NURIYE DINÇKAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2016

← 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

(DOKTORA TEZİ)

NON-SENDROMİK DİŞ AGENEZİSİ İLE İLİŞKİLİ YENİ GENLERİN VE SİNYAL YOLAKLARININ YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

NURİYE DİNÇKAN

DANIŞMAN
PROF. DR. Z. OYA UYGUNER

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Doktora öğrencisi Nuriye DİNÇKAN COŞKUN tarafından Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER 'in danışmanlığında hazırlanan ''Non- Sendromik Diş Agenezisi İle İlişkili Yeni Genlerin ve Sinyal Yolaklarının Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri İle Araştırılması'' başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 05/09/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Uğur ÖZBEK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE Genetik A.D

Prof. Dr. Oya AKTÖREN
İ.Ü. Diş Hekimliği Fak. Pedodonti A.D.

Prof. Dr. Hülya KAYSERİLİ
Koç Üniv. Tıp Fak. Tıbbi Genetik A.D..

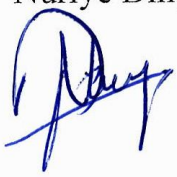
Doç. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN
T.C. Bilim Üniv. Tıp Fak. Tıbbi Genetik A.D.

Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER
İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Genetik A.D.
(Danışman)

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.

Nuriye Dinçkan



İTHAF

Barış ve huzura kavuşmalarını dilediğim tüm dünya çocuklarına...

TEŞEKKÜR

Moleküler genetik alanında bildiğim herşeyi öğreten, en başından beri bana inandığını hissettiren, bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili hocam sayın Prof. Dr. Z. Oya Uyguner'e,

Tezimde, moleküler biyoloji alanında beni yönlendiren, değerli zamanını bana ayırarak bilgilerini aktaran sevgili hocam sayın Doç. Dr Ariadne Letra'ya,

Bana laboratuvarının kapılarını açan ve tüm çalışanları ile yeni nesil dizileme teknolojisini daha iyi anlamamı sağlayan, sayın Prof. Dr. Jim Lupski'ye,

Klinik genetik bilgisinden çok şey öğrendiğim ve hastaları birlikte değerlendirdiğim sayın Prof. Dr. Hülya Kayserili'ye,

Genetik bilimiyle ilgili en derin tecrübelerinden faydalandığım sayın Prof. Dr. Seher Başaran'a,

Tıbbı Genetik Anabilim Dalında çalışan herkese, özellikle hasta örneklerinin düzenlenmesinde bana yardımcı olan Alev Yalın'a,

Ziyaretim boyunca teknik desteklerini sürdüren tüm University of Texas Center for Craniofacial Research ekibine,

Aldığım eğitim süresince yardımlarını esirgemeyen tüm Baylor College of Medicine, Human Molecular Genetics bölümü çalışanlarına, Human Sequencing Genome Center'a,

Tez projemi destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tezime katılmayı kabul eden tüm ailelere,

Beni bugünlere getiren, kendime olan inancımı kaybettiğimde bile bana inanan, her kararıma destek olan hayattaki tek varlığım canım anneme,

Hayatta başımıza gelen herşeyin bir sebebi olduğuna, ne olursa olsun herşeyin çok daha güzel olacağına beni inandıran, yol arkadaşıma, Onur'a, çok teşekkür ederim.

[Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 48398]

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Diş Gelişimi 3
2.1.1. Diş Oluşumunun Embriyolojik Aşamaları 3
2.1.2. Diş Gelişiminde Rol Oynayan Moleküller 5
2.2. Diş Agenezisi Tanımı 9
2.3. Diş Agenezisinin Görülme Sıklığı 11
2.3.1. Genel Populasyondaki Görülme Sıklığı 11
2.3.2. Türk Toplumunda Görülme Sıklığı 12
2.4. Diş Agenezisinin Etiolojisi 13
2.4.1. Çevresel etkenler 14
2.4.2. Genetik Etkenler; Sinyal Yolakları ve Genler 14
2.4.3. Epigenetik Etkenler 20
2.5. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1. Çalışma grubu 24
3.2. Yöntemler 24
3.2.1. Klinik Değerlendirmeler 24
3.2.2. Moleküler Yöntemler 24
3.2.2.1. Çalışmada kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler 24

3.2.2.2. DNA Eldesi: 25
3.2.2.3. Tüm Ekzom Dizileme (TED) 25
3.2.2.4. Varyant Analizi, Filtreleme ve İsimlendirme (*Annotation*) 26
3.2.2.5. Varyant yorumlaması 28
3.2.2.6. Primerlerin Tasarlanması 29
3.2.2.7. Ekzon Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Çoğaltılması ve saflaştırılması: 31
3.2.2.8. Sanger Dizi Analizi ile Varyant Doğrulama ve Biyoinformatik analizi 31
4. BULGULAR 34
4.1. Olgu 1 34
4.1.1. Klinik Değerlendirme 34
4.1.2. Aile ağacı değerlendirmesi 35
4.1.3. Moleküler Analiz 36
4.2. Olgu 2 37
4.2.1. Klinik Değerlendirme 37
4.2.2. Aile ağacı değerlendirmesi 37
4.2.3. Moleküler Analiz 38
4.3. Olgu 3 39
4.3.1. Klinik Değerlendirme 39
4.3.2. Aile ağacı değerlendirmesi 40
4.3.3. Moleküler Analiz 41
4.4. Olgu 4 43
4.4.1. Klinik Değerlendirme 43
4.4.2. Aile ağacı değerlendirmesi 43
4.4.3. Moleküler Analiz 44
4.5. Olgu 5 45
4.5.1. Klinik Değerlendirme 45
4.5.2. Aile ağacı değerlendirmesi 46
4.5.3. Moleküler Analiz 47
4.6. Olgu 6 49
4.6.1. Klinik Değerlendirme 49
4.6.2. Aile ağacı değerlendirmesi 50
4.6.3. Moleküler Analiz 51

4.7. Olgu 7....52
4.7.1. Klinik Değerlendirme....52
4.7.2. Aile ağacı değerlendirmesi....53
4.7.3. Moleküler Analiz....53
4.8. Olgu 8....56
4.8.1. Klinik Değerlendirme....56
4.8.2. Aile ağacı değerlendirmesi....57
4.8.3. Moleküler Analiz....58
4.9. Olgu 9....58
4.9.1. Klinik Değerlendirme....58
4.9.2. Aile ağacı değerlendirmesi....59
4.9.3. Moleküler Analiz....60
4.10. Olgu 10....61
4.10.1. Klinik Değerlendirme....61
4.10.2. Aile ağacı değerlendirmesi....62
4.10.3. Moleküler Analiz....63
5. TARTIŞMA....64
KAYNAKLAR....76
FORMLAR....87
MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU....90
ETİK KURUL KARARI....94
ÖZGEÇMİŞ....97

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kalıcı dişler için FDI numaralandırma sistemi 11
Tablo 2-2: Süt dişler için FDI numaralandırma sistemi 11
Tablo 3-1: Primer listesi, dizileri ve amplikon boyları 30
Tablo 3-2: PZR koşulları 31
Tablo 3-3: Dizi için PZR Reaksiyonu 32
Tablo 5-1: Oligodonti/hipodonti ile segregasyonu tespit edilen tüm varyantlar 64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Diş gelişiminin evreleri; (14)'ten uyarlanarak alınmıştır 4
Şekil 2-2: İnsan dişlerin değişme zamanları; (15)'ten uyarlayarak alınmıştır 5
Şekil 2-3: Dental epitel ve mezenkimin sinyalleşme yönleri; (25)'ten alınmıştır 7
Şekil 2-4: Dişin gelişim aşamalarında görev alan moleküller; (5)'ten uyarlanarak alınmıştır 8
Şekil 2-5: Dişlerin normal sayısı ve konumları (39)'dan alınmıştır 9
Şekil 2-6: Diş agenezisinin ağız içi ve panoramik röntgen görüntüleri; University of Texas, Endodonti departmanı'nın hastalarından izinle alınmıştır 10
Şekil 2-7: Diş agenezisinin meydana gelmesine neden olan faktörler 13
Şekil 2-8: Dişin gelişiminde rol alan moleküller; (24)'ten alınmıştır 15
Şekil 2-9: Diş gelişiminde etkili protein-protein etkileşimi (STRING, Versiyon 10.0). 18
Şekil 3-1: Ekzom dizileme yöntemi; (133)'dan uyarlanarak alınmıştır 26
Şekil 3-2: Veri eldesi için kullanılan algoritma şematik olarak gösterilmektedir. 28
Şekil 3-3: Kalıtım modellerine göre varyantların önceliklendirilmesi 29
Şekil 4-1: Olgu 1 (III-3)'e ait panoramik röntgen görüntüsü. 12, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 36, 41, 42, 43, 45, 46, 47 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir 35
Şekil 4-2: Olgu 1'in aile ağacı 36
Şekil 4-3: Olgu 2 (V-2)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 13, 17, 22, 23, 27, 31, 32, 34, 37, 41, 42, 43, 44, 47 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir 37
Şekil 4-4: Olgu 2'nin aile ağacı 38
Şekil 4-5: Olgu 2'nin *WNT10A* genindeki c.G433A (NP_079492; p.V145M) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*) 39
Şekil 4-6: Olgu 2'nin *WNT10A* (NM_025216.2) geninde ekzon 3'de homozigot c.G433A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü ... 39
Şekil 4-7: Olgu 3 (III-3)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 15, 17, 22, 27, 31, 35, 42, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir 40
Şekil 4-8: Olgu 3'ün aile ağacı 41
Şekil 4-9: Olgu 3'ün *BCOR* genindeki heterozigot c.G1651A (NP_060215, p.D551N) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *reverse*) 42

Şekil 4-10: Olgu 3'ün *BCOR* (NM_017745.5) geninde ekzon 4'deki heterozigot c.G1651A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü .. 42
Şekil 4-11: Olgu 4 (III-3)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 14, 15, 24, 25, 31, 34, 35, 37, 41, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir..... 43
Şekil 4-12: Olgu 4'ün aile ağacı 44
Şekil 4-13: Olgu 4'ün *WNT10A* genindeki heterozigot c.T682A (NP_079492; p.F228I) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*) 45
Şekil 4-14: Olgu 4'ün *WNT10A* (NM_025216.2) geninde ekzon 3'deki heterozigot c.T682A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü..... 45
Şekil 4-15: Olgu 5 (III-1)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 14, 15, 17, 22, 24, 25, 35, 44, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir..... 46
Şekil 4-16: Olgu 5'in aile ağacı 47
Şekil 4-17: Olgu 5'in *WNT10A* genindeki heterozigot c.T682A (NP_079492; p.F228I) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*) 48
Şekil 4-18: Olgu 5'in *WNT10A* (NM_025216.2) geninde ekzon 3'deki heterozigot c.T682A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü..... 48
Şekil 4-19: Olgu 5'in *LAMA3* genindeki heterozigot c.G1097A (NP_000218.3; p.R366H) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*)..... 49
Şekil 4-20: Olgu 5'in *LAMA3* (NM_000227.4) geninde ekzon 10'da heterozigot c.G1097A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü .. 49
Şekil 4-21: Olgu 6 (III-2)'ye ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 14, 15, 22, 24, 25, 31, 34, 35, 41, 44, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir..... 50
Şekil 4-22: Olgu 6'ın aile ağacı 50
Şekil 4-23: Olgu 6'nın *LRP6* genindeki heterozigot c.3607+3_3607+6delAAGT varyantının IgV görüntüsü (kalıp *reverse*)..... 51
Şekil 4-24: Olgu 6'nın *LRP6* (NM_002336.2) geninde intron 16'da heterozigot delesyon varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü (reverse kalıp) 52
Şekil 4-25: Olgu 7 (II-1)'ye ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 22 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir..... 53
Şekil 4-26: Olgu 7'nin aile ağacı 53
Şekil 4-27: Olgu 7'nin *DKK1* genindeki heterozigot c.548-4G>T varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward)*..... 54

Şekil 4-28: Olgu 7'nin *DKK1* (NM_012242.2) geninde intron 3'de heterozigot c.548-4G>T varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü 55
Şekil 4-29: Olgu 7'de *LAMA3* genindeki c.G2798T (NP_000218; (p.G933V) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*) 55
Şekil 4-30: Olgu 7'nin *LAMA3* (NM_000227.4) geninde ekzon 21'de heterozigot c.G2798T varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü... 55
Şekil 4-31: Olgu 7'de *COL17A1* genindeki heterozigot c.3277+3G>C varyantına ait IgV görüntüsü (kalıp *reverse*) 56
Şekil 4-32: Olgu 7'nin *COL17A1* (NM_000494) geninde intron 47'de heterozigot c.3277+3G>C varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü 56
Şekil 4-33: Olgu 8 (III-2)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 15, 17, 27, 35, 37, 45, 47 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir..... 57
Şekil 4-34: Olgu 8'in aile ağacı 57
Şekil 4-35: Olgu 9 (III-2)'a ait panoramik röntgen görüntüsünde 17, 27, 31, 32, 33, 41, 42, 43 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir..... 59
Şekil 4-36: Olgu 9'un aile ağacı 59
Şekil 4-37: Olgu 9'un *ANTXR1* genindeki homozigot c.C1312T (NP; 115584; p.R438C) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*) 60
Şekil 4-38: Olgu 9'un *ANTXR1* (NM_032208.2) geninde ekzon 16'da homozigot c.C1312T varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü... 61
Şekil 4-39: Olgu 10 (III-3)'a ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 22, 35, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir..... 62
Şekil 4-40: Olgu 10'un aile ağacı 62
Şekil 5-1: Bcor geninin farenin molar diş gelişimindeki değişik haftaları içeren ekspresyon çalışması (158)'dan uyarlanarak alınmıştır..... 68
Şekil 5-2: Olgu 7 ve Olgu 5'e ait değişimlerin *LAMA3* geni üzerindeki yerleri sırasıyla gösterilmektedir (cioPortal, MutationMapper) 71
Şekil 5-3: LAMA3, COL17A1 ve DKK1 protein-protein etkileşimleri (STRING, Versiyon 10.0) 72

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ANTXR1 geni: Anthrax Toxin Receptor 1

***AXIN2* geni:** Axis inhibition protein 2

***BARX1* geni:** BARX Homeobox 1

***BCOR* geni:** BCL6 Corepressor

***CCBE1* geni:** Collagen And Calcium Binding EGF Domains 1

***COL17A1* geni:** Collagen, type 17, alpha 1

dbSNP: The Single Nucleotide Polymorphism Database

***DAAM2* geni:** Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis 2

***DKK1* geni:** Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1

Dlx* geni*: Distal-less homeobox

DMSO: dimetil sülfoksid

***EDAR* geni:** Ectodysplasin-A receptor

***EDARADD* geni:** Ectodysplasin-A receptor-associated adapter protein

EDTA: Etilendiamin tetraasedik asit

***EGF* geni:** Epidermal Growth Factor

***EGFR* geni:** Epidermal Growth Factor Receptor

FDI: Federation Dentaire Internationale Numbering System

GLI* geni*: Gliotactin

***IRF6* geni:** Interferon regulatory factor 6

***LAMA3* geni:** Laminin Subunit Alpha 3

***Lef1* geni:** Lymphoid enhancer-binding factor 1

***LHX6* geni:** LIM Homeobox 6

***LHX7* geni:** LIM Homeobox 7

***LRP6* geni:** LDL Receptor Related Protein 6

MAF: Minör Allel Frekansı

***MSX1* geni:** Msh homeobox 1

MZİ: Monozigotik İkiz

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

***PAX9* geni:** Paired box protein 9

***Pitx2* geni:** Paired Like Homeodomain 2

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

***POLR3B* geni:** Polymerase (RNA) III polypeptide B

***PTH2R* geni:** Parathyroid Hormone 2 Receptor

***PVR11* geni:** Poliovirus receptor 11

***RECQL4* geni:** RecQ Like Helicase 4

RPM: Revolutions per Minute

***SMOC2* geni:** SPARC Related Modular Calcium Binding 2

SNP: Single nucleotide polymorphism

***SNX10* geni:** Sorting Nexin 10

***Sp3* geni:** Specificity Protein 3

TBE çözeltisi: Tris-Borat-EDTA

TED: Tüm Ekzom Dizileme

TGD: Tüm Genom Dizileme

Tm: Melting tempature

YND: Yeni Nesil Dizileme

WNT: Wingless-Type MMTV Integration Site Family

***WNT10A* geni:** Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 10A

ÖZET

Dinçkan N. Non-Sendromik Diş Agenezisi ile İlişkili Yeni Genlerin ve Sinyal Yolaklarının Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri ile Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2016.

Diş agenezisi, diş gelişimindeki hatalar sonucunda bir veya daha fazla dişin konjenital eksikliği olarak tanımlanmaktadır. Eksik olduğu diş sayısına göre oligodonti veya hipodonti olarak isimlendirilmektedir. Genel toplum sıklığı %3-10 arasında olduğu tespit edilerek insanda en sık karşılaşılan kraniyofasiyal gelişimsel anomali olduğu bildirilmektedir. Sendromik ve non-sendromik olarak sınıflandırılan diş agenezisi dişilerde erkeklere oranla daha sık görülmektedir. Etyolojisi henüz tam aydınlatılamamış olmakla birlikte diş agenezisi ile ilişkilendirilmiş, önemli bir bölümü diş gelişiminde etkin sinyal yolaklarında görevli sekiz gen tanımlanmıştır.

Bu çalışmada, non-sendromik diş agenezisi ile ilişkili bilinen genlerdeki ve yeni genlerdeki varyasyonlarının Tüm Ekzom Dizileme yöntemi ile araştırılması amaçlandı. Bu kapsamda diş agenezisi olan olgu ve aileleri detaylı aile ağacı analizleri, klinik ve radyolojik olarak incelendi ve non-sendromik olgu/aileleri çalışmaya dahil edildi.

Diş gelişimi yolağında da yer aldığı bilinen *WNT10A* geninde fenotiple ilşkilendirilmiş iki ve *LRP6* geninde ise tanımlanmış ancak özgün bir fenotiple ilişkilendirilmemiş bir olmak üzere toplam üç varyant saptandı. İnsanda diş gelişimi ile daha önce ilişkilendirilmemiş beş farklı gende ise (*BCOR, LAMA3, DKK1, COL17A1* ve *ANTXR1*) diş agenezisi fenotipi ile segregasyon gösteren çeşitli varyantlar gösterildi.

Sonuç olarak diş agenezisi ile ilgili WNT sinyal yolunun önemi vurgulanıp yeni genlerin tanımlanmasında multigenik kalıtım modellerinin de dikkatle araştırılması gerektiği düşünüldü. Elde edilen sonuçların gelişimsel evrede aktif olan genlerin ve sinyal yolaklarının daha iyi anlaşılmasına ve yeni yolakların tanımlanmasına katkı getirmesi beklenmektedir. Diş agenezisi çalışmalarının multifaktöriyel kalıtım gösteren ve gelişim evresinde başlayan hastalıkların araştırılmasına model olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: oligodonti, Wnt, sinyal yolu, diş agenezisi, tüm ekzom dizileme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 48398

ABSTRACT

Dinçkan N. Evaluation of Non-Syndromic Tooth Agenesis Related Novel Genes and Pathways by Next Generation Sequencing Technologies. İstanbul University Institute of Health Science Department of Genetics. PhD Dissertation. İstanbul. 2016.

Tooth Agenesis is defined as congenital absence of one or more permanent teeth as a result of the failure of tooth development. It is divided as oligodontia or hypodontia based on the number of missing teeth. It is reported to be the most common craniofacial developmental abnormality in humans with general population frequency of 3-10%. Tooth agenesis, which is classified as syndromic and non-syndromic, is more commonly observed in females than males. Presently eight genes, which majority playing critical roles in the pathways for tooth development, related to tooth agenesis, have been identified, though much is still unknown in its etiology.

The goal of this study is to investigate the causative novel genes, variants and pathways in non-syndromic tooth agenesis by using next generation sequencing technology. Cases and families are thoroughly examined by clinical findings and radiological images to exclude the syndromic forms. Detailed pedigree analysis and inheritance models are defined and Whole Exome Sequencing is performed for all the index cases afflicted with non-syndromic tooth agenesis.

One novel and two known variants are identified in two genes (*WNT10A* and *LRP6*) that were already reported to play role in tooth agenesis. Furthermore, novel variations in five genes (*BCOR*, *LAMA3*, *DKK1*, *COL17A1* and *ANTXR1*) that were previously not associated with human tooth agenesis, segregated with the phenotype in our families.

In conclusion, this study underlines the importance of WNT pathway that is associated with tooth agenesis, and suggests that comprehensive evaluation of multigenic inheritance models are important for the identification novel genes. We propose our results contribute to the recognition of new genes in the aspects of developmental stages. We also recommend that tooth agenesis is a suitable model for understanding the multifactorial diseases.

Key Words : oligodontia, Wnt, pathway, tooth agenesis, whole exome sequencing

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Proje No: 48398

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diş gelişimi, birçok farklı etmenin birlikte hareket ettiği komplike bir süreçtir. Bu süreçte bir çok genetik mekanizma ve doku etkileşimi görev almaktadır. Diş oluşumundaki gelişimsel sapmalar dişin yapısında, boyutlarında, konumunda ya da sayısında çeşitli anomalilere yol açabilmektedir.

Diş agenezisi insanlarda en sık görülen kraniyofasiyal anomali olup, doğumsal olarak bir ya da birden fazla dişin eksikliği olarak tanımlanmaktadır (1). Diş agenezisi, sporadik olabileceği gibi ailevi de olabilmektedir. Otozomal dominant, otozomal resesif ve X'e bağlı kalıtım gösteren aileler tanımlanmış olmasına rağmen, otozomal dominant kalıtım modeli en sık rastlanan ve ekspresivite değişkenliği ve penetrans yokluğu görülebilmektedir. Diş agenezisinin etyolojisinde hem genetik, hem çevresel faktörler rol oynamakta olup, özellikle ailevi olgularda genetik faktörlerin etkili olduğu öngörülmektedir (2).

Birden fazla dişin eksik olması (beş dişe kadar) 'hipodonti', altı veya daha fazla dişin eksikliği 'oligodonti' ve tüm dişlerin eksikliği 'anodonti' olarak tanımlanmaktadır (3). Özellikle ağır vakalarda, diş eksikliği maloklüzyona neden olmakta, kraniyofasiyal gelişimi etkileyebilmekte ve bu olguların oral rehabilitasyonları maliyeti yüksek olan tedaviler gerektirmektedir (4).

Diş agenezi, önemli sendromlarla bağlantılı olabildiği gibi herhangi bir sendroma eşlik etmeden non-sendromik olarak da (izole) görülebilmektedir. Bugüne kadar Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)'de diş agenezisi bulgusu olan 200'den fazla sendrom bildirilmiştir.

Hayvan çalışmalarında, 300'den fazla genin dolaylı veya dolaysız olarak diş gelişiminde rol aldığının gösterilmesi ve bu genlerin ve / veya sinyal yolaklarının daha iyi anlaşılmaya başlanması sayesinde diş gelişiminin ve defektlerinin genetik temeli aydınlatılmaya başlanmıştır (5). Günümüzde insanlarda oligodonti ile ilişkisi en iyi tanımlanmış olan iki gen, *PAX9* (MIM#167416) ve *MSX1* (MIM#142893)'dir. Ayrıca kolorektal kanser ve oligodontinin birlikte görüldüğü ailelerde, *AXIN2* (MIM#604025) geni mutasyonları da tanımlanmıştır (6, 7). Özellikle 2010 yılında yapılan bir çalışmada, gelişimin önemli sinyal yolaklarından biri olan Wnt sinyal yolağında yer

alan Wnt-10A proteinini kodlayan *WNT10A* (MIM#606268) geninin diş gelişiminin değişik evrelerinde önemli fonksiyonlar üstlendiği gösterilmiştir (8). Literatürde, farklı genlerdeki varyantların diş gelişimi ile ilişkisinin irdelendiği çok sayıda vaka-kontrol araştırmaları bulunmaktadır (9-12).

Bu tez çalışmasında, non-sendromik diş agenezisi olgularında, diş eksikliği fenotipinden sorumlu olan genlerde yeni mutasyonların ve fenotipten sorumlu yeni genlerin tanımlanması amaçlandı. Elde edeceğimiz sonuçların gelişimsel evrede aktif olan genlerin ve sinyal yolaklarının daha iyi anlaşılmasına ve yeni yolakların tanımlanmasına katkı yapması, gelişim genetiği alanında yeni çalışmalara öncü olması hedeflendi. Ayrıca, oligodontinin moleküler genetik tanısında kullanılacak algoritmaların da belirlenmesine yardımcı olması beklendi. Edineceğimiz bilgiler, araştırmaya katılan ailelerin, kalıtım modeli ve tekrarlama riskleri konusunda özgün genetik danışma almalarını da sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diş Gelişimi

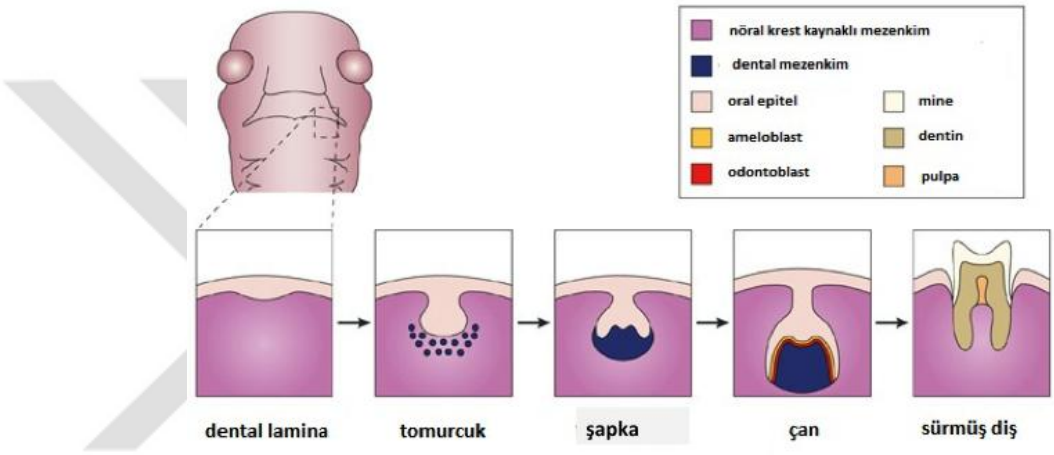
2.1.1. Diş Oluşumunun Embriyolojik Aşamaları

Yüzün şekli, mandibula ve maksillanın büyümesiyle birlikte belirlenmektedir. Embriolojik gelişim döneminin yaklaşık 6. haftasında, ağız boşluğunun epitel döşemesinin bazal tabakası, alt ve üst çenenin uzunluğu boyunca dental laminayı oluşturmaktadır. Dental lamina, sonra sırayla bir dizi tomurcuğu ortaya çıkarmaktadır. Her çenede 10'ar adet bulunan bu oluşumlar dişlerin ektodermal komponentlerini oluşturmaktadır. Bir süre sonra tomurcukların derin yüzeyi girintili yapı oluşturarak, diş gelişiminin şapka (*cap*) evresini başlatmaktadır. Bu yapıda mevcut olan oluşumlar sırayla; dış tabaka, dış diş epitelyum, bir iç tabaka, iç diş epitelyum ve gevşek dokulu bir merkez, çekirdek, stellar retikulumdur. Oluşan girintilere yerleşen nöral krest kökenli mezenkim, dişin papillasını meydana getirmektedir. Meydana gelen dental şapka büyümekte, oluşan girinti derinleşmektedir. Bu haliyle diş bir çan görünümünü andırmaktadır (çan evresi). Papillanın mezenkim hücreleri, diş tabakasına komşu olarak daha sonra dentini üretecek olan odontoblastlara farklılaşmaktadır. Üretilen dentin tabakasının kalınlığının artmasıyla birlikte, odontoblastlar dentin içinde dental proses adında ince bir sitoplazmik uzantı bırakmaktadır. Oluşan odontoblast tabakası dişin ağızda kaldığı süre boyunca korunmakta ve daha sonra ise dentine dönüşen predentini üretmektedir. Dış diş epitel hücreleri ise ameloblastlara (mine oluşturuculara) farklılaşmaktadır. Ameloblastlar da dentinin üzerinde biriken uzun mine prizmalarını üretmektedir. Mine dokusu ilk başlangıçta dişin üst kısmına döşenmektedir. Dişin tepesinden yavaşça dişin boynuna doğru yayılmaktadır. Mine dokusu kalınlaştığı zaman ameloblastlar stellar retikulumun içine çekilmektedir. Mine yüzeyinde daha sonra kaybolacak ince bir zar bırakarak gerilerler. Bu ince zara dental kütikül adı verilmektedir. Dişin sürmesinden sonra, bu zar dökülmektedir (13).

Diş kökünün oluşumu, dişin eiptel tabakalarının altta yer alan mezenkim tabakalarına girmesiyle başlamaktadır. Bu şekilde epitelyal kök kılıfını meydana gelmektedir. Dental papilla hücreleri ise, devam eden dentin tabakasını döşemektedir.

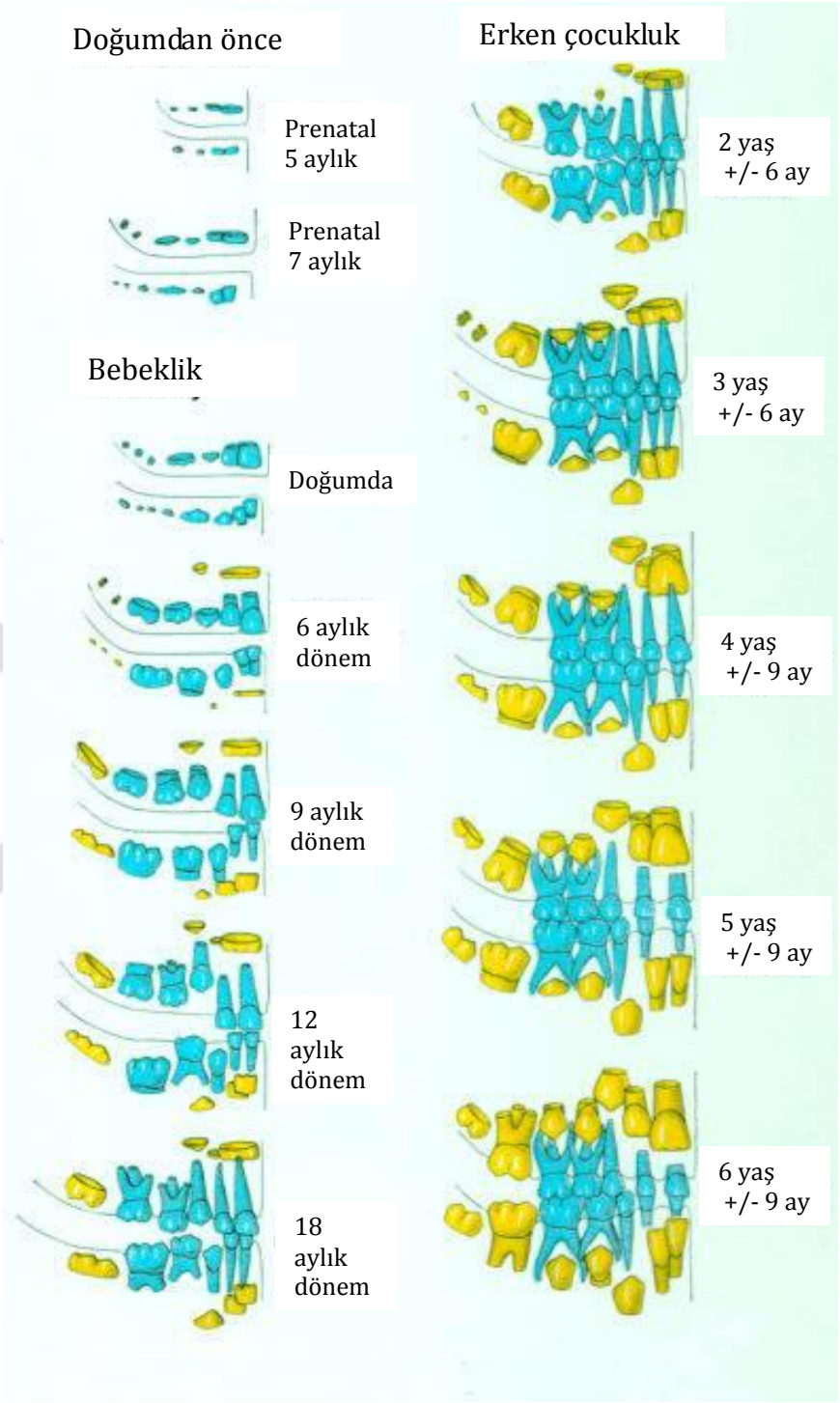
Bu süreçte dentin depolanırken, pulpa bölmesi daralmakta ve dişin kan damarlarını ve sinirlerini içeren bir kanal oluşmaktadır (Şekil 2-1).

Sementoblastlar, dişin dış yüzeyinde yer alan ve kökün dentine dokunan kısmında bulunan mezenkimal hücrelerden farklılaşmaktadır. Sementoblastlar da ince bir tabaka özelleşmiş kemik olan sementumu oluşturmaktadır. Sement tabakasının dışındaki mezenkim dokusu da periodontal ligamenti oluşturmaktadır. Periodontal ligament dişin yerinde sağlam bir şekilde durmasını sağlamaktadır (13).



Şekil 2-1: Diş gelişiminin evreleri; (14)'ten uyarlanarak alınmıştır

Dişin gelişmesiyle birlikte dişin kuron (taç) kısmı, üstündeki dokuların arasından ağız boşluğuna doğru itilmektedir. Süt dişler, doğumdan sonraki 6 ay itibariyle sürmeye başlamakta olup dişlerin sürme süreci 2.5 yaşa kadar devam etmektedir. Kalıcı dişlerin tomurcukları, süt dişlerinin dil tarafındaki yüzünde yer almakta ve gelişim sürecinin postnatal 3. ayında oluşmaktadır. Tomurcukların her biri kendilerine karşılık gelen süt dişlerini alttan iterek süt dişlerin dökülmelerine yardımcı olmaktadır (Şekil 2-2). Kalıcı diş gelişirken, üstündeki süt dişinin kökü, osteoblastlar tarafından resorbe edilmektedir. Bazı olgularda alt iki kesici dişin doğumda sürmüş olduğu görülmektedir. Bu dişler neonatal/natal dişler olarak isimlendirilmekte olup kökleri yoktur. Bu dişlerin anormal şekilde oluştuğu ve mine tabakalarının çok az olduğu düşünülmektedir (13).



Şekil 2-2: İnsan dişlerin değişme zamanları; (15)'ten uyarlayarak alınmıştır

2.1.2. Diş Gelişiminde Rol Oynayan Moleküller

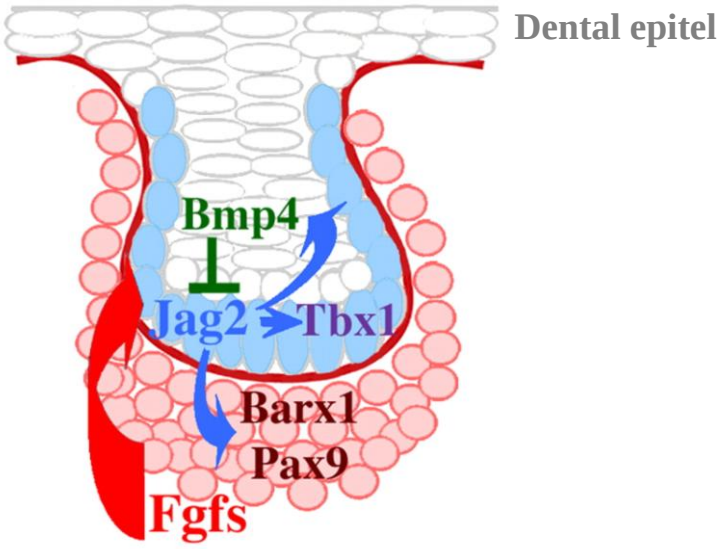
Diş gelişimi embriyolojik olarak tomurcuk, şapka ve çan evreleri olmak üzere üç ana evre içerir, bunlar sırasıyla (16):

- Başlangıç evresi
- Tomurcuk evresi
- Şapka evresi
- Çan evresi
- Apozisyon evresi
- Olgunlaşma evresidir

Dişlerin şekillenmesi homeobox (HOX) genler aracılığıyla kontrol edilmekte Notch, Wingless/integration1 (Wnt), kemik morfogenetik protein (BMP), fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ve sonic hedgehog (Shh) sinyal yollarındaki birçok molekülün etkileşimi ile diş oluşumu sağlanmaktadır. Ectodysplasin (Eda) sinyal yolağının da dişin formasyonu ve olgunlaşmasında etkin olduğu bildirilmiştir (17-19). Bu sinyal yolakları hücre yüzey reseptörlerini ve gen ekspresyonlarını düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kapsamaktadır (18, 20). Epitelden çıkan ve FGF8, BMP4, Shh ve Wnt10b içeren sinyaller, ektomezenkimde Barx1, Dlx1/2, Lhx6, Msx1, Pax9, Ptc, Gli ve Lef1 gibi transkripsiyon faktörlerini düzenlemektedir (21).

Diş primordiumu ortaya çıkmadan önce, 1. brankial arkta ilk oluşan eksenin *Lhx6* ve *Lhx7* homeobox genlerinin ifadesi ile kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu iki *Lhx* geninin ifadesine Fgf-8'in katılımı ile gelişim evrelerinin çok hızlı bir şekilde ilerlediğinin gözlnemesi Fgf-8'in diş gelişiminin tüm genetik basamaklarında çok önemli bir rol oynadığını düşündürmüştür (22).

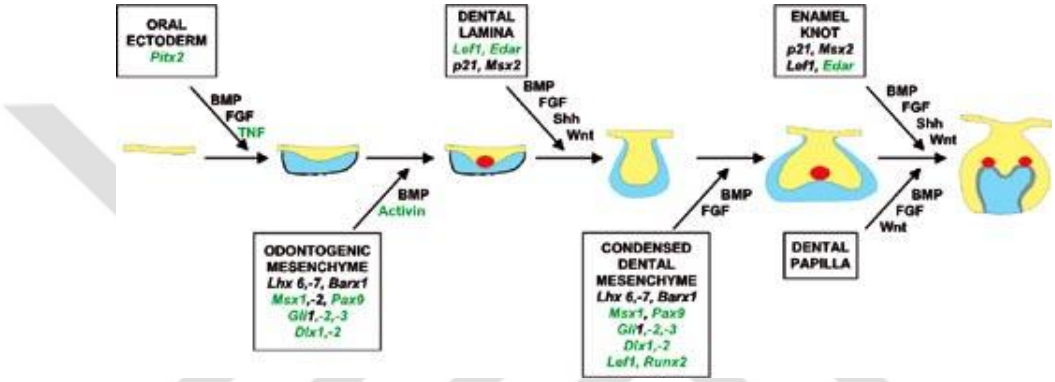
Tomurcuk aşamasında FGF, TGFβ ve BMP'ler diş gelişiminin sürdürülebilmesi için gerekli olan mezenkimal transkripsiyon faktörlerinin ifade edilmesini de uyarırlar (Şekil 2-3) (23, 24). Erken diş gelişimi boyunca morfogenez sürecinde Bmp-2, Bmp-4 ve Bmp-7 ifadesinin epitelyal-mezenkimal sinyalleşmede yön değiştirmesi gözlenmektedir. Tomurcuk evresinden önce, Fgf-8 sadece dental epitelde gözlenmektedir. Ancak tomurcuk evresinde Fgf-2, Fgf-4, Fgf-8 ve Fgf-9 gibi FGF'lerin Msx1 ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir (23).



Şekil 2-3: Dental epitel ve mezenkimin sinyalleşme yönleri; (25)'ten alınmıştır

Diş gelişimin her aşaması için çok önemli olan başka bir sinyal yolağı Wnt yolağıdır. Dental epitelde ifade edilen *Wnt4*, *Wnt6*, *Wnt10a* ve *Wnt10b* genleri, dental laminadan tomurcuk evresine geçişte dental lamina içinde gerçekleşmektedir (26). Wnt genleri olan *Wnt3*, *Wnt4*, *Wnt5a*, *Wnt6*, *Wnt7b*, *Wnt10b* ile Wnt antagonist ve/veya reseptör antagonistlerini kodlayan *Fzd6*, *Frzb* ve *Frp2* genlerinin murin odontogenezinin farklı evrelerindeki ekpresyonu incelenmiştir. Sonuç olarak Wnt-4, Wnt-6 ve MFz6'nın hem yüz hem oral hem dental epitelde gözlendiği ancak Wnt-10b'nin özellikle dental epitelde lokalize olduğu bildirilmiştir (16, 27). Wnt sinyalinin bir mediatörü olan *Lef1*'in yıkılması ya da Wnt'nin aynı süreçte ifade edilen ko-reseptörlerinin (*co-receptors*) engellenmesi tüm dişlerin yokluğuna neden olmaktadır. *Lef1*'in mutant olduğu farelerde tomurcuk evresinden şapka evresine geçişte de duraklama gözlenmektedir (28). Kanonikal Wnt sinyal yolu inhibitörü olan Dickkopf1 (Dkk1), Wnt sinyal yolağının aktivasyonu için gerekli olan Lipoprotein receptor-related protein (LRP) ko-reseptörlerine bağlanıp Wnt sinyalinin iletimini durdurmaktadır (29). Ayrıca *Sox2* geninin de dişin şekillenmesi için hücre göçüne Wnt sinyal yolağı aracılığı ile katkıda bulunduğu gösterilmiştir (30, 31).

Shh, başta dişin başlangıç evresi olmak üzere ve diğer tüm evlerinde etki gösteren önemli bir başka sinyal molekülüdür. Farelerdeki 3 adet Gli zinc finger transkripsiyon faktörü (Gli1, Gli2 ve Gli3), hedgehog yolağının hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive etmektedir (32). Dental epitel *Shh* ekspresyonunun mezenkimal FGF'ler tarafından başlatıldığı rapor edilmiştir (33). *Shh* ifadesinin dental epitelde başlatılması için dental mezenkimde de Wnt sinyalinin gerekli olduğu bildirilmiştir (34).



Şekil 2-4: Dişin gelişim aşamalarında görev alan moleküller; (5)'ten uyarlanarak alınmıştır

Aktivin proteinleri, aktivin βA ve aktivin βB genleriyle kodlanmış βA ve βB alt birimlerinden oluşan dimer olup TGFβ büyüme faktörü ailesinin üyeleridir. Aktivin βA mutant farelerde maksiller molar dişler normal iken diğer dişlerin eksik olduğu gözlenmiştir. Farelerde *Dlx1-6* mandibular primordiumla örtüşen alanlarda eksprese olurken, *Dlx1* ve *Dlx2*'nin sadece maksiller yayda eksprese olduğu gözlenmiştir. *Pitx2* başlangıçta fare oral epiteli boyunca eksprese edilen bir homeobox geni olup *Pitx2*$^{-/-}$ farelerde diş gelişiminin tomurcuk evresinde durakladığı gösterilmiştir (26).

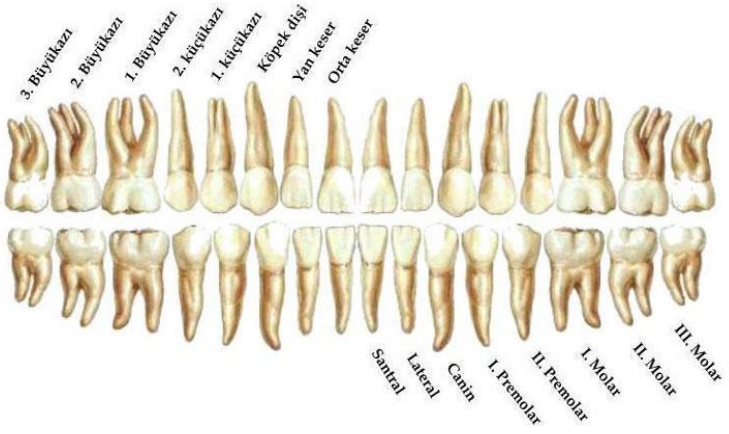
Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bir transkripsiyon faktörü olan *Ctip2*'nin iç mine epitelinde ifade edildiği ve diş gelişiminde ve amelogenezde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. *Ctip*2$^{-/-}$ farelerde, diş gelişimi şapka evresinde normal iken, çan evresinde çeşitli defektler gelişmektedir (35). Specificity protein 3 (Sp3) üzerine yapılmış bir diğer çalışmada da, *Sp3*'ün dişte hücre farklılaşmasıyla ilişkili olduğu, *Sp3*

mutant farelerde dentinogenez veya amelogenez bozulduğu için dentin ve mine tabakasının tam olarak oluşamadığı gözlenmiştir (36).

Shh, Pitx2, Msx1, Irf6, p63 ve Eda sinyal yolaklarında yer alan genlerde oluşacak herhangi bir mutasyon diş gelişimini etkilemektedir (Şekil 2-4). Eda sinyal yolağı dişin büyüklüğünün ve kuron şeklinin belirlenmesinde önemlidir. EDA sinyal yolağında oluşan sorunlar, NF-κB transkripsiyon faktör yolağında oluşacak mutasyonlar ile birlikte deriyi etkilemekte ve dişlerde büyüklük ve şekil anomalilerine yol açmaktadır. Bu sinyal yolağında yer alan genler *EDA, EDAR, EDARADD, NEMO (IKBKG)* ve *TP63* 'tür (37).

2.2. Diş Agenezisi Tanımı

Diş agenezisi, insanda en sık görülen gelişimsel anomalilerden biri olup süt ve sürekli dişlerin normal gelişimindeki hata olarak tanımlanabilir. Diş gelişimi sırasında oluşan birtakım hatalar sonucu bir veya birden fazla dişin konjenital olarak oluşamaması, ağızdaki dişlerin normal sayısından daha az olması durumu diş agenezisi olarak adlandırılmaktadır (38).



Şekil 2-5: Dişlerin normal sayısı ve konumları (39)'dan alınmıştır

Sahip olunacak tüm süt dişler 3 yaş civarında, daimi dişler ise (3. molarlar hariç) 12-14 yaşları arasında ağızda görülebilmektedir. Süt dişlerinin varlığı 3 yaşına kadar panoramik radyografi olmadan da yapılabilmektedir (Şekil 2-5). Sürekli dişlerin varlığı ise ancak 6 yaşından sonra panoramik röntgen ile belirlenebilmekte hatta 20

yaş dişleri için çok daha sonrası beklenmektedir (40). Dişlerde değişme zamanı geldiği halde halen ağızda bulunan süt dişleri, sürmesi gereken sürekli dişlerin eksikliğini göstermektedir. Üçüncü molarlar dışında bir veya beş dişin konjenital olarak eksik olması "hipodonti", üçüncü molarlar dışında altı ya da daha fazla dişin konjenital eksikliği ise "oligodonti" olarak adlandırılmaktır. Nadir görülen "Anodonti" ise tüm dişlerin eksikliğini ifade eder (Şekil 2-6) (3, 38). Hangi dişlerin eksik olduğunu tanımlarken FDI numaralandırma sistemi (Federation Dentaire Internationale Numbering System) kullanılmaktadır (Tablo 2-1 ve 2-2).



Şekil 2-6: Diş agenezisinin ağız içi ve panoramik röntgen görüntüleri; University of Texas, Endodonti departmanı'nın hastalarından izinle alınmıştır

Yeni doğandaki radyolojik bir incelemeyle bütün süt dişler ve 1. daimi molar dişlerin tüberkül tepeleri görülebilmektedir. Çocuk 2-3 yaşlarına geldiğinde ise premolar dişler ve daimi 2. molar dişler mineralize olmaya, altı yaşına geldiğinde ise, bütün daimi diş kronları (3. molarlar hariç) mineralize olmaya başlar ve radyografik incelemede görülür hale gelir. 3. molar dişlerin genellikle 8–10 yaşları arasında kalsifiye olmaya başlamaktadır. İnsanda diş gelişimi uzun yıllar sürmekte ve bu sürecin uzunluğu ırka, cinsiyete, aileye ve bireysel faktörlere göre değişmektedir (41).

Hipodontinin diğer anomalilerle ilişkili olduğu durumlar da bildirilmiştir. Bunlar; yarık dudak-damak, kısa diş kökü, dişlerin malpozisyonu, gecikmiş diş

sürmesi, varlığını sürdüren süt dişleri, diş minesi anomalileri, artmış boş alanlar, yanlış diastema, artmış over-bite kapanış, taurodontizm ve mine hipolazisi olarak sıralanabilmektedir (42-44).

Tablo 2-1: Kalıcı dişler için FDI numaralandırma sistemi

SAĞ ÜST ÇENE								SOL ÜST ÇENE							
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
SAĞ ALT ÇENE								SOL ALT ÇENE							

Tablo 2-2: Süt dişler için FDI numaralandırma sistemi

SAĞ ÜST ÇENE					SOL ÜST ÇENE				
55	54	53	52	51	61	62	63	64	65
85	84	83	82	81	71	72	73	74	75
SAĞ ALT ÇENE					SOL ALT ÇENE				

Oligodontinin özgün bulguları, diş sayısı ve boyutlarında azalma, anormal diş şekli ve sürme gecikmesi olarak bildirilmiştir. Kural olarak süt dişi gelişmediğinde, altından gelecek sürekli diş de oluşamamaktadır (32).

2.3. Diş Agenezisinin Görülme Sıklığı

2.3.1. Genel Populasyondaki Görülme Sıklığı

Diş agenezisinin görülme sıklığı her diş için farklılık göstermektedir. 3. Molar diş agenezisi sürekli dişlenmedeki en sık görülen gelişimsel anomali olarak belirlenmiştir (45). 3. Molar agenezisinin farklı toplumlardaki görülme sıklığı üzerine farklı çalışma sonuçları çalışma grubuna katılan adayların yaşlarına, cinsiyetlerine ve çalışma grubunun büyüklüğüne göre farklılık göstermiştir (46-48). Örnek olarak Japon toplumunda bilateral maksiller 3. Molar agenezisi %16,9 iken mandibular 3. Molar agenezisi %10,4'tür (49). Genel olarak 3. Molar agenezisinin prevelansı daha geniş bir aralıkta %5 ile %37 arasında bildirilmiştir (50).

Önceki çalışmalar genel populasyonda 3. Molar diş hariç tutulduğunda, diş eksikliğine %1,6-9 oranında rastlanmakta olduğunu, vakaların %70-80'inde bir veya iki dişin eksik olduğunu göstermiştir (51). Hipodontinin genel prevelansı %6,4 olarak

belirlenmiştir (52). Oligodonti ise çok daha nadir (%0.1 oranında) görülmekte olup süt dentisyonunda görülmesi oldukça nadirdir (40). Hipodonti, Afrika toplumunda %13,4, Avrupa'da %7, Asya'da %6,3, Avustralya'da %6,3, Kuzey Amerika'da %5, Latin Amerika ve Karayipler topluluklarında ise %4,4 sıklıkla görülmektedir. Ayrıca en çok etkilenmiş dişler mandibular 2. Premolar dişler olup onu maksiller lateral kesici dişler ve maksiller 2. Premolar dişler izlemektedir. Son olarak da kadınlarda erkeklere oranla daha sık görüldüğü bildirilmiştir (52).

Köpek dişi agenezisi üzerine yapılmış çok çalışma olmamakla birlikte Macaristan'da yapılmış bir çalışmada 6-18 yaşları arasında çocuklar incelmiştir. Panoramik röntgen bulguları incelenen 4.417 hastanın 13'ünde köpek diş agenezisine rastlanmış ve prevelansı %0,29 olarak bildirilmiş, diş eksikliğinin üst çenede % 0,27 oranında, alt çenede ise % 0,09 oranında olduğu gözlenmiştir (53).

2.3.2. Türk Toplumunda Görülme Sıklığı

Toplumumuzda diş agenezisinin prevelansı üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. 2000'li yıllara kadar bu konuda pek fazla sayıda araştırma yapılmamıştır. Konjenital diş eksikliğininin görülme sıklığı üzerine Altuğ-Ataç ve Erdem'in 2007 yılında 3.043 birey üzerinde yaptıkları çalışmaya göre ülkemizde hipodontinin görülme sıklığı %2,63, oligodonti görülme sıklığı ise %0,13 olarak gösterilmiştir. Diş eksikliği gösterilen vakaların 70 tanesinin erkek, 96 tanesinin ise kız olduğu bildirilmiştir. Çalışma grubunun % 5,46'sında en az bir gelişimsel dental anomali tespit edilmiştir. Eksikliği en sık görülen dişler ise üst lateral kesiciler olarak belirlenmiş, bunu premolar dişler takip etmiştir. Üst lateral kesici eksikliğinin görülme sıklığı %1,74 olarak bildirilmiştir. Üst kesicileri eksik olan vakaların %72'sinde çift, %28'inde tek taraflı eksiklik saptanmıştır. Aynı çalışmada mandibular lateral diş eksikliğine %0,36 oranında rastlanırken, mandibular kanin eksikliğine %0,07 oranında rastlanmıştır (54).

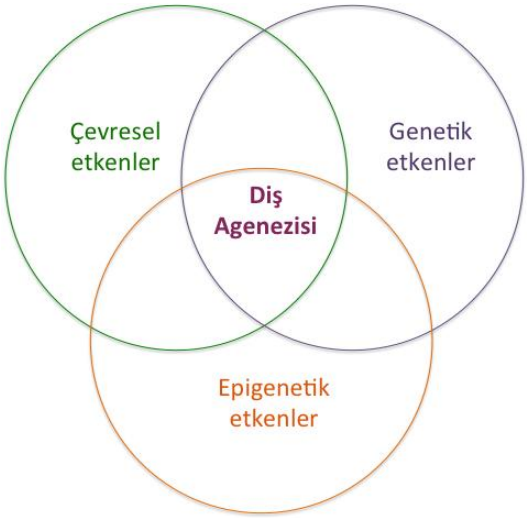
Çelikoğlu ve arkadaşlarının Erzurum Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ortodonti Bölümü kapsamında yaptıkları bir taramada 10-25 yaşları arasında sendromik olmayan 3.341 hastanın panoramik ve sefalometrik röntgenlerini inceleyerek konjenital diş eksikliğini değerlendirmişlerdir. Araştırma sonucuna göre Türk ortodonti hasta grubu için diş agenezisinin dişi bireylerde daha yüksek olduğunu ve prevalansının %4,6 olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Hipodonti %4,3 oligodonti

ise %0,3 olarak kaydedilmiştir (55). Yine aynı bölgede yapılmış bir diğer çalışmada ise doğumsal diş eksikliği sıklığı %6,2 olarak bildirilmiştir (56). Karadeniz bölgesinde yapılan bir başka araştırmada ise hipodontinin görülme sıklığı %3,67 oligodontinin ise %0,21 olarak bildirilmiştir (57).

Uzuner ve arkadaşları 2013 yılında 1.382'si dişi ve 1.148'i erkek olmak üzere toplam 2.530 hasta üzerinde araştırma yapmışlardır. Yaşları 7 ile 16 arasında değişen hasta grubu için genel Türk popülasyonunda hipodontinin görülme sıklığı %5 olarak belirlenmiştir. Hasta başına ortalama eksik diş sayısı 2,03 olarak kaydedilmiş, konjenital olarak eksik olan dişlerin %34'ü maksiller yan kesici dişler, %30'u mandibular 2. Premolar dişler olarak bildirilmiştir. Bu dişlerin eksikliğinin çoğunlukla simetrik olduğu ve genel diş eksikliğinin görülme sıklığının dişilerde erkeklere oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (58).

2.4. Diş Agenezisinin Etiolojisi

Konjenital diş eksikliğinin etiyolojisi ile ilgili pek çok araştırma yapılmış olmasına rağmen diş agenezisinin etyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Günümüze kadar halen çözülememiş olmasında hem diş gelişiminin komplike oluşu hem de diş eksikliğine neden olan çok sayıda etmenin olması etkili olmuştur. Diş agenezisinin patogenezinde, genetik, epigenetik ve çevresel etkenlerin rol aldığı düşünülmektedir (Şekil 2-7) (38, 59, 60).



Şekil 2-7: Diş agenezisinin meydana gelmesine neden olan faktörler

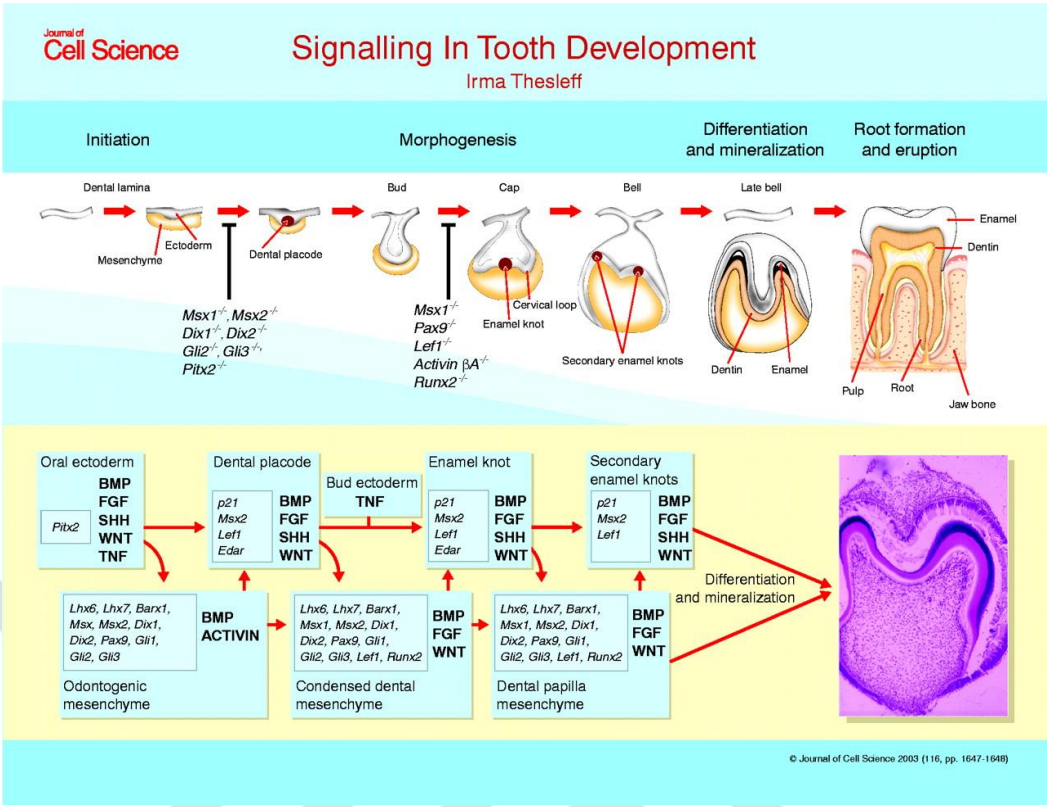
2.4.1. Çevresel etkenler

Yapılan araştırmalara göre konjenital diş eksikliği dört ana sebeple açıklanabilmektedir. Bunlar; dişin sürmesi için gereken yerin olmaması, dental epitelin fonksiyonel anomalileri, mezenkim dokuda hücre proliferasyonunun gerçekleşmemesi ve dental laminanın bazı etkenlerle oluşamaması olarak sıralanmaktadır. Nunn ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada konjenital diş eksikliğinin nedenlerini genel ve lokal faktörler olarak ikiye ayırmışlardır. Genel faktörler genetik nedenler ve sendromlar olarak gösterilirken, lokal faktörler diş germlerinin radyasyona maruz kalması, hormonal ve metabolik etkenler olarak sıralanmaktadır (61).

Genel olarak dişin gelişim defektleri prenatal, postnatal, yeni doğan ve erken çocukluk döneminde radyasyona maruziyeti olabilmektedir. Konjenital diş eksikliğine neden olan diğer çevresel faktörler de çeşitli kimyasalların kullanımı (florid, tetrasiklin, talidomin), premature doğum, yetersiz beslenme, neonatal hipokalsemi, D vitamin eksikliği, maternal diabet, bilirubinemi, tiroid rahatszılıkları, neonatal asfiksi, ciddi enfeksiyonlar ve metabolik hastalıklar olarak belirtilmiştir (60). Ayrıca hamilelik sırasında maruz kalınan kemoterapi ve radyoterapi de çevresel nedenler arasında sayılmaktadır (62).

2.4.2. Genetik Etkenler; Sinyal Yolakları ve Genler

Diş agenezisi, önemli genetik hastalıklarla ilişkili olarak bir sendromun parçası olabildiği gibi (sendromik) izole (nonsendromik) olarak da görülebilmektedir. OMIM'de bildirilmiş 300'den fazla sendromda hipodonti veya oligodonti gözlenmiştir. Non-sendromik diş agenezisinin geniş fenotipik heterojenitede ailevi ya da sporadik olabildiği de vurgulanmaktadır (63). Nonsendromik formunda çoğunlukla otozomal dominant (OD) kalıtım modeli gözlense de otozomal resesif (OR) ve X'e bağlı dominant kalıtım modelinin olduğu vakalar bildirilmiştir (XLD) (2).



Şekil 2-8: Dişin gelişiminde rol alan moleküller; (24)'ten alınmıştır

Yeni moleküler biyoloji yaklaşımlarının gelişmesi, hipodonti fenotipini aydınlatacak yeni gen ve lokusların tanımlanmasına yardımcı olmaktadır (63). Diş agenezisinin temel genetik nedenlerini anlamak için yapılan çalışmalarda, hayvan modelleri değerli olup özellikle fareden yararlanılmaktadır (64). Fare dentisyonu, insan dentisyonundan farklı olarak yalnızca bir dişlenme olsa da diş gelişimi sırasında, insan ile fare dişleri arasında yapılmış gen ifadesi çalışmaları göz ardı edilebilir farklar olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, fareler diş gelişiminin incelenmesinde hayvan modeli olarak seçilmekte ve elde edilen bulgular insanlar üzerinde yapılan incelemeler ile desteklenmektedir. Ayrıca diş gelişiminin erken evreleri, her iki türde büyük benzerlik göstermektedir (65). Fare modellerinde diş gelişimi sırasında ekprese olduğu bilinen 200'den fazla gen olduğu bildirilmektedir (66).

Diş anomalileri çoğunlukla diş gelişimi sırasında oral epitel ile mezenkim arasındaki karmaşık moleküler etkileşimdeki sonucu ortaya çıkmaktadır (24). Diş gelişiminde rol oynayan NOTCH, BMP, FGF, SHH ve WNT sinyal yolaklarında oluşan aksamalar diş agenezisine neden olmaktadır (Şekil 2-8).

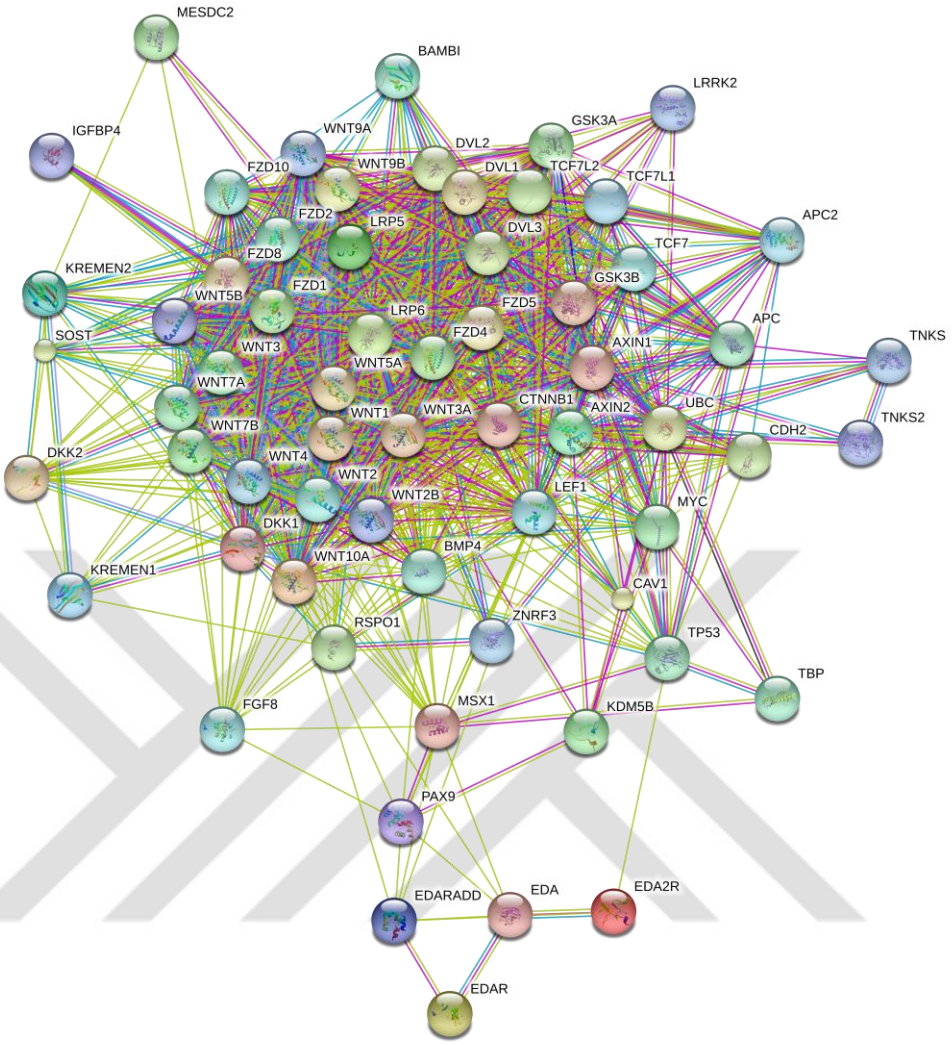
Yapılan hayvan deneylerinde *Pax9, Dlx1/2, Msx1, Pitx1, Gli1/2, p63* ve *Lef1 knockout* farelerde diş gelişiminin tomurcuk evresinde aksadığı gözlenmiştir. Diş gelişiminin erken evrelerinde, tomurcuk aşamasından çan aşamasına kadar *Pax9, ,Msx1, Axin2, Eda, Edar, Edaradd, Irf6, P63, Pitx2, Pvrl1, Shh* ve *Nemo* gibi çeşitli genlerin görev aldığı bilinmektedir (32). *Dlx1/2* knockout farelerde maksiller molar diş agenezisi gözlenmiştir. Aktivinβa (TGFβ ailesinden bir transkript faktörü) eksikliğinde maksiller molar dişlerin korunup, mandibular molar ve kesici dişlerin eksikliği görülmüştür. *TGFA* genindeki mutasyonlar kesici diş agenezisi (67). *FGFR1* genindeki mutasyonlar ise premolar dişlerin agenezisi ile ilişkilendirilmiştir (68).

Bugüne kadar nonsendromik diş agenezisi ile ilişkilendirilmiş genler *PAX9, MSX1, AXIN2, EDA, EDAR, EDARADD* ve *WNT10A*'dır (6, 11, 19, 69, 70). *LRP6* geni ise en yeni tanımlanmış olanıdır (71, 72). *MSX2, EGF, EGFR* ve *FGF3* nonsendromik hipodonti için aday genler olarak gösterilmektedir. *Lef1* null mutant farelerde diş gelişiminin geç tomurcuk evresinde duraksama gözlenmiş olduğundan, insanda da *LEF1* geninin diş gelişimi açısından önemli olabileceği vurgulamaktadır (73). Fare deneylerinde, diş gelişiminde görev aldığı bilinen ancak insan diş gelişimi için çalışmaların planlanması beklenen diğer aday genler; *DLX1, DLX2, DLX5, BARX1, LHX6, LHX7, BMP2, BMP4, BMP7, FGF1, FGF2, FGF4, FGF8, FGF9, GLI2* ve *GLI3*'tür (74, 75). Bu aday genlerin de etkileşim halinde olduğu birçok molekül bulunmaktadır (Şekil 2-9). *DLX* brankial arkların mezenkiminde, dişin tomurcuk evresinde, dental laminada, kraniyal nörel krestte, dorsal nöral tüpte ve frontonazal oluşum sürecinde ifade edilmektedir. Bu gendeki mutasyonlar, mandibula ve kalvaryumun da türetildiği ilk dört brankial arkta anomalilere neden olmaktadır. *DLX* geninin fonksiyon kaybı mutasyonları, üst molar dişin gelişimini etkilemektedir (76). *LHX* birinci brankial arkın ektomezenkiminde ekprese olmaktadır. *LHX* genindeki mutasyonların diş agenezisine ve yarık damak oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir (77). *BARX* mandibular ve maksillar yapının oluşumunda ve oral epitelin gelişimi sırasında ifade edilmektedir (76).

PAX9 geni, transkripsiyon faktörlerinde paired-box ailesinin bir üyesidir. Bu genin, kraniyofasiyal ve diş gelişiminde nöral krestte ifade edilip fetal büyümeden ve organogenezden sorumlu olduğu düşünülmektedir (78). *Pax9* ekspresyonunun, daha sonra oluşacak dişlerin yerlerini belirlediği, tomurcuk evresinde prospektif diş

mezenkiminde bulunduğu ve diş gelişimi boyunca düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir (26). *PAX9* gen mutasyonlarının nonsendromik otozomal dominant kalıtımlı molar diş agenezisinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (79). Bu çalışmayı takiben birçok ayrı çalışmada *PAX9* mutasyonları diş agenezisinin farklı fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir (80-90). Ayrıca yapılan *in vitro* biyokimyasal deneyler ve *in vivo* transgenik fare model çalışmaları, *Pax9* ve *Msx1* genlerinin sinerjik olarak *Bmp4* genini aktive ettikleri gösterilmiştir (91).

MSX1, MSX homeobox gen ailesinin bir üyesi olup, kraniofasiyal gelişimde, median nazal ve faringeal arkların oluşumunda ifade edilmektedir (76). *MSX1* mutasyonları 2. premolar ve 3. molar (akıl dişi) dişlerin agenezisi ile ilişkililendirilmiştir (91, 92) . *Msx1* mutant farelerde diş gelişiminin tomurcuk aşamasında kaldığı ve ilerleyemediği gözlenmiştir. İnsanda *MSX1* geninin diş agenezisi ve dudak damak yarığının çeşitli kombinasyonları ile ilişkili olduğunu gösteren bir kaç vaka çalışması rapor edilmiştir (93). Japon bir ailede yapılan bir çalışmada *MSX1* geninde gösterilen intronik bir varyantın diş agenezisine neden olduğu bildirilmiş ve etkilenmiş ikizlerin fenotipik farklılıkları göz önünde bulundurularak *MSX1* haployetersizliğine bağlı bu durumun çevresel ve epigenetik sebepler nedeniyle oluşmuş olabileceği tartışılmıştır (94).



Şekil 2-9: Diş gelişiminde etkili protein-protein etkileşimi (STRING, Versiyon 10.0)

AXIN2 (axis inhibition protein 2), Wnt sinyal yolağının negatif düzenleyicisi ve Wnt/β-catenin yolağının esansiyel bir komponentidir (9). *Axin2*, fare odontogenezi sırasında dental mezenkimde, mine düğümünde, dental papilla mezenkiminde ve mezenkimal odontoblastlarda eksprese olmaktadır (32). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *Axin2* genindeki anlamsız (nonsense) mutasyonların, *Msx1* ve *Pax9* mutasyonları için tanımlanandan daha şiddetli bir fenotiple ailesel oligodontiye neden olduğu rapor edilmiştir. Ailevi diş agenezi ve kolorektal kanseri olan Finli bir ailede *MSX1* ve *PAX9* mutasyonlarına rastlanmamış, *AXIN2* geninde mutasyon gösterilmiştir. Bu genin ailesel adenomatöz polipoz, sonrasında kolorektal kansere ve diş agenezisine sebep olduğu bildirilmiştir (6). Bu çalışma diğer kanser türleri ve diş

anomalileri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için bir başlangıç noktası olmuştur. Liang ve arkadaşları da *AXIN2* gen mutasyonlarının foksiyonel analizi üzerine yaptıkları bir çalışmada, bu geninin farklı mutasyonlarının, Wnt sinyalinin ve diş fenotipinin değişik şekilde etkilenmesine neden olabileceğini savunmuşlardır (95).

Edar reseptörü, TNF sinyaline cevap veren hücreleri oluşturan mine düğümü içinde indüklenmektedir. Ektodisplasin-edar sinyalleşmesi, diş oluşumunu düzenlemekte ve mine düğümünün sinyal aktivitesini ortaya çıkarmaktadır (96). EDA, TNF (tümör nekrozis faktör) ilişkili ligand ailesinin bir üyesi olup,bir tip II trimerik membran proteinidir ve gelen uyarı doğrultusunda reseptörleri olan EDAR ve EDARADD'a bağlanmakta ve (NF)–κB sinyal yolunu aktive etmektedir (97). *EDA* gen mutasyonlarının X'e bağlı Hipohidrotik Ektodermal Dizplazi (XLHED, MIM#305100)'ye neden olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (98). Ayrıca yapılan çalışmalarla bu genin nonsendromik diş agenezinden de sorumlu olduğu ortaya konmuştur (70, 99). *EDAR* ve *EDARADD* genleri üzerine yapılan araştırmalar da bu genlerin insanlarda diş agenezisine neden olduğunu göstermiştir (11, 40).

Son zamanlarda diş anomalileri ile ilişkili olarak üzerinde en çok durulan gen ise *WNT10A*'dır. Wnt-beta katenin sinyal yolagının diş morfogenezinde ne kadar önemli olduğundan daha önce bahsedilmişti.

Wnt sinyal yolağının süt ve sürekli dişlenmenin morfogenezinde en temel mekanizmalardan biri olduğu bildirilmiştir (100). Bu sinyal yolağının bir üyesi olan *WNT10A*'nın diş morfogenezinde anahtar bir röle sahip olduğu ve kodladığı *WNT10A* genindeki mutasyonların kalıtımsal diş eksikliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (101, 102). Ayrıca *WNT10A*'nın kodlayan bölge varyantlarının maksiller ikinci kesici diş agenezisinden de sorumlu olabileceği bildirilmiştir (103).

Van den Boogard ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı bir çalışmada üçüncü molar dişler hariç altıdan daha fazla sayıda diş eksikliği bulunan sendromik olmayan bireylerde %56 oranında *WNT10A* mutasyonu saptanmıştır. Araştırmacılar çalışma sonucunda *WNT10A*'nın izole oligodonti vakalarının etyolojisindeki en önemli gen olduğunu bildirmişlerdir (69). Bir diğer populasyon çalışmasında ise 102 adet nonsendromik oligodonti hastası incelenmiş ve hasta grubunun %28'nin *WNT10A* mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir (104). Daha sonra oligodontisi ve çok hafif ektodermal bulguları olan büyük bir hasta grubunda da aynı genin farklı mutasyonları

tanımlanmıştır (105). Son olarak genel popülasyonda nonsendromik diş agenezisi hastalarının %51,6'sının *WNT10A* geninde varyasyon taşıdığı bildirilmiş ve bu genin diş anomalileri açısından önemi bir kez daha vurgulanmıştır (106).

2.4.3. Epigenetik Etkenler

Uzun yıllar üzerine çalışılan çevresel ve genetik faktörlerden sonra hala cevaplanamamış bazı sorular akla olası genetik dışı faktörleri getirmiştir.

Yapılan monozigotik ikiz (MZİ) çalışmaları konjenital diş eksikliği ya da supernumere diş gibi diskordant fenotiplerin olduğunu göstermiştir. 24 MZİ ile yapılan bir çalışmada, 21'inde ikizlerden birinin lateral ya da ikinci premolar diş agenezisine sahip iken diğerinin etkilenmiş dişin sayısı ya da pozisyonu bakımdan ikiz eşi illediskondans olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada sekiz olgunun da ikizi ile supernumere diş sayısı açısından diskordans olduğu gözlenmiştir (107, 108). Bu örnekler dişin sayı anomalileri için epigenetik faktörlerin etkisini güçlendirmiştir.

DNA metilasyonun diş agenezisindeki etkisini araştırmak için, beş etkilenmiş ve beş sağlıklı bireyden oluşan bir çalışma yapılmıştır. Bu hasta grubunu oluşturan vakaların bir tanesi anodonti olarak değerlendirilmiş, diğer dört etkilenmiş birey ise ikişer adet mandibular kesici eksiklikleri ile hipodonti olarak değerlendirilmiştir. Tüm genomun metillenme seviyeleri açısından hasta ve sağlıklı grup arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Bu çalışma DNA metilasyonunun diş agenezisi için kritik önemde olduğunu göstermiştir (109).

2.5. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri

1990-2003 yılları arasında gerçekleştirilen İnsan Genom Projesi ardından genomun yapısını ve fonksiyonunu daha iyi anlayabilmek için başlatılan ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) projesi ve eşlik eden çok sayıdaki projeler ile "Post Genomik Çağ" olarak adlandırılan bir dönem başlamıştır. Araştırmaların ilerletilmesinde, canlı genomunun nükleik asit dizi bilgilerinin önemli birer kaynak teşkil ettiği görülerek uzun yıllardan beri kullanılmakta olan Sanger dizileme yönteminin, büyük gen ve genom dizilemelerinde süre, emek, maliyet ve etkinlik açısından yetkin olmadığı, çok daha hızlı işleyen dizileme yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir (The International Human Genome Seq Consortium, 2004) (110). Bu nedenle, Post Genomik Çağ'da, Yeni Nesil Dizileme (YND) olarak

tanımlanan ve hedefinde genomun belli bölgelerinin ya da tümünün kısa sürede dizilenmesi olan teknolojilerin geliştirilmesi için büyük yatırımlar yapılmıştır (111). Günümüzde halen, bu alandaki gelişmeler son derece dinamik olup cihaz, kimyasal madde ve bilgisayar alt yapı ve program yazılımlarında büyük ilerlemeler kaydedilmektedir. Bu teknolojiler sayesinde yapılan araştırmalar insan genomunda saptanan varyasyonların, gelişim, sağlık, hastalık ve tedavi ile ilişkilerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmakta, bazı durumlarda klinik tanı ve tedaviye karar vermede etkin olmaya başlamış bulunmaktadır.

YND teknolojileri ve eşlik eden fonksiyon analizleri çeşitli hastalıkların daha önce bilinmeyen yeni genetik temellerinin saptanmasına imkan sağlayarak genetik tanı için çeşitli yaklaşımların ortaya çıkmasına ve özellikle de panel gen testlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (112-114). Bu teknolojiler merak edilen gen bilgilerine hızlı bir şekilde ulaşılmasını sağlamasına karşın yorumlamada halen büyük zorluklar yaşanmaktadır. Sanger yönteminde tek bir dizileme işlemi yapılırken, YND platformlarında, çok yüksek sayıda paralel dizilemeler yapılmakta ancak okuma uzunlukları (amplikon boyları) Sanger dizilemeye göre daha kısa olmaktadır (115). Bu durum, genomun bazı bölgelerinin ve özellikle de tekrarlayan dizilerin, amplikon boyunu aşan büyük delesyon ve duplikasyonların net olarak belirlenmesini, dengeli translokasyonlarda, kırık bölgelerin amplikon ile örtüşme durumuna bağlı olarak belirlenmesini imkansızlaştırabilmekte ya da bu durumu saptayabilmek için özel bilgisayar yazılımlarının kullanılmasını ve geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Kısa amplikon dizilerinin ortaya çıkardığı sorunları aşmak için geliştirilmekte olan uzun okuma dizileme yöntemleri ise henüz çok daha pahalı olup işlem hacmi düşüktür (116). YND teknolojisindeki yeni gelişmeler temeli PZR'e dayalı olmayan teknolojilere doğru evrilmekte, bu teknoloji daha kısa sürede sonuç alınmasını sağlamanın yanı sıra PZR hatalarının önüne geçmeyi hedeflemektedir. PZR'ye dayalı olan yüksek kapasiteli nükleik asit dizileme teknolojileri, ikinci jenerasyon PZR'ye dayalı olmayanlar ise üçüncü jenerasyon YND olarak isimlendirilmektedir.

Genom dizileme yaklaşımlarından biri, genomun kodlamayan bölgeleri de dahil tüm genomun bütünüyle dizilendiği "Tüm Genom Dizileme (TGD)" yöntemidir. Araştırmacılar, bu teknoloji aracalığıyla genomik bilginin en geniş kapsamlı halini ve aynı zamanda ilişkili biyolojik etkileri de elde etmeye çalışmaktadır (117). Örneğin,

bir çalışmada TGD yaklaşımı kullanılarak meme kanseri hastalarında genler ile aromataz inhibitör terapisi arasındaki ilişkiler araştırılmış, saptanan varyantların klinik bulgularla arasındaki bağlantıların çeşitliliği çok kompleks bir patolojik tablonun varlığını göstermiş ve bu tekniğin hastalığın yapısını anlamak açısından önemli katkılar sağladığı vurgulanmıştır (118).

Yeni nesil dizileme teknolojilerinden bir diğeri olan "Tüm Ekzom Dizileme (TED)", genin kodlayan ekzonlarını ve foksiyonel elementlerini hedefleyen (yaklaşık tüm genomun %1'i) bir dizileme yaklaşımıdır (119). Bu yöntem, günümüzde hastalıkların genetik mutasyonlarını saptamada yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Özellikle, yüksek genetik heterojenite gösteren hastalıklarda, klinik tanıyı desteklemede önemli katkılar sunmaktadır (120). Ayrıca, otizm, epilepsi, beyin malformasyonları, konjenital kalp hastalıkları ve nörogelişimsel yetersizlikler gibi bir çok farklı hastalık grubunda yeni gen ve sinyal yolakları araştırmalarında da etkin olarak kullanılmaktadır (121). Bu yöntem, Sanger'e göre çok daha kısa sürede çok daha fazla örneğin dizilenebilmesine olanak sağlamaktadır (122). Klinik ekzom olarak tanımlanan sadece hastalık/yolak ilişkili bilinen gen verilerini değerlendirmeyi hedefleyen yaklaşımların kullanıldığı TED analizlerinin nadir genetik hastalıklarda ilişkili mutasyon saptama oranının %22-26 olduğu bildirilmektedir (123, 124). Genetik hastalıkların moleküler temelleri konusunda daha sınırlı bilgilerimizin olduğu 1995'li yıllarda, Mendel hastalıklarıyla ilişkili mutasyonların %85'inin ekzomlarda ya da korunmuş kırpılma bölgelerinde yer aldığı gösterilmekteydi (125).

Iossifov ve arkadaşları TED ile otizm spektrumlu tek çocuğu olan (*simpleks*) 2500 ailede yaptığı üçlü analizlerde (indeks-anne-baba) olguların yaklaşık %30'unda *de novo* gen-bozan (gene-disrupting) mutasyon ve kopya sayısı varyantları tespit ettiklerini bildirmişler ve TED yönteminin kompleks hastalıklarda yüksek okuma derinliğine karşın varyant yorumlarının yetersizliğine dikkat çekmişlerdir (126).

TGD yöntemi klinikte kullanım için, TED'e göre henüz pahalı bir tekniktir. Daha fazla ham DNA dizi verisi barındırdığından varyant analizleri çok uzun sürmekte ancak bilgi verici özelliği yüksek bulunmaktadır (127). TGD'nin özellikle ekzon-intron sınır bölgelerindeki mutasyonların saptanmasında daha etkili olduğu bildirilmektedir (119). Bilgisayar programlarının gelişmesine paralel olarak klinikte kullanımı da her geçen gün artmaktadır (128, 129). Genom dizileme çalışmalarının tıp

alanındaki önemli aşamalarından biri de farmakogenetik alanında görülmektedir. Hastalıklarla ya da uygulanacak ilaçların metabolik yolaklarla ilişkisini araştıran, kişinin ilaca vereceği yanıtı etkileyen genomik dizilerin ortaya çıkarılması için yapılan araştırmalar, "kişiye özel genom"'dan "kişiye özel tıp"'a geçen çok önemli bir kavşağa gelinmesini sağlamıştır. Bu nedenle gelecekte kişiye özel tıp uygulamalarında, özellikle ilaç kullanımına yol göstermede TGD yönteminin çok önemli bir yerinin olacağı bildirilmektedir (111).

Geçtiğimiz yüzyılda gelişim biyolojisini anlamamıza yardımcı olan itici güç eldeki birkaç model organizmanın genetik bilgileri idi, fakat modellenmeyen yapıları çözmek ya olanaksız ya da çok yavaş ilerleyebilmekteydi. YND teknolojileri sayesinde organizmanın genom dizilerine ulaşılması hızlandı ve kolaylaştı. Ancak, genetik varyasyonların aksine fenotipik varyasyonların değerlendirilmesinin, organizmanın molekülünden bütününe ve hatta organizmalar arası ilişkilere kadar uzanan çok daha geniş bir spektrumda seyrettiğinden, tek bir yöntemle yapılması beklenmemektedir. YND teknolojileri, farklı türlerin genom, epigenom ve transkriptom dizilerini saptamamızı kolaylaştırmış olsa da fenotipleri ölçen/değerlendiren hızlı, basit ve ucuz yöntemler geliştirilemediği sürece türlerde saptanan özgün intra ve inter farklılıklarının biyolojik öneminin anlaşılması güçlüklerle doludur (130). Çünkü fenotip sadece genotipten değil aynı zamanda çevre koşullarından da etkilenerek şekillenen, herhangi bilinen bir faktörle lineer bir bağlantı içinde olmayan, zaman faktörü ile de değişkenlik gösteren bir özelliktir. Canlılarda bu tip değişkenlikleri saptamaya yönelik yöntemlerin geliştirilmesi, "fenomiks" tanımı altında toplanan büyük ölçekli deneyler ve platformlarla geliştirilen projeler ile başlamış bulunmaktadır (131).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma grubu

Bu çalışmaya 2006-2015 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı izlemli diş agenezisi tanısı ile İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na yönlendirilen, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde klinik ve radyolojik açıdan detaylı olarak değerlendirilerek diş agenezisi ile ilişkili olası diğer sendromların dışlanmasıyla non-sendromik diş agenezisi tanısı kesinleşen ve projeye katılmayı kabul eden 10 olgu ve ailesi (n=46) imzalı onamları alınarak dahil edildi. Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Dosya no: 2014/1396). Çalışmaya katılan ailelerden bilgilendirilmiş onam alındı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Klinik Değerlendirmeler

Olguların fizik muayenesi 7. bölümde verilen muayene formu esas alınarak kaydedildi. Değerlendirmeye dahil edilen tüm olgu ve ailelerin aile ağaçları çizildi. Gerektiği durumlarda aile ağaçları, yatay ve dikey olarak genişletildi. Etkilenmiş bireylerin fotoğrafları (yüz, ağız-çene bölgeleri ve vücudun diğer bölgeleri) ve panoramik röntgen görüntüleri arşivlendi. Olguların gerekli görülen diğer anabilim dalı/bilim dalı konsültasyonları istendi ve sonuçlar dosyalarına kaydedildi.

3.2.2. Moleküler Yöntemler

3.2.2.1. Çalışmada kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler

- Buzdolabı (4 ^{o}C) (SR-L629EV (Samsung)
- Derin Dondurucu (-20^{o}C) (Real)
- Derin Dondurucu (-80^{o}C) (Wisd, DAIHAN Scientific)
- Görüntüleme sistemi (UV) (Omes, Fotodyne, EPI Transilluminator)
- Nanodrop spektrofometre (Thermo Scientific-ND 2000c)
- Mikropipet seti (Gilson, FinPipette)

- Mikro Santrifüj (Labofuge 200/Heraeus SepaTech)
- Santrifüj (Beckman Coulter
- Termal döngü cihazı (PZR) (BioRad, Veriti-LifeTech, *Techne*-TC 5000, ABD)
- Yeni nesil dizileme cihazı (Illumina HiSeq2000)
- Yeni nesil diziler için kütüphane cihazı (NimbleGen Seq Cap Exome Library, Roche)
- Sanger dizileme reaktifleri ABI 3500 (Applied Biosystems)
- 0.2-1.5 ml Eppendorf (Nest Biotechnology)
- Exonuclease I (Fermentas, Roche)
- rApidAlakalinePhosphatase (Fermantas, Roche)
- Taq DNA polymerase (Fermantas, Roche)
- MagNApure Compact NucleicAcidIsolation Kit I-Largevolüme (Roche)
- BigDyeTerminator v3.1 Ready ReactionCycleSequencing Kit (LifeTech)
- Bilgisayar Programları (CASAVA, Annovar, Atlas2, Seq Scape)
- Merdiven Markör (Sigma)
- Etidyum Bromür (Sigma)
- Agaroz (Sigma)

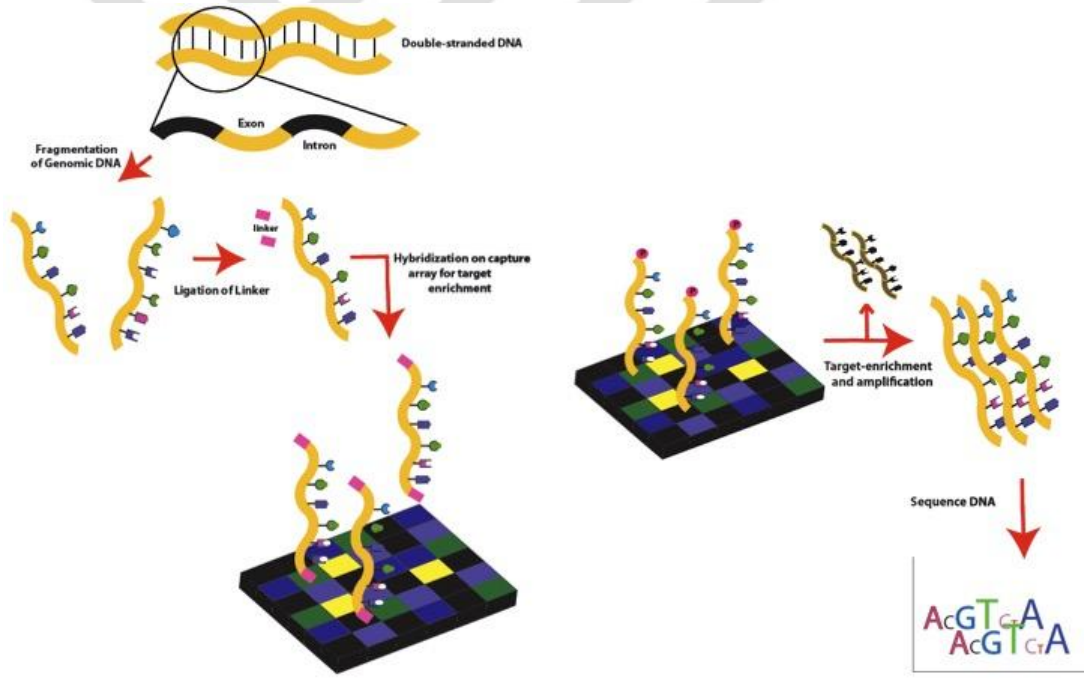
3.2.2.2. DNA Eldesi:

DNA izolasyonları 5ml K_3 EDTA'lı tüplere alınan periferik kandan, kit kullanılarak, firma protokolüne uygun olarak yapıldı (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche Diagnostics).

3.2.2.3. Tüm Ekzom Dizileme (TED)

Indeks olgulara ait 0.5 ng genomik DNA örnekleri için 'pair-end' kütüphane hazırlığı (*paired-end pre-capture library*) yapılarak Illumina Hiseq yeni nesil DNA dizileme platformunda University of Texas Health Science, Center for Craniofacial Research, Houston'da yürütüldü. İlk olarak DNA örnekleri sonikasyon yöntemi ile

fragmente edildi, fragmentasyon sonrası örnekler Illumina multiplex '*pair-end'* adaptörlerle birleştirildi. Adaptörlere bağlanan DNA fragmentleri sekans barkodu içeren indeks primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Üretici firmanın protokulü ufak modifikasyonlar ile değiştirildi. Her okuma için 101 siklus ve indeks okuma için de ek olarak 7 siklüs reaksiyon olmak üzere dizileme sağlandı (132). Amplifiye edilen örnekler (42 Mb VCRome version 2.1, Roche NimbleGen) ekzom yakalama (*exome capture*) çözeltisinde hibridize edildi. Dizi alanı 7.7 Gb büyüklüğünde olan '*pair-end*' örnekler, Illumina HiSeq 2000 platfromunda, ortalama okuma derinliği 120 X'den fazla ve hedef DNA dizilerinin % 97'sinin en az 20 defa (20X) kapsanarak okunacağı şekilde dizilendi. UTR ve intronlar ile ekzonlara yakın +/- 5 bazlık kısmı hariç analize dahil edilmedi (Şekil 3-1)

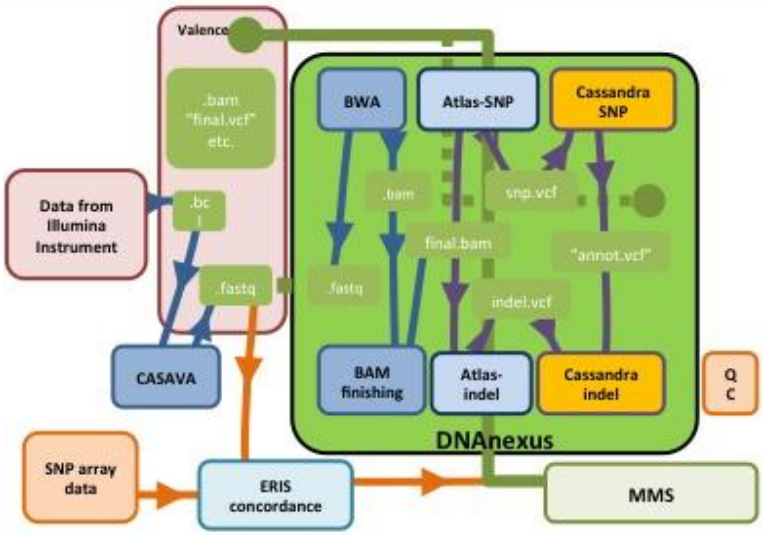


Şekil 3-1: Ekzom dizileme yöntemi; (133)'dan uyarlanarak alınmıştır

3.2.2.4. Varyant Analizi, Filtreleme ve İsimlendirme (*Annotation*)

Ekzom verisi *in-house* olarak geliştirilen HGSC-Mercury (Baylor College of Medine) yazılımı aracılığıyla analiz edildi ve varyantlar isimlendirildi (134). Illimuna HiSeq 2000 cihazından elde edilen veri çıktıları, cihaza ait CASAVA yazılım aracılığıyla bcl dosyasından FastQ dosyasına dönüştürüldü. Elde edilen FastQ dosyası, referans sekans olan haploit insan genom dizisine (Genome Reference Consortium

Human Genome Build 37, Human Genome 19) BWA (Aligment of Burrows-Wheeler, bio-bwa.sourceforge.net) programı aracılığıyla haritalandı. Sonlandırılan Bam (*binary alignment map*) dosyaları GATK yazılımı (135) kullanılarak kalibrasyon kaliteleri gözden geçirilerek sıralandı. Referans sekanstan farklı olan varyantların (Variant calls) isimlendirilmesi Atlas2 (Atlas-SNP ve Atlas-Indel) algoritması kullanılarak yapıldı ve VCF (*variant call file*) dosyaları oluşturuldu. Son olarak, oluşturulan VCF dosyalarındaki isimlendirilmiş varyantlar Baylor College of Medicine'da geliştirilmiş olan CASSANDRA programı kullanılarak filtrelendirildi ve anote edildi. İstenilen skorun altındaki veriler değerlendirme dışı tutuldu. Elde edilen varyantlar allel frekansı (MAF) <%1 altında olacak şekilde, 1000 Genom Projesi veri tabanından, UCSC ve RefSeq gen modellerinden ve *in-house* olarak geliştirilmiş ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) grubundan tekrar filtrelendi. Ayrıca, aday genler CMG (The Baylor-Hopkins, Center for Mendelian Genomics) veri tabanında bulunan Türk toplumuna ait allel frekansı verileriyle karşılaştırıldı. Filtrelemelerden sonra amino asit değişikliğine neden olmayan nükleotit değişiklikleri ve ekzon sınırına 10 bp'den uzak olan intronik varyantlar çıkartıldı. Elde edilen tüm *de novo*, homozigot, birleşik heterozigot, heterozigot ve hemizigot varyantlar görüntülendi. Varyant isimlendirmeleri, dbSNP, ve 1000 Genomes veri tabanlarıyla karşılaştırılarak yapıldı. Varyantlar yenilik, kodlanan proteine etkisi, türler arasındaki korunmuşluk, ekspresyon paternlerine göre değerlendirildi. *In silico* algoritmalar (PolyPhen-2, SIFT ve MutationTaster) uygulanarak, patojenite değerlendirilmesi yapıldı (136-138). Varyantlar, mutasyon çeşitlerine göre öncelikle stop kodon, çerçeve kayması, kırpılma hatası ve missense mutasyonlar olarak sınıflandırılarak önceliklendirildi (Şekil 3-3). Aday genler Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Genecards ve UCSC Genome portal kullanılarak incelendi (139-141).



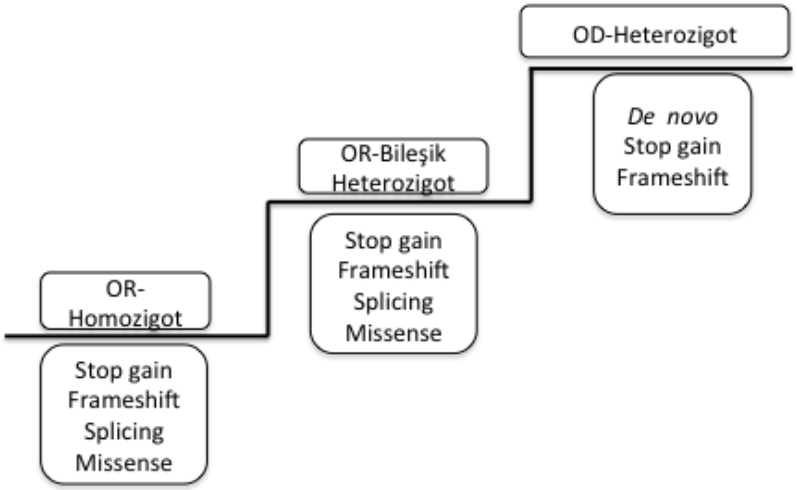
Şekil 3-2: Veri eldesi için kullanılan algoritma şematik olarak gösterilmektedir.

3.2.2.5. Varyant yorumlaması

Varyantlar, çeşitli öngörülen skorlama programlarına göre patojeniteleri, sıklıkları, bilinen sinyal yolakları ile olan etkileşimleri, içinde bulundukları genin ekspresyonu ve fonksiyonu, diğer kohortlardaki varlığı, sıklığı ve son olarak ailede hastalıkla birlikte segrege olma durumları gibi seçim kriterleri uygulanarak yorumlandı. İlk filtrelemede bilinen genler ve sinyal yolları ile ilişkili olan genlerdeki varyantlar değerlendirmeye alındı ve aile ağacı değerlendirmesine göre kalıtım modeli esas alınarak segregasyonu incelendi. İkinci filtrelemede ise en az iki *in silico* analizde patojenik özellik gösteren, MAF değeri %1'den az olan ve kalıtım modeli ile uyumlu olan tüm diğer genlerdeki değişimler değerlendirildi.

Kalıtım modeli olarak OD model düşünüldüyse öncelikle heterozigot varyantlar, OR kalıtım modeli düşünüldüyse homozigot ve birleşik heterozigot varyantlar önceliklendirildi. (Şekil 3-3). Varyant yazılımında, aynı gende birden fazla MAF (Minör Allel Frekansı) <% 1, patojenik ya da *novel* varyant saptanırsa, bunları birleşik heterozigot sütünu altında listelenmektedir. Bu listede yer alan ve irdelenmesi önemli olduğu düşünülen varyantlarda gerçek birleşik heterozigotluk için indeks, anne ve baba üçlüsünde ilgili varyant için Sanger dizileme ile inceleme yapıldı. Ancak kalıtım modelinden bağımsız olarak diğer tüm varyantlar da irdelendi. Varyantların değerlendirilmesinde esas olarak önceki bölümde bahsedilen kriterler kullanıldı. Okuma derinlikleri de göz önünde bulundurularak patojen olduğu düşünülen

varyantların Interactive Genomic Viewer (IgV) görüntüleri ilgili program aracılığı ile incelendi (142). Özellikle okuma derinliği 20X'in altında olan şüpheli varyantlar için IgV görüntüleri ile okuma derinliği tekrar kontrol edilerek varyant yorumlaması sonlandırıldı.



Şekil 3-3: Kalıtım modellerine göre varyantların önceliklendirilmesi

Bulunan varyantın bilinen bir gende olup olmamasına, bu varyantın daha önce tanımlanıp tanımlanmamasına, bilinen bir sinyal yolu ile ilişkisine, hayvan modelleri çalışması varlığına (143) ve fonksiyonuna göre değerlendirilerek olgulardaki fenotipe neden olan etiyolojinin aydınlatılıp aydınlatılamadığına karar verildi. Bu karar sırasında varyantın Türkiye toplumuna ait 700 bireye ait DNA örneğinin ekzom dizileri de kontrol edildi. Bulunan varyantların sıklığının Türkiye toplumunda da <%1 altında olmasına dikkat edildi.

3.2.2.6. Primerlerin Tasarlanması

Primerler tasarlanırken, seçilen oligonükleotidlerin herhangi bir SNP ve tekrarlayan dizi içermemesine, ileri ve geri primer çiftlerinin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla +/- 2-5˚C fark), içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin olabildiği kadar eşit dağılımlı olmasına, 17-24 mer içermesine ve gen bölgesi için özgün olmasına özen gösterildi (144). SNP yoğun bölgelerde, primerin bir SNP üzerine gelmesi kaçınılmaz ise MAF değerinin %1'den daha az olmasına dikkat edildi. Özgünlük, USCS Genome Browser dan "in silico PCR" interaktif analizi ile test edildi (145) .

Bu aşamalarda kullanılan primer dizileri Tablo 3-1'de gösterilmektedir. İlgili genlerin PZR koşulu ise Tablo 3-2'de sunulmaktadır.

Tablo 3-1: Primer listesi, dizileri ve amplikon boyları

Gen	Dizi (5' → 3')	PZR ürün boyu
ANTXR1-F	TTGGGTAGCATTCACATTGC	373 bç
ANTXR1-R	GGGTTTTAGGTTGGGATTTTATC	
AXIN2-F	CTCCACCCAAACCCAATC	348 bç
AXIN2-R	TTCCAGTTCTTCTAACCCAGTTTC	
BCOR-F	AATCTCGGAAAACCGATTCC	1135 bç
BCOR-R	CAATGGCAAGTATCCCAAGG	
CCBE1-F	ATCGCTGTGGGAGTGGG	292 bç
CCBE1-R	AGGAGCAGGACGCTTGG	
COL17A1-F	TGACGAGTGAGGCCAGG	197 bç
COL17A1-R	GGAATAGTGAGGGTGTTGCTTC	
DAAM2-F	AAGGGGCTGTAACCCTCAAC	198 bç
DAAM2-R	GGCCACCAAGAACCCTACTAC	
DKK1-F	GAATTATTTTAGTGAAACGATGCAG	391 bç
DKK1-R	GGTCATAAAAGGTTTTCATAGCATC	
KMT2D-F	GCTGAGGAGACAGTAAAGTTCG	500 bç
KMT2D-R	CCCTCACAGACAGGTGCTTA	
LAMA3-F1	ATGCATCCTCATCCTCTTGG	651 bç
LAMA3-R1	TGTGCTGTAAGAATGTGCGG	
LAMA3-F2	TTGCAACTAGGGAAATTTTGG	277 bç
LAMA3-R2	AGGAGCAGCGAGGGATATG	
LRP6-F	GCAAAACTAAAAGTGCATGAAAG	390 bç
LRP6-R	TTACCAAAAGTATAACTTGACCCAC	
POLR3B-F	GTCTTGCAGTTTGCTTGGTG	350 bç
POLR3B-R	GCTCCTCTGGGATCAGCC	
PTH2R-F	TTGTAATAGATCGGGTGCAAGA	396 bç
PTH2R-R	TGGCCTAAGAACACTATCCACA	
RECQL4-F	CGAAGCACCTGCACCAG	531 bç
RECQL4-R	CTCTCCCCTGAGGGACTAGG	
SMOC2-F	AGAAAGCAGAGTGGGCCTC	240 bç
SMOC2-R	AAGAAACGGCAAACCAATTC	
SNX10-F	TTTAGTGCAGTCGTTTTGTTCAG	241 bç
SNX10-R	CAACTTTATCCCATAAAATGTATCCC	
WNT10A-F1	CTGGAGAATGGGGTGTCAAG	518 bç
WNT10A-R1	CAGAAGAGAGGTAGGCCAGG	
WNT10A-F2	TTGGGACAGAGTGTGTGTTG	399 bç
WNT10A-R2	TCTGAGGTGGAGATGCTGG	

3.2.2.7. Ekzon Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Çoğaltılması ve saflaştırılması:

Olguların TED sonucunda hastalığa neden olduğu bilinen gendeki mutasyonlar, aday varyantlar ve yeni genlerdeki aday varyantlar için tasarlanan özgün primerlerle PZR reaksiyonu yapıldı. Her bir PZR reaksiyonu için, 100-200 ng gDNA, 1X tampon solüsyonu [10X $(NH_4)_2SO_4$], 2 mM $MgCl_2$, % 0-10 DMSO (Sigma), 200 µM dNTP, 300-800 µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Fermentas, Roche) kullanıldı. Reaksiyon karışımı, bidistile su (H_20) ile 50 µl ye tamamlandı. PZR, 95°C de 10 dakika (dk) denatürasyon, ardından 95°C de 30 saniye (sn) denatürasyon, primerlerin Tm ısılarına göre belirlenmiş iki kademeli ısıda 30 sn lik bağlanma ve 70°C de uzama (her 1 kb için 60 sn) basamaklarından oluşan toplam 30-40 döngü ve son olarak 70°C de 10 dk lık uzama olacak şekilde, iki kademeli PZR yöntemi kullanılarak, termal döngü cihazında gerçekleştirildi (Tablo 3-2). Elde edilen PZR ürünleri amplifikasyon özgünlüğü ve bant boylarının doğruluğu için agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Bu işlem içinPZR 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, 25-30 dk yürütülerek boyutlarına göre ayrıldı. Elde edilen bantlar ultraviyole (Omes, Fotodyne) ışık altında görüntülenerek fotoğrafları kayıt edildi. PZR ürünleri ticari kit kullanılarak, firma protokolüne uygun olarak saflaştırıldı. (PCR product purification kit, Roche). Dizileme için yeterli kalitede olan örnekler Sanger dizileme yöntemiyle incelendi.

Tablo 3-2: PZR koşulları

PZR Koşulları		
95°C	10 dakika	1x
95°C	30 saniye	
60°C	30 saniye	40x
70°C	60 saniye	
72°C	10 dakika	1x
72°C	∞	

3.2.2.8. Sanger Dizi Analizi ile Varyant Doğrulama ve Biyoinformatik analizi

Sanger dizileme reaktifleri ABI 3500 (Applied Biosystems) kapiller dizileme cihazında yürütüldü (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: Dizi için PZR Reaksiyonu

Reaktif	Standard reaksiyon (20 µL)	
	Örnek Forward	Örnek Reverse
BigDyeTM Terminator 3.1 Mix	8 µL	8 µL
Forward primer (3.2 µM)	1 µL	—
Reverse primer (3.2 µM)	—	1 µL
İyonsuz su (RNase/DNase-free)	9 µL	9 µL
Kalıp	2 µL	2 µL
Toplam Hacim	**20 µL**	**20 µL**

Hazırlanan ürünler 96 kuyulu mikroplate üzerindeki kuyucuklara aktarıldı. Karışım termal döngü cihazında yürütüldü. Protokol toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn denatürasyon, 50°C de 5 sn bağlanma ve 60°C de 4 dk sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C'ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

Dizi reaksiyon ürünlerindeki artık primer ve diğer reaktiflerin temizliği için mikro plak içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 ethanol eklendi. Mikro plak alüminyum koruyucu yapışkan bir bant ile kapatılarak oda ısısında 15 dk bekletildi. 3810 RPM'de (2012 G) 45 dk. santrifüj yapıldı. Bu işlemden sonra koruyucu yapışkan bant açıldı ve mikro plak kuyucuk ağızları üste gelecek biçimde çevrilerek 1100 RPM'de (168 G) 30 sn kısa süreli santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik ethanol eklendi. Tekrar mikro plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 RPM'de (1660 G) 15 dk santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve 1170 RPM'de (190 G) 60 sn kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon tampon çözeltisi [(dH_2O ya da HiDi formamid (Highly Deionized formamid)] eklendi. Örnekler 95 °C de 5 dk denatüre edildi, 2 dk buz üzerinde bekletildi ve sekans analizatöründe yürütüldü.

Saflaştırılan örnekler en yüksek hızda kısa bir süre için santrifüj yapılıp denatüre edildikten sonra yürütme işlemine geçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dyeset seçildi.

Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı:8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn ’ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

Dizileme sonuçları, Chromas 2.32 SequencerTM software (Gene Codes Corporation, MI, USA), Seq Scape ve NCBI BLAST (Basic Local Asligment Search Tool) programları kullanılarak bilgisayar ortamında analiz edildi. Saptanan değişimlerin tanımlanmış SNP olup olmadıkları “NCBI Entrez SNP” ve “ENSEMBL, GeneSNPView” veri tabanları kullanılarak değerlendirildi (146-148).

Son olarak, bulunan ve doğrulanan varyantlar ilgili ailelerde aranarak segragasyon analizi ile tamamlandı.

4. BULGULAR

Çalışma grubunda 10 aileden 10 indeks, dokuzu etkilenmiş toplam 20 ebeveyn, yedisi etkilenmiş 16 aile bireyi olmak üzere toplam 46 birey yer aldı. İndeks olguların sekizi erkek, ikisi dişi idi. Toplam dokuz olgu oligodonti (Olgu 1, Olgu 2, Olgu 3, Olgu 4, Olgu 5, Olgu 6 , Olgu 8, Olgu 9, Olgu 10), bir olgu hipodonti (Olgu 7) tanısı aldı.

İndeks olguların TED analizi sonucu elde edilen varyantları 3.2.2.4 bölümünde belirtilen kriterler doğrultusunda filtrelendi. Gerekli görüldüğü durumlarda kaltım modeli ve varyant tiplerine göre kriterler değiştirilerek filtreleme işlemi tekrarlandı ve önceliklendirildi.

TED analizi ile incelenen toplam on indeks olgudan beşinde *WNT10A* gen varyantları saptandı. Bunlardan üçünün aile içinde hastalıkla segrege olduğu belirlenirken (Olgu 2, Olgu 4 ve Olgu 5) , diğer iki olguda segrege olmadığı (Olgu 1 ve Olgu 3) gösterildi. Bu ailelerden birinde (Olgu 5) *WNT10A* gen varyantına *LAMA3* gen varyantının eşlik ettiği saptandı. Bir olguda *LRP6* gen varyantı (Olgu 6), bir olguda ise (Olgu 7) *DKK1, COL17A, LAMA3* gen varyantlarının, birlikte aile bireylerinde fenotip ile segrege olduğu gösterildi. Bir olguda (Olgu 3) *BCOR* gen varyantı diğerinde ise (Olgu 9) *ANTRX1* gen varyantının ailede fenotip ile segrege olduğu gösterildi. İki olguda ise (Olgu 8 ve Olgu 10) oligodonti ile ilişkili olabilecek hiç bir varyasyon saptanmadı (%30).

4.1. Olgu 1

4.1.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında 1° derece kuzen evliliği olan etkilenmiş anne ile sağlıklı babanın ikinci çocuğu idi (G5P3Sek2). Annede üst lateral dişlerin eksikliği tariflenmekteydi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik, 36. haftada normal spontan doğum ile sonlanmıştı. Doğum tartısı, boyu ve baş çevresi bilinmiyordu.

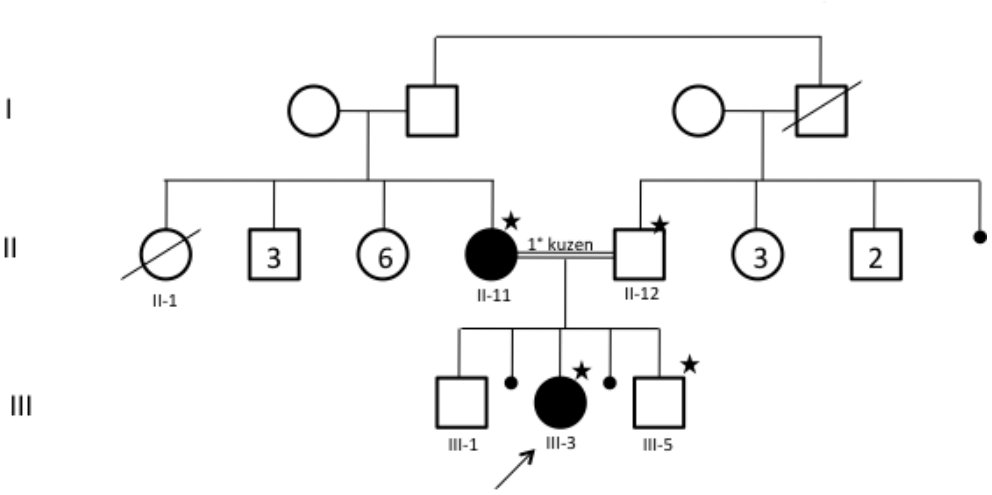
Fizik muayenede (15 yaşında kız) boyu 154 cm (25p), kilosu 45 kg (10p) ve baş çevresi 52,5 cm (10p) idi. Üst çenede 4 adet süt, 4 adet kalıcı, alt çenede ise 6 adet süt, 3 adet sürekli diş gözlendi. Daha sonra da panoramik röntgen ile tekrar değerlendirildi şekil ve büyüklük anomalileri de gözlendi. (Şekil 4-1). Sırt ve karın bölgesinde 4x5 cm büyüklüğünde hiperpigmente alanlar mevcuttu. Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.



Şekil 4-1: Olgu 1 (III-3)'e ait panoramik röntgen görüntüsü. 12, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 36, 41, 42, 43, 45, 46, 47 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.1.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede iki etkilenmiş birey (anne ve kız çocuk) varlığı OD kalıtım lehine değerlendirildi (Şekil 4-2). Annenin (II-11) anne ve babasının (I-1 ve I-2) akraba olmaması OR kalıtım olasılığını azaltmaktaydı.



Şekil 4-2: Olgu 1'in aile ağacı

4.1.3. Moleküler Analiz

Olgu 1 ailesinde etkilenmiş olguya (III-3) ait gDNA örneğinde TED analizi yapıldı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında toplam 544 adet heterozigot, 12 adet homozigot, 80 adet öngörülen birleşik heterozigot varyant saptandı. Bu varyantlar yolak genlere göre önceliklendirildiğinde *WNT10A*, *CCBE1* ve *PTHR2* genlerinde üç adet aday varyant belirlendi.

İlk olarak diş agenezisi ile ilişkisi daha önce tanımlanmış olan *WNT10A* geni 3. ekzonunda yer alan homozigot c.G433A (p.V145M) varyant değerlendirmeye alındı. Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs543063101 olarak tanımlı idi. Aile içi segregasyonu PZR ve Sanger dizileme yöntemi ile yapılan incelemede etkilenmiş anne, sağlıklı baba ve sağlıklı kardeşin bu varyantı heterozigot olarak taşıdığı saptanarak varyantın segregasyonu dışlandı.

Hastalıkla daha önce ilişkilendirilmemiş *CCBE1* geninin 1. ekzonunda saptanan c.C116T (NP_597716, CCG>CTG, p.P39L) ile *PTH2R* (NM_005048) geninin 7. ekzonunda saptanan c.853+3A>T varyantlarının da aile içindeki analizi, bu varyantların oligodonti ile segrege olmadıklarını gösterdi. Bu genlerde saptanan varyantlar daha önce tanımlanmamıştı.

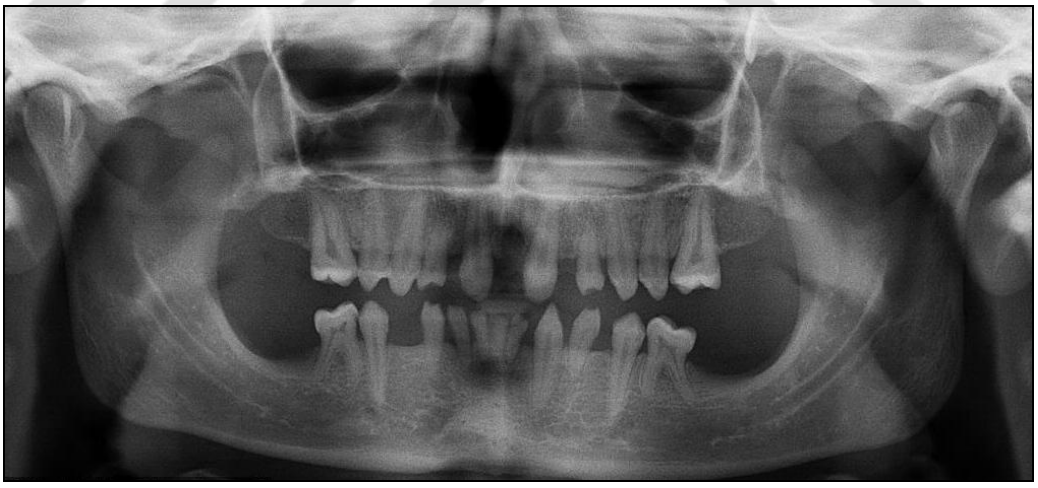
4.2. Olgu 2

4.2.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında 1.5° derece kuzen evliliği olan sağlıklı anne ile etkilenmiş babanın ikinci çocuğu idi (G5P6). Babada benzer bulgular ile diş eksikliği tariflenmekteydi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik, 38. haftada normal spontan doğum ile sonlanmıştı. Doğum tartısı, boyu ve baş çevresi bilinmiyordu.

Fizik muayenede (20 yaşında kız) boyu 148,5 cm (<3p), kilosu 66,2 kg (>97p) ve baş çevresi 53,5 cm (10-25p) idi. Burun kökü geniş, üst dudağı ince idi ve malar hipoplaziye ek olarak alt çene prognatizmi vardı. Üst çenede 2 adet süt 8 adet kalıcı, alt çenede ise 7 adet süt, 4 adet kalıcı diş gözlenmekteydi. Daha sonra da panoramik röntgen ile tekrar değerlendirilerek mikrodonti ve dişlerde şekil anomalileri de gözlendi (Şekil 4-3). Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.

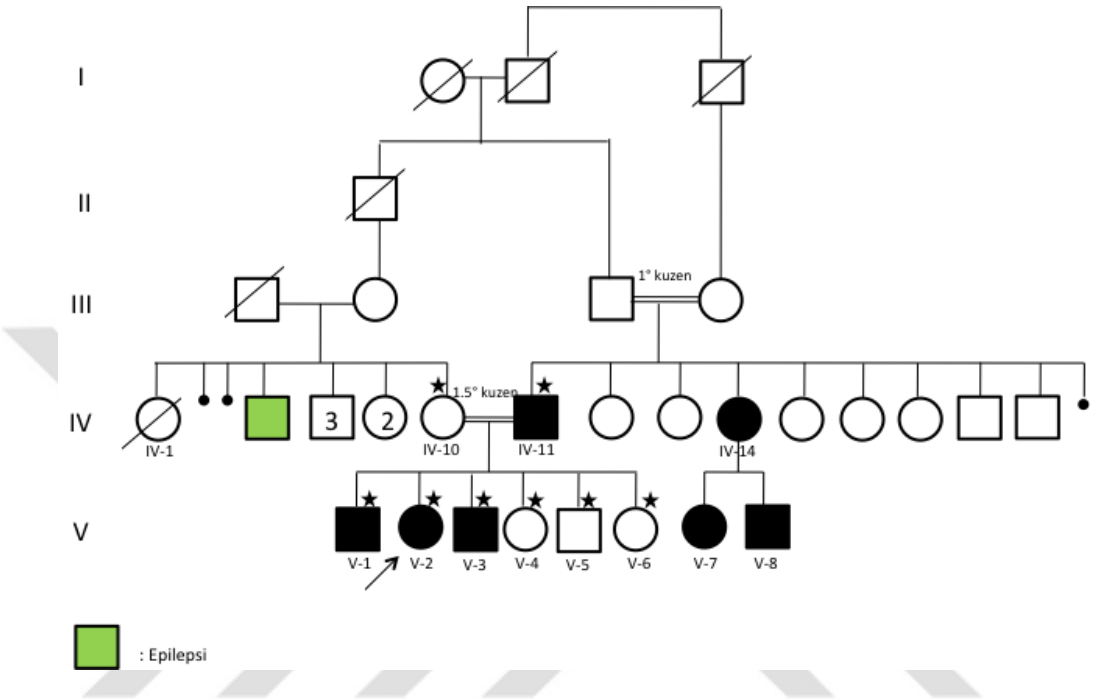


Şekil 4-3: Olgu 2 (V-2)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 13, 17, 22, 23, 27, 31, 32, 34, 37, 41, 42, 43, 44, 47 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.2.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede iki etkilenmiş kardeşte birinin üç, diğerinin iki etkilenmiş çocuğunda oligodonti varlığı OD kalıtımı desteklerken, iki etkilenmiş olgunun ebeveyninin akrabalık ilişkisi bilinmemekle birlikte, beş etkilenmiş olgunun (IV-11 ve IV-14, V:1-

3) ebeveyninin akraba olması OR kalıtımın da göz ardı edilmemesi gerektiğini düşündürdü (Şekil 4-4). Ailedeki IV-14, V-7 ve V-8 bireyleri proje için kan örneği vermede çekimser oldukları için moleküler analize dahil edilemediler.

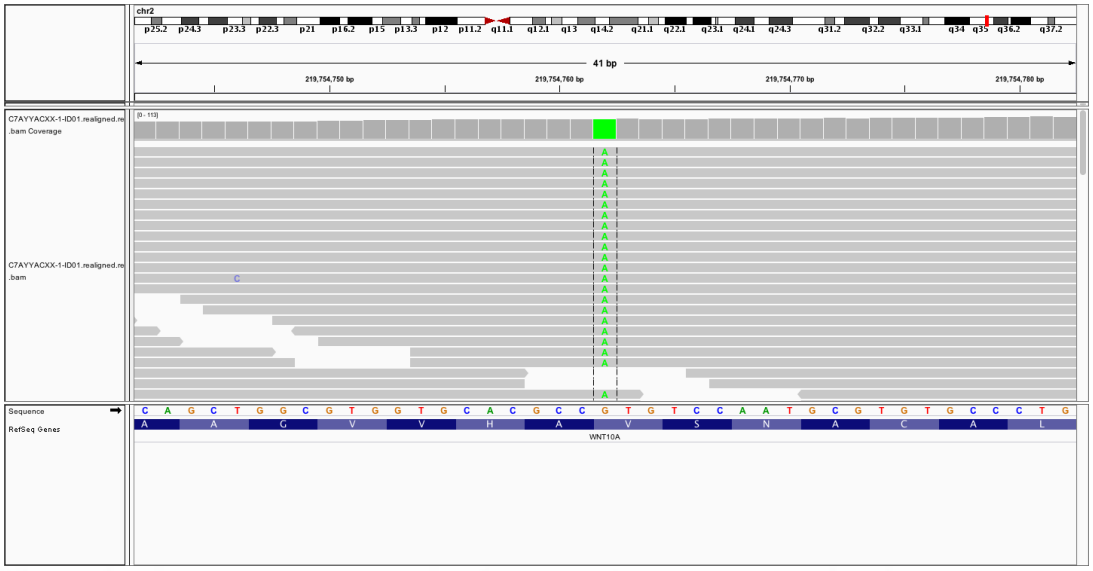


Şekil 4-4: Olgu 2'nin aile ağacı

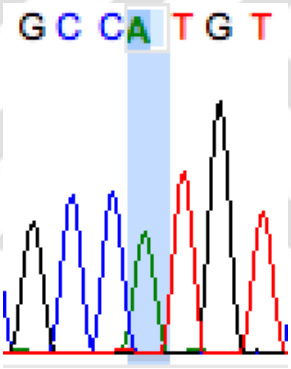
4.2.3. Moleküler Analiz

Olgu 2 ailesinde etkilenmiş olguya (V-2) ait gDNA örneğinde TED analizi yapıldı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında toplam 728 adet heterozigot, 52 adet homozigot, 118 adet öngörülen birleşik heterozigot varyant saptandı. Bu varyantlar yolak genlerine göre önceliklendirildiğinde sadece bir varyant elde edildi.

İlk aşamada, diş agenezisi ile ilişkisi daha önce tanımlanmış olan indeks olguda homozigot saptanmış olan *WNT10A* genindeki c.G433A (p.V145M) varyantı değerlendirildi (Şekil 4-5 ve 4-6). Bu varyant olgu 1'deki *WNT10A*'da rs543063101 olarak tanımlanmış varyant ile aynı idi. Aile çalışmasında varyantın etkilenmiş baba ve etkilenmiş iki erkek kardeşte homozigot, sağlıklı anne ve diğer sağlıklı üç kardeşte heterezigot formda saptanması OR kalıtımı destekleyen segregasyonu olduğu lehine kabul edildi.



Şekil 4-5: Olgu 2'nin *WNT10A* genindeki c.G433A (NP_079492; p.V145M) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*)



Şekil 4-6: Olgu 2'nin *WNT10A* (NM_025216.2) geninde ekzon 3'de homozigot c.G433A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü

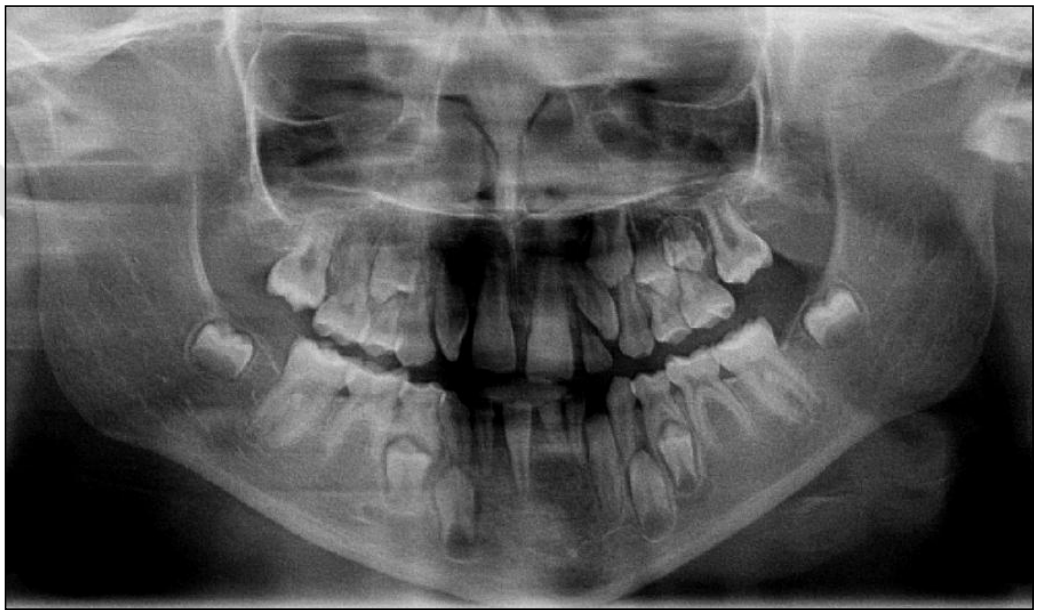
4.3. Olgu 3

4.3.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında akraba evliliği olmayan sağlıklı anne ile etkilenmiş babanın üçüncü çocukları idi (G4P3Sek1). Babada ve kız kardeşte de benzer bulgular ile diş eksikliği (hipodonti) tariflenmekteydi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik, 38. haftada normal spontan doğum ile sonlanmıştı. Doğum tartısı 3200 gr, boyu 57 cm ve baş çevresi bilinmiyordu.

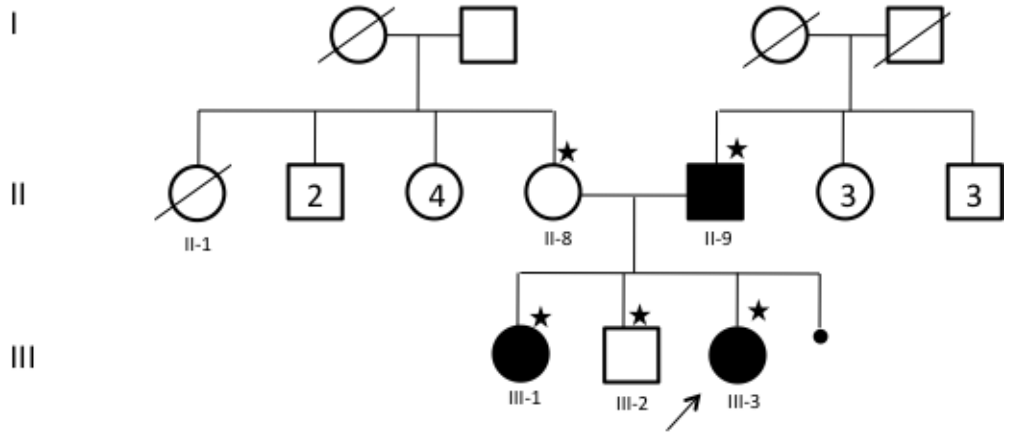
Fizik muayenede (8 yaş 3 aylık kız) boyu 132 cm (75-90p), kilosu 40 kg (90p) ve baş çevresi 53,5 cm (25-50p) idi. Hafif hipertelorizm, ince üst dudakları vardı. Alt çene ucu belirgindi. Üst çenede 7 adet süt 4 adet kalıcı, alt çenede ise 5 adet kalıcı, 5 adet süt diş gözlenmekteydi. Daha sonra da panoramik röntgen ile tekrar değerlendirildi (Şekil 4-7). El eklemlerinde hiperekstansiyon ve parmak yastıkçıkları mevcuttu. Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.



Şekil 4-7: Olgu 3 (III-3)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 15, 17, 22, 27, 31, 35, 42, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.3.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede 3 etkilenmiş bireyin varlığı OD kalıtım modelini desteklerken, etkilenmiş babanın (II-9), etkilenmiş iki kız (III-1 ve III-3) ve sağlıklı bir erkek çocuğunun (III-2) varlığı X'e bağlı kalıtımdan uzaklaştıramadı (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: Olgu 3'ün aile ağacı

4.3.3. Moleküler Analiz

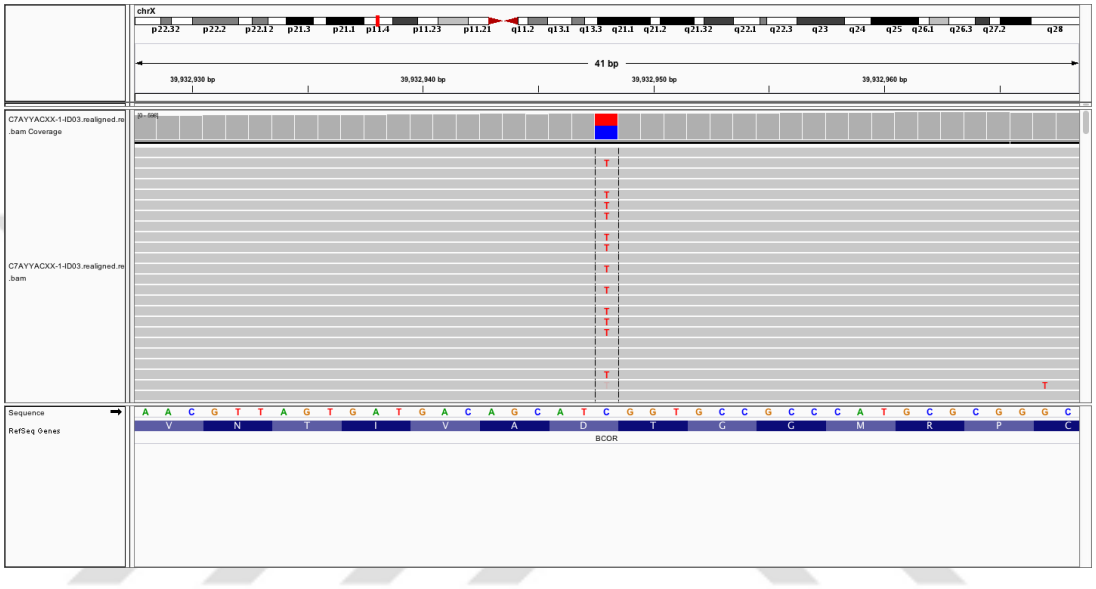
Olgu 3 ailesinde etkilenmiş olguya (III-3) ait gDNA örneğinde TED analizi yapıldı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında toplam 758 adet heterozigot, 35 adet homozigot, 169 adet öngörülen birleşik heterozigot varyant saptandı.

Olguda ilk olarak bilinen *WNT10A* geninde 3. ekzonda homozigot c.T682A (p.F228I) varyantı saptandı. Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs121908120 olarak tanımlı olup daha önce oligodonti ile ilişkilendirilmiş bir mutasyondu. Bu mutasyonun aile çalışmasında, etkilenmiş kardeşte, homozigot etkilenmiş baba (II-9), sağlıklı anne (II-8) ve sağlıklı erkek kardeşte (III-2) ise heterozigot formda bulunduğu belirlenerek ailede hastalık ile segregasyonu desteklenemedi.

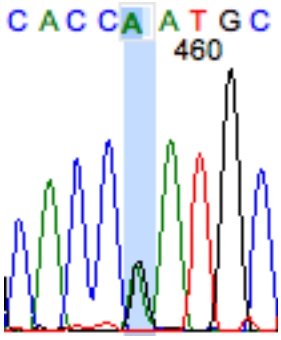
SMOC2 (NM_022138) geninin 4. ekzonunda heterozigot c.C404G (NP_071421, p.T135R) ve *KMT2D* (NM_003482) genin 39. ekzonunda heterozigot c.A11570T (NP_003473, CAG>CTG, p.Q3857L) varyantları saptandı. *SMOC2*'de saptanan aynı nükleotiddeki c.C404T (p.T135M) dönüşümü NCBI-SNP veri bankasında rs756749965 olarak tanımlıydı ancak aynı nükeleotiddeki bu C>G değişimi daha önce tanımlanmamıştı. *KMT2D*'deki varyant da daha önce tanımlanmamış bir değişimdi. Aile çalışmasında iki varyantın da ailede oligodonti ile segrege olmadığı görüldü.

Daha sonra tüm varyantlar tekrar filtrelenerek mutasyon tiplerine göre ayrı ayrı incelendi. İncelemenin sonunda, X kromozomu üzerinde yer alan *BCOR* geninde 4. ekzonda heterozigot c.G1651A (p.D551N) değişimi saptandı (Şekil 4-9 ve 4-10).

Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs372463512 olarak tanımlıydı. Aile çalışmasıyla etkilenmiş babada da (II-9) aynı değişimin varlığı, etkilenmiş kızkardeşlerin (III-1, III-3) değişimi heterozigot olarak taşıdığı saptandı. Sağlıklı anne (II-8) ve erkek kardeşin (III-2) mutasyonu taşımadığı gösterilerek varyantın oligodonti ile segrege olduğu belirlendi.



Şekil 4-9: Olgu 3'ün *BCOR* genindeki heterozigot c.G1651A (NP_060215, p.D551N) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *reverse*)



Şekil 4-10: Olgu 3'ün *BCOR* (NM_017745.5) geninde ekzon 4'deki heterozigot c.G1651A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü

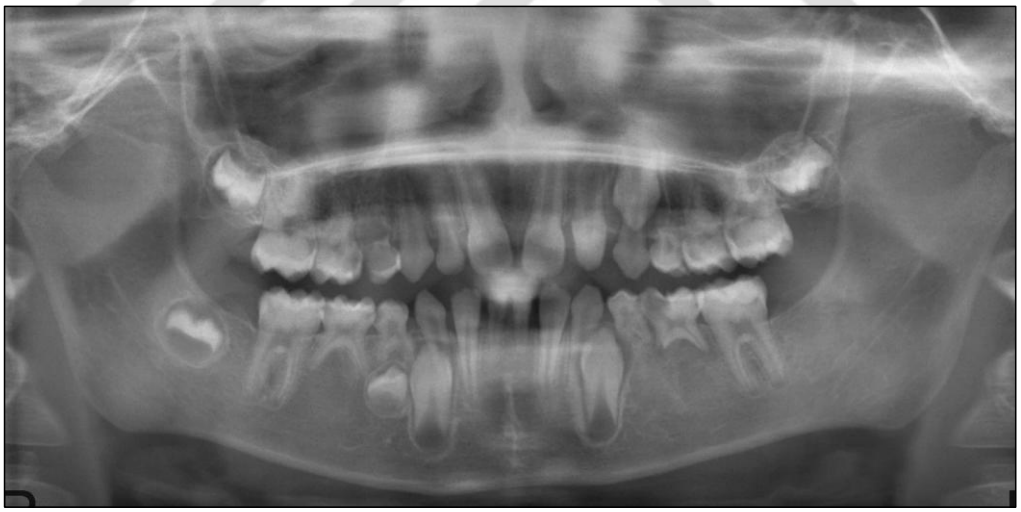
4.4. Olgu 4

4.4.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında 1° derece kuzen evliliği olan etkilenmiş anne ile sağlıklı babanın ikinci çocukları idi (G4P2Ab2). Annede, teyzede ve erkek kardeşte de benzer bulgular tariflenmekteydi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik zamanında, 40. haftada normal spontan doğum ile sonlanmıştı. Doğum tartısı 3450 gr, boyu 52 cm ve baş çevresi bilinmiyordu.

Fizik muayenede (11 yaş 11 aylık erkek) boyu 136cm (3-10p), kilosu 37 kg (50p) ve baş çevresi 54 cm (75p) idi. Üst çenede 7 adet süt 4 adet kalıcı, alt çenede ise 8 adet süt, 4 adet kalıcı diş gözlenmekteydi. Daha sonra da panoramik röntgen ile tekrar değerlendirildi (Şekil 4-11). Sternum sağ tarafta 0,5x0,5 cm büyüklüğünde hiperpigmente lezyon mevcuttu. Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.

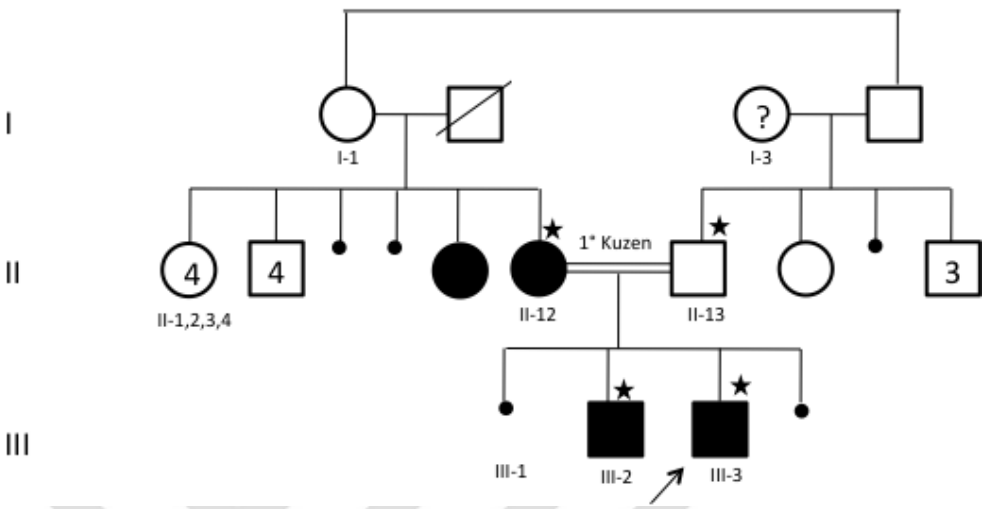


Şekil 4-11: Olgu 4 (III-3)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 14, 15, 24, 25, 31, 34, 35, 37, 41, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.4.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede, etkilenmiş annenin ebeveynleri arasında akrabalık ilişkisi olmaması, eşinin etkilenmemiş olması, etkilenmiş bir kardeşinin ve iki çocuğunun olması dikey

olarak gözlenen OD kalıtımı desteklenmekteydi. (Şekil 4-12). Ancak akraba evliliği varlığı düşünülerek OR kalıtım da değerlendirmeye alındı.

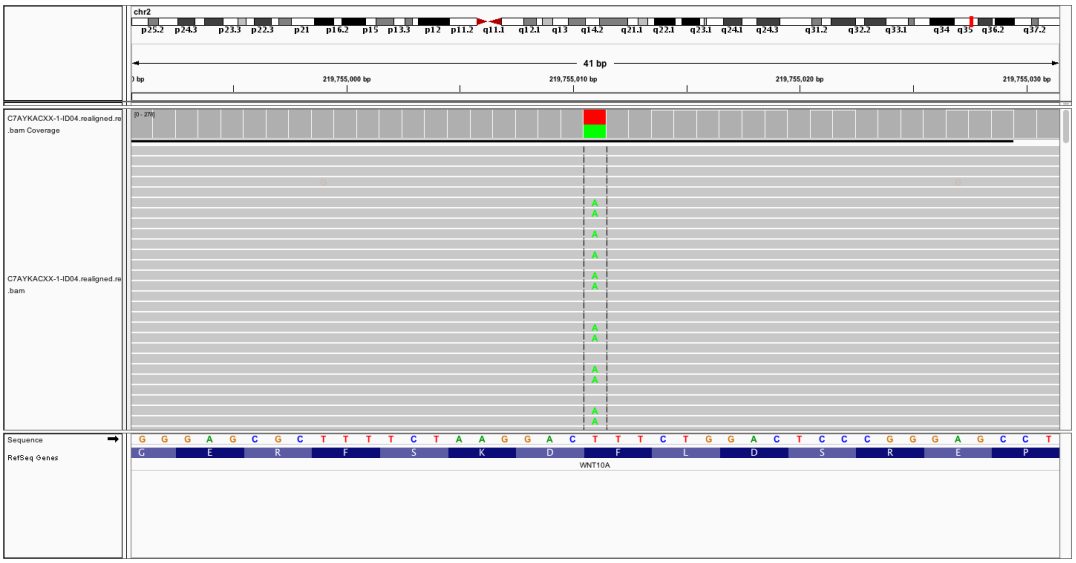


Şekil 4-12: Olgu 4'ün aile ağacı

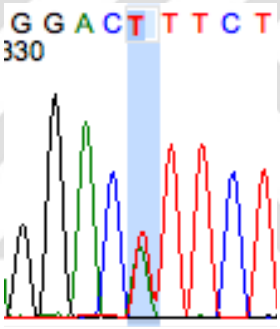
4.4.3. Moleküler Analiz

Olgu 4 ailesinde etkilenmiş olguya (III-3) ait gDNA örneğinde TED analizi yapıldı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında toplam 666 adet heterozigot, 46 adet homozigot, 109 adet öngörülen birleşik heterozigot varyanta rastlandı. Bu varyantlar ikinci kez filtrelenerek önceliklendirildi.

Olguda, bilinen gen olan *WNT10A* geninde 3. ekzonda heterozigot c.T682A (p.F228I) varyantı saptandı (Şekil 4-13 ve 4-14). Daha önce hastalıkla ilişkilendirilmiş olan bu mutasyon NCBI-SNP veri bankasında rs121908120 olarak tanımlı idi. Aile çalışmasında, etkilenmiş anne (II-12) ve kardeşin de (III-2) bu mutasyon için heterozigot oldukları belirlendi. Sağlıklı babanın ise bu mutasyonu taşımadığı belirlenerek mutasyonun ailede oligodonti ile segrege olduğu gösterildi.



Şekil 4-13: Olgu 4'ün *WNT10A* genindeki heterozigot c.T682A (NP_079492; p.F228I) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*)



Şekil 4-14: Olgu 4'ün *WNT10A* (NM_025216.2) geninde ekzon 3'deki heterozigot c.T682A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü

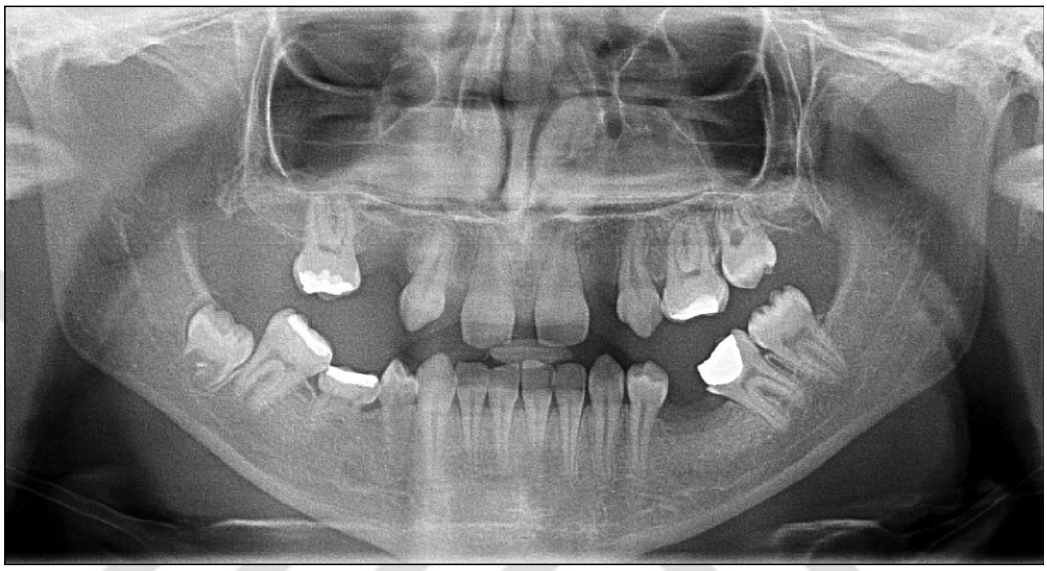
4.5. Olgu 5

4.5.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında 2° derece kuzen evliliği olan etkilenmiş anne ile sağlıklı babanın ilk çocukları idi (G4P3Ab1). Annede ve kızkardeşte de benzer bulgular tariflenmekteydi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik zamanında, 40. haftada sezeryan ile sonlanmıştı. Doğum tartısı 2800 gr, boyu 42 cm ve baş çevresi bilinmiyordu.

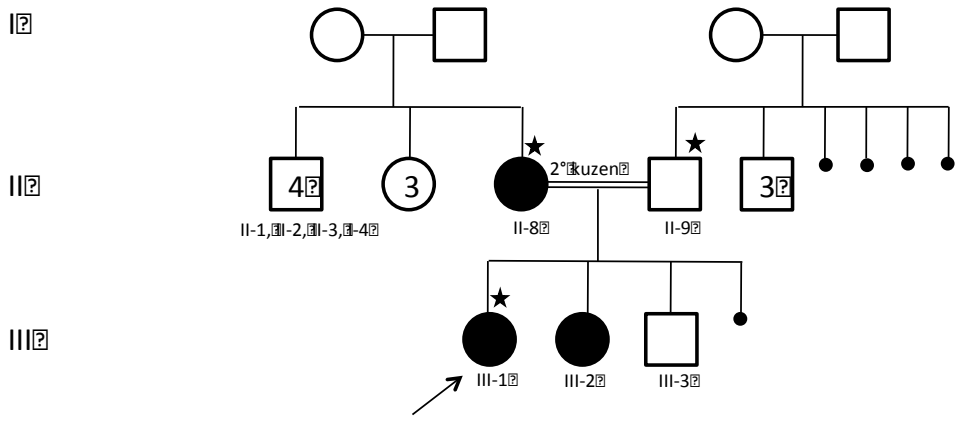
Fizik muayenede (15 yaş 4 aylık kız) boyu 165cm (75p), kilosu 64 kg (90p) ve baş çevresi 54 cm (50-75p) idi. Perioküler bölgede hafif hiperpigmentasyon ve aşağı yerleşimli kulomellası vardı. Üst çenede 7 adet kalıcı, alt çenede ise 2 adet süt, 10 adet kalıcı diş gözlenmekteydi (Şekil 4-15). Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.



Şekil 4-15: Olgu 5 (III-1)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 14, 15, 17, 22, 24, 25, 35, 44, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.5.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Aile, etkilenmiş annenin anne ve babasının arasında akrabalık olmaması, sağlıklı eşinden iki etkilenmiş çocuğunun olması dikey olarak gözlenen OD kalıtımı desteklemekteydi. (Şekil 4-16). Anne baba arasındaki kuzen evliliği nedeniyle OR kalıtım da değerlendirildi.



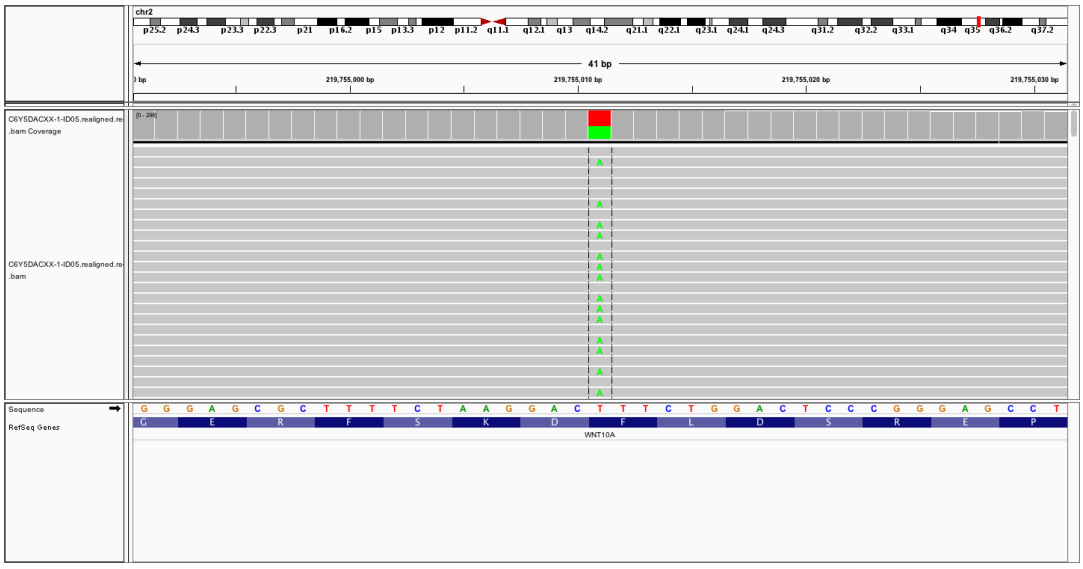
Şekil 4-16: Olgu 5'in aile ağacı

4.5.3. Moleküler Analiz

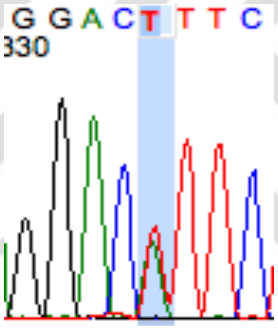
Olgu 5 ailesinde etkilenmiş olguya (III-1) ait gDNA örneğinde TED analizi uygulandı. İlk filtreleme ile sıklığı <%1'in altında toplam 711 adet heterozigot, 34 adet homozigot, 104 adet öngörülen birleşik heterozigot varyant belirlendi. Bu varyantlar OD ve OR için ve aranan kriterlere göre ikinci kez filtrelenerek önceliklendirildi.

Olguda ilk olarak, bilinen gen olan *WNT10A* geninde 3. ekzonda heterozigot c.T682A (p.F228I) varyantın heterozigot olarak bulunduğu belirlendi (Şekil 4-17 ve 4-18). Aynı varyant Olgu 3 ve 4'te de saptanmıştı. Hastalıkla ilişkili olduğu bilinen bu mutasyonun etkilenmiş anne (II-8) ve kardeşte de (III-2) heterozigot olduğu, sağlıklı babanın (II-9) ise değişimi taşımadığı belirlenerek mutasyonun ailede oligodonti ile segrege olduğu gösterildi.

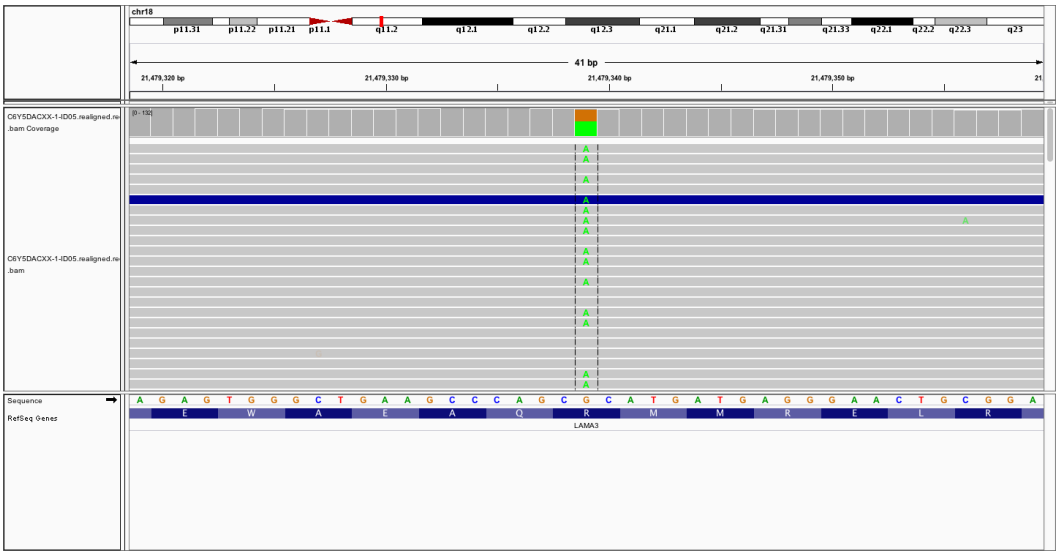
LAMA3 geninin 10. ekzonunda heterozigot c.G1097A (p.R366H) varyantı saptandı (Şekil 4-19 ve 4-20). Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs149809232 tanımlı idi. Etkilenmiş anne ve kızkardeşin de aynı değişimi heterozigot olarak taşıdığı ancak sağlıklı babanın taşımadığı belirlenerek bu değişimin de ailede oligodonti ile segrege olduğu belirlendi.



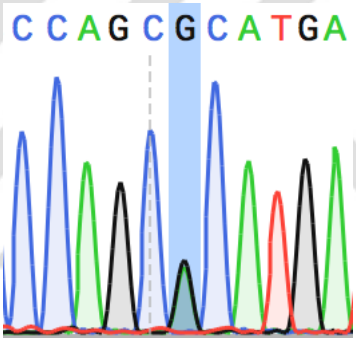
Şekil 4-17: Olgu 5'in *WNT10A* genindeki heterozigot c.T682A (NP_079492; p.F228I) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*)



Şekil 4-18: Olgu 5'in *WNT10A* (NM_025216.2) geninde ekzon 3'deki heterozigot c.T682A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü



Şekil 4-19: Olgu 5'in *LAMA3* genindeki heterozigot c.G1097A (NP_000218.3; p.R366H) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*)



Şekil 4-20: Olgu 5'in *LAMA3* (NM_000227.4) geninde ekzon 10'da heterozigot c.G1097A varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü

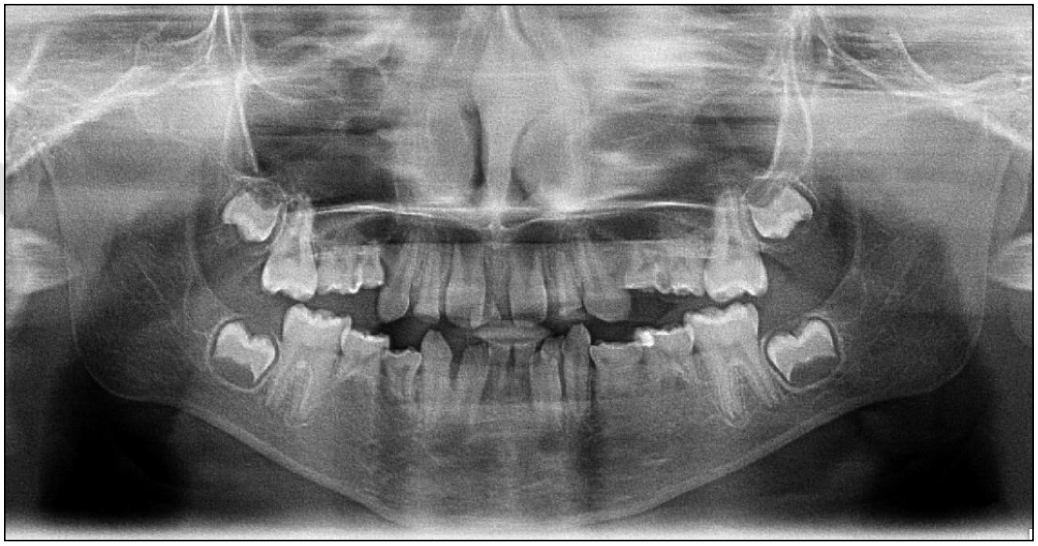
4.6. Olgu 6

4.6.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında akraba evliliği olmayan etkilenmiş anne ile sağlıklı babanın ikinci çocukları idi (G7P2Ab3Sek2). Annede, dayıda ve anneannede benzer bulgular ile diş eksikliği tariflenmekteydi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik, 38. haftada mükerrer sezaryen ile sonlanmıştı. Doğum tartısı 2800 gr, boyu 49 cm ve baş çevresi bilinmiyordu.

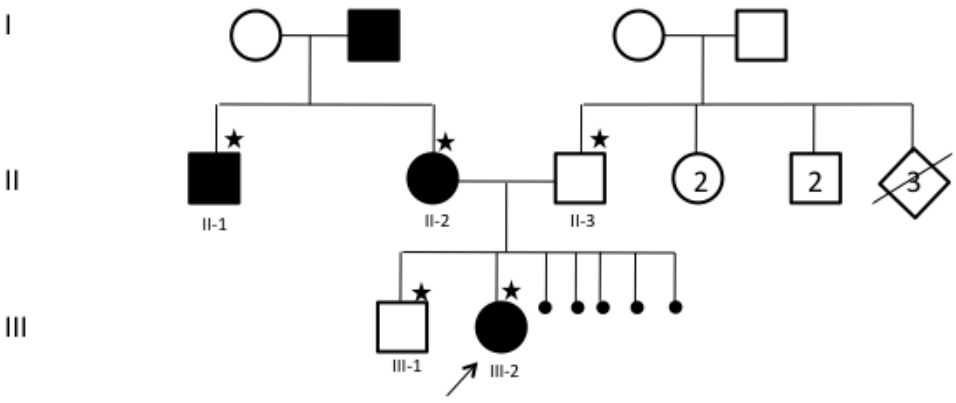
Fizik muayenede (11 yaş 1 aylık kız) boyu 152cm (75-90p), kilosu 38 kg (50p) ve baş çevresi 54 cm (75-90p) idi. Çok hafif hipotelorizm, hafif perioküler hiperpigmentasyon, hipoplazik alae nasi, aşağı yerleşimli kolumella, hafif malar hipoplazi ve kısa filtrumu vardı. Üst çenede 6 adet süt 6 adet kalıcı, alt çenede ise 6 adet süt dişi, 6 adet kalıcı diş gözlenmekteydi. Daha sonra da panoramik röntgen ile tekrar değerlendirildi (Şekil 4-21). Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.



Şekil 4-21: Olgu 6 (III-2)'ye ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 14, 15, 22, 24, 25, 31, 34, 35, 41, 44, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.6.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede dört etkilenmiş bireyin üç kuşakta dikey olarak gözlenmesi OD kalıtımı desteklemekteydi (Şekil 4-22).

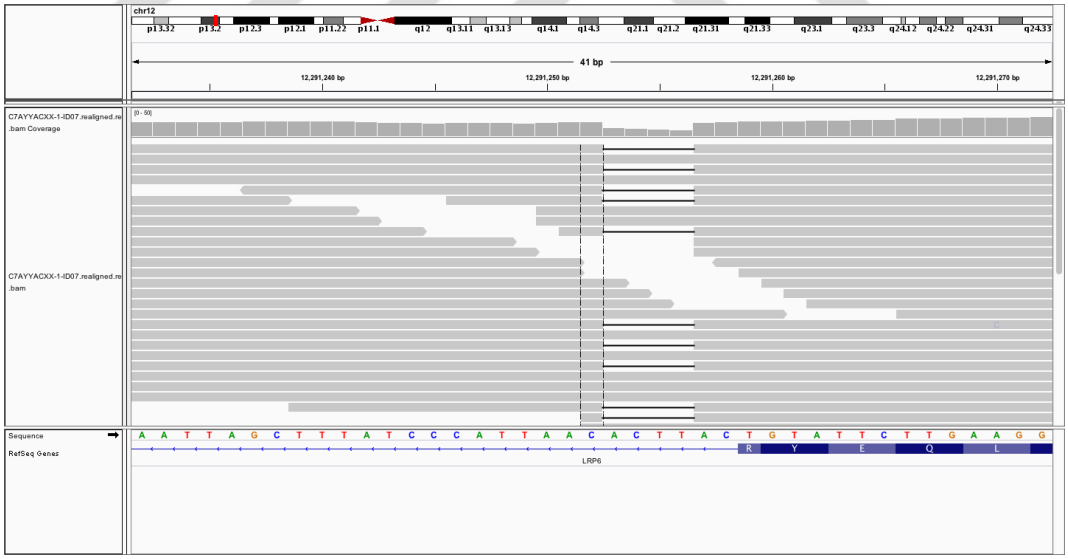


Şekil 4-22: Olgu 6'ın aile ağacı

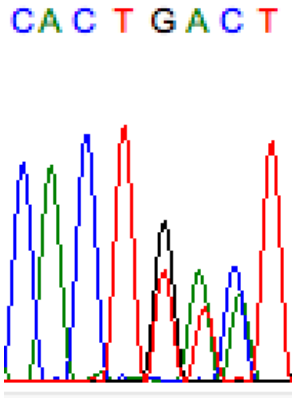
4.6.3. Moleküler Analiz

Olgu 6 ailesinde etkilenmiş olgu (III-2) ve olgunun etkilenmiş dayısına (II-2) ait gDNA örneklerine TED yöntemi uygulandı. İki olgunun paylaştığı varyantlar göz önünde bulundurularak analiz yapıldı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında paylaşılan homozigot varyant olmadığı belirlendi. Her iki örnekte de örtüşen toplam 621 adet heterozigot, 482 adet öngörülen birleşik heterozigot varyantın bulunduğu belirlendi. Aile ağacı ile uyumlu olarak ilk önce heterozigot varyantlar olmak üzere tüm paylaşılan varyantlar ikinci kez filtrelenerek önceliklendirildi.

Olguda bilinen gen olan *LRP6* geninde 16. ekzonun dönor bölgesinde heterozigot c.3607+3_3607+6delAAGT varyantı saptandı (Şekil 4-23 ve 4-24). Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs777692401 olarak tanımlı idi. Segregasyon çalışması etkilenmiş anne (II-2) ve dayının (II-1) varyant için heterozigot olduklarını gösterdi. Sağlıklı baba ve kardeşte değişimin olmaması bu varyantın ailedeki oligodonti ile segrege olduğu lehine idi.



Şekil 4-23: Olgu 6'nın *LRP6* genindeki heterozigot c.3607+3_3607+6delAAGT varyantının IgV görüntüsü (kalıp *reverse*)



Şekil 4-24: Olgu 6'nın *LRP6* (NM_002336.2) geninde intron 16'da heterozigot delesyon varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü (reverse kalıp)

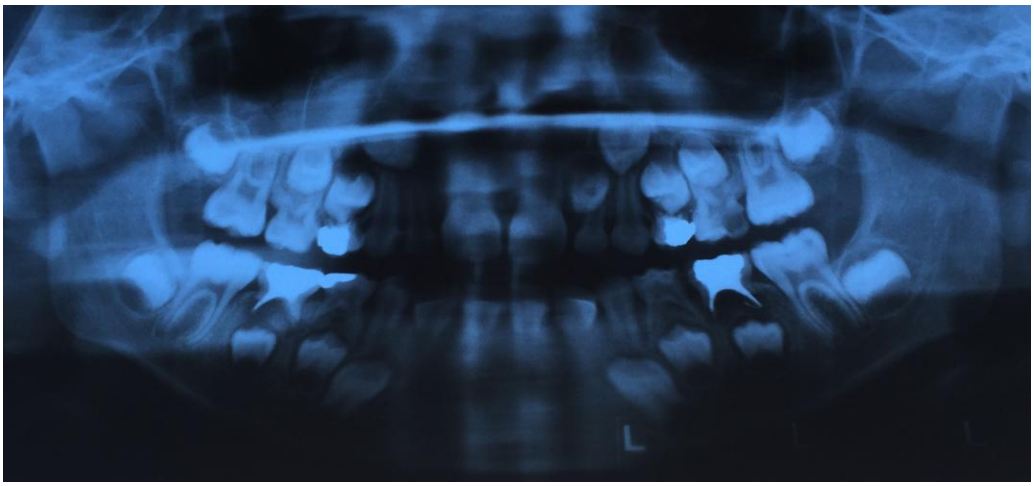
4.7. Olgu 7

4.7.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında akraba evliliği olmayan etkilenmiş anne ile sağlıklı babanın üçüncü çocukları idi (G1P1). Annede de benzer şekilde üst lateral dişlerde eksiklik tariflenmekteydi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik zamanında, 40. haftada normal spontan doğum ile sonlanmıştı. Doğum tartısı, boyu ve baş çevresi bilinmiyordu.

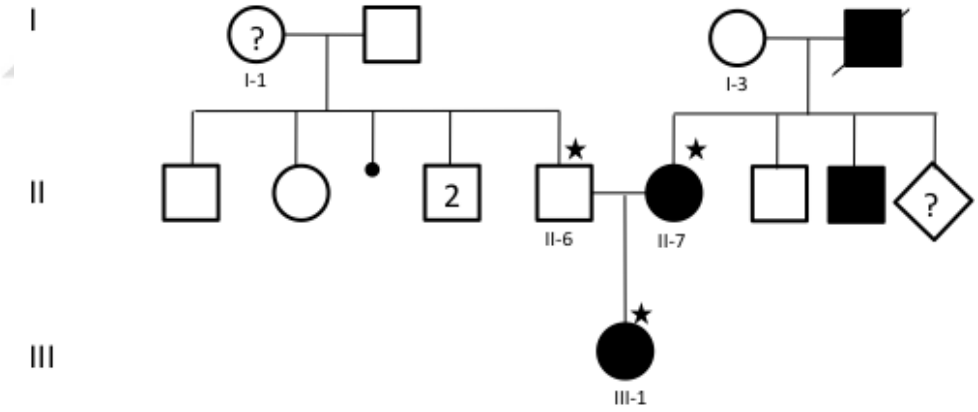
Fizik muayenede (10 yaşında kız) boyu 135 cm (25-50p), kilosu 43 kg (90p) ve baş çevresi 53 cm (75-90p) idi. Üst çenede 8 adet süt 4 adet kalıcı, alt çenede ise 6 adet süt, 5 adet kalıcı dişi gözlenmekteydi (Şekil 4-25). Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.



Şekil 4-25: Olgu 7 (II-1)'ye ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 22 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.7.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede dört etkilenmiş bireyin üç kuşakta varlığı dikey olarak gözlenen OD kalıtımı desteklemekteydi. (Şekil 4-26).

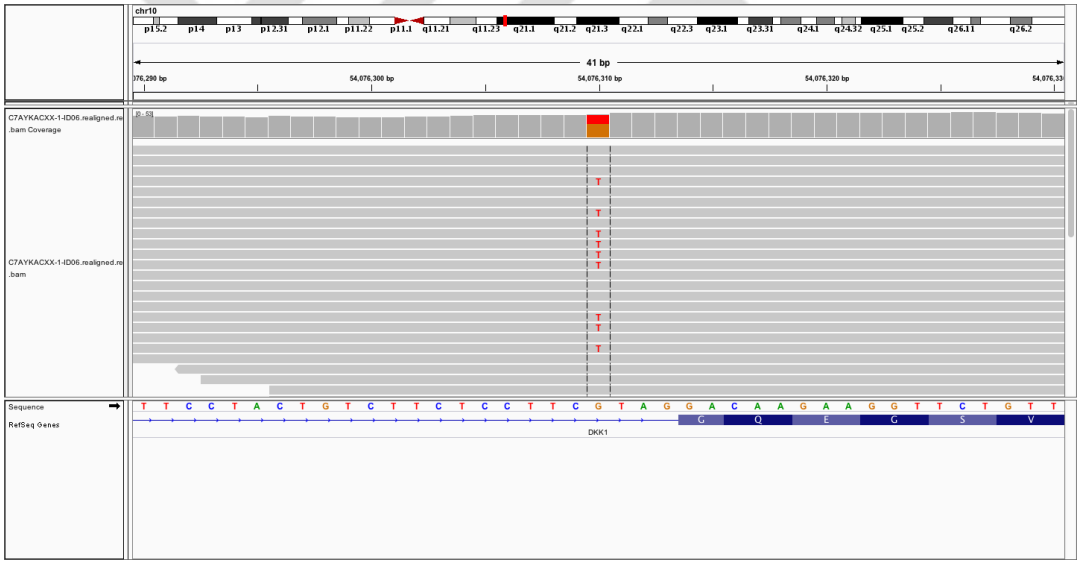


Şekil 4-26: Olgu 7'nin aile ağacı

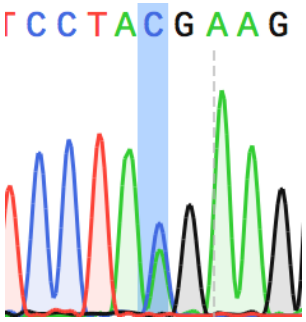
4.7.3. Moleküler Analiz

Olgu 7 ailesinde etkilenmiş olguya (III-1) ait DNA örneğinde TED yöntemi uygulandı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında toplam 810 adet heterozigot, 28 adet homozigot, 142 adet öngörülen birleşik heterozigot varyanta rastlandı. Bulunan varyantlar önceliklendirilerek tekrar filtrelendi. Son olarak olguda; *DDK1*, *LAMA3*, *COL17A1* genlerinde üç adet varyant belirlendi.

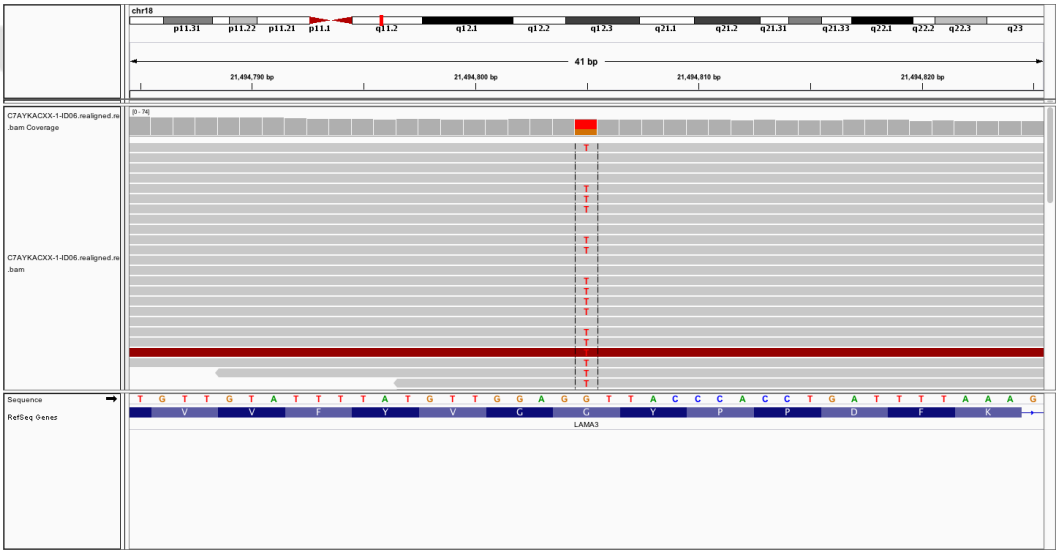
DKK1 geninin 4. ekzonda kırpılma *acceptor* bölgesinde kırpılmayı bozması beklenen heterozigot c.548-4G>T saptandı (Şekil 4-27 ve 4-28) . Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs183951849 olarak tanımlı idi**.** Aynı heterozigot değişim etkilenmiş annede (II-7) saptanırken, babanın (II-6) bu değişimi taşımadığı belirlendi. *LAMA3* (NM_000227) geninin 21. ekzonunda c.G2798T (NP_000218, GGT>GTT, p.G933V) varyantı saptandı (Şekil 4-29 ve 4-30). Bu varyant daha önce tanımlanmamıştı. Bu varyantı babanın taşımadığı annenin ise heterozigot taşıdığı gözlendi. *COL17A1* geninin 47. intronunda kırpılma *donor* bölgesinde heterozigot c.3277+3G>C saptandı (Şekil 4-31 ve 4-32). Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs757250244 olarak tanımlı idi. Aynı değişim için annenin heterozigot olduğu babanın taşımadığı belirlendi. Bu üç değişim için yapılan aile çalışması tümünün hipodonti ile segrege olduğunu gösterdi.



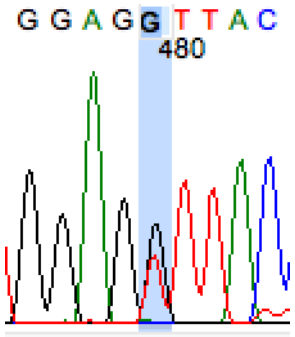
Şekil 4-27: Olgu 7'nin *DKK1* genindeki heterozigot c.548-4G>T varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward)*



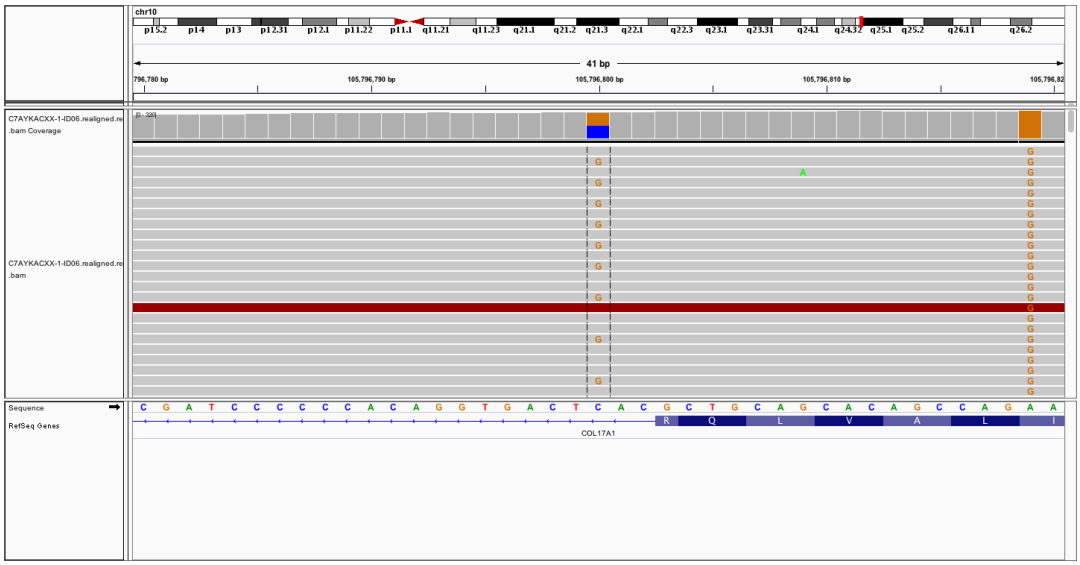
Şekil 4-28: Olgu 7'nin *DKK1* (NM_012242.2) geninde intron 3'de heterozigot c.548-4G>T varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü



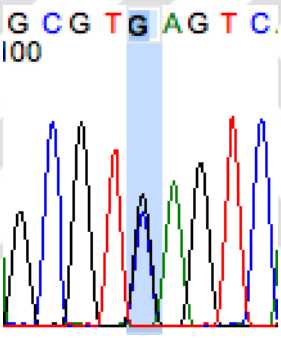
Şekil 4-29: Olgu 7'de *LAMA3* genindeki c.G2798T (NP_000218; (p.G933V) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*)



Şekil 4-30: Olgu 7'nin *LAMA3* (NM_000227.4) geninde ekzon 21'de heterozigot c.G2798T varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü



Şekil 4-31: Olgu 7'de *COL17A1* genindeki heterozigot c.3277+3G>C varyantına ait IgV görüntüsü (kalıp *reverse*)



Şekil 4-32: Olgu 7'nin *COL17A1* (NM_000494) geninde intron 47'de heterozigot c.3277+3G>C varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü

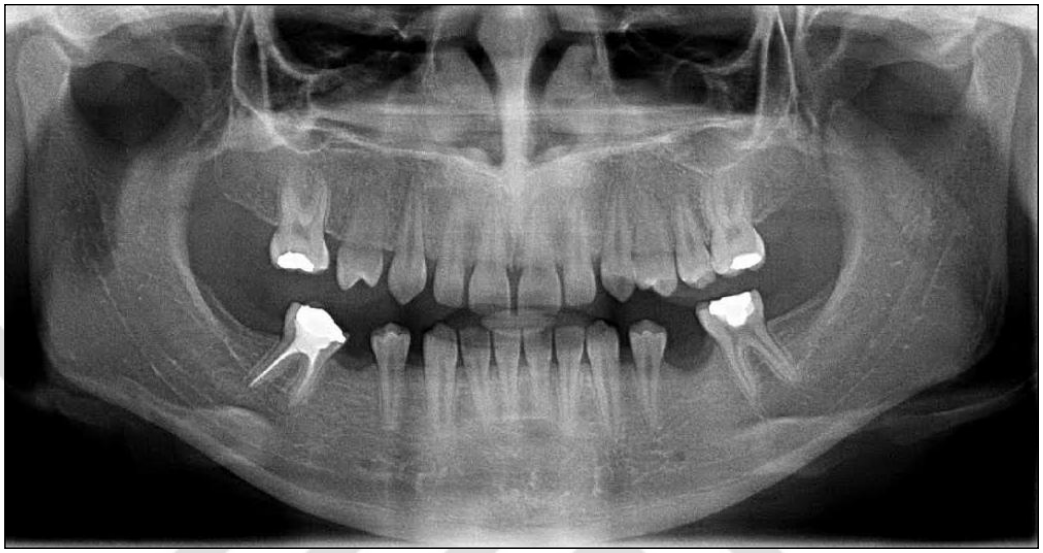
4.8. Olgu 8

4.8.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında akraba evliliği olmayan sağlıklı anne ile etkilenmiş babanın ikinci çocukları idi (G5P3Ab2). Babada, halada ve üç amcada benzer bulgular tariflendi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik zamanında, 40. haftada normal spontan doğum ile sonlanmıştı. Doğum tartısı 4500 gr, boyu ve baş çevresi bilinmiyordu.

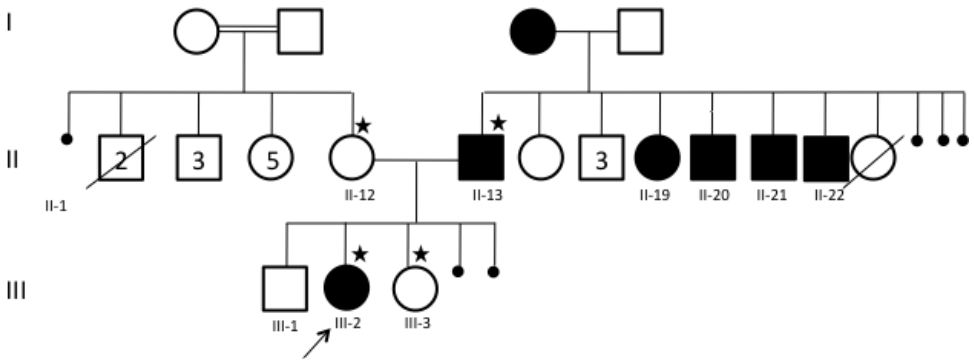
Fizik muayenede (14 yaş 8 aylık kız) boyu 163 cm (75p), kilosu 78 kg (>90p) ve baş çevresi 56 cm (90-97p) idi. Üst çenede 11 adet kalıcı, alt çenede ise 10 adet kalıcı diş gözlenmekteydi (Şekil 4-33) . Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.



Şekil 4-33: Olgu 8 (III-2)'e ait panoramik röntgen görüntüsünde 15, 17, 27, 35, 37, 45, 47 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.8.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede 7 etkilenmiş bireyin üç kuşakta dikey olarak yer alması OD kalıtımı desteklemekteydi (Şekil 4-34).



Şekil 4-34: Olgu 8'in aile ağacı

4.8.3. Moleküler Analiz

Olgu 8 ailesinde etkilenmiş olguya (III-2) ait DNA örneğinde TED yöntemi uygulandı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında toplam 774 adet heterozigot, 31 adet homozigot, 114 adet öngörülen birleşik heterozigot varyanta rastlandı. Aile ağacı analizi doğrultusunda varyantlar OD kalıtıma uygun olarak önceliklendirildi.

Olguda, *DAAM2* (NM_015345.3) geninin 9. ekzonunda heterozigot c.C1003T (NP_056160.2, p.R335W) değişimi saptandı. Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs371806282 olarak tanımlı idi. Ayrıca COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) veri bankasında ise COSM4753332 olarak kayıtlı idi. Ailedeki etkilenmiş ve etkilenmemiş tüm bireylerin aynı heterozigot değişimi taşıdığı saptandı. *RECQL4* (NM_004260) geninin 10. ekzonunda heterozigot c.C1684T (NP_004251.3, p.R562W) ve *POLR3B* (NM_018082) geninin 1. ekzonunda heterozigot c.A34G (NP_060552, p.T12S) varyantlar saptandı. NCBI-SNP veri bankasında rs61759892 olarak tanımlı olan *RECQL4* varyantı, sağlıklı anne (II-12) ve kız kardeşte (III-3) heterozigot olarak bulunmakta iken etkilenmiş babada (II-13) saptanmadı. *POLR3B* genindeki değişim ise daha önce tanımlanmamıştı. Bu varyant etkilenmiş baba (II-13) ve kız kardeşte (III-3) heterozigot, sağlıklı annede (II-12) ise bulunmamakta idi. Saptanan varyantların aile analizinde hiç birinin oligodonti ile segrege olmadığı belirlendi.

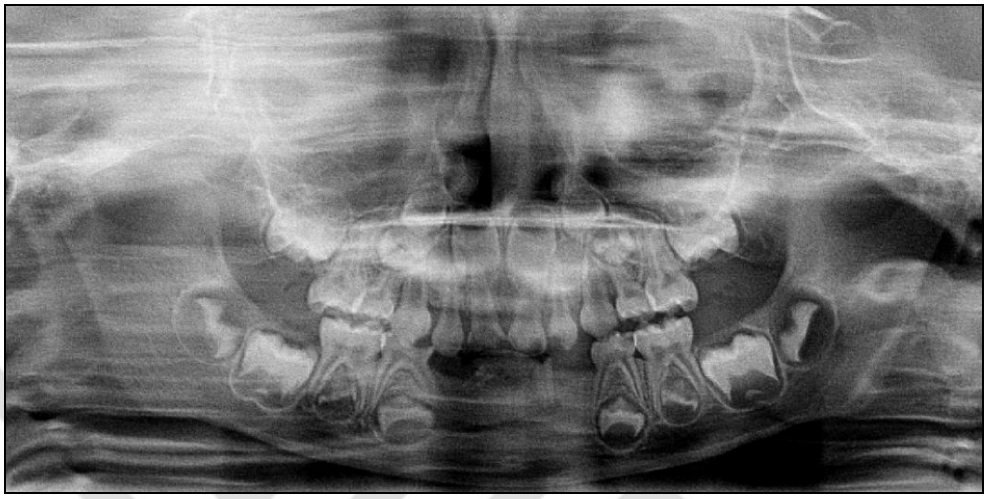
4.9. Olgu 9

4.9.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında 1° derece kuzen evliliği olan sağlıklı anne ile sağlıklı babanın ikinci çocukları idi (G2P2). Ailede benzer olgu tariflenmedi.

Antenatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik zamanında, 40. haftada normal spontan doğum ile sonlanmıştı. Doğum tartısı 3700 gr, boyu ve baş çevresi bilinmiyordu. Postnatal 2. Günde anal atrezi opere edilmişti. 3 aylıkken ise yapışık dil frenulumu operasyonu gerçekleştirildi. Fizik muayenede (6 yaş 9 aylık erkek) boyu 123 cm (50-75p), kilosu 22 kg (25-50p) ve baş çevresi 51 cm (10-25p) idi. Sınırda

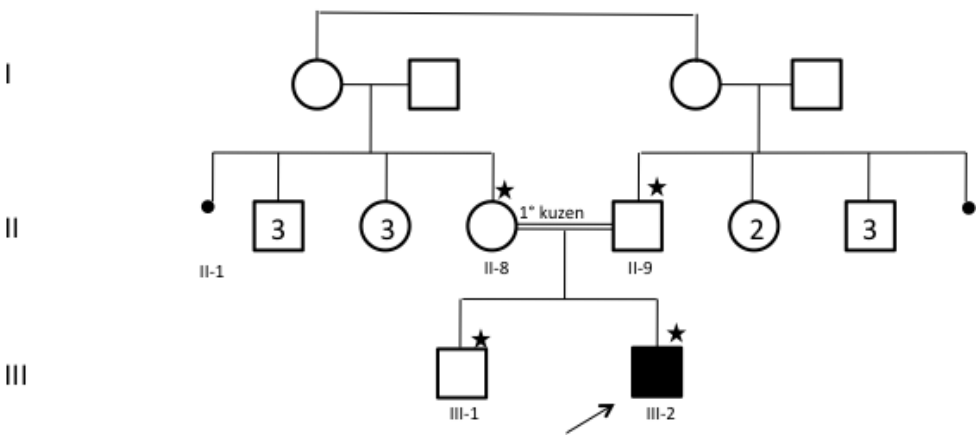
düşük kulak çizgisi, aşağı yerleşimli kolumella, hipoplazik ala nasi, hafif mandibular retrognati vardı. Üst çenede 10 adet süt, alt çenede ise 4 adet süt dişi gözlenmekteydi. Daha sonra da panoramik röntgen ile tekrar değerlendirildi (Şekil 4-35). Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.



Şekil 4-35: Olgu 9 (III-2)'a ait panoramik röntgen görüntüsünde 17, 27, 31, 32, 33, 41, 42, 43 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.9.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede 1 etkilenmiş bireyin ve sağlıklı anne babanın varlığı OR kalıtımı desteklemekteydi (Şekil 4-36).

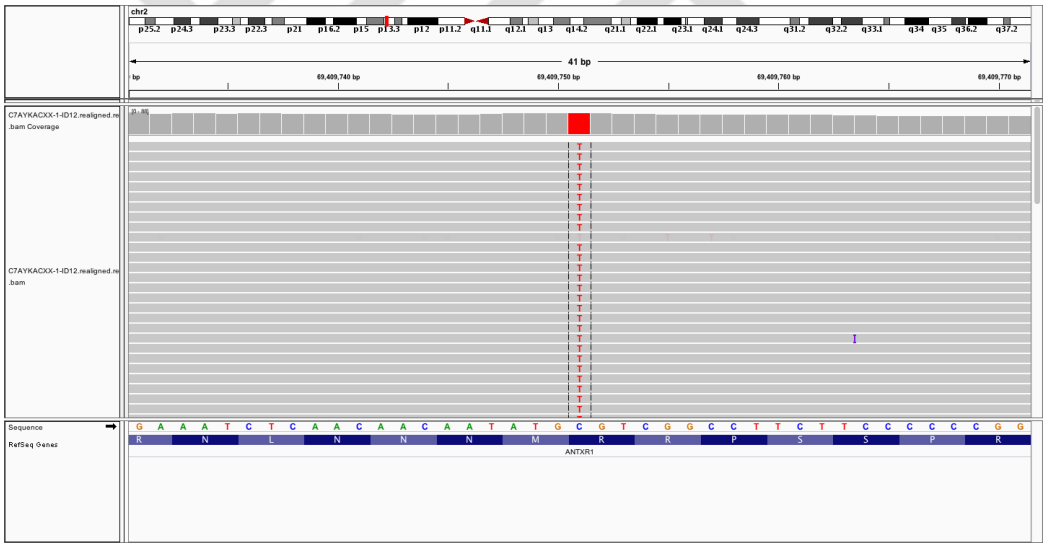


Şekil 4-36: Olgu 9'un aile ağacı

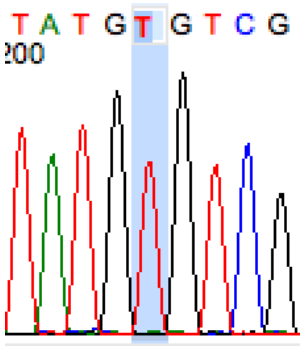
4.9.3. Moleküler Analiz

Olgu 9 ailesinde etkilenmiş olguya (III-2) ait DNA örneğinde TED yöntemi uygulandı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında toplam 695 adet heterozigot, 49 adet homozigot, 109 adet öngörülen birleşik heterozigot varyanta rastlandı. Varyantlar ilk olarak OR kalıtım modeli üzerinden önceliklendirildi.

Olguda *ANTXR1* geninin 16. ekzonunda homozigot c.C1312T (p.R438C) değişimi saptandı (Şekil 4-37 ve 4-38). Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs144438225 olarak tanımlı idi. Ayrıca COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) veri bankasında ise COSM1641964 olarak kayıtlı idi. Bulunan bu yanlış anlamlı değişim için aile analizinde, etkilenmemiş anne ve babanın aynı varyant için heterozigot olduğu, sağlıklı kardeşin ise değişimi taşımadığı görüldü. Bu çalışma varyantın ailede oligodonti ile segrege olduğunu gösterdi.



Şekil 4-37: Olgu 9'un *ANTXR1* genindeki homozigot c.C1312T (NP; 115584; p.R438C) varyantının IgV görüntüsü (kalıp *forward*)



Şekil 4-38: Olgu 9'un *ANTXR1* (NM_032208.2) geninde ekzon 16'da homozigot c.C1312T varyantına ait Sanger dizilemeden elde edilen elektroferogram görüntüsü

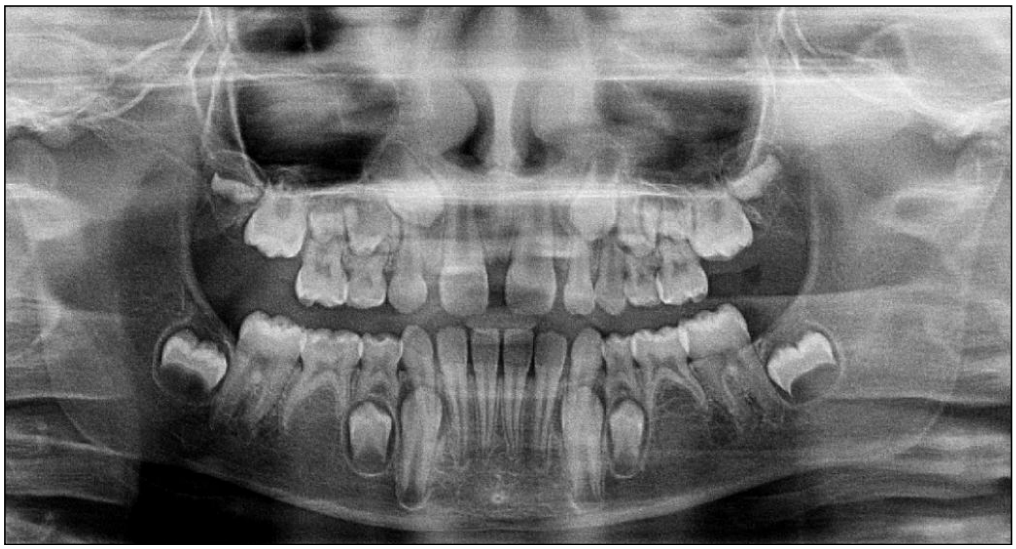
4.10. Olgu 10

4.10.1. Klinik Değerlendirme

Diş agenezisi klinik tanısı ile takip edilen olgu, aralarında akraba evliliği olmayan sağlıklı anne ile etkilenmiş babanın üçüncü çocukları idi (G6P4Sek2). Etkilenmiş baba ve kızkardeşte de benzer bulgular tariflendi.

Antenatal, natal ve postnatal öyküsünde özellik yoktu. Gebelik zamanında, 40. haftada mükerrer sezeryan ile sonlanmıştı. Doğum tartısı 2250 gr, boyu 57 cm ve baş çevresi bilinmiyordu.

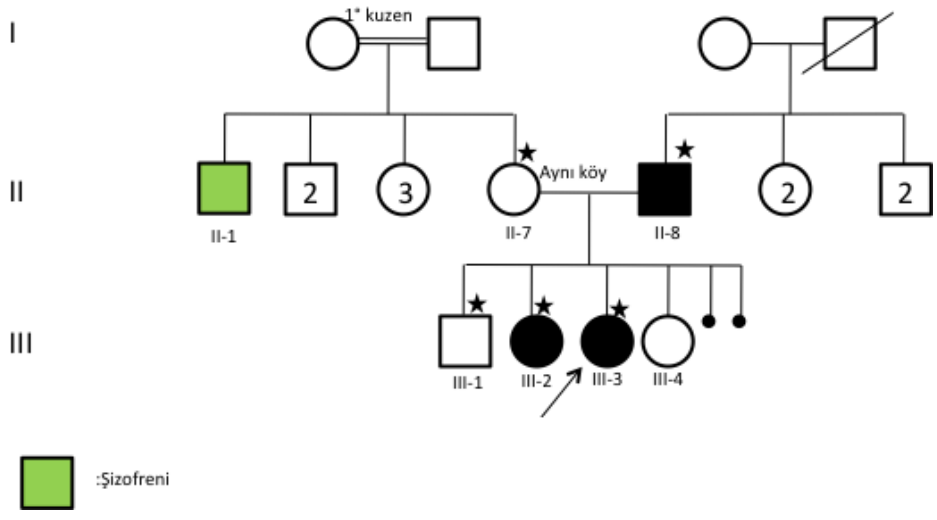
Fizik muayenede (9 yaş 2 aylık kız) boyu 134 cm (50-75p), kilosu 29 kg (50-75p) ve baş çevresi 52 cm (50p) idi. Üst çenede 7 adet süt, 2 adet kalıcı, alt çenede ise 6 adet süt, 6 adet kalıcı diş gözlenmekteydi (Şekil 4-39). Diğer sistem muayanelerinde özellik yoktu.



Şekil 4-39: Olgu 10 (III-3)'a ait panoramik röntgen görüntüsünde 12, 22, 35, 45 numaralı dişlerin eksikliği gözlenmektedir

4.10.2. Aile ağacı değerlendirmesi

Ailede, 2 kuşakta 1 erkek ve 2 dişi bireyin etkilenmiş olması OD kalıtımı desteklemekteydi (Şekil 4-40).



Şekil 4-40: Olgu 10'un aile ağacı

4.10.3. Moleküler Analiz

Olgu 10 ailesinde etkilenmiş olguya (III-3) ait DNA örneğinde TED yöntemi uygulandı. İlk filtreleme sonrasında sıklığı <%1'in altında toplam 764 adet heterozigot, 26 adet homozigot, 136 adet öngörülen bileşik heterozigot varyanta rastlandı. Varyantlar ilk olarak OD kalıtım modeline uygun olarak önceliklendirildi. Ancak ebeveynlerin aynı köyden gelmesi göz önünde bulundurularak OR kalıtım modeli de değerlendirildi.

Olguda, diş agenezisi ile ilişkilendirilmiş *AXIN2* (NM_004655.3) geninin 8. ekzonunda homozigot c.T1985C (p.L662P) değişimi saptandı. Bu varyant NCBI-SNP veri bankasında rs142476324 olarak tanımlı idi. Aile analizinde etkilenmiş babanin aynı varyant için homozigot olduğu belirlendi. Sağlıklı anne, sağlıklı erkek kardeş ve etkilenmiş kızkardeşin bu değişimi heterozigot olarak taşıdığı gösterilerek değişimin ailede oligodonti ile segrege olmadığı belirlendi. Ayrıca *SNX10* (NM_001199835) geninin 1. ekzonunda heterozigot c.C13T (NP_001186764, p.Q5*) varyantı saptandı. Bu varyant daha önce tanımlanmamıştı. Aile çalışmasında "dur" kodonu mutasyonunun oligodonti ile segrege olmadığı belirlendi.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda dişin oluşumu ve gelişimini kontrol eden moleküler ve hücresel mekanizmaları açıklamak için birçok çalışma yapılmıştır. Diş agenezisi, genetik ve fenotipik olarak heterojen bir durumdur (38). Birçok faktörün ve genin bir etkileşim ağı içinde, heterojen fenotiplere neden olduğu düşünülmektedir. Bu konuda yapılmış çalışmalar çok sınırlı sayıda olmakla birlikte genomik teknolojilerin gelişmesi diş gelişimini anlamamız için yeni kapılar açmaktadır.

Bu tez çalışması, bilgimiz dahilinde, diş agenezisinin genetik etmenlerini araştıran TED yönteminin kullanıldığı, Türkiye'deki ilk çalışmadır. Çalışma kapsamında on farklı diş agenezisi olgusunda tüm ekzom dizilerinden elde edilen varyantlar detaylı olarak irdelenerek yedi olgu ve ailesinde fenotipten sorumlu olduğu düşünülen genler ve mutasyonlar saptandı. Diş gelişimi yolağında yer aldığı daha önce bildirilmiş iki gende (*WNT10A* ve *LRP6)*, sırasıyla biri daha önce ilişkilendirilmiş, diğeri SNP veri tabanında yer alsa da oligodonti ile ilişkilendirilmemiş varyantlar saptandı. İnsanda diş gelişimi ile daha önce ilişkilendirilmemiş beş farklı gende ise (*BCOR*, *LAMA3*, *DDK1*, *COL17A1*, *ANTXR1)* oligodonti fenotipi ile segregasyon gösteren biri daha önce tanımlanmamış varyantlar saptandı (Tablo 5-1).

Tablo 5-1: Oligodonti/hipodonti ile segregasyonu tespit edilen tüm varyantlar

Olgu	Gen	Lokasyon	Zigosite	Mutasyon Tipi	Transkript	rs#	Nükleotid değişimi	Protein Değişimi
2	*WNT10A*	2:219754762	Hom.	yanlış anlamlı	NM_025216.2	rs5430631101	c.G433A	p.V145M
3	*BCOR*	X:39932948	Het.	yanlış anlamlı	NM_0017745.5	rs372463512	c.G1651A	p.D551N
4	*WNT10A*	2:219755011	Het.	yanlış anlamlı	NM_025216.2	rs121908120	c.T682A	p.F228I
5	*WNT10A*	2:219755011	Het.	yanlış anlamlı	NM_025216.2	rs121908120	c.T682A	p.F228I
5	*LAMA3*	18:21479339	Het.	yanlış anlamlı	NM_000227.4	rs149809232	c.G1097A	p.R366H
6	*LRP6*	12:12291252	Het.	kırpılma hatası	NM_002336.2	rs777692401	c.3607+3delAAGT	-
7	*DKK1*	10:54076310	Het.	kırpılma hatası	NM_012242.2	rs183951849	c.548-4G>T	-
7	*LAMA3*	18:21494805	Het.	yanlış anlamlı	NM_000227.4	Novel	c.G2630T	p.G877V
7	*COL17A1*	10:105796800	Het.	kırpılma hatası	NM_000494	rs757250244	c.3277+3G>C	?
9	*ANTXR1*	2:69409751	Hom.	yanlış anlamlı	NM_032208.2	rs144438225	c.C1312T	p.R438C

Olgulardan beşinde (%50) fenotipten sorumlu tek bir gen belirlenirken, bir olguda (%10) iki adet sorumlu gen ile digenik kalıtım, bir diğer olguda (%10) ise üç adet sorumlu gen belirlenerek multigenik kalıtım modeli düşünüldü. Lee ve arkadaşlarının 2014 yılında 814 olgu üzerinde yaptıkları bir çalışmada TED yöntemi ile hastalık ilişkili mutasyon saptama oranının %26 olduğu bildirilmiştir (123). 250 olgu üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise bu oran %25 olarak belirlenmiştir (149). Daha hassas klinik yöntemlerle seçilmiş hasta gruplarında yapılan bir araştırmada ise mutasyon saptama oranının %90'a kadar çıkabildiği gösterilmiştir (150). Bu tez çalışmasında, on ailenin yedisinde oligodonti/hipodonti ilişkili varyantlar saptandığından, mutasyon saptama oranı %70 olarak belirlendi ve bu değerin literatür ile uyumlu olduğu düşünüldü.

İncelenen ailelerden beşinde daha önce oligodontiye neden olduğu bildirilen iki farklı *WNT10A* gen varyantı (p.V145M ve p.F288I) saptandı. İlk aşamada ailelerimizdeki hastalık ile *WNT10A* gen ilişkisinin %50 olduğu düşünüldü. Ancak aile çalışması sadece üç ailede varyantın oligodonti ile segrege olduğunu göstererek bu oranın %30 olduğunu gösterdi. Daha önce yapılan populasyon çalışmalarının birinde oligodonti olgularının %28'inden *WNT10A* geni sorumlu tutulurken genel populasyon için bu oranın yaklaşık olarak %50 olduğu belirtilmektedir (69, 104). Bizim çalışmamız da literatürdeki pek çok çalışma gibi WNT sinyal yolunun diş gelişimi için önemini desteklemiş ve *WNT10A* geninin diş gelişimi için anahtar rol oynadığı hipotezini güçlendirmiştir. Ancak, literatürdeki bu tip çalışmalar sadece olgular üzerinde yapılmış olup ailedeki oligodonti ile segregasyonu göz ardı edilmiştir. Saptadığımız varyantların bir ailede segrege olurken diğerinde olmaması, bu varyantların fonksiyonel etkisi olan bir polimorfizm niteliğinde olduğunu, modifiye edici genlerdeki değişimlerin bu etkide rolu olabileceğini düşündürmektedir. Bu tip ailelerin TGD gibi daha ileri genetik analizlerle karşılaştırmalı olarak incelenmesinin modifiye edici genlerin ortaya çıkarılmasında değerli birer kaynak olduğunu düşünmekteyiz. Ne var ki gelişim sadece gendeki etmenlerin değil çevre faktörlerinin ve zamanı da içine alan çok faktörlü bir etkileşim ağının bir ürünü olduğundan oligodonti/hipodonti gibi gelişimsel defektlerin moleküler patolojilerini anlayabilmek için fenomiks alanındaki ilerlemelerin de yakın olarak irdelenmesi ve anlaşılması gerekmektedir.

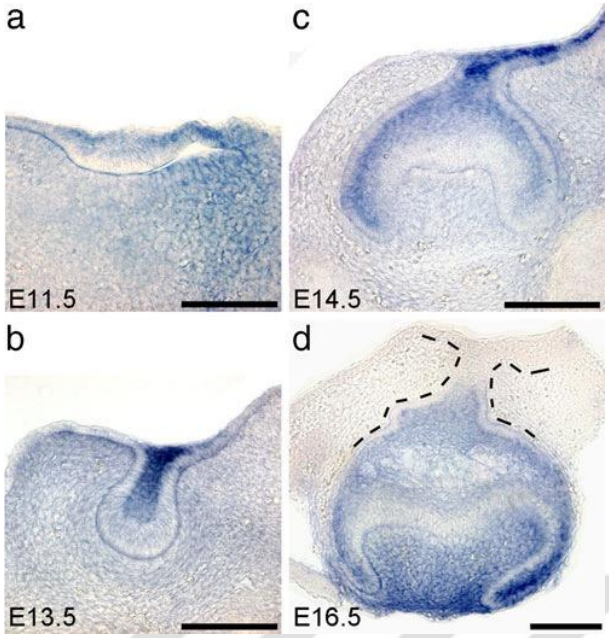
Çalışma grubumuzdaki her bir olgu ve ailesinde saptanan varyantlar aşağıda detaylı olarak irdelenerek tartışılmaktadır.

Olgu 1'de, üç farklı gendeki (*WNT10A, CCBE1* ve *PTH2R*) varyantlar için yapılan segregasyon analizi sonucunda kalıtım modeli ile uyumlu bir sonuç elde edilememiş ve fenotipten sorumlu genetik etmen aydınlatılamamıştır. Olgunun (III-3) *WNT10A* geninde daha önce hastalıkla ilişkilendirilmiş olan c.G433A (p.V145M) varyantı homozigot formda taşıması, daha hafif etkilenmiş annesinin (üst lateral diş agenezisi), sağlıklı babasının ve sağlıklı erkek kardeşinin ise heterozigot taşıması, bu aile için olası başka gen mutasyonlarının varlığını düşündürmektedir. Bu varyant Olgu 2'de de tespit edilmiş olup literatür bilgisi ve detaylı tartışma Olgu 2 ile birlikte değerlendirilmiştir. *CCBE1* geni kollajen ve kalsiyum bağlayıcın EGF (*epidermal growth factor*) domain 1 proteinini kodlamakta olup, bu gendeki bi-allelik mutasyonları Hennekam Lenfanjiektazi Lenfödem sendromuna (HKLLS1, MIM#235510) neden olmaktadır. Bir çok iskelet ve organ sistemleri bulgularına ek olarak oligodonti, konik ön kesici diş ve sürme gecikmesi bulguları gözlenen bu sendromda 11'i yanlış anlamlı ve biri çerçeve kaymasına neden olan insersiyon mutasyonu olmak üzere toplam 12 farklı mutasyon bu hastalıkla ilişkili olarak gösterilmiştir (151-153). *CCBE1* geninde saptanan c.C116T (NP_597716, CCG>CTG, p.P39L) daha önce mutasyon ve herhangi bir SNP veri bankasında tanımlanmamıştır. *PTH2R* (NM_005048) geni ise paratiroid hormon reseptör 2 proteinini kodlamakta olup daha önce herhangi bir bilinen hastalıkla ilişkilendirilmemiş, saptanan c.853+3A>T varyantı da daha önce bildirilmemiştir. Bu varyantlar TED filtrelemelerinde *in silico* algoritmalar sonucunda patojenik değişim olarak hastalık yapıcı bulunması nedeniyle seçilmiş olup segregasyonu aile çalışmasında dışlanmıştır.

Olgu 2'de, *WNT10A* genindeki homozigot c.G433A (p.V145M) varyantın ailede segregasyon göstermesi bu ailede fenotipten sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Bu varyant yanlış anlamlı bir değişim sonucu protein zincirinde değişikliğe neden olmaktadır. van den Boogaard ve arkadaşlarının (2012) 34 oligodonti olgusunda yaptıkları bir çalışmada bir olguda bu homozigot varyantın saptandığı bildirilmiştir (69). Ancak çalışmada olgunun ailesine ait segregasyon bilgisi bulunmamaktadır. Bir başka çalışmada da aynı varyant homozigot olarak

ektodermal bulguları olan bir oligodonti hastasında gösterilmiştir (154). Ancak bu tez çalışmasına dahil edilen tüm olgularda olduğu gibi bu olguda da ektodermal bulgular açısından klinik değerlendirme yapılmış ve sendromik herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Arte ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında c.G433A (p.V145M) varyantı bir olguda heterozigot olarak saptanmış, aile çalışmasında ise heterozigot taşıyıcıların bazılarının etkilenmemiş olduğu gözlenmiştir (155). Bu çalışmada varyantın *in silico* algoritmalar ile 'hastalık yapıcı' olması üzerinden tartışılmış olsa da gerçekten hastalığa neden olup olmadığı konusu net değildir. Aynı varyantın, etkilenmiş bir çok bireyin bulunduğu Olgu 2 ailesinde otozomal resesif kalıtım ile uyumlu şekilde segrege olması, ancak etkilenmiş annede ve etkilenmemiş babada heterozigot saptanan varyantın Olgu 1'de homozigot bulunması, mutasyonun fenotipik etkisinin ortaya çıkmasında başka faktörlerin (multigenik kalıtım, penetrans farklılığı, penetrans üzerine etkin genetik ve çevresel faktörler) de rol aldığı olasılığını desteklemektedir. Olgu 1 ve Olgu 2'nin tüm aile bireylerinin ağız muayenesi ile tekrar kontrolünün yapılarak benzerliklerin/farklılıkların ortaya konmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Olgu 3'te, X kromozomu üzerinde yer alan *BCOR* genindeki heterozigot c.G1651A (p.D551N) varyantın, ailede X'e bağlı kalıtım modeline uygun olarak segrege olduğu gösterilerek fenotipten sorumlu olduğu düşüldü. *BCOR* geni daha önce izole diş agenezisi ile ilişkilendirilmemiş olup diş gelişimi için adı geçen genlerden biri de değildir. *BCOR* proteini promotor DNA elemanına bağlandığı zaman '*corepressor*' olarak görev almaktadır. BCOR proteininin aşırı ifadesinin BCL6'yı baskıladığı bildirilmektedir (156). *BCOR* geni daha önce OculoFacioCardioDental (OFCD) Sendromu ile ilişkilendirilmiştir (MIM #300166). Diğer adıyla *Microphthalmia* Sendromu Aalfs ve arkadaşları tarafından konjenital katarakt, kısa burunlu uzun dar yüz, ASD (bazen VSD) ağızda bulunan süt dişleri ve oligodonti ile karakterize edilmiştir (157). Oligodonti hastalığın klinik bulgularından biri olarak tanımlamıştır. Başka bir değişle oligodontinin sendromik formu olarak adlandırılabilmektedir. Cai J ve arkadaşları, *Bcor* genin diş gelişimdeki rolünü anlamak için RNA interferans kullanarak fonksiyon çalışması yapmıştır (158). Fare molar dişinin gelişimi sırasında Bcor ekspresyonunu inceleyen grup, *Bcor* geninin hem dental epitelde hem de dental mezenkimde eksprese olduğunu göstermişlerdir (Şekil 5-1).



Şekil 5-1: Bcor geninin farenin molar diş gelişimindeki değişik haftaları içeren ekspresyon çalışması (158)'dan uyarlanarak alınmıştır

Bu bilgiler ışığında, insan diş gelişimi için *BCOR* genin aday bir gen olabileceği tez kapsamında gösterilmiştir. Bir sonraki aşamada bu gen ve saptanan varyant ile ilgili fonksiyon çalışmaları yapılması planlanmaktadır. Ayrıca bu olgu ve ailesinde daha önce oligodonti ile ilişkilendirilmiş *WNT10A* geni homozigot p.F228I varyantı saptanmış olmasına karşın bu değişimin ailede fenotip ile segrege olmadığı gözlenmiştir. Oysa aynı varyant, Olgu 4 ve Olgu 5 ailelerinde de saptanmış ve fenotip ile segrege olmuştur. Bu olguda *SMOC2* ve *KMT2D* genlerinde daha önce tanımlanmamış, *in silico* analizlerde patojenik olabileceği yorumu yapılan yanlış anlamlı değişimlere yol açan iki farklı varyant saptanmış ve bu değişimler de ailede oligodonti ile segregasyon göstermemiştir. Hücre membranında kalsiyuma bağlanma özelliği gösteren bir proteini kodlayan *SMOC2* genindeki bi-allelik mutasyonlar otozomal resesif diş gelişim bozukluğuna neden olan ve dentin displazisi, mikrodonti ve dişte şekil bozukluğu ile tanımlanan bir hastalığa neden olmaktadır (MIM#607223). Bu gende şimdiye kadar biri terminasyon diğeri kırpılma hatası olan iki farklı mutasyon tanımlanmıştır (159, 160). *KMT2D* genindeki mutasyonlar ise Kabuki sendromu (MIM#602113) ile ilişkilendirilmektedir. Bu ailede, Olgu 3'te (III-3) oligodonti, diğer iki bireyde (II-9 ve III-1) ise hipodonti gözlenmişti. Olgu 3'te *WNT10A* varyantı homozigot, *SMOC2* ve *KMT2D* varyantları ise heterozigot olarak

bulunmakta iken babada (II-9) *SMOC2* varyantı, kız kardeşte de (III-1) *KMT2D* varyantı bulunmamakta idi. Olgu 3'te varyantların birlikte mutasyon yükü oluşturarak oligodontiye neden olmuş olabileceği düşünülebilir.

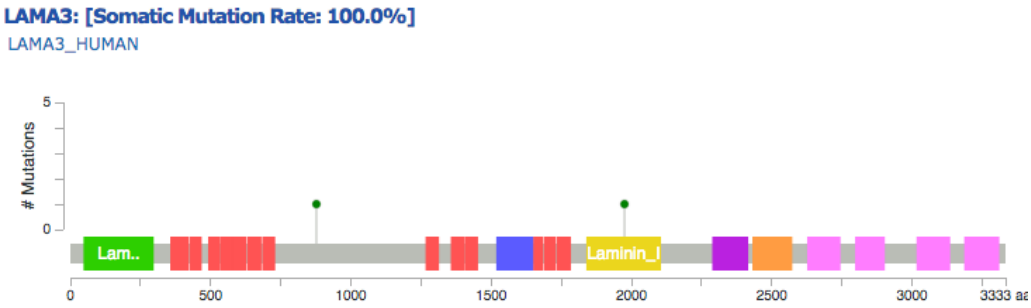
Olgu 4'te, *WNT10A* geninde saptanan heterozigot c.T682A (p.F228I) mutasyonunun ailede segregasyonun fenotipten sorumlu olabileceği olasılığını destekler yöndedir. Bu mutasyon non-sendromik diş agenezisi hasta grubunda en sık gösterilen mutasyon olarak literatürde tanımlanmaktadır ve tanımlanan tüm *WNT10A* mutasyonlarının % 62'sini oluşturduğu bildirilmektedir (69). Başka çalışmalarda da benzer şekilde bu mutasyonun diş agenezisi ile ilişkili en sık görülen mutasyon olduğu yinelenmiştir (161). Bir diğer çalışmada *WNT10* geninin kodlayan varyantlarından c.T682A (p.F228I) mutasyonunun maksiller lateral diş agenezisi ile ilişkili spesifik bir mutasyon olduğu ileri sürülmüştür (103). Olgu 4'te maksiller lateral diş agenezisi ile alt santral dişler, premolar ve 2. molar dişlerin de eksikliği gözlenmiş olup sorumlu genin *WNT10A* geninde saptanan p.F228I varyantı olduğu desteklenmiştir.

Olgu 5'te, biri bilinen *WNT10A* gen varyantı diğeri aday *LAMA3* gen varyantı olmak üzere iki farklı gendeki değişimin ailedeki oligodonti ile segrege olması fenotipten sorumlu olabileceklerini düşündürmüştür. *WNT10A* geninde 3. ekzonda heterozigot c.T682A (p.F228I) mutasyonu ile *LAMA3* geninin 10. ekzonunda heterozigot c.G1097A (p.R366H) değişimi ailede birlikte oligodonti ile segrege olmaktadır. Olgu 4'te de tespit edilen c.T682A (p.F228I) mutasyonu bu tez çalışması kapsamında toplam üç olgu ve ailesinde saptanmış ancak iki olgu ve ailesinde (Olgu 4 ve Olgu 5) segregasyon analizi ile oligodonti ilişkisi desteklenmiştir. Literatür araştırması sonucunda elde edilen bilgiye göre *LAMA3* geni daha önce diş agenezi ile ilişkilendirilmemiştir. *LAMA3* geni laminin gen ailesinin bir üyesi olup Laminin-5 (LAM5) (diğer bir ismiyle Epiligrin) isoformuna sahiptir (162). *LAMA3* geni Epidermolisiz Bülloza'nın Herlitz (MIM#226700) ve Non-Herlitz (MIM#226650) tipleri ile aynı zamanda Laryngoonychocutaneous Sendromu (MIM#245660) ile ilişkilendirilmektedir. Non-Herlitz tip Epidermolisiz Bülloza'nın bir bulgusu hipodontidir. Laminin genlerinin fonskiyonları üzerine de çeşitli fonksiyon çalışması yapılmıştır. Salmivirta K ve arkadaşlarının murin diş gelişimi üzerine yaptıkları bir araştırmada *Laminin alfa-3*'ün murin dental epitel-mezenkim etkileşiminde rol

oynadığı tespit edilmiştir (163). Bir başka fare modeli çalışmasında ise *Lama3* genin diş dokusunda eksprese olduğunu ortaya koymuştur (164). Tüm bu bilgiler Olgu 5'te bulunan *LAMA3* genindeki heterozigot c.G5924A (p.R1975H) değişiminin hastalıkla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Tez çalışması kapsamında *LAMA3* geninin diş agenezisi için aday gen olabileceği düşünülerek insan diş gelişimindeki önemini araştırmak amacıyla çeşitli fonksiyon analiz çalışmalarının yapılması planlanmıştır. Olgu 5 ailesinde iki ayrı gen varyasyonunun aynı anda segrege olması digenik kalıtım modelini desteklemekte olup diğer aile bireylerine ulaşılarak, çalışmaya katılmayı kabul etmeleri durumunda, bu varyantın ailedeki dağılımını daha detaylı olarak irdelemeyi planlamaktayız.

Olgu 6'da, *LRP6* genindeki heterozigot c.3607+3delAAGT varyantın aile bireylerinde oligodonti ile segrege olması fenotipten sorumlu olabileceğini düşündürdü. Bulunan bu varyant donör bölge kırpılma hatası mutasyonu olarak değerlendirildi. *LRP6* geni çok yakın bir zamanda, bu tez çalışması devam ederken, Hollanda'lı bir grup araştırmacı tarafından diş agenezisi ile ilk kez ilişkilendirildi. 20 oligodonti hastasını TED yöntemi ile analiz eden çalışma grubu, 4 olguda saptadıkları *LRP6* gen varyantlarını oligodonti ile ilişkilendirmiştir (71). Bu dört farklı varyantın üçü duplikasyon [c.1144_1145dupAG (p.Ala383Glyfs*8), c.1779dupT (p.Glu594*), c.2224_2225dupTT (p.Leu742Phefs*7)] dördüncüsü ise yanlış anlamlı bir mutasyondu [c.56C>T (p.Ala19Val)]. Bu çalışmanın ardından yayınlanan bir makalede ise diş agenezisi ve/veya orofasiyal yarıkları olan (Sadece diş agenezisi olan hasta sayısı 67, diş agenezisi ve orofasiyal yarıklı hasta sayısı 1.072) bir hasta grubunda yapılan TED incelemesinde, orofasiyal yarık ve diş agenezisi olan bir olguda *LRP6* geninde çevreve kayması mutasyonu [c.4594delG (p.Cys1532fs)], sadece diş agenezisi olan bir olguda ise donör bölge kırpılma hatası mutasyonu [c.3398A>C] saptandığı bildirildi (72). Olgu 6'da saptanan, NCBI-SNP veri bankasında rs777692401 olarak tanımlanan ve herhangi bir popülasyon sıklık bilgisi olmayan, c.3607+3delAAGT değişiminin, literatürde *LRP6* geninin oligodontiye neden olduğu gösterilen üçüncü vaka ve mutasyon olduğunu önermekteyiz. Bir sonraki aşamada, saptadığımız varyantın fonksiyon çalışması ile desteklenmesi planlanmaktadır.

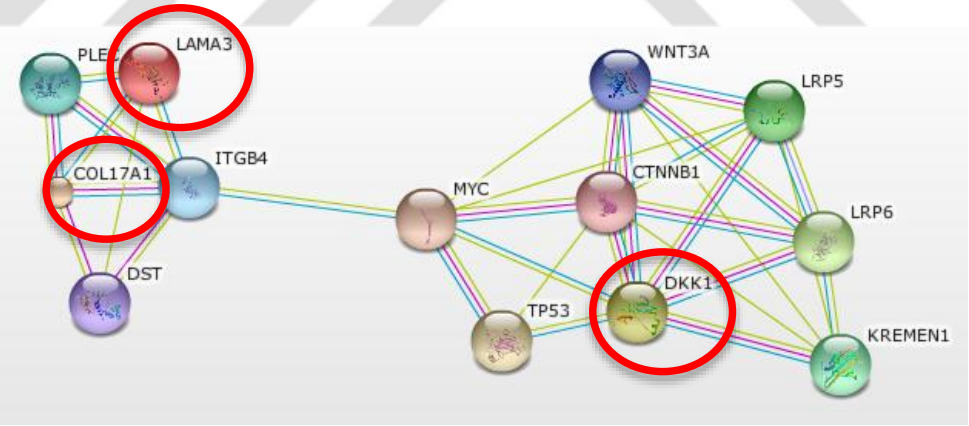
Olgu 7'de, üç farklı gendeki değişimin (*DKK1* genindeki heterozigot c.548-4G>T, *LAMA3* genindeki heterozigot c.G2798T (p.G933V), ve *COL17A1* genindeki heterozigot c.3277+3G>C) ailede oligodonti ile segregasyonu her birinin ayrı ya da birlikte fenotipten sorumlu olabileceğini düşündürdü. *DKK1* ve *COL17A1*'deki varyantlar sırasıyla rs183951849 ve rs757250244 numaraları ile NCBI SNP veri bankasında farklı toplumlarda sıklığı %1'den daha az, nadir varyantlar olarak nitelendirilirken, *LAMA3* geninde saptanan varyant daha önce tanımlanmamıştır. Tez kapsamında Olgu 5'te de *LAMA3* geninde ilişkili olduğu düşünülen bir varyantın saptanmış olması bu genin aday niteliğini güçlendirmektedir. Aynı gendeki bu iki varyantın peptid zinciri üzerindeki yerleri Şekil 5-2'de gösterilmiştir. Olgu 5'deki yanlış anlamlı değişim Pfam Q16787 numaralı protein domain modeline göre (http://pfam.xfam.org/protein/Q16787) "laminin EGF" domaininde yer alırken, Olgu 7'deki yanlış anlamlı değişim yalın peptid zinciri üzerinde oluşmuştur. Bu değişimlerin fonksiyonel özellikleri üç boyutlu protein modellemesi ile daha detaylı irdelenebilir.



Şekil 5-2: Olgu 7 ve Olgu 5'e ait değişimlerin *LAMA3* geni üzerindeki yerleri sırasıyla gösterilmektedir (cioPortal, MutationMapper)

Olgu 7'de gösterilen diğer bir varyant *COL17A1* geninde oluşmuştur. *LAMA3* ve *COL17A1* genleri daha önce literatürde diş agenezisinin sendromik bir formu olan Epidermolisiz Bülloza'nın Non-Herlitz (MIM#226650) tipi ile ilişkilendirilmiştir. Tez çalışmasının klinik değerlendirme aşamasında bu her iki olgu da diğer olgularda olduğu gibi sendromik açıdan değerlendirilmiş ve non-sendromik olduklarına karar verilmiştir. Bir sonraki aşamada, bu varyantlar için fonksiyon analizleri yaparak, diş agenezisi ile ilişkisini desteklemeyi planlamaktayız. Bu ailedeki segregasyonda

oligodonti ilişkisi desteklenen bir diğer varyant olan c.548-4G>T, *DKK1* geni üzerinde bulunmaktadır. *DKK1* geni, WNT sinyal yolağının bir üyesi olup WNT reseptörlerinin *upstream* fonskiyonunu antagonize ettiği bildirilmektedir (165). *Dkk1*'in Lrp6-Wnt/beta-catenin sinyalini bloke ettiği bildirilmektedir (166). *DKK1* geni bugüne kadar herhangi bir insan hastalığı ile ilişkilendirilmemiştir. *DKK1* geninin WNT sinyal yolağının bir elemanı olması ve diş agenezisi ile ilişkili gen olan *LRP6* ile karşılıklı etkileşiminin bulunması bu genin de aday gen olma olasılığını güçlendirmektedir. Ayrıca *DKK1* geninin rs11001553 polimorfizmi Çin-Han populasyonunda diş agenezisi ile ilişkili bulunmuştur (167). Tüm bu bilgiler Olgu 7 ailesinde hipodonti ile segrege olan bu üç varyantın diş agenezisi ile ilgili aday gen olabileceğini ve multigenik kalıtım modelini desteklemektedir. Hipodontinin anne tarafından kalıtılması nedeniyle anne tarafının diğer aile bireylerinden de genişletilmiş çalışma yapılması istenmiş olmasına karşın onam alınamadığından bu çalışma yapılamamıştır. LAMA3, COL17A1 ve DKK1 proteinlerinin birbirleriyle olası etkileşimi Şekil 5-3'te gösterilmektedir.



Şekil 5-3: LAMA3, COL17A1 ve DKK1 protein-protein etkileşimleri (STRING, Versiyon 10.0)

Olgu 8'de *DAAM2*, *RECQL4* ve *POLR3B* genlerinde seçilen üç aday varyant da nadir görülen, en az iki *in silico* tahmin programında patojenik varsayılan değişimler olmasına rağmen aile segregasyonu ile desteklenememiş ve yapılan analizlerle fenotip ile ilişkisi gösterilememiştir. Bu değişimlerin dışlanmasından sonra ailede klinik bulguların tekrar değerlendirilmesi ve analizin filtereleme kriterlerinin

gevşetilerek tekrarlanması, bu analizlerden sonuç alınmazsa anne ve babanın da TED yöntemi ile analiz edilmesi planlanmıştır.

Olgu 9'da, *ANTXR1* genindeki homozigot c.C1312T (p.R438C) değişimi aile segregasyonu gösterilerek fenotipten sorumlu gen olabileceği düşünülmüştür. ATR (*anthrax toxin receptor*) direk olarak *Anthrax*'ın protektif antijen (PA)'ine bağlanır. ATR, PA reseptörü olarak fonksiyon görebilmektedir (168). *ANTXR1* genindeki mutasyonlar, daha önce iki tane anlamsız ve bir tane donör bölge kırpılma hatası mutasyonu GAPO sendromu (MIM #230740) ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca GAPO sendromu hastalarının fibroblastlarında uygulanan '*Phalloidin staining*' aktin mikrofilamentlerin organizasyonunu göstererek *ANTXR1* geninin aktinlerin bir araya gelmesindeki kritik önemi vurgulanmıştır. GAPO sendromu; büyüme geriliği, alopesi, psödoanodonti ve optik atrofi ile giden bir sendromdur (169). Sendrom bulgularında bahsedilen psödoanodontinin dişlerin sürmesindeki hata mı yoksa diş konjenital eksikliği mi olduğu konusu yeterince açık değildir. Tez çalışması kapsamında sendrom ile ilgili yayınların yazarlarına ulaşılmaya çalışılmış ancak bu konuda net bir bilgi sağlanamamıştır. Bu gen de bugüne kadar diş agenezisinin sendromik formları ile ilişkili olarak bildirilmekteydi. *Antxr1* mutant farelerde ön keser dişlerinin sıralamasında hata gözlendiği bildirilmektedir (170). Ayrıca farklı *Antxr1* mutant fare modellerinde anormal diş gelişimi gözlendiği bildirilmektedir. Olgu 9'daki homozigot c.C1312T (p.R438C) değişiminin Türk toplumundaki heterozigot taşıyıcılık oranına bakılmış ve oranın 0,006 olduğu gösterilerek *ANTXR1* geninin non-sendromik diş agenezisi için aday gen olabileceği düşünülmüştür.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, aynı genlerin sendromik ve nonsendromik diş eksikliğinde ilişkili olabileceğini göstermektedir. Buna örnek olarak *MSX1* mutasyonlarının hem izole diş eksikliğinden, hem de tırnak anomalileri ve hipodonti ile karakterize olan Witkop sendromundan (MIM#189500) sorumlu olduğunu göstermektedir (171). *EDA* genindeki mutasyonlar hem Hipohidrotik Ektodermal Displazi'ye hem de Nonsendromik Hipodontiye neden olmaktadır (172, 173). Bu da diş agenezisinin sendromik formuna neden olan genlerin nonsendromik diş agenezisine de neden olabileceğini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında tez çalışması kapsamında tespit edilen *LAMA3* (Olgu 5 ve Olgu 7), *BCOR* (Olgu 3), *COL17A1* (Olgu 7) ve *ANTXR1* (Olgu 9) genlerinin çeşitli sendromlarla ilişkilendirilmiş

olmasına rağmen aynı zamanda non-sedromik diş agenezisi için de aday genler olabileceğini göstermektedir. Bu hipotezi desteklemek amacıyla çeşitli fonksiyon ve hayvan modeli çalışmaları planlanmaktadır. Aday genler ile ilgili gerekli çalışmalar tamamlandıktan sonra bu bilgilerin yayın haline dönüştürülmesi hedeflenmektedir. Böylece başka toplumlardaki araştırmacılara da ulaşılıp benzer olguların eşleştirilmesi düşünülmektedir.

Olgu 10'da, aday olduğu düşünülen iki varyantın da aile segregasyonu ile desteklenememesi sonucu fenotipten sorumlu genetik köken aydınlatılamamıştır. Özellikle oligodonti için bilinen genlerden biri olan *AXIN2* genindeki homozigot c.T1985C (p.L662P) değişiminin ailede oligodonti ile segrege olmaması ailede ikinci bir patojenik değişimin varlığını düşündürmektedir. Ailede ilk olarak klinik bulgular tekrar gözden geçirilip gerekli durumda olgu anne babasının da TED ile analiz edilmesi planlanmaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında incelenen on oligodonti/hipodonti ailesinden dördünde aday olduğu düşünülen, üçünde ise bilinen genlerde ilişkili varyantlar saptanırken, üç olgu ve ailesinde etyopatogenez (Olgu 1, Olgu 8 ve Olgu 10) aydınlatılamadı. Oligodonti ilişkili genetik kökenin aydınlatılamadığı bu üç aile için filtreleme dışı bırakılmış olabilecek varyantların irdelenmesi planlanmaktadır. Bu ailelerde oligodonti fenotipine neden olan varyantlar, uygulanan TED yönteminde yeterince kapsanmamış bölgelerde yer almış olabilir. Teknik kısıtlamalar nedeniyle gözden kaçırılmış olabilecek tüm değişimler için filtreleme ve önceliklendirme kriterleri değiştirilerek analizin tekrarlanması planlanmaktadır. Ayrıca klinik değerlendirmenin de tekrarlanması ve bu ailelerdeki tüm üyelere ulaşılmaya çalışılması da etyopatogenezi aydınlatmakta katkı sağlayabilir. Ekzon bölgeleri dışında yer alan varyantları görebilmek için ise TGD yöntemi de bir sonraki seçenek olarak düşünülebilir.

Bu çalışmada, beş farklı gende (*SMOC2*, NP_0071421, p.T135R; *CCBE1*, NP_5977165, p.P39L; *PTH2R*, NM_005048, c.853+3A>T; *POLR3B*, NP_060552, p.T12S ve *SNX10*, NP_01186764, p.Q5*) daha önce SNP veri tabanlarında tanımlanmamış varyantlar saptanmış ve bu varyantların heterozigotluklarının ailelerimizdeki oligodonti ile ilişkisi segregasyon analizi ile dışlanmıştır.

Bu tez çalışmasında diş oluşumu ve gelişimindeki genlerin ve sinyal yolaklarının aydınlatılabilmesi açısından önemli bilgilere ulaştığımızı düşünmekteyiz. Oligodonti ile ilişkili olduğunu öngördüğümüz beş aday genin (*BCOR*, *LAMA3*, *DKK*, *COL17A1* ve *ANTXR1*), fonksiyonel çalışmalarla daha detaylı olarak incelenmesinin gelişim genetiği alanında yeni bilgiler edinmemizi sağlayacağına inanmaktayız. Dişin gelişimsel genetiğini anlamak hastalara sunulacak tedavi uygulamaları için yeni açılımlar kazandırabilir. Ayrıca diş agenezisinin kolon kanseri ile ilişkisi bazı çalışmalar ile ortaya konmuş ancak diğer kanser türleri ile ilişkisi net olarak halen bilinmemektedir. Bu çalışmayla öne sürülen yeni genlerin kanser ile bağlantısı da araştırmaya açık bir konudur. Bu çalışmanın hem değişik kalıtım modelleri ile ortaya çıkan hem de multifaktöriyel özellik gösteren hastalıkların oluşum mekanizmalarını daha iyi anlayabilmek için uygun bir model olacağını umut ediyoruz.

KAYNAKLAR

1. Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RC. Syndromes of the head and neck: Oxford University Press New York; 1990.
2. Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2000;117(6):650-6.
3. Symons AL, Stritzel F, Stamation J. Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisor and second premolar. Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 1993;17:109-.
4. Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. Current opinion in cell biology. 1996;8(6):844-50.
5. Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defects. American Journal of Medical Genetics Part A. 2006;140(23):2530-5.
6. Lammi L, Arte S, Somer M, Järvinen H, Lahermo P, Thesleff I, et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. The American Journal of Human Genetics. 2004;74(5):1043-50.
7. Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski PP. Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis. Journal of human genetics. 2006;51(3):262-6.
8. Tamura M, Nemoto E, Sato M, Nakashima A, Shimauchi H. Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. Frontiers in bioscience (Elite edition). 2009;2:1405-13.
9. Callahan N, Modesto A, Meira R, Seymen F, Patir A, Vieira A. Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms and tooth agenesis. Archives of oral biology. 2009;54(1):45-9.
10. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology. 2009;85(2):169-73.
11. Bergendal B, Klar J, Stecksén-Blicks C, Norderyd J, Dahl N. Isolated oligodontia associated with mutations in EDARADD, AXIN2, MSX1, and PAX9 genes. American Journal of Medical Genetics Part A. 2011;155(7):1616-22.
12. S. Antunes L, C. Küchler E, N. Tannure P, BL Dias J, N. Ribeiro V, Lips A, et al. Genetic variations in MMP9 and MMP13 contribute to tooth agenesis in a Brazilian population. Journal of oral science. 2013;55(4):281-6.
13. Sadler T. Special embryology, digestive system. Langman's medical embryology. 1995:241-71.
14. Moore K, Persaud T. The Developing Human. Noida. India, Thomson Press (I) Ltd., Saunders Elsevier; 2009.
15. Spiller M. Tooth Development Chart [20.06.2016]. http://doctorspiller.com/schematic.htm.
16. Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. Mechanisms of development. 1999;85(1):197-200.
17. Tucker A, Headon D, Courtney J-M, Overbeek P, Sharpe P. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. Developmental biology. 2004;268(1):185-94.

18. Mitsiadis TA, Graf D. Cell fate determination during tooth development and regeneration. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews. 2009;87(3):199-211.
19. Mitsiadis T, Feki A, Papaccio G, Catón J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. Advances in dental research. 2011;23(3):275-9.
20. Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. Mechanisms of development. 2000;92(1):19-29.
21. Mitsiadis TA, Smith MM. How do genes make teeth to order through development? Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. 2006;306(3):177-82.
22. Tucker A, Sharpe P. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place. Journal of Dental Research. 1999;78(4):826-34.
23. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. Mechanisms of development. 1997;67(2):111-23.
24. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. Journal of cell science. 2003;116(9):1647-8.
25. Mitsiadis TA, Graf D, Luder H, Gridley T, Bluteau G. BMPs and FGFs target Notch signalling via jagged 2 to regulate tooth morphogenesis and cytodifferentiation. Development. 2010;137(18):3025-35.
26. Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. Human molecular genetics. 2003;12(suppl 1):R69-R73.
27. Miletich I, Sharpe PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews. 2004;72(2):200-12.
28. van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo R-G, Parslow TG, Bruhn L, et al. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. Genes & development. 1994;8(22):2691-703.
29. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. Developmental cell. 2002;2(5):643-53.
30. Lee M-J, Kim E-J, Otsu K, Harada H, Jung H-S. Sox2 contributes to tooth development via Wnt signaling. Cell and tissue research. 2016:1-8.
31. Li X, Xu Y, Chen Y, Chen S, Jia X, Sun T, et al. SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/β-catenin signal network. Cancer letters. 2013;336(2):379-89.
32. Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe P, Tucker A. Tooth agenesis: from molecular genetics to molecular dentistry. Journal of Dental Research. 2008;87(7):617-23.
33. Kratochwil K, Dull M, Farinas I, Galceran J, Grosschedl R. Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. Genes & Development. 1996;10(11):1382-94.
34. Fujimori S, Novak H, Weissenböck M, Jussila M, Gonçalves A, Zeller R, et al. Wnt/β-catenin signaling in the dental mesenchyme regulates incisor development by regulating Bmp4. Developmental biology. 2010;348(1):97-106.
35. Golonzhka O, Metzger D, Bornert J-M, Bay BK, Gross MK, Kioussi C, et al. Ctip2/Bcl11b controls ameloblast formation during mammalian odontogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106(11):4278-83.

36. Bouwman P, Göllner H, Elsässer HP, Eckhoff G, Karis A, Grosveld F, et al. Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. The EMBO journal. 2000;19(4):655-61.
37. Morlon A, Munnich A, Smahi A. TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF-κB activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptator Edaradd. Human molecular genetics. 2005;14(23):3751-7.
38. Nieminen P. Genetic basis of tooth agenesis. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. 2009;312(4):320-42.
39. Hipnodenta. Dişlerin Gelişimi ve Yapısı [03.04.2016]. http://www.hipnodenta.com/254/dislerin-gelisimi-ve-yapisi.
40. Arte S, Nieminen P, Apajalahti S, Haavikko K, Thesleff I, Pirinen S. Characteristics of incisor-premolar hypodontia in families. Journal of Dental Research. 2001;80(5):1445-50.
41. Casamassimo PS, Fields Jr HW, McTigue DJ, Nowak A. Pediatric dentistry: infancy through adolescence: Elsevier Health Sciences; 2013.
42. Camilleri S. Maxillary canine anomalies and tooth agenesis. The European Journal of Orthodontics. 2005;27(5):450-6.
43. Albashaireh Z, Khader Y. Prevalence of hypodontia and developmental malformation of permanent teeth in Saudi Arabian schoolchildren. Commun Dent Health. 2006;23(4):239-43.
44. Calvano Küchler E, De Andrade Risso P, De Castro Costa M, Modesto A, RezendE Vieira A. Assessing the proposed association between tooth agenesis and taurodontism in 975 paediatric subjects. International Journal of Paediatric Dentistry. 2008;18(3):231-4.
45. Grahnén H. Hypodontia in the permanent dentition: a clinical and genetical investigation: Gleerup; 1956.
46. Thompson G, Popovich F. Probability of congenitally missing teeth: results in 1,191 children in the Burlington Growth centre in Toronto. Community dentistry and oral epidemiology. 1974;2(1):26-32.
47. Albashaireh ZS, Khader YS. The prevalence and pattern of hypodontia of the permanent teeth and crown size and shape deformity affecting upper lateral incisors in a sample of Jordanian dental patients. Community dental health. 2006;23(4):239.
48. Mok Y, Ho K. Congenitally absent third molars in 12 to 16 year old Singaporean Chinese patients: a retrospective radiographic study. Annals of the Academy of Medicine, Singapore. 1996;25(6):828-30.
49. Endo M, Kumakura H, Kanai H, Araki Y, Kasama S, Sumino H, et al. Prevalence and risk factors for renal artery stenosis and chronic kidney disease in Japanese patients with peripheral arterial disease. Hypertension Research. 2010;33(9):911-5.
50. Rakhshan V. Congenitally missing teeth (hypodontia): A review of the literature concerning the etiology, prevalence, risk factors, patterns and treatment. Dental research journal. 2015;12(1):1.
51. Polder BJ, Van't Hof MA, Van der Linden FP, Kuijpers-Jagtman AM. A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. Community dentistry and oral epidemiology. 2004;32(3):217-26.
52. Khalaf K, Miskelly J, Voge E, Macfarlane TV. Prevalence of hypodontia and associated factors: a systematic review and meta-analysis. Journal of orthodontics. 2014;41(4):299-316.

53. Rózsa N, Nagy K, Vajó Z, Gábris K, Soós A, Alberth M, et al. Prevalence and distribution of permanent canine agenesis in dental paediatric and orthodontic patients in Hungary. The European Journal of Orthodontics. 2009;31(4):374-9.
54. Altug-Atac AT, Erdem D. Prevalence and distribution of dental anomalies in orthodontic patients. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2007;131(4):510-4.
55. Celikoglu M, Kamak H, Oktay H. Prevalence and characteristics of supernumerary teeth in a non-syndrome Turkish population: associated pathologies and proposed treatment. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010;15(4):e575-8.
56. Cantekin K, Gurbuz T, Demirbuga S, Demirci T, Duruk G. Dental caries and body mass index in a sample of 12-year-old eastern Turkish children. Journal of dental sciences. 2012;7(1):77-80.
57. Karadas M, Celikoglu M, Akdag MS. Evaluation of tooth number anomalies in a subpopulation of the North-East of Turkey. European journal of dentistry. 2014;8(3):337.
58. Uzuner D, Celik MM, Toy E, Turkdonmez CO. Assessment of hypodontia in the Turkish patients referring to the orthodontic clinic: a retrospective study. European journal of dentistry. 2013;7(5):9.
59. Brook A. A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size. Archives of Oral Biology. 1984;29(5):373-8.
60. Brook A. Multilevel complex interactions between genetic, epigenetic and environmental factors in the aetiology of anomalies of dental development. Archives of oral biology. 2009;54:S3-S17.
61. Nunn J, Carter N, Gillgrass T, Hobson R, Jepson N, Meechan J, et al. The interdisciplinary management of hypodontia: background and role of paediatric dentistry. British dental journal. 2003;194(5):245-51.
62. Stimson JM, Sivers JE, Hlava GL. Features of oligodontia in three generations. The Journal of clinical pediatric dentistry. 1996;21(3):269-75.
63. Chhabra N, Goswami M, Chhabra A. Genetic basis of dental agenesis-molecular genetics patterning clinical dentistry. 2014.
64. Fleischmannova J, Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT. Mouse models of tooth abnormalities. European journal of oral sciences. 2008;116(1):1-10.
65. Yen AH-H, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. Cell and tissue research. 2008;331(1):359-72.
66. Mitsiadis T, Luder H. Genetic basis for tooth malformations: from mice to men and back again. Clinical genetics. 2011;80(4):319-29.
67. Vieira A, Meira R, Modesto A, Murray J. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. Journal of dental research. 2004;83(9):723-7.
68. Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa ARS, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. American Journal of Medical Genetics Part A. 2007;143(6):538-45.
69. van den Boogaard M-J, Créton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, et al. Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. Journal of medical genetics. 2012;49(5):327-31.
70. Shen W, Wang Y, Liu Y, Liu H, Zhao H, Zhang G, et al. Functional Study of Ectodysplasin-A Mutations Causing Non-Syndromic Tooth Agenesis. PloS one. 2016;11(5):e0154884.

71. Massink MP, Créton MA, Spanevello F, Fennis WM, Cune MS, Savelberg SM, et al. Loss-of-function mutations in the WNT co-receptor LRP6 cause autosomal-dominant oligodontia. The American Journal of Human Genetics. 2015;97(4):621-6.
72. Ockeloen CW, Khandelwal KD, Dreesen K, Ludwig KU, Sullivan R, van Rooij IA, et al. Novel mutations in LRP6 highlight the role of WNT signaling in tooth agenesis. Genetics in Medicine. 2016.
73. Sasaki T, Ito Y, Xu X, Han J, Bringas P, Maeda T, et al. LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. Developmental biology. 2005;278(1):130-43.
74. De Coster P, Marks L, Martens L, Huysseune A. Dental agenesis: genetic and clinical perspectives. Journal of Oral Pathology & Medicine. 2009;38(1):1-17.
75. Gerits A, Nieminen P, De Muynck S, Carels C. Exclusion of coding region mutations in MSX1, PAX9 and AXIN2 in eight patients with severe oligodontia phenotype. Orthodontics & craniofacial research. 2006;9(3):129-36.
76. Kavitha B, Priyadharshini V, Sivapathasundharam B, Saraswathi T. Role of genes in oro-dental diseases. Indian Journal of Dental Research. 2010;21(2):270.
77. Zhang Y, Mori T, Takaki H, Takeuchi M, Iseki K, Hagino S, et al. Comparison of the expression patterns of two LIM-homeodomain genes, Lhx6 and L3/Lhx8, in the developing palate. Orthodontics & craniofacial research. 2002;5(2):65-70.
78. Peters H, Wilm B, Sakai N, Imai K, Maas R, Balling R. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. Development. 1999;126(23):5399-408.
79. Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. Nature genetics. 2000;24(1).
80. Klein M, Nieminen P, Lammi L, Niebuhr E, Kreiborg S. Novel mutation of the initiation codon of PAX9 causes oligodontia. Journal of dental research. 2005;84(1):43-7.
81. Wang Y, Wu H, Wu J, Zhao H, Zhang X, Mues G, et al. Identification and functional analysis of two novel PAX9 mutations. Cells Tissues Organs. 2008;189(1-4):80-7.
82. Wang S-K, Chan H-C, Makovey I, Simmer JP, Hu JC. Novel PAX9 and COL1A2 missense mutations causing tooth agenesis and OI/DGI without skeletal abnormalities. PloS one. 2012;7(12):e51533.
83. Das P, Hai M, Elcock C, Leal SM, Brown DT, Brook AH, et al. Novel missense mutations and a 288-bp exonic insertion in pax9 in families with autosomal dominant hypodontia. American Journal of Medical Genetics Part A. 2003;118(1):35-42.
84. Mitsui S, Yasue A, Masuda K, Watanabe K, Horiuchi S, Imoto I, et al. Novel PAX9 mutations cause non-syndromic tooth agenesis. Journal of dental research. 2014;93(3):245-9.
85. Lammi L, Halonen K, Pirinen S, Thesleff I, Arte S, Nieminen P. A missense mutation in PAX9 in a family with distinct phenotype of oligodontia. European Journal of Human Genetics. 2003;11(11):866-71.
86. Liang J, Song G, Li Q, Bian Z. Novel missense mutations in PAX9 causing oligodontia. Archives of oral biology. 2012;57(6):784-9.
87. Jumlongras D, Lin J-Y, Chapra A, Seidman CE, Seidman JG, Maas RL, et al. A novel missense mutation in the paired domain of PAX9 causes non-syndromic oligodontia. Human genetics. 2004;114(3):242-9.

88. Mostowska A, Kobielak A, Biedziak B, Trzeciak WH. Novel mutation in the paired box sequence of PAX9 gene in a sporadic form of oligodontia. European journal of oral sciences. 2003;111(3):272-6.
89. Kapadia H, Frazier-Bowers S, Ogawa T, D'souza RN. Molecular characterization of a novel PAX9 missense mutation causing posterior tooth agenesis. European journal of human genetics. 2006;14(4):403-9.
90. Suda N, Ogawa T, Kojima T, Saito C, Moriyama K. Non-syndromic oligodontia with a novel mutation of PAX9. Journal of dental research. 2011;90(3):382-6.
91. Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski PP. Novel MSX1 mutation in a family with autosomal-dominant hypodontia of second premolars and third molars. Archives of oral biology. 2012;57(6):790-5.
92. Shimizu T, Maeda T. Prevalence and genetic basis of tooth agenesis. Japanese dental science review. 2009;45(1):52-8.
93. van den Boogaard M-JH, de Costa D, Krapels IP, Liu F, van Duijn C, Sinke RJ, et al. The MSX1 allele 4 homozygous child exposed to smoking at periconception is most sensitive in developing nonsyndromic orofacial clefts. Human genetics. 2008;124(5):525-34.
94. Tatematsu T, Kimura M, Nakashima M, Machida J, Yamaguchi S, Shibata A, et al. An aberrant splice acceptor site due to a novel intronic nucleotide substitution in MSX1 gene is the cause of congenital tooth agenesis in a Japanese family. PloS one. 2015;10(6):e0128227.
95. Yue H, Liang J, Yang K, Hua B, Bian Z. Functional analysis of a novel missense mutation in AXIN2 associated with non-syndromic tooth agenesis. European journal of oral sciences. 2016;124(3):228-33.
96. Jernvall J. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(12):8116-20.
97. Yin W, Bian Z. The gene network underlying hypodontia. Journal of dental research. 2015:0022034515583999.
98. Monreal AW, Zonana J, Ferguson B. Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations. The American Journal of Human Genetics. 1998;63(2):380-9.
99. Sarkar T, Bansal R, Das P. Whole genome sequencing reveals novel non-synonymous mutation in ectodysplasin a (EDA) associated with non-syndromic X-linked dominant congenital tooth agenesis. PloS one. 2014;9(9):e106811.
100. Liu F, Millar SE. Wnt/β-catenin signaling in oral tissue development and disease. Journal of dental research. 2010;89(4):318-30.
101. Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, et al. Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. Differentiation. 2007;75(5):452-62.
102. Kantaputra P, Sripathomsawat W. WNT10A and isolated hypodontia. American Journal of Medical Genetics Part A. 2011;155(5):1119-22.
103. Mostowska A, Biedziak B, Zadurska M, Matuszewska-Trojan S, Jagodziński PP. WNT10A coding variants and maxillary lateral incisor agenesis with associated dental anomalies. European journal of oral sciences. 2015;123(1):1-8.

104. Arzoo PS, Klar J, Bergendal B, Norderyd J, Dahl N. WNT10A mutations account for ¼ of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations. American Journal of Medical Genetics Part A. 2014;164(2):353-9.
105. Plaisancié J, Bailleul-Forestier I, Gaston V, Vaysse F, Lacombe D, Holder-Espinasse M, et al. Mutations in WNT10A are frequently involved in oligodontia associated with minor signs of ectodermal dysplasia. American Journal of Medical Genetics Part A. 2013;161(4):671-8.
106. Song S, Zhao R, He H, Zhang J, Feng H, Lin L. WNT10A variants are associated with non-syndromic tooth agenesis in the general population. Human genetics. 2014;133(1):117-24.
107. Townsend G, Richards L, Hughes T, Pinkerton S, Schwerdt W. Epigenetic influences may explain dental differences in monozygotic twin pairs. Australian dental journal. 2005;50(2):95-100.
108. Townsend G, Richards L, Messer LB, Hughes T, Pinkerton S, Seow K, et al. Genetic and environmental influences on dentofacial structures and oral health: studies of Australian twins and their families. Twin Research and Human Genetics. 2006;9(6):727-32.
109. Wang J, Sun K, Shen Y, Xu Y, Xie J, Huang R, et al. DNA methylation is critical for tooth agenesis: implications for sporadic non-syndromic anodontia and hypodontia. Scientific reports. 2016;6.
110. Consortium EP. The ENCODE (ENCyclopedia of DNA elements) project. Science. 2004;306(5696):636-40.
111. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. nature. 2008;452(7189):872-6.
112. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. Nature. 2009;461(7261):272-6.
113. Bainbridge MN, Wang M, Wu Y, Newsham I, Muzny DM, Jefferies JL, et al. Targeted enrichment beyond the consensus coding DNA sequence exome reveals exons with higher variant densities. Genome biology. 2011;12(7):1.
114. Bainbridge MN, Wiszniewski W, Murdock DR, Friedman J, Gonzaga-Jauregui C, Newsham I, et al. Whole-genome sequencing for optimized patient management. Science translational medicine. 2011;3(87):87re3-re3.
115. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. BioMed Research International. 2012;2012.
116. Goodwin S, Gurtowski J, Ethe-Sayers S, Deshpande P, Schatz MC, McCombie WR. Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and de novo assembly of a eukaryotic genome. Genome research. 2015;25(11):1750-6.
117. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. Nature Reviews Genetics. 2010;11(6):415-25.
118. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. Nature. 2010;464(7291):999-1005.
119. Lupski JR, Gonzaga-Jauregui C, Yang Y, Bainbridge MN, Jhangiani S, Buhay CJ, et al. Exome sequencing resolves apparent incidental findings and reveals further complexity of SH3TC2 variant alleles causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy. Genome medicine. 2013;5(6):1.

120. Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. Genetics in Medicine. 2014;17(6):444-51.
121. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. Genetics in Medicine. 2015.
122. Goodwin G, Hawley PP, Miller DT. A Case of HDR Syndrome and Ichthyosis: Dual Diagnosis by Whole-Genome Sequencing of Novel Mutations in GATA3 and STS Genes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2016;101(3):837-40.
123. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. JAmA. 2014;312(18):1880-7.
124. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. Jama. 2014;312(18):1870-9.
125. Scriver CR. The metabolic & molecular bases of inherited disease: New York; Montreal: McGraw-Hill; 2001.
126. Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. Nature. 2014;515(7526):216-21.
127. Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA. Human genome sequencing in health and disease. Annual review of medicine. 2012;63:35.
128. Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. Nature. 2014.
129. Howard HC, Knoppers BM, Cornel MC, Clayton EW, Sénécal K, Borry P. Whole-genome sequencing in newborn screening? A statement on the continued importance of targeted approaches in newborn screening programmes. European Journal of Human Genetics. 2015.
130. Rowan BA, Weigel D, Koenig D. Developmental genetics and new sequencing technologies: the rise of nonmodel organisms. Developmental cell. 2011;21(1):65-76.
131. Houle D, Govindaraju DR, Omholt S. Phenomics: the next challenge. Nature Reviews Genetics. 2010;11(12):855-66.
132. Sequencing Library Construction Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine [12.10.2015]. http://www.hgsc.bcm.edu/content/protocols-sequencing-library-construction.
133. Exome Sequencing Workflow [12.07.2016]. https://en.wikipedia.org/wiki/Exome_sequencing#/media/File:Exome_Sequencing_Workflow_1a.png.
134. Mercury Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine [12.09.2015]. http://www.hgsc.bcm.edu/content/mercury.
135. Genome Analysis Toolkit Variant Discovery in High-Throughput Sequencing Data Broad Institute [11.05.2015]. http://www.broadinstitute.org/gatk.
136. PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs [02.06.2016]. http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/.
137. SIFT J. Craig Venter Institute [02.07.2016]. http://sift.jcvi.org/.

138. mutation t@sting [01.06.2016]. Available from: http://mutationtaster.org/.
139. Online Mendelian Inheritance in Man McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine [01.08.2016]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim.
140. Gene Cards The Human Gene Database Weizmann Instutite of Science [29.07.2016]. http://www.genecards.org.
141. Genome Browser University of California Santa Cruz [26.07.2016]. http://genome.ucsc.edu.
142. Integrative Genomics Viewer Broad Institute [14.08.2015]. http://www.broadinstitute.org/igv/AlignmentData
143. Mouse Genome Informatics The Jackson Laboratory [27.07.2016]. http://www.informatics.jax.org.
144. Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator [23.05.2016]. www.basicnorthwestern.edu/biotolls/oligocalc.html.
145. UCSC In-Silico PCR University of California Santa Cruz [29.07.2016]. http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr.
146. Basic Local Alignment Search Tool U.S. National Library of Medicine [17.06.2016]. www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.
147. dbSNP Short Genetic Variations NCBI [16.06.2016]. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.
148. Ensembl Wellcome Trust Sanger Institute [02.08.2016]. www.ensembl.org/genesnpview.
149. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. New England Journal of Medicine. 2013;369(16):1502-11.
150. Charng WL, Karaca E, Coban Akdemir Z, Gambin T, Atik MM, Gu S, et al. Exome sequencing in mostly consanguineous Arab families with neurologic disease provides a high potential molecular diagnosis rate. BMC Med Genomics. 2016;9(1):42. PubMed PMID: 27435318. Pubmed Central PMCID: 4950750.
151. Alders M, Mendola A, Adès L, Al Gazali L, Bellini C, Dallapiccola B, et al. Evaluation of clinical manifestations in patients with severe lymphedema with and without CCBE1 mutations. Molecular syndromology. 2012;4(3):107-13.
152. Frosk P, Chodirker B, Simard L, El-Matary W, Hanlon-Dearman A, Schwartzentruber J, et al. A novel CCBE1 mutation leading to a mild form of hennekam syndrome: case report and review of the literature. BMC medical genetics. 2015;16(1):1.
153. Alders M, Hogan BM, Gjini E, Salehi F, Al-Gazali L, Hennekam EA, et al. Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. Nature genetics. 2009;41(12):1272-4.
154. Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, Mansour S, Guigue P, Masmoudi S, et al. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. Human mutation. 2011;32(1):70-2.
155. Arte S, Parmanen S, Pirinen S, Alaluusua S, Nieminen P. Candidate gene analysis of tooth agenesis identifies novel mutations in six genes and suggests significant role for WNT and EDA signaling and allele combinations. PLoS One. 2013;8(8):e73705.
156. Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. Genes & development. 2000;14(14):1810-23.

157. Hedera P, Gorski JL. Oculo-facio-cardio-dental syndrome: Skewed X chromosome inactivation in mother and daughter suggest X-linked dominant Inheritance. American Journal of Medical Genetics Part A. 2003;123(3):261-6.
158. Cai J, Kwak S, Lee J-M, Kim E-J, Lee M-J, Park G-H, et al. Function analysis of mesenchymal Bcor in tooth development by using RNA interference. Cell and tissue research. 2010;341(2):251-8.
159. Alfawaz S, Fong F, Plagnol V, Wong F, Fearne J, Kelsell D. Recessive oligodontia linked to a homozygous loss-of-function mutation in the SMOC2 gene. Archives of oral biology. 2013;58(5):462-6.
160. Bloch-Zupan A, Jamet X, Etard C, Laugel V, Muller J, Geoffroy V, et al. Homozygosity mapping and candidate prioritization identify mutations, missed by whole-exome sequencing, in SMOC2, causing major dental developmental defects. The American Journal of Human Genetics. 2011;89(6):773-81.
161. Mostowska A, Biedziak B, Zadurska M, Dunin-Wilczynska I, Lianeri M, Jagodzinski P. Nucleotide variants of genes encoding components of the Wnt signalling pathway and the risk of non-syndromic tooth agenesis. Clinical genetics. 2013;84(5):429-40.
162. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, et al. A new nomenclature for the laminins. Matrix Biology. 1994;14(3):209-11.
163. Salmivirta K, Sorokin LM, Ekblom P. Differential Expression of Laminin Chains During Murine Tooth Development. Developmental dynamics. 1997;210:206-15.
164. Ryan MC, Lee K, Miyashita Y, Carter WG. Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells. The Journal of cell biology. 1999;145(6):1309-24.
165. Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. Gene. 1999;238(2):301-13.
166. Mao B, Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. Gene. 2003;302(1):179-83.
167. Liu H, Zhang J, Wong S, Han D, Zhao H, Feng H. Association between rs11001553 of DKK1 and non-syndromic tooth agenesis in the Chinese Han population. Genetics and Molecular Research. 2014;13(3):7133-9.
168. Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. Nature. 2001;414(6860):225-9.
169. Stránecký V, Hoischen A, Hartmannová H, Zaki MS, Chaudhary A, Zudaire E, et al. Mutations in ANTXR1 cause GAPO syndrome. The American Journal of Human Genetics. 2013;92(5):792-9.
170. Cullen M, Seaman S, Chaudhary A, Yang MY, Hilton MB, Logsdon D, et al. Host-derived tumor endothelial marker 8 promotes the growth of melanoma. Cancer research. 2009;69(15):6021-6.
171. Jumlongras D, Bei M, Stimson JM, Wang W-F, DePalma SR, Seidman CE, et al. A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. The American Journal of Human Genetics. 2001;69(1):67-74.
172. Zhang J, Han D, Song S, Wang Y, Zhao H, Pan S, et al. Correlation between the phenotypes and genotypes of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia and non-syndromic hypodontia caused by ectodysplasin-A mutations. European journal of medical genetics. 2011;54(4):e377-e82.

173. Ayub M, Ur-Rehman F, Yasinzai M, Ahmad W. A novel missense mutation in the ectodysplasin-A (EDA) gene underlies X-linked recessive nonsyndromic hypodontia. International journal of dermatology. 2010;49(12):1399-402.

FORMLAR

Non-sendromik Diş Agenezisi Muayene Formu

Tarih:

Olgu No:

Ad-Soyad: Protokol No:

D.T/ yaşı: DNA No:

Cinsiyet:

Adres bilgileri:

Tel:

Özgeçmiş:

Akrabalık:

Soygeçmiş:

Antenatal/Natal/Postnatal:

Öykü:

Psikososyal motor gelişme:

Aile ağacı:

Fizik muayene:

Baş çevresi: Tartı: Boy:

Ağız-içi bulgular:

Kraniyofasiyal bulgular:

Sistemik muayene:

Panoramik görüntüleme:

Ek tetkikler:

Pozitif bulgular:

TANI:

Moleküler analizler:

MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Proje Adı

"NON-SENDROMİK DİŞ AGENEZİSİ İLE İLİŞKİLİ YENİ GENLERİN VE SİNYAL YOLAKLARININ YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİLERİ İLE ARAŞTIRILMASI"

Tarih:

Bu inceleme, klinik ve radyolojik olarak sporadik ve ailevi non-sendromik diş agenezisi grubunda yer aldığı düşünülen seçilmiş olgularda, oligodonti/hipodonti fenotipine neden olan moleküler patolojinin araştırılması amaçlanmaktadır. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine gönderilen olgularda araştırma amaçlı moleküler incelemelerinin yapılmasına izin vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz.

Aşağıdaki **Moleküler İncelemeler için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı: İnceleme, non-sendromik diş agenezisi grubu olgularında altta yatan nedenin ileri düzeyde aydınlatılmasını amaçlamaktadır. Bu çalışmalar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

İleri moleküler analizlerin yapılması için hastaların tanı amacı ile önceden alınmış olan mevcut doku örnekleri kullanılacaktır. Seçilecek uygun olgularda ileri moleküler yöntemler kullanılarak detaylı tanıya gidilmeye çalışılacaktır. Eldeki örneklerin yetersiz olması ya da kullanılamaması durumunda hastadan yeniden doku (kan, vb) örnekleri almamız gerekebilir. Bu durumda hasta ve aile bilgilendirilecek ve izni alınacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Bu incelemeler için sizden alınan kanlardan elde edilecek örneklerinizin saklanması konusunda lütfen aşağıdaki seçeneklerden birini seçiniz:

a. Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra bölümünüz örnek bankasında saklanmasına izin veriyorum.

b. Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra imha edilmesini istiyorum.

Doku örneğiniz saklandığı takdirde size sorulmadan, izniniz alınmadan hiçbir şekilde 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 gelişmesi durumu.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. 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 ya da babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Olası yararlar: Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan kromozom anomalisini daha detaylı araştırmak ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde 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)

(Tanık Kişi)

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: Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner
Uzm. Dt. Nuriye Dinçkan

Ulaşılabilecek Tel. No.'ları: Direk hat: (0 212) 534 84 40
Dahili hat: (0 212) 414 20 00 – 32564

Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi: .....

İzin: Yukarıda tanımlanan ileri düzey incelemenin uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında şayet vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin/çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım. Araştırma bulguları, ailemdeki genetik hastalığın klinik ve moleküler tanısına ve tedavisine faydalı sonuçlar vermesi durumunda bana rapor edileceğini kabul ettiğimi bildirmek istiyorum.

Adı Soyadı Doğum tarih İmza (Ebeveyn)

Aile üyesi ----------

Aile üyesi ----------

Aile üyesi ----------

Aile üyesi ----------

Aile üyesi ----------

Aile üyesi ----------

Aile üyesi ----------

Aile üyesi ----------

Aile üyesi ----------

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 1414 **Tarih : 16.09.2014**

Konu : Prof.Dr. Hülya KASERİLİ

Sayın Prof.Dr. Hülya KAYSERİLİ
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi :Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 01/09/2014 gün ve 254 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Nuriye DİNÇKAN'ın yürüteceği 2014/1396 dosya numaralı "Non-Sendromik Diş Agenezisi İle İlişkili Yeni Genlerin Ve Sinyal Yolaklarinin Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri İle Araştirilmasi" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/09/2014 tarih ve 15 sayılı sayılı sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ		
	ETİK KURULUN ADI	**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**
	AÇIK ADRESİ:	**İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL**
	TELEFON	**0 (212) 414 21 53**
	FAKS	**0 (212) 414 21 53**
	E-POSTA	**itfetikkurul@istanbul.edu.tr.**

BAŞVURU BİLGİLERİ					
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Non-Sendromik Diş Agenezisi İle İlişkili Yeni Genlerin Ve Sinyal Yolaklarinin Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri İle Araştirilmasi"**			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	**---**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	**Prof.Dr. Hülya KAYSERİLİ**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	**Aile Hekimliği Genetik**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	**İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**			
	DESTEKLEYİCİ	**TÜBİTAK İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	**---**			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Non-Sendromik Diş Agenezisi İle İlişkili Yeni Genlerin Ve Sinyal Yolaklarinin Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri İle Araştirilmasi"**

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	OLGU RAPOR FORMU	■		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:15**	**Tarih: 12/09/2014**
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı görevli **Prof.Dr. Hülya KAYSERİLİ**'nin sorumluluğunda ve Nuriye DİNÇKAN'ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir..	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	**19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik**
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.