde olup, 2010 yılında yayınlanan Rankin ve ark bulgularını desteklemektedir (76). Bu iki çalışma bir arada değerlendirildiğinde, toplam

65 Moebius olgusunda *HOXA1* geninde herhangi bir mutasyonun saptanmaması, bu gen ile Moebius sendromunun ilişkisinin dışlandığını göstermektedir.

HOXA2:

Fare modeli çalışmaları, rombomer sınırlarının belirlenmesinde *HOXA1* geni ile *HOXA2* geninin örtüşen fonksiyonlarının olduğunu göstermektedir. *HOXA2*$^{-/-}$ mutantlarının r1/r2 ile r2/r3 sınırlarını kaybettikleri (70,71), *HOXA1*$^{-/-}$/*HOXA2*$^{-/-}$ mutantlarının ise rombomer sınırlarının hiç oluşmadığı bildirilmektedir (69). Ayrıca homozigot mutant farelerde kulak kepçesinin gelişmemesi, *HOXA2* geninin dış kulak gelişiminde rol oynadığını göstermektedir (70). Bir çalışmada, bu genin Homeobox domainindeki homozigot p.Gly186Lys (rs119489104) mutasyonu, insanlarda küçük kulak (mikrotia), duyma problemleri ve yarık damak ile ilişkilendirilmiştir (84).

Çalışmamızda 25 olgunun 5 inde (MBS#6, MBS#17, MBS#18, MBS#19, MBS#28) birinci intronda yer alan heterozigot rs2428431 polimorfizmi saptanmıştır. Veritabanlarında heterozigotluk sıklığı ile ilgili bir bilgi bulunmayan bu polimorfizmin tespit edildiği Afrikalı, Amerikalı ve İspanyol topluluklarında sitozin (C) alelinin görülme sıklığı %73.3, guanin (G) alelinin görülme sıklığı ise %26.7 olarak verilmektedir (73,78). Bizim grubumuzda C alleli % 90 ve G alleli % 10 oranında saptanmıştır. *HOXA2* genindeki dizin probları gen dışı bölgelerde yer aldığından, mikrodizin çalışması yapılan olgularda, olası heterozigot *HOXA2* ekson/gen delesyonları dışlanamamıştır. Çalışmamızda bu polimorfizm dışında herhangi bir mutasyon bulunmamış olması bu gen ile Moebius sendromu arasında ilişki olasılığını azaltmaktadır.

HOXB1:

Fare modelleri üzerindeki çalışmalar, homozigot *HOXB1* mutant farelerde rombomer segmentasyonun normal olmasına karşın KS VII nin çekirdeğinin gelişmediğini, bu nedenle farelerde Moebius sendromuna benzer bir fenotipin oluştuğunu göstermiştir (8). Yaptığımız çalışmada, *HOXB1* geninde çeşitli polimorfizmler saptandı. Olguların 5 inde (MBS#8, MBS#17, MBS#20, MBS#21, MBS#27) heterozigot olarak saptanan rs12939811 (c.309A>T; p.Gln103His) 103 üncü kodonda glisini histidine dönüştürmekte ve Homoebox domaini dışında kalmaktadır. NCBI veritabanında heterozigotluk sıklığı konusunda bilgi bulunmamaktadır (78).

MBS#17, MBS#20, MBS#21, MBS#27 olgularında görülen rs12946855 (c.237C>T) ve rs7207109 (c.450G>A) polimorfizmleri birinci eksonda yer alan sessiz (*synonymous*) değişimler olup genin korunmuş motif ve domaininde değillerdir. NCBI veritabanında her ikisi için de heterozigotluk bilgisi bulunmamaktadır (78).

Beş olguda (MBS#8, MBS#17, MBS#20, MBS#21, MBS#27) heterozigot olarak saptanan rs79792056 polimorfizmi, NCBI veritabanında DIP olarak tanımlanmaktadır (78). Homeobox domaini dışında kalan bu polimorfizmde, 9bp lik 5'ACAGCGCCC 3' dizisi ardışık iki ya da üç tekrar biçiminde bulunmaktadır. Faiella ve ark ları 250 birey üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bu dizinin ardışık iki kopya olarak bulunma sıklığını % 78.8, üç kopya olarak bulunma sıklığını ise % 21.2 olarak bildirmişlerdir (94). Bizim olgularımızda, iki kopya sıklığı % 90 ve üç kopya sıklığı % 10 olarak saptanmıştır.

MBS#17 olgusunun ikinci eksonundaki heterozigot rs35115415 polimorfizmi sessiz bir varyasyon olup homoebox domaininde yer almaktadır. NCBI-SNP veribankasında bu polimorfizmin beyaz ırk ve Afrika kökenli Amerikalılarda saptandığı belirtilmekte ancak, heterozigotluk sıklığı konusunda bilgi bulunmamaktadır (78).

Ebeveynleri 2,5° akraba olan MBS#4 olgusunda, *HOXB1* geninin ikinci eksonunda veritabanlarında belirtilmeyen yeni heterozigot c.578C>G değişimi saptandı. Genin homoebox domaini dışında yer alan bu değişim 193. kodondaki nonpolar nötral yüklü alanini, aynı özellikte olan glisine (p.Ala193Gly) dönüştürmektedir. Bu değişimin ailevi bir polimorfizm olup olmadığının anlaşılması için ebeveynlerde de bu eksonun dizi analizi ile incelenmesi planlanmış ancak babanın DNA sının yetersizliği nedeniyle bu çalışma sadece annede yapılabilmiştir. Olgunun annesinde de heterozigot olarak görülen bu değişimin yeni bir polimorfizm olduğu düşünülerek NCBI-SNP veritabanına bildirilmesi planlanmıştır.

MBS#26 numaralı olguda, veritabanlarında daha önce tanımlanmamış c.619G>A değişimi saptandı. Polipeptid zincirinde, 207. kodondaki polar ve pozitif yüklü arginini (R), polar ve nötr histidine (H) dönüştürdüğü (p.Arg207His) belirlenen bu değişimin aralarında 1,5° kuzen evliliği olan ebeveynlerde heterozigot olarak bulunduğu saptandı. Bu değişimin mutasyon olup olmadığının araştırılması için 80 sağlıklı kontrol bireyinde PCR + restriksiyon enzim kesimi tekniği uygulandı ve 160 kontrol kromozomunda bu değişimin olmadığı gösterildi. Interaktif SIFT analizinde

"tolere edilemeyen", POLYPHEN-2 analizinde ise "patolojik" olarak nitelenen bu değişimin olgumuzdaki Moebius sendromu ile ilişkili bir mutasyon olduğu düşünüldü (79,95). Olgumuzda KS VII nin bilateral paralizisi varlığı, *HOXB1 knock-out* farelerde tanımlanmış olan KS VII bilateral paralizisi ile uyumlu olarak değerlendirildi. Kraniyal sinir çekirdeklerinin ve yerleşimlerinin gösterilmesi için olguda kraniyal MRI görüntüleme yapılması planlandı.

HOXB1 transkriptinin etkilediği tüm gen ve gen yolakları çeşitli veritabanlarında listelenmektedir. STRING veritabanında *GATA2, GATA3, EPHA2, PBX1, CD1D, KDM6A (UTX)* genlerinin *HOXB1* geni ile biyolojik ve fonksiyonel olarak ilişkili olabileceği bildirilmektedir (83). *GATA2, GATA3* ve *EPHA2* genlerinin r4 teki ekspresyonlarının. *HOXB1* geni tarafından kontrol edildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (96,97). Bu bulguya dayanarak, *HOXB1* geninin primer etkileşim içinde olduğu diğer genlerin fonksiyonlarının araştırılmasının Moebius sendromunun altında yatan moleküler yolakların aydınlatılmasına katkı getireceği düşünülmektedir.

Canlılarda transkripsiyonel düzenlemenin yapıldığı regülatör bölgelerde meydana gelen mutasyonların, ilgili genin ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir. Transkripsiyonel düzenlenme, transkripsiyon faktörleri ile promotor, *enhancer* (arttırıcı), *silencer* (susturucu) ve *respond element* (cevap elementleri) gibi düzenleyici bölgeler arasındaki etkileşim ile sağlanmaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda *HOXB1* geninin regülatör bölgelerinin incelenmesi önemli olacaktır.

HOXB2:

Çalışmamızda incelediğimiz bir diğer gen olan *HOXB2* geninde yapılan fare modeli çalışmaları da *HOXB1* geninde yapılan çalışmalara benzer sonuçlar vermektedir. *HOXB2*$^{-/-}$ homozigot mutasyonuna sahip farelerde *HOXB1*$^{-/-}$ homozigot mutasyonuna sahip farelere benzer fakat daha ağır olan yüz paralizislerinin görülmesi ve KS VII nin çekirdeğinin olmaması, bu gende olası mutasyonların da Moebius sendromuna yol açabileceğini düşündürmüştür (9). Ekspresyon çalışmaları *HOXB2* geninin *HOXB1* geni üzerinde baskılayıcı (*down regulated)* bir etkisi olduğunu göstermektedir. Fare modeli çalışmaları, *HOXB2* mutantlarında görülen fasiyal paralizisin aslında ekspresyonu azalan *HOXB1* geni nedeniyle ortaya çıkabileceğini gösterdiğinden, *HOXB1* geninin KS VII oluşumundaki önemini daha da artmıştır. Ancak fasiyal defektlerin *HOXB2* mutantlarında daha ağır görülmesi, KS VII nin gelişiminde *HOXB2* nin de önemli bir

rolünün olduğunu göstermektedir (9). Çalışmamızda, Moebius olgu grubunda *HOXB2* geninde bilinen polimorfizmler dışında başka bir değişikliğe rastlanmadı. Saptanan polimorfizmlerin tamamı genin 5' ve 3' UTR bölgesinde yer almakta idi. MBS#16 da heterozigot olarak saptanan rs9899351 (c.-76G>T) in populasyon sıklığı ile ilgili bir bilgi verilmemektedir. MBS#23 deki heterozigot rs111401880 (c.-100G>C) polimorfizmi, NCBI-SNP veribankasında, 60 olguda yapılan bir çalışmada gösterilmiş olup C alelinin % 93, G alelinin ise % 7 oranında görüldüğü bildirilmiştir (78). Bu polimorfizmin heterozigotluk sıklığı ile ilgili bir bilgi ise bulunmamaktadır.

MBS#17 ve MBS#19 hariç tüm olgularda heterozigot ve homozigot olarak saptanan rs1042815 (c.*142C>T) in, NCBI-SNP veribankasında heterozigotluk sıklığı ile ilgili bir bilgi yer almamaktadır. MBS#8, MBS#17, MBS#20, MBS#21, MBS#27 olgularında görülen heterozigot rs1042818 (c.*319A>G) polimorfizmi için de heterozigotluk sıklığı ile ilgili bir bilgi yer almamaktadır., *1000 Genomes Project* çalışması, görülme sıklılarını A aleli için %83, G aleli için %17 olarak vermektedir (78). Bizim olgularımızda A aleli görülme sıklığı % 90, G aleli görülme sıklığı % 10 olarak saptandı.

rs1042822 (c.*335C>A) polimorfizmi MBS#8, MBS#20, MBS#21, MBS#27 olgularında, rs2229302 (c.*28C>T) polimorfizmi MBS#17, MBS#20, MBS#21, MBS#27 olgularında heterozigot olarak saptandı. NCBI-SNP veribankasında bu polimorfizmlerin heterozigotluk sıklığı ile ilgili bir bilgi yer almamaktadır.

HOXB2 genindeki dizin probları gen dışı bölgelerde yer aldığından, mikrodizin çalışması yapılan olgularda, olası heterozigot *HOXB2* ekson/gen delesyonları dışlanamamıştır.

Moebius sendromunun nadir bir hastalık olarak görülmesi ve olguların genelde ailedeki etkilenmiş tek bireyler olmaları, bu sendrom ile ilişkili gen ya da genlerin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Literatürde bildirilmiş olan az sayıda ailevi Moebius olgusunda yapılan bağlantı analizi çalışmaları ile ilişkili bir gen/genlere ulaşılamaması, çalışmaları zengin olgu grupları üzerinde aday gen yaklaşımına yönlendirmektedir. Anabilim dalımızda Moebius sendromu tanısı alan 25 sporadik olgu, aday gen çalışmalarının yapılabilmesi için iyi bir populasyon oluşturmaktadır.

Çalışmamızda dizi analizi *HOXA1, HOXA2, HOXB1 ve HOXB2* genlerinde veritabanlarında tanımlanmış 15 farklı polimorfizm saptanmıştır.

HOXB1 geninde yalnızca bir olguda karşılaştığımız homozigot yanlış anlamlı değişimin, olgunun ebeveynlerinde heterozigot taşınması ve 160 kontrol kromzomunda görülmemesi nedeniyle bir mutasyon olacağı kanaatine varılmıştır. İnteraktif veritabanlarında bu değişimin patolojik olarak yer alması da bu görüşü destekler nitelikte bulunmuştur.

HOXB1 geninde farklı bir olguda karşılaştığımız heterozigot tanımlanmamış değişimin ise, olgunun annesinde de heterozigot olarak bulunduğunun saptanmasıyla yeni bir polimorfizm olduğuna karar verilmiş ve veritabanlarına bildirilmesi planlanmıştır.

Kalıtım modeli net olmayan, etiyolojisi bilinmeyen, kliniği heterojenlik gösteren ve ilişkilendirilmiş herhangi bir geni olmayan Moebius sendromunda, embriyonal gelişim evrelerinde önemli olan *HOXA1, HOXA2, HOXB1* ve *HOXB2* genlerinin dizi analizi ile incelenmesinin bu sendromla ilgili yapılan araştırmalara katkı getireceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1**.** Keith L. Moore, T. V. N. Persaud, Hakkı Dalçık, Mehmet Yıldırım, *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*, 2nd ed. Nobel Tıp Kitabevleri; 2009.

2**.** Slack J.M.W, *Essential developmental biology*, 2nd ed. UK: Blackwell Publishing; pp.204. 2006.

3. Fraser S, Keynes R, Lumsden A**.** Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 1990; **344**: 431-435.

4. Birgbauer E, Fraser S.E. Violation of cell lineage restriction compartments in the chick hindbrain. *Development* 1994; **120**: 1347-1356.

5. Stiles J. *The fundamentals of brain development: integrating nature and nurture*, USA: pp.100-150.2008.

6. *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM)* İnternette Erişim 01.02.2010, McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD) World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

7. Sanes D.H, Reh T.A, Harris W.A, *Development of the nervous system* 2nd ed.Elsevier Academic Press, pp.30-40. 2006**.**

8. Goddard J.M, Rossel M, Manley N.R, Capecchi M.R. Mice with targeted disruption of Hoxb-1 fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development* 1996; **122**: 3217-3228.

9. Barrow J.R, Capecchi M.R. Targeted disruption of the Hoxb-2 locus in mice interferes with expression of Hoxb-1 and Hoxb-4. *Development* 1996; **122**: 3817-3828

10. Strachan T, Andrew PR. *Human Molecular Genetics 3*, 3rd ed. New York: Garland Publishing; 2004

11. Dudek R, Fix J.D, *Embryology*, 3rd ed. LippincottWilliams&Wilkins, 2005.

12. LeVay S, Baldwin J, *Human sexuality*, 3rd ed. Sinauer Associates, 2009.

13. Sadler T, Langman J, Langman's medical embryology, Lippincott William & Wilkins, 2009.

14. Wikipedia, The Free Encyclopedia World Wide Web URL: İnternette Erişim, 02.10.2010, http://www.en.wikipedia.org/w/index

15. von Baer, K. Über die Entwickelungsgeschichte der Thiere, Beobachting and Reflexion, Borntrager, Königsberg, 1828.

16. Cordes S.P, Molecular Genetics of Cranial Nerve Development in Mouse. *Nature reviews. Neuroscience* 2001; Volume 2: 611-622.

17. McGraw-Hill Company İnternette Erişim 15.09.2010, http://www.mcgraw-hill.com.

18. Wilson L, Akesson E.J, Stewart P.A, *Cranial nerves in health and disease*, 2nd ed,USA: B. C. Decker Incorporated; 2002.

19. John Wiley & Sons, Inc. İnternette Erişim, 12.10.2010, www.blackwellpublishing.com.

20. Verzjil, H. T. F. M., Van der Zwaag, B., Cruysberg, J. R. M., Padberg, G. W. Moebius syndrome redefined: a syndrome of rhombencephalic maldevelopment. *Neurology* 2003; **61**: 327-333.

21. Von Graefe A, In. von Graefe, A.; Sawmisch, T. (eds.): Handbuch der gesammten augenheilkunde. *Leipzig: Engemann* 1880; P. 60.

22. Moebius P. J, Ueber angeborene doppelseitige Abducens-Facialis-Laehmung. *Muench. Med. Wschr*. 1888; **35**: 91-94,108-111.

23. Wilbrand H, Saenger A, Die Neurologie des Auges. *Muench. und Wiesbaden* 1921; **8:** 179.

24. Sprofkin B. E, Hillman J. W, Moebius's syndrome--congenital oculofacial paralysis. *Neurology* 1956; **6**: 50-54.

25. Wishnick M. M. Nelson L. Reich E. W. Hubbard L. Moebius syndrome with dominant inheritance. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet*. 1981; **33**: 96A.

26. Miller MT. Ray V. Owens P. Chen F. Moebius and Moebius-like syndromes (TTV-OFM, OMLH). *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1989; **26**:176-88.

27. Möbius, P.J. Über infantilen Kernschwund. *Munch. Med. Wochenschr* 1892; **39**: 17,41,51.

28. Hendersen, J.L. The congenital facial diplegia syndrome, *Brain* 1939; **62**: 381–403.

29. Richards, R.N. The Möbius syndrome. *J. Bone Joint Surg*. 1953; **35**: 437–444.

30. Kumar, D. Moebius syndrome. *J. Med. Genet*. 1990; **27**: 122–126.

31. Orphanet: The portal for rare diseases and orphan drugs. İnternette Erişim, 10.02.2010. http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=EN.

32. Moebius Syndrome Foundation announces first ever research conference. *Moebius Syndrome News,* 2007;*16,* 1.

33. Krueger K. E. Friedrich D. Familiaere kongenitale Motilitaetsstoerungen der Augen. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 1963; **142**: 101-117.

34. Legum C, Godel V, Nemet P. Heterogeneity and pleiotropism in the Moebius syndrome. *Clin. Genet*. 1981; **20**: 254-259.

35. Journel H, Roussey M, Le Marec B. MCA/MR syndrome with oligodactyly and Moebius anomaly in first cousins: new syndrome or familial facial-limb disruption sequence? *Am. J. Med. Genet.* 1989; **34**: 506-510.

36. Abramson DL, Cohen Jr MM, Mulliken JB. Möbius syndrome: classification and grading system. *Plast Reconstr Surg* 1998; **102(4)**: 961-7.

37. Goldberg C, DeLorie R, Zuker RM, et al. The effects of gracilis muscle transplantation on speech in children with Moebius syndrome. *J Craniofac Surg* 2003; **14(5):** 687-90.

38. Briegel W. Neuropsychiatric findings of Möbius sequence: a review. *Clinical Genetics* 2006; **70(2)**: 91–97.

39. Terzis JK, Noah EM. Dynamic restoration in Möbius and Möbius-like patients. *Plast Reconstr Surg* 2003; **111(1):** 40-55.

40. Terzis JK, Noah EM. Möbius and Möbius-like patients: etiology, diagnosis, and treatment options. *Clin Plast Surg* 2002; **29(4)**: 497-514.

41. Parker D. L, Mitchell P. R, Holmes G. L. Poland-Moebius syndrome. *J. Med. Genet*.1981; **18**: 317-320.

42. Bozaykut A,İpek İ.Ö, Atay E, Ünver O. Poland-Moebius sendromu: olgu sunumu,*Türk Pediatri Arşivi* 2004; **39**: 178- 80.

43. Baraitser, M. Genetics of Möbius syndrome. *J. Med. Genet*. 1977; **14**: 415–417.

44. Hellstrom, B. Congenital facial diplegia. *Acta Paediatr*. 1949; **37**: 464–473.

45. Johansson M, Wentz E, Fernell E, Strömland K, Miller MT, Gillberg C. Autistic spectrum disorders in Möbius sequence: a comprehensive study of 25 individuals. *Dev Med Child Neurol* 2001; **43**: 338-345.

46. Gillberg C, Steffenburg S. Autistic behaviour in Moebius syndrome. *Acta Paediatr Scand* 1989; **99**: 399-406.

47. Miller M, Strömland K. The Möbius sequence: a relook. *J AAPOS* 1999; **3**: 199-208.

48. Briegel W, Schimek M, Kamp-Becker I, Hofmann C, Schwab KO. Autism spectrum disorders in children and adolescents with Moebius sequence. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2009; **18**: 515-519.

49. Durukan İ, Türkbay T. Möbius Sendromunda Otizm: Eştanı mı, Rastlantı mı? *Pskiyatride Güncel Yaklaşımlar* 2010; **2(3)**: 308317.

50. Pedraza S, Gamez J, Rovira A, ve ark. MRI findings in Moebius syndrome: correlation with clinical features. *Neurology 2000;* **55**:1058–1060.

51. Saint-Martin C, Clapuyt P, Duprez T, ve ark. Moebius sequence and severe pons hypoplasia: a case report**.** *Pediatr Radiol* 1998; **28**: 932.

52. Kuhn MJ, Clark HB, Morales A, ve ark. Group III Moebius syndrome: CT and MR findings**.** *AJNR Am J Neuroradiol* 1990; **11**: 903–904.

53. Verzijl, H. T. F. M., Padberg, G. W., Zwarts, M. J. The spectrum of Moebius syndrome: an electrophysiological study. *Brain 2005;* **128**: 1728-1736.

54. Towfighi J, Marks K, Palmer E ve ark. Mobius syndrome: neuropathologic observations. *Acta Neuropathol* 1979; **48**: 11–17.

55. Bavinck J.N, Weaver D.D. Subclavian artery supply disruption sequence: hypothesis of a vascular etiology for Poland, Klippel–Feil,and Moebius anomalies. *Am. J. Med. Genet* 1986; **23**: 903–918.

56. Issaivanan M, Virdi V.S, Parmar V.R,. Subclavian artery supply disruption sequence Klippel–Feil and Mobius anomalies. *Indian J. Pediatr.* 2002; **69 (5)**: 441–442.

57. Ouanounou S, Saigal G, Birchansky S. Moebius Syndrome Case Report. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005; **26**: 430–432.

58. Ziter F. A, Wiser W. C, Robinson A. Three-generation pedigree of a Moebius syndrome variant with chromosome translocation. *Arch. Neurol*. 1977; **34**: 437-442, 1977.

59. Slee J. J, Smart R. D, Viljoen D. L. Deletion of chromosome 13 in Moebius syndrome. *J. Med. Genet.* 1991; **28**: 413-414.

60. Uzumcu A, Karaman B, Toksoy G, Uyguner ZO, Candan S, Eris H ve ark. Molecular genetic screening of MBS1 locus on chromosome 13 for microdeletions and exclusion of FGF9, GSH1 and CDX2 as causative genes in patients with Moebius syndrome. *Eur J Med Genet* 2009*;* **52(5):**315-20.

61. Uzumcu A, Candan S, Toksoy G, Uyguner ZO, Karaman B, Eris H ve ark. Mutational screening of BASP1 and transcribed processed pseudogene TPPsig-BASP1 in patients with Möbius syndrome. *J Genet Genomics* 2009; **36(4)**: 251-6.

62. Donahue SP, Wenger SL, Steele MW, Gorin MB. Broad-spectrum Mobius syndrome associated with a 1;ll chromosome translocation.*Ophthalmic Paediatr Genet* 1993; **14**: 17-21.

63**.** Nishikawa M, Ichiyama T, Hayashi T, Furukawa S. Moebius-like syndrome associated with a 1;2 chromosome translocation. *Clin. Genet.* 1997; **51**: 122-123.

64. Kremer H, Kuyt L. P, Van den Helm B, Van Reen M, Leunissen J. A. M., Hamel B. C. J, ve ark. Localization of a gene for Moebius syndrome to chromosome 3q by linkage analysis in a Dutch family. *Hum. Molec. Genet*. 1996; **5**: 1367-1371.

65. Van Der Zwaag B, Verzijl HT, Beltran-Valero De Bernabe D, Schuster VL, Van Bokhoven H, Kremer H ve ark. Mutation analysis in the candidate Möbius syndrome genes PGT and GATA2 on chromosome 3 and EGR2 on chromosome 10. *J Med Genet.* 2002; **39(6)**:E30.

66. Verzijl H. T. F. M, van den Helm B, Veldman B, Hamel B. C. J, Kuyt L. P, Padberg G. W, Kremer H. A. Second Gene for Autosomal Dominant Moebius Syndrome Is Localized to Chromosome 10q, in a Dutch Family. *Am. J. Hum. Genet. 1999;* **65**: 752–756.

67. Lufkin T, Dierich A, LeMeur M, Mark M, Chambon P. Disruption of the *Hox-1.6* homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* 1991; **66**: 1105-1119.

68. Chisaka O, Musci T. S, Capecchi M. R. Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *Hox-1.6*. *Nature* 1992; **355:** 516-520.

69. Champagnat J, Fortin G. Primordial respiratory-like rhythm generation in the vertebrate embryo. *Trends Neurosci* 1997; **20**: 119-124.

70. Krumlauf R. *Hox* genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. *Trends Genet* 1993; **9**: 106-112.

71. Barrow J.R, Capecchi M.R. Compensatory defects associated with mutations in Hoxa1 restore normal palatogenesis to Hoxa2 mutants. *Development* 1999; **126**: 5011-5026.

72. Rossel M, Capecchi M.R. Mice mutant for both Hoxa1 and Hoxb1 show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development.
Development 1999; **126**: 5027-5040.

73. Ensembl Database, İnternette erişim: 10.01.2011 World Wide Web URL http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene.

74. Tischfield M. A, Bosley T. M, Salih M. A. M, Alorainy I. A, Sener E. C, Nester M. J, ve ark. Homozygous HOXA1 mutations disrupt human brainstem, inner ear, cardiovascular and cognitive development. *Nature Genet*. 2005; **37**: 1035-1037.

75. Bosley T. M, Alorainy I. A, Salih M. A, Aldhalaan H. M, Abu-Amero K. K, Oystreck D. T. ve ark. The clinical spectrum of homozygous HOXA1 mutations. *Am. J. Med. Genet*. 2008; **146A**: 1235-1240.

76. Rankin J.K, Andrews C, Chan W, Engle E.C. *HOXA1* mutations are not a common cause of Moebius syndrome. *J AAPOS*. 2010; **14(1)**:78-80.

77. Human Genome Mutation Database, İnternette erişim: 26.01.2011.World Wide Web URL: http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac

78. National Center for Biotechnology Information, İnternette erişim: 11.02.2010. http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

79. PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2), İnternette erişim:17.04.2011. http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2

80. Ingram JL, Stodgell CJ, Hyman SL, Figlewicz DA, Weitkamp LR, Rodier PM. Discovery of allelic variants of HOXA1 and HOXB1: Genetic susceptibility to autism spectrum disorders. *Teratology* 2000; **62**: 393-405.

81. Li J, Tabor HK, Nguyen L, Gleason C, Lotspeich LJ, Spiker D ve ark. Lack of association between HoxA1 and HoxB1 gene variants and autism in 110 multiplex families. *Am J Med Genet* 2002; **114**: 24-30.

82. Romano V,Cali F, Mirisola M, Gambino G, Anna R.D, Rosa P.D. ve ark. Lack of association of HOXA1 and HOXB1 mutations and autism in Sicilian (Italian) patients *Molecular Psychiatry* 2003; **8**: 716–717.

83. String: functional protein association Networks, İnternette erişim: 01.03.2011, http://string-db.org/

84. Alasti F, Sadeghi A, Sanati M. H, Farhadi M, Stollar E, Somers T. ve ark. A mutation in HOXA2 is responsible for autosomal-recessive microtia in an Iranian family. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; **83**: 424.

85. Lüleyap Ü.H., *Moleküler Genetiğin Esasları*, İstanbul: Nobel Kitabevleri,2008.

86. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977; **74 (2)**: 560–4.

87. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1975; **94 (3)**: 441–8.

88. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977; **74 (12)**: 5463–7.

89. UCSC Genome Browser, İnternette erişim: 22.06.2010 World Wide Web URL; http://genome.ucsc.edu

90. *Restriction enzyme digest of DNA* İnternette erişim: 17.04.2011 World Wide Web URL; http://insilico.ehu.es/restriction

91. Affymetrix İnternette erişim: 12.03.2010 World Wide Web URL; http://www.affymetrix.com.

92.Mouse Genome Informatics, İnternette erişim: 20.01.2011 World Wide Web URL; http://www.informatics.jax.org

93. Muscarella LA, Guarnieri V, Sacco R, Curatolo P, Manzi B, Alessandrelli R ve ark, Candidate gene study of HOXB1 in autism spectrum disorder. *Molecular Autism*. 2010; **1(1):**9.

94. Faiella A, Zortea M, Barbaria E, Albani F, Capra V, Cama A ve ark. A genetic polymorphism in the human HOXB1 homeobox gene implying a 9bp tandem repeat in the amino-terminal coding region. *Human mutation*, 1998;**12(5):**363.

95. SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant, İnternette erişim: 15.04.2011 World Wide Web URL; http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html.

96. Pata I, Studer M, van Doorninck JH, Briscoe J, Kuuse S, Engel JD ve ark. The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development*. 1999;**126(23):** 5523-31.

97. Chen J, Ruley HE. An enhancer element in the EphA2 (Eck) gene sufficient for rhombomere-specific expression is activated by HOXA1 and HOXB1 homeobox proteins. *J Biol Chem*. 1998; **273(38)**: 24670-5.

FORMLAR

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

PROJE ADI: MOEBIUS SENDROMLU OLGULARDA *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXB1* VE *HOXB2* GEN İLİŞKİSİNİN DNA DİZİLEME YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Tarih:

Bu araştırma, kalıtsal bir hastalığı bulunan hastalar ile ailelerini ilgilendiren bir çalışmadır. Böylesi bir çalışmaya katılma kararı vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. Aşağıdaki **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Olur Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı:

Araştırmanın amacı sizde/ aile bireylerinizde yukarıda belirtilen genetik hastalığa yol açan genetik faktörleri tanımlamaktır. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü Tıbbi Genetik Bilim Dalı tarafından yürütülecektir.

Yapılan epidemiyolojik ve genetik çalışmalar, bu hastalığa genetik faktörlerin yol açabileceğini düşündürmektedir. Hastalığa neden olan gen ve genlerin tanımlanabilmesi amacı ile yapılacak analizler için sizden ve ailenizin etkilenmiş ve etkilenmemiş üyelerinden kan örnekleri almamız gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmada gönüllü katılım esas alınmıştır. Bu çalışma için sizden alınan kanlardan elde edilecek DNA örnekleri başka bir çalışma için kullanılmayacaktır.

2. Olası riskler ve faydalar :

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Ancak yaptığımız testlerin sizin veya ailenizin bir bireyinin gelecekte bu genetik hastalıktan etkileneceğini ortaya çıkarabileceğini belirtmek isteriz. Bu bilginin kötü yönde kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizde psikolojik sorun da yaratabilir. Sizde böyle bir gen bulunduğunu saptadığımızda bulgularımızı istediğiniz takdirde size bildireceğiz. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Çocuklarla ilgili açıklamalar: Çalışmalarımız sonlandığında çocuklarınızın bu geni taşıdığını ve bunun ilerdeki kuşaklar için bir risk oluşturduğunu bulabiliriz. Bu bulgularımız çocuklara erişkin çağa ulaşıncaya kadar anlatılmayacak ve onlarla tartışılmayacaktır. Erişkin dönemlerinde kendi arzuları doğrultusunda bilgi ve genetik danışma sağlanacaktır. Bu açıklamalar doğrultusunda çocuğunuzun bu çalışmaya katılması için tercihen her iki ebeveynin, eğer mevcut değilse bir tanesinin izin formunu imzalaması gerekmektedir.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı ailenizde saptanan genetik hastalığa neden olan veya ortaya çıkmasını kolaylaştıran genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada size veya çocuğunuza doğrudan yada dolaylı bir yararının olup olmayacağını henüz bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece gelecekte diğer hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz taktirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Uygulanacak işlemin yapısı ve amacı hakkında, olası riskleri ve yararları tarafımdan ,

---

(Doktor Adı)

hastaya, ---

(Aile Adı)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek yeni riskler ve/veya yararlar tarafımdan katılımcıya iletilecektir.

Tarih :

Doktorun imzası:

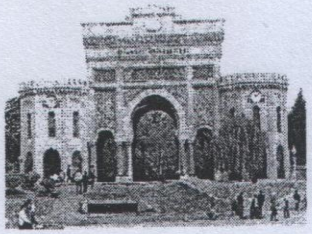
Kontak kurulabilecek kişiler: Doç. Dr. Z. Oya UYGUNER
Bio. Hilal Özgür

Ulaşılabilecek Tel. No.'ları: Direk hat: (0 212) 631 13 63
Dahili hat: (0 212) 414 20 00 - 32327

Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı Enstitüsü Tıbbi Genetik Bilim Dalı
Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi: hllzgr@hotmail.com

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 2553

Tarih : 26/09/2008

Konu : Doç.Dr.Hülya KAYSERİLİ hk,

Sayın, Doç.Dr.Hülya KAYSERİLİ
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgi : 16.04.2008 tarihli, 50 sayılı yazınız,

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz 2008/1194 dosya no'lu "Kraniofasiyel malformasyonlara klinik ve bilimsel yaklaşım, An integrated clinical and scientific approach for craniofacial malformations" başlıklı çok merkezli (6 merkez) çok uluslu Klinik ve Genetik araştırma kurulumuzun 21.05.2008 tarihli, 05 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafer ARI
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 21/05/2008

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 5

Sorumlu araştırıcılığını Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Hülya KAYSERİLİ'nin üstlendiği 2008/1194 protokol numaralı "Kraniofasiyel malformasyonlara klinik ve bilimsel yaklaşım, An ıntegrated clınıcal and scıentıfıc approach for cranıofacıal malformatıons" başlıklı çok merkezli (6 merkez) çok uluslu Klinik ve Genetik araştırma kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilimdalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBECİ
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM (Katılmadı)
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN (Katılmadı)
Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU
Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR (İzinli)
Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)
Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR (İzinli)
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK (Katılmadı)
Hukukçu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hilal	**Soyadı**	Özgür
Doğ.Yeri	Eskişehir	**Doğ.Tar.**	19.05.1984
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	14443426334
Email	hllzgr@hotmail.com	**Tel**	05323060626

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Ens. Genetik	2011
Lisans	Marmara Üniversitesi Fen-Edeb.Fak.Biyoloji bölümü	2006
Lise	Özel Atayurt Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Tıbbi Satış Mümessili	Basel Kimyevi Maddeler ve İlaç Sanayi, İSTANBUL	2007-2008
2.	Bölge Sorumlusu	Piyon Emzirme Çözümleri, İSTANBUL	2006-2007
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	Orta	Orta		

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	62	63	65
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office Programları	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

V.Dismorfoloji Günleri, Nisan 2011, İSTANBUL
R.Ö.Rosti, Z.O. Uyguner, M.Bekerecioğlu, **H.Özgür**, S.Pehlivan
Turkish Setleis Syndrome Family with *TWIST2* Mutation (Bildiri)

Nörometabolik Dismorfoloji Sempozyumu, Şubat 2011, İSTANBUL (Dinleyici)

9.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Aralık 2010, İSTANBUL
H.Özgür, G. Toksoy, U. Altunoğlu, H. Kayserili, S. Başaran, O. Uyguner
Novel de novo splice site mutation in *EFNB1* gene cause craniofrontonasal syndrome (Poster)
Kurslar: Kalıtım Modelleri, Klinik Tanı ve Genetik Danışma
Mikroarray çeşitleri, Array CGH ve CNVs taramaları
Moleküler Genetik Tanıda İnteraktif Yaklaşımlar
Kanserli Hastaya Yaklaşım

Hibrid Kursu (2.Course in Integration of Cytogenetics, Microarrays and Massive Sequencing in Biomedical and Clinical Research), Ekim 2009, İSTANBUL

IV. Dismorfoloji Günleri, Nisan 2009, İSTANBUL (Dinleyici)

2.Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi- 5.Tıbbi Biyolojik Bilimler Öğrenci Sempozyumu
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 2006, İSTANBUL (Dinleyici)

ISO 22000 Bilgilendirme Semineri
İstanbul Teknik Üniversitesi, 2006, İSTANBUL (Dinleyici)

10.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi (Dinleyici)
Marmara Üniversitesi, 2003, İSTANBUL

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, Tiyatro