

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPİLEPSİLİ VE KORPUS KALLOSUM
ANOMALİLİ ÇOCUKLARDA İLİŞKİLİ
OLABİLECEK GENLERİN
ARAŞTIRILMASI**

ELİF KURT

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2011

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2009970162

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EPİLEPSİLİ VE KORPUS KALLOSUM
ANOMALİLİ ÇOCUKLARDA İLİŞKİLİ
OLABİLECEK GENLERİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ELİF KURT

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Sultan Cingöz

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri
Şube Müdürlüğü tarafından 2008 K.B.SAG.013 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2009970162

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Elif Kurt ‘**EPİLEPSİLİ VE
KORPUS KALLOSUM ANOMALİLİ ÇOCUKLARDA İLİŞKİLİ
OLABİLECEK GENLERİN ARAŞTIRILMASI**’ konulu Yüksek Lisans
tezinitarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

ÜYE

ÜYE

İÇİNDEKİLER

Tabloların Listesi.....	I
Şekillerin Listesi.....	II
Kısaltmalar.....	III
Teşekkür.....	IV
Özet (Türkçe).....	1
Özet (İngilizce).....	2
1.Giriş ve Amaç	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1 Korpus Kallosum.....	5
2.1.1 Evrimsel Açıdan Korpus Kallosum.....	5
2.1.2 Anatomik Olarak Korpus Kallosum.....	6
2.1.3 Korpus Kallosum'un Embriolojisi ve Yapısı.....	7
2.1.4 Korpus Kallosum'un Gelişimi.....	8
2.1.5 Korpus Kallosum'un Fonksiyonu.....	11
2.2 Korpus Kallosum Displazileri.....	12
2.3 Korpus Kallosum Displazilerinin Genel Klinik Özellikleri.....	13
2.3.1 Genetik Faktörler.....	13
2.3.2 Çevresel Faktörler.....	16
2.4 Korpus Kallosum ve Epilepsi.....	16
2.5 AKT Gen Ailesi ve AKT3 Hakkında Genel Bilgiler.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1. Araştırmanın Tipi.....	21
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	21
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	21
3.4. Çalışma Materyali.....	21
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	22
3.6. Veri Toplama Araçları.....	22

3.6.1 Hasta-Kontrol Gruplarının Belirlenmesi ve Periferik Kan Örneklerinin Alımı.....	22
3.6.2 Periferik Kandan Kromozom Analizi.....	23
3.6.2.1 Ortam Hazırlama.....	23
3.6.2.2 Kan Örneklerinin Ortamlara Ekimi.....	24
3.6.2.3 Periferik Kandan Hücre Eldesi (Harvest İşlemi).....	25
3.6.2.4 Yıkama İşlemi.....	26
3.6.2.5 G Bantlama İle Konvansiyonel Sitogenetik Analiz.....	27
3.6.2.5.1 Damlatma İşlemi.....	27
3.6.2.5.2 Boyama İşlemi.....	28
3.6.2.5.3 Kromozom Analizi (Karyotipleme).....	30
3.6.3 Alınan Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	30
3.6.3.1.İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Saptanması.....	33
3.6.4. PCR İle Belirlenen Gen Bölgelerinin Çoğaltılması.....	34
3.6.4.1. PCR'da Kullanılan Komponentler.....	34
3.6.4.2. Primerlerin Dizayn edilmesi.....	35
3.6.4.3 Primerlerin Hazırlanması.....	37
3.6.4.4 PCR'ın Hazırlanışı.....	37
3.6.4.4.1 <i>AKT3</i> geninin ekzonlarının ve ekzon/intron sınırlarının çoğaltılması.....	38
3.6.4.5 PCR Ürünlerinin Agoroz Jelde Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler.....	43
3.6.5. Kullanılan malzeme listesi.....	45
3.7. Araştırma planı.....	46
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	47
3.8.1. PCR Ürünlerinin Sekans Analizleri.....	47
3.8.1.1. Karşılaştırma (BLAST) Analizi.....	48
3.8.1.2. Dizi Analiz Programının Kullanılması.....	48
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları.....	48
3.10. Etik Kurul Onayı.....	48

4. BULGULAR	49
4.1. Olgu Grubunun Oluşturulması.....	49
4.2. G Bantlama İle Konvansiyonel Sitogenetik Analiz Sonuçları.....	50
4.3. Belirlenen bölgelerin PCR ile çoğaltılması ve görüntülenmesi.....	52
4.3.1. Çoğaltılan AKT3 Gen Bölgelerinin Jel Görüntüleri.....	52
4.3. DNA Dizi Analizi Verileri.....	81
5. TARTIşMA	84
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	91
EK-1 Hasta Bilgilendirme Ve Onam Formu	

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Farede korpus kallosum gelişimi sırasında malformasyona neden olan genler.....	10
Tablo 2.2. KK Displazisi İle İlişkili İnsan Konjenital Sendromları.....	14
Tablo 2.3. <i>AKT3</i> Gen Özellikleri.....	19
Tablo 2.4. <i>AKT3</i> Protein Özellikleri.....	20
Tablo 3.1. Kan örneklerinin ekildiği ortam içeriği.....	24
Tablo 3.2. Çoğaltılan bölgelerin ve kullanılan primer dizilerinin listesi.....	36
Tablo 3.3. <i>AKT3</i> geninin 1, 5, 6, 7, 8, 10 ve 13. ekzonları için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	38
Tablo 3.4. <i>AKT3</i> geninin 2. ekzonu için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	39
Tablo 3.5. <i>AKT3</i> geninin 12. ekzonu için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	39
Tablo 3.6. <i>AKT3</i> geninin 3. ekzonu için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	40
Tablo 3.7. <i>AKT3</i> geninin 4. ekzonu için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	40
Tablo 3.8. <i>AKT3</i> geninin 9 ve 11. ekzonları için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları	41
Tablo 3.9. <i>AKT3</i> gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR profilleri.....	41
Tablo 3.10. Kullanılan malzemelerin listesi.....	45
Tablo 3.11. Araştırma planı.....	47
Tablo 4.1. Dizi analizi yapılan bölgelerde saptanan nükleotid değişiklikleri.....	82
Tablo 4.2. Nükleotid değişikliklerinin olgu grubundaki genotip ve allel yüzdeleri.....	82
Tablo 5.1. Ep-11-251 no'lu hastanın 2. ekzonunda saptanan T>TA:42P>P/P nükleotid değişikliği'nin değerlendirilmesi.....	89

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 KK'un sagittal (yandan görünüş) düzleminden ve üst taraftan görünüşü.....	5
Şekil 2.2 KK'un nöroanatomisi.....	6
Şekil 2.3 Korpus Kallosum'un bölümleri.....	8
Şekil 2.4 Korpus Kallosum'un gelişimi.....	9
Şekil 2.5 T1-ağırlıklı orta hat sagittal magnetik rezonans görüntüleri.....	12
Şekil 2.6 AKT Gen Ailesinin görev aldığı biyolojik prosesler.....	18
Şekil 4.1 G bantlama.....	52
Şekil 4.2 AKT3 geninin 1. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	55
Şekil 4.3 AKT3 geninin 2. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	57
Şekil 4.4 AKT3 geninin 3. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	59
Şekil 4.5 AKT3 geninin 4. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	61
Şekil 4.6 AKT3 geninin 5. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	64
Şekil 4.7 AKT3 geninin 6. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	66
Şekil 3.8 AKT3 geninin 7. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	68
Şekil 4.9 AKT3 geninin 8. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	70
Şekil 4.10 AKT3 geninin 9. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	72
Şekil 4.11 AKT3 geninin 10. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	74
Şekil 4.12 AKT3 geninin 11. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	77
Şekil 4.13 AKT3 geninin 12. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	79
Şekil 4.14 AKT3 geninin 13. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.....	81
Şekil 4.15 2. ekzonda saptanan nükleotid değişikliğinin kromatogram görüntüsü	83
Şekil 4.16 4. ve 5. ekzonlar arasındaki intronik bölgede saptanan nükleotid değişikliğinin kromatogram görüntüsü.....	83
Şekil 5.1 Farklı 1q44 submikroskobik delesyonları.....	86
Şekil 5.2 MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) ve farklı mikroarray platformları ile tanımlanmış farklı uzunluktaki 1q delesyonları.....	88
Şekil 5.3. Ep-11-277 no'lu hastanın 4. ve 5. ekzonları arasındaki intronik bölgede saptanan T>TA nükleotid değişikliği'nin değerlendirilmesi.....	89

KISALTMALAR

ACC: Korpus Kallosum Agenezi

AKT3: V-akt murine thymoma viral oncogen homolog 3

bp: Baz Çifti

DMSO: Dimetil Sülfoksit

dNTP: Deoksiribonükleotit

EB: Etidyum Bromür

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

GW: Glial wedge

IG: Indusium griseum

IGG: Indusium griseum glia

kb: Kilo Baz

KK: Korpus Kallosum

MZG: Midline zipper glia

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TBE: Tris-Borat-EDTA

TEŞEKKÜR;

Benim için oldukça yoğun ve öğretici geçen bir yüksek lisans dönemini tamamlamaktan dolayı mutluluk duyuyorum. Öncelikle bu dönemde desteğini esirgemeyen danışman Hocam Doç. Dr. Sultan Cingöz’e teşekkür ederim.

Tez projemizde yer alan hastaların tanılarının konmasında ve proje için gereken tüm katkıları sağlamaları nedeniyle Prof. Dr. Ayşe Semra Hız Kurul’a ve tüm Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD. Çocuk Nöroloji Bilim Dalı’na teşekkür ederim.

Her ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen ve yol gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Neşe Atabey’e, Prof. Dr. Meral Sakızlı’ya, Doç. Dr. Esra Erdal’a ve tüm Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Lisansa başladığım ilk gün tanıştığım ve bir daha da ayrılmadığım sevgili dostum Seçil Kaya’ya ayrıca teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen laboratuvar arkadaşım Sinem Ağıkaya’ya, her zaman desteğini hissettiğim Elif Kutlu Özen’e, hiçbir sorumu saçma bulmayan ve sabırla cevaplayan tüm Anabilim Dalı öğrencilerine teşekkür ederim.

Ayrıca babamı sağlığına kavuşturarak bana dünyaları veren Doç. Dr. Cenk Erdal’a çok teşekkür ederim.

Tanıdığım günden itibaren eşsiz bir insan olduğu düşüncesinde bir an bile tereddüt etmediğim, harika bir eğitici, dost ve kardeş olan sevgili Ablam Dilek Özdemir’e sonsuz teşekkürler.

Son olarak, maddi ve manevi her zaman yanımda olan ve desteklerini yürekten hissettiğim sevgili Babama, sevgili Anneme, canım Ablama ve Cansuyum’a çok teşekkür ederim.

ÖZET

EPİLEPSİLİ VE KORPUS KALLOSUM ANOMALİLİ
ÇOCUKLARDA İLİŞKİLİ OLABİLECEK GENLERİN
ARAŞTIRILMASI

Elif Kurt

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.
Balçova- İZMİR

Korpus Kallosum (KK) birçok duyu ve motor fonksiyonlarında önemli rol oynar. Üç boyutlu görebilmede, görsel bilgilerin ayrımını yapabilmeye, sesin lokalizasyonunda, bimanuel koordinasyonda ve birçok öğrenme proseslerinde iki hemisferi birbirine bağlayarak görev yapmaktadır. KK displazileri (anomalileri) çok sayıda konjenital sendromlarla ilişkilidir. Bunun yanında metabolik hastalıkları ve sendromları da içeren bir çok serebral ve/veya ekstraserebral anomalilerle birlikte de görülür. Prevelansı genel populasyonda 0.3% ve 0.7% arasında değişir. KK displazisi farklı sendromlarla birlikte kötü bir prognoza sahip olabilmektedir. KK displazili bireylerde en yaygın klinik özellik epileptik nöbetlerle birlikte zeka geriliğidir. Son dönem araştırmalarda *AKT3* geninin KK anomalileri ile ilişkisi tartışma konusu olmuştur. Bu sebeple sahip olduğumuz olgu grubunda ilk olarak bu gende mutasyon taraması yapılmıştır. Hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptoz, tümörijeniz, gibi birçok biyolojik proseste yer alan *AKT3* geninin tüm ekzonları ve ekzon intron sınırları PCR ile çoğaltılarak DNA dizi analizleri gerçekleştirildi. 47 hasta grubunda gerçekleştirilen bu çalışmada iki farklı nükleotid değişikliği saptandı. Bu iki nükleotid değişikliğinden biri ekzon içerisinde olup amino asit değişikliğine neden olmamakta (sessiz mutasyon), diğeri de intronik bölgede olup korunmuş bölgelerin içerisine girmemektedir. Bu nedenle bu değişimlerin *AKT3* proteinini yapısal ve fonksiyonel açıdan etkilediği düşünülmemektedir. Eldeki veriler yardımıyla *AKT3* geninin KK'un gelişimsel bozuklukları ile ilişkili olup olmadığı tartışmasına olmadığı yönünde katkı sağlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Korpus Kallosum Displazisi (Anomalisi), Epilepsi, *AKT3* geni.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EPILEPSY AND CORPUS CALLOSUM DYSPLASIA ASSOCIATED GENES WITHIN CHILDREN

Elif Kurt

Department of Medical Biology and Genetics, Dokuz Eylül University School of Medicine, Balçova- İZMİR/ TURKEY kurt.elif@hotmail.com

The corpus callosum(CC) which connects two hemispheres, has been found to play a role in various sensory and motor functions such as binocular convergence and stereoscopic vision, the transfer of learned visual discrimination, bimanual coordination, sound localization, various learning processes. Dysplasia of the corpus callosum is a birth defect that occurs in many different human congenital syndromes. Dysplasia of CC is often associated with other cerebral and/or extracerebral malformations including syndromes and metabolic diseases. Its prevalence varies between 0.3% and 0.7% in the general population. Prognosis of dysplasia of CC remains controversial, several studies have reported a worse prognosis in the presence of additional anomalies. The most common clinical feature is mental retardation together with epilepsy. Recently, there is a controversial topic that *AKT3* associated with dysplasia of CC among the researchers. Because of this, we initially researched for any mutation in this gene. All of the exon and exons/introns boundaries of *AKT3* gene that plays a role in a wide variety of biological processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, tumorigenesis, as well as glycogen synthesis and glucose uptake has been amplified by Polymerase Chain Reaction(PCR) followed by DNA sequencing. As a result of sequence analysis we detected two nucleotide changes in 47 patients with dysplasia of CC. However, it is uncertain how these two nucleotide changes modify structural and functional features of *AKT3*. We aim to contribute to controversy about *AKT3* gene association with dysplasia of CC with our results.

KEY WORDS Displasia (Anomaly) of Corpus Callosum, Epilepsy, *AKT3*.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Korpus kallozum (KK), sağ ve sol serebral hemisferleri birbirine bağlayan en büyük fiber demetidir. Her iki hemisferin homolog alanları arasındaki duyusal, motor ve bilişsel bilginin iletilmesinde bütünleştirici bir rol oynar. KK gelişim bozuklukları (displazileri) kısmi agenezi (disgenezi), hipoplasia ve tam agenezi olarak tanımlanır.

KK displazisi, 50'den fazla farklı konjenital sendromla birlikte görülebilir. Bunlardan bazıları, Andermann sendromu, Rubinstein-Taybi sendromu, Joubert sendromu, Wolf-Hirschhorn sendromu, Aicardi sendromu gibi sendromlardır (1, 2, 3). KK metabolik hastalıklar, enfeksiyöz hastalıklar ve beyin tümörleri gibi birçok patolojik durumdan da birincil ya da ikincil olarak etkilenebilir. Kollosal malformasyonlarda otozomal resesif geçişi destekleyen birkaç etkilenmiş aile üyesinin tanımlandığı soyağaçlarının bildirilmesine rağmen, vakaların çoğu sporadik olarak görülür (4).

1965'te yayınlanan bir çalışmada, 210 kallosal agenezili vakanın 185'i asemptomatik bulunmuş ve bunların 1/3'ünün kısmi agenezisi olduğu belirtilmiştir. 1965'ten sonra radyodiagnostik bilimdeki ilerlemeler sayesinde asemptomatik agenezinin rutin muayeneler sırasında tespit edilebilmesiyle, korpus kallosum agenezisi'nin insidansının tahmin edilenden daha yüksek olduğu anlaşılmaya başlanmıştır (5). İnsidans aralığı 10.000 doğumda 0,5 ile 70 arasında değişir (6).

KK'un yapısı ve fonksiyonu yalnızca her iki hemisferi birbirine bağladığını gösteren kanıtlar nedeniyle değil psikiyatrik ve gelişimsel bozukluklarla olan ilişkisi nedeniyle de ilgi çeken bir araştırma konusudur. Örneğin, anormal bir KK'a sahip olan hastalara şizofreni, otizm (7), Down sendromu (8), dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (9), gelişimsel disleksi (10; 11) gibi teşhisler konulabilmektedir. Bu sebeplerle KK displazili hastalarda bununla ilişkili olabilecek gen ve kromozomal bölgelerin

araştırılması oldukça önemli ve merak uyandıran konulardan biridir. Literatürde korpus kallosum abnormaliteleri ile ilişkili olduğu düşünülen kromozomal bölgeleri tanımlayan birkaç makale vardır (12).

Bir önceki çalışmada 1q terminal delesyonu olan KK Displazili 2 hasta bireyin karyotipleme, array CGH ve FISH yöntemleri ile karakterizasyonları yapıldı ve delesyonların 1q43-44 bölgesinde çakıştığı saptandı. Bu bölgenin içerdiği genlerden biri de *AKT3* genidir. Bir önceki çalışmanın ışığında ve yapılan literatür araştırmaları sonucu elde edilen verilere göre kendi çalışmamızda, sahip olduğumuz hasta grubunda (47 KK'lu vakada) *AKT3* geninin KK malformasyonları ile ilişkili olabileceği düşünülerek bu gende mutasyon taraması yapılmıştır. Bunun yanı sıra hasta grubunun konvansiyonel sitogenetik analizleri de gerçekleştirilmiştir.

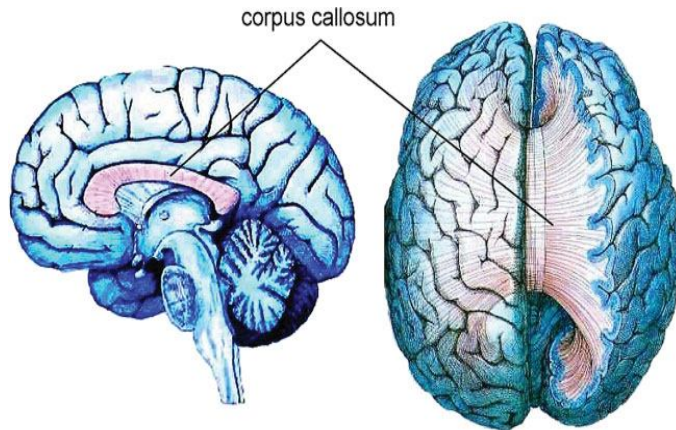
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Korpus Kallosum

2.1.1 Evrimsel Açıdan Korpus Kallosum

Korpus kallosum, plasental memelilerin beyinlerindeki majör interhemisferik fiber demetidir (13). İnsanlardaki KK yaklaşık olarak 200 milyon akson içerir ve bu özelliği KK'ı merkezi sinir sisteminin en büyük fiber demeti yapar (14; 15). KK yalnızca plasental memelilerde (Eutheria) bulunur. Bunun dışında günümüze kadar yapılan araştırmalarda nonplasental memelilerde KK gözlenmemiştir (13; 16).

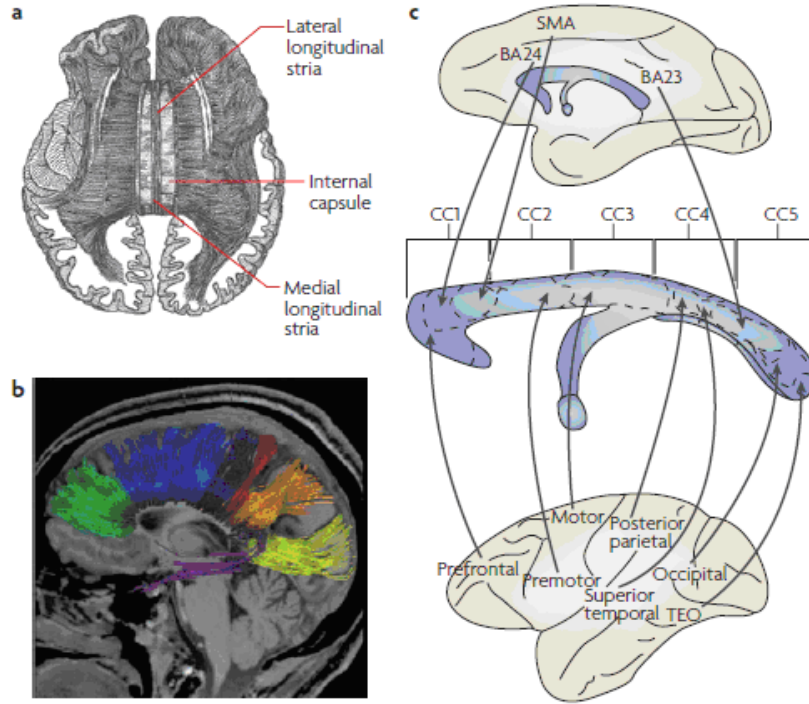
Nonplasental türlerde herhangi bir homolojik prekürsör yapıya rastlanmaması KK'un evrimsel bir yenilik olarak tanımlanmasına sebep olmuştur (17; 18; 19; 20; 13) (Şekil 2.1). Darwin'nin evrim teorisinden bu yana, bilim adamları KK gibi kompleks bir yapının, genetik mutasyonların birikimi ve doğal seçilim ile oluşmuş olabileceğini düşünmektedirler (20).



Şekil 2.1 KK'un sagittal (yandan görünüş) düzlemden ve üst taraftan görünüşü (21).

2.1.2 Anatomik Olarak Korpus Kallosum

Sağ ve sol beyin hemisferlerindeki ilgili merkezleri birbirine bağlayan, kalın miyelinli liflerden oluşmuş bir yoldur. *Fissura longitudinalis serebri*'nin tabanını ve *ventriculus lateralis*'lerin büyük bir kısmının tavanını oluşturan korpus kallosum, yaklaşık 8 cm uzunluğundadır. Korpus kallosum'a ait lifler, laterale doğru gittikçe yelpaze şeklinde açılarak korteks serebri'nin çeşitli bölgelerine gider. Korpus kallosum'un üzeri *indusium griseum* (*gyrus supracallosi*) adı verilen ince bir gri cevher tabakasıyla örtülüdür (22). Korpus kallosumun nöroanatomişi açık bir şekilde Şekil 2. 2'de gösterilmiştir (23).



Şekil 2.2 KK'un nöroanatomişi.

a-) Histolojik açıdan insan KK'ü b-) Difüzyon Magnetik Rezonans Görüntüleme (dMRI) ve Traktografi ile KK; prefrontal lop (yeşil), premotor ve ilave motor bölgeler (açık mavi), primer motor bölgeler (koyu mavi), primer duyu korteksi (kırmızı), parietal lop (turuncu), oksipital lop (sarı), ve temporal lop (mor) c-) Araştırmacıların maymunlar üzerinde kullandıkları izlenebilen kimyasallar sayesinde oluşturulan KK haritası; BA23, Brodmann bölgesi; CC, Korpus Kallosum; SMA, İlave Motor Bölgeleri.

2.1.3 Korpus Kallosum'un Embriolojisi ve Yapısı

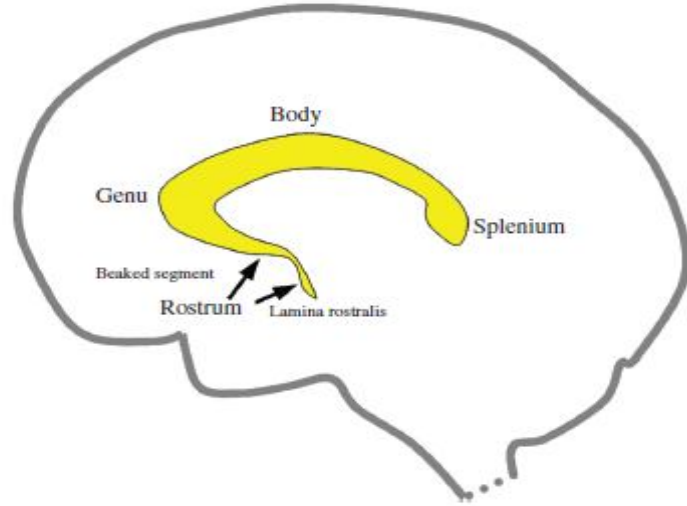
Korpus Kallosum ilk olarak gebeliğin 10-11. haftalarında belirmekte ve 12-13. haftalarda temel kollasal düzlem görülmektedir (24). Korpus Kallosum ilk olarak kuyruk kısmından büyümeye başlar daha sonra gaga şeklinde bir yapı oluşturacak şekilde gelişir. Miyelinizasyon ise yavaşça gerçekleşen bir süreçtir ve ergenlik çağında tamamlanır (25). Miyelinizasyon da kuyruk kısmından başlar ve korpus kallosumun gelişimine paralel olarak (spleniumdan genu ve rostruma doğru) gelişmeye devam eder (26).

Korpus kallosum iki hemisferin homolog kortikal bölgelerini birbirine bağlar (25). Korteksin ön (anterior) bölgeleri korpus kallosumun ön yollarıyla, korteksin arka (posterior) bölgeleri de yine KK'un arka yollarıyla bağlantılıdır (27).

Korpus kallosum önden arkaya doğru rostrum, genu, gövde ve splenium olmak üzere dört kısma ayrılır (Şekil 2.3). Rostrum'u oluşturan lifler her iki *lobus frontalis*'in orbital yüzlerini, genu'yu oluşturan lifler ise öne doğru kıvrılarak her iki *lobus frontalis*'in çeşitli kısımlarını birbirine bağlar. Genu'yu oluşturan liflerin meydana getirdiği kıvrıma *forceps minor* adı verilir. Korpus kallosumun orta kısımları motor ve somatosensori bölgelerini birbirine bağlar. Korpus kallosumun gövde kısmından geçen lifler laterale doğru, splenium kısmından geçen lifler ise arkaya doğru uzanarak iki hemisfer arasında yoğun bağlantılar sağlar. Splenium'u oluşturan lifler mediale doğru bir seyir takip ederek her iki oksipital lobun içerisine girer; bu liflerin meydana getirdiği kıvrıma *forceps major* adı verilir. Gövde ve spleniumdan ayrılan liflerin bir kısmı *ventriculus lateralis*'in *cornu inferius*'unun lateral duvarını, *cornu posterius*'un ise tavanını ve lateral duvarını meydana getirir (22).

Korpus kallosum fiberleri iki tiptir. Büyük çaplı fiberler duyu- motor koordinasyonuna yardımcı olurken, küçük çaplı fiberler buna yardım eden

bölgeleri birbirine bağlarlar. Küçük çaplı fiberler çok sayıdadır. Korpus kallosumun boyutundaki bireysel farklanmalar, küçük çaplı fiberlerin kompozisyonundan kaynaklanmaktadır ve bu fiberlerin serebral hemisferlerde eksitasyon ve inhibisyon arasındaki dengenin sağlanmasında önemli olduğu düşünülmektedir (28).



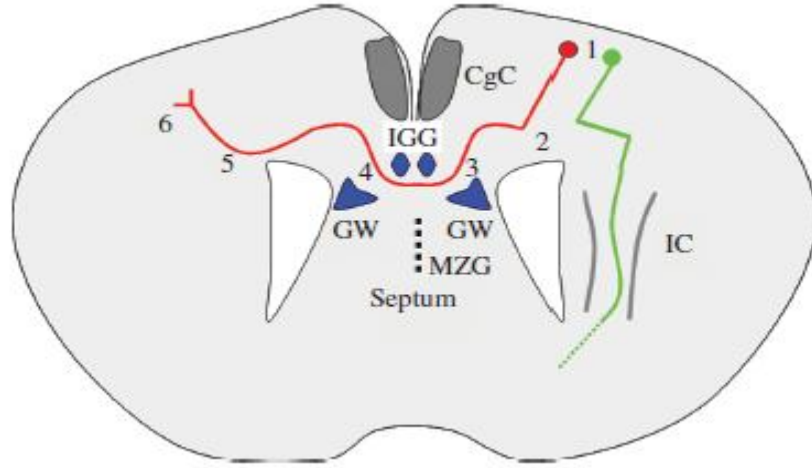
Şekil 2.3 Korpus Kallosum'un bölümleri. Korpus kallosum'un farklı bölgelerini gösteren sagittal görünümün şematik tasfiri.

Rostrum, *lamina rostralis* ve gaga şeklindeki segmentten (beaked segment) oluşmaktadır. Rostrum'u genu, gövde ve splenium takip eder. İnsanda *lamina rostralis* ve gövdenin burun kısmı ilk kollasal aksonların çapraz yaptığı bölge olarak rapor edilmiştir (29).

2.1.4 Korpus Kallosum'un Gelişimi

Korpus kallosumun gelişimi çok sayıda farklı selüler ve moleküler mekanizmalara dayanır (Şekil 2.4). İlk olarak orta hat glial populasyon oluşumu gerçekleşir. Daha sonra kollasal aksonların orta hat'a doğruca yönelmesi ve çaprazlanmanın doğru bir şekilde gerçekleşmesi için spesifik moleküller eksprese edilir. Bununla birlikte singulat kortekste sinir hücrelerinden çıkan öncü aksonlar tarafından oluşturulan metabolik yolda, neokorteks sinir hücreleri kaynaklı kollasal aksonlarca kullanılan ilave

mekanizmalar da gelişir. Fare ve insanlardan elde edilen veriler rostrokaudal ve dorsoventral eksen boyunca korpus kallosumun gelişimini kontrol eden farklı mekanizmaların olduğunu gösterir (Tablo 2.1). Bu kompleks gelişim süreci insanlarda rastlanan çok sayıdaki konjenital sendromlarla birlikte korpus kallosum displazilerinin de görülmesini mantıklı kılmaktadır (29).



Şekil 2.4 Korpus Kallosum'un gelişimi (29).

Neokorteksteki sinir hücreleri kaynaklı aksonlar rehber faktör Sema3A etkisiyle ara zona doğru ilerler (1) (30). Ara zona ulaşan aksonlar orta hata doğru döner (2) (31). Bu nokta kollasal aksonların internal kapsüle (IC) doğru ilerleyen aksonlardan ayrıldığı noktadır. Sonra kollasal aksonlar gelişerek singulat kortekse (CgC) doğru yaklaşırlar. Bu noktada aksonlar dönerek orta hatta çapraz oluştururlar (3). Aksonlar burada ortahat glial yapılarla karşılaşır (IGG, *indusium griseum glia*; GW, glial wedge). Bu glial yapılar da aksonları regüle eder ve aksonlar orta hatta ilerlemeye devam eder. Karşı hemisferde tekrar glial popülasyonla (IG) karşılaşılırlar (4). Buradan singulat kortekse ve daha sonra kontralateral neokortekse girerler (5) (32, 33, 34). Son olarak aksonlar hedef bölge ve nöronlara ulaşabilmek için radial glial fiberleri kullanılırlar ve doğru hedef bölgeye ulaşılırlar (6) (35, 36). (MZG, midline zipper glia).

Tablo 2.1. Farede korpus kallosum gelişimi sırasında malformasyona neden olan genler (29)

Gene	Mouse loci	Human loci
Guidance molecules/receptors		
DCC	18 45.0 cM	18q21.3
EphA5	5 43.0 cM	4q13.2
EphB2 (Sek4)	4 65.7 cM	1p36.1–36.5
EphB3 (Nuk)	16 B1-B4	3q21–qter
fzd3	14 27.0 cM	8p21
Netrin1	11 B3	17p13–p12
Npn1	8 73.0 cM	10p12
Slit2	5 B3	4p15.2
Transcription factors		
Emx1	6 35.5 cM	2p14–p13
Emx2	19 53.5 cM	10q26.1
Hesx1	14 A3-B	3p21.2–p21.1
Nfia	4 45.8 cM	1p31.3–p31.2
Pax6	2 58.0 cM	11p13
Vax1	19 53.5 cM	10q26.1
Tlx	10 25.5 cM	6q21
Extracellular matrix molecules		
Ankyrin _B (ankyrin2)	3 62.5 cM	4q25–q27
L1 CAM	X 29.51 cM	Xq28
Signaling/Cytoplasmic molecules		
βAPP	16 56.0 cM	21q21.2
CREB1	1 31.0 cM	2q34
GAP43	16 29.5 cM	3q13.1–q13.2
MAP1B	13 51.0 cM	5q13
MARCKS	10 22.0 cM	6q22.2
macMARCKS (MLP)	4 59.0 cM	1p34.3
Mena (Enah)	1 98.7 cM	1q42.13
p35 (cdk5R1)	11 46.5 cM	17q12
cdk5	5 12.0 cM	7q36
p190-A RhoGAP	unknown	19q13.3
PTP6	17 33.8 cM	19p13.3
Arx	X C1	Xp22.1–21.3
Jip3	17 A3.3	16p13.3
FE65	7 46.6 cM	11p15
FE65L1	5 C3.1	4p14
Growth factors		
FGF8	19 45.0 cM	10q24
IGFBP-1	11 1.3 cM	7p13–p12
ACC mouse strains		
BTBR T/+ <i>tf/</i>		
Ckr		
BALB/cWah1 9XCA/Wah		

2.1.5 Korpus Kallosum'un Fonksiyonu

Birçok araştırmacı korpus kallosumun bir bütün olarak fonksiyon gösterdiğini düşünmüş fakat bu varsayım günümüzde tamamen geçersiz olmuştur. Banich (1995), farklı türdeki bilgilerin korpus kallosumun farklı bölümleri tarafından iletildiğini öne sürmüştür (p. 431) (27). Korpus kallosum beyinde birçok farklı bölgelerle iletişim halindedir ve fiberlerin miyelinizasyon dereceleri farklıdır. Chiarello (1995, p. 177), fonksiyon oluşumu takip ediyorsa, çok çeşitli kollasal fonksiyonların ve interhemisferik bağlantıların mevcut olduğunu savunmuştur (37). Bu görüşler korpus kallosumun bir bütün olarak fonksiyon gösterdiği düşüncesine meydan okumuştur ve yapılan araştırmalar sonucu korpus kallosumun farklı bölümlerinin birbirinden bağımsız olarak davranış gösterdiği anlaşılmıştır (84).

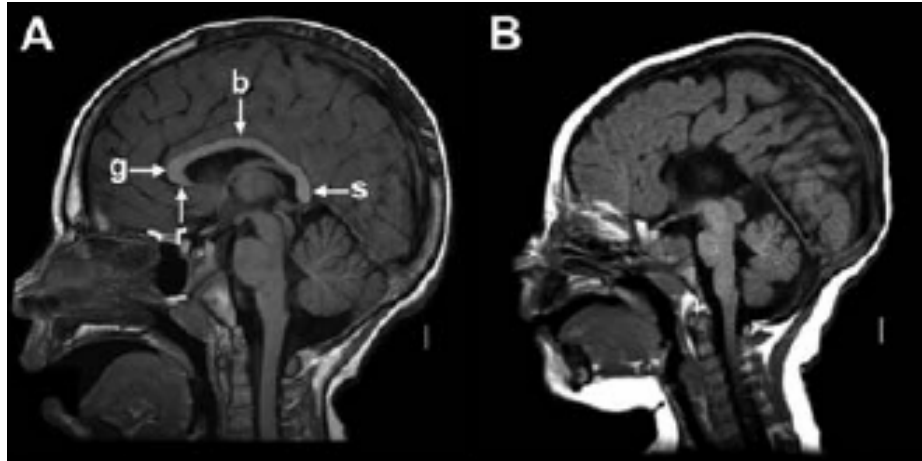
Korpus kallosum bir çok duyu ve motor fonksiyonlarında önemli rol oynar. Üç boyutlu görüşün sağlanmasında (stereoskopik görüş) ve görme olayı sırasında iki ayrı görüntünün tek bir görüntü şeklinde algılanmasında (38), öğrenilmiş görüntüler arasındaki benzerlik ve farklılıkların ayırımını yapabilmeye (31), her iki hemisferde de oluşan görüntülerin orta hat füzyonunda (40), biamuel kooordinasyonda (41), ses lokalizasyonunda (13) işlev görür. Korpus kallosumun görme olayı sırasında her iki hemisferde oluşan görüntülerin çakışmasını iki hemisfer arasındaki bağlantıyı yüksek hızda kurarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (15; 42).

Korpus kallosumun hemisferler boyunca çeşitli nöron toplulukları arasında iletişim kurarak bu toplulukların aktivasyonuna yardımcı olduğu ve böylece nöron topluluklarının gelişimsel iletişimde ve çeşitli öğrenme proseslerinde de rol oynadığı düşünülür (43).

2.2 Korpus Kallosum Displazileri

Literatürlerde kallosal malformasyonları (displazileri) tanımlamak için birkaç farklı terim kullanılmaktadır. Korpus kallosum agenezi (ACC), KK'un tam yokluğunu ifade ederken (Şekil 2.5), kısmi KK yokluğu için hipogenez, kısmi agenezi veya disgenezi terimleri kullanılmaktadır. Hipoplazi terimi ise bütün segmentlerin var olduğu fakat anormal bir biçimde ince olduğu veya KK'un kısa görüldüğü fakat onun dışında herhangi bir anormallik tespit edilmediği durumlarda kullanılır (4; 44; 45).

Prevelansı farklı çalışmalarda değişiklik gösterse de genel popülasyonda 0.3% ve 0.7% arasında değişir (46). ACC, metabolik hastalıkları ve sendromları da içeren bir çok serebral ve/veya ekstraserebral malformasyonlarla birlikte görülebilir (48; 50). ACC'nin prognozu hala tartışma konusu olsa da farklı sendromlarla birlikte kötü bir prognoza sahip olduğu rapor edilmiştir (47; 49).



Şekil 2.5 T1-ağırlıklı orta hat sagittal magnetik rezonans görüntüleri. A. normal bir korpus kallosuma sahip birey, rostrum (r), genu (g), gövde (b), ve splenium (s). B. 1q44 delesyonuna sahip bir bireyde korpus kallosum agenezi (12).

2.3 Korpus Kallosum Displazilerinin Genel Klinik Özellikleri

Son dönem araştırmalarında KK anomalili bireylerin bazılarında (çocuklarda) davranışsal ve nöropsikiyatrik problemlerin meydana geldiği saptanmış, bunun yanında; öğrenme güçlüğü (51), uyku bozuklukları (52), dil ve sosyal iletişim problemleri (53), görme (54) ve beslenme problemleri görülmüştür. En yaygın klinik tablo ise epileptik nöbetlerle birlikte görülen zeka geriliğidir (4).

2.3.1 Genetik Faktörler

İnsanlarda, korpus kallosum malformasyonlarının genetik nedenleri çok çeşitlidir ve KK gelişiminin kompleksliği ile bağlantılıdır. Elde edilen son verilere göre tek gen Mendelian mutasyonları, tek gen sporadik mutasyonlar, kompleks genetik mutasyonlar (hem kalıtsal hem de sporadik mutasyonların karışımı) gibi genetik mekanizmaların birleşmesinin malformasyon oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir.

Literatürdeki veriler değerlendirildiğinde vakaların yaklaşık %30-45'nin tanımlanabilir nedenleri, %10'nun kromozomal anomalileri ve geriye kalan %20-35'nin tanımlanmış genetik sendromları olduğu görülmektedir. Yalnızca tam agenezi görülen bireyler değerlendirildiğinde tanımlanmış sendromları olan hastaların yüzdesi %10-15'e düşer. Bu durumda tam agenezi görülen hastaların %75'nin nedenleri tanımlanamamıştır (55). İnsan konjenital sendromları ile KK displazileri arasında ilişki kuran Tablo 2.2 aşağıda verilmiştir (29).

Tablo 2.2. KK Displazisi İle İlişkili İnsan Konjenital Sendromları

Disorder/OMIM number	Phenotype	Region	Gene
Autosomal dominant			
Apert syndrome/101200	ACC, Hypoplastic	10q26	FGFR2
Basal cell nevus/109400	ACC	9q31	PTCH 9q22.3 GLI3
Greig cephalopolysyndactyly Syndrome/175700	ACC	7p13	
Kallmann syndrome 2/147950	ACC	8p11.2-p11.1	FGFR1
Lissencephaly type I/247200	ACC, Hypoplastic	17p13.3	LIS1, 14-3-3, ABR, CRK, MYO1C, SKIP, PITPNA, RILP, SERPINF1, CREBBP
Rubinstein-Taybi syndrome/180849	ACC	16p13.3	
SOD (Septo-Optic dysplasia)/182230	ACC	3p21.2-p21.1	HESX1
Sotos syndrome/117550	ACC, Hypoplastic, Hypoplastic (Caudal only)	5q35	NSD1
Autosomal recessive			
Andermann syndrome/218000	ACC, Hypoplastic	15q13q14	SLC12A6
Aniridia type II/106210	ACC (homozygotes only), Agenesis of the Anterior Commissure	11p13	PAX6
Desmoterolosis/602398	ACC, Hypoplastic	1p33-p31.1	DHCR24
Fukuyama muscular dystrophy/253800	Partial ACC	9q31	FCMD
Hemifacial microsomia/164210	Partial ACC (Rostral)	14q32	
Joubert syndrome 1/213300	Hypoplastic, and occasional ACC	9q34.3, 2q13	NPHP1
Lyon syndrome (Encephalopathy, axonal, with necrotizing myopathy, cardiomyopathy, and cataracts)/225740	ACC likely due to axonal atrophy, Hypoplastic, Other midline defects		
Macrocephaly with multiple epiphyseal dysplasia and distinctive facies/607131	ACC	15q26.1	
Meckel syndrome/249000	ACC, Partial ACC	17q21q23	
Microcephalic osteodysplasia dwarfism I/210710	ACC		
Mowat-Wilson syndrome (Hirschprung disease Syndrome)/235730	Hypoplastic, partial ACC (rostral), agenesis of anterior commissure	2q22	ZFX1B
Toriello-Carey syndrome/217980	ACC, partial ACC, Hypoplastic		
Vici syndrome/242840	ACC		
Walker-Warburg syndrome/236670	ACC	9q34.1	POMT1

Tablo 2.2.'nin devamı

Disorder/OMIM number	Phenotype	Region	Gene
X-linked			
Aicardi syndrome/304050 ACC with mental retardation, ocular coloboma, and micrognathia/300472	ACC, Hypoplastic ACC	Xp22 Xq13.1-13.3	IGBP1
CFND (Craniofrontonasal syndrome)/304110	Partial ACC	Xq12, Xp22	EFNB1
HSAS (Hydrocephalus due to congenital stenosis of aqueduct of Sylvius)/307000	ACC	Xq28	L1CAM
Lenz microphthalmia syndrome/309800 MASA syndrome (Mental retardation, aphasia, shuffling gait, and adducted thumbs)/303350	ACC ACC, Hypoplastic	Xq27-q28 Xq28	L1CAM
MLS (Microphthalmia with linear skin defects)/309801	ACC	Xp22.31	
Opitz syndrome/300000 (Autosomal forms also exist)	ACC, Hypoplastic	Xp22	MID1
OFD1 (Oro-Facio-Digital syndrome Type 1)/311200	ACC	Xp22.3-p22.2	CXORF5
Periventricular heterotopia/300049 Proud syndrome/300004 XLAG (X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia)/300215	Partial ACC ACC	Xq28 Xp11.3 q21.3 Xp22.13	FLNA ARX
XLIS (X-linked lissencephaly)/300067	ACC	Xq22.3-q23	DCX
Metabolic disorders			
Fumarase deficiency/606812 Glycine encephalopathy/605899	ACC, Hypoplastic ACC	1q42.1 9p22	FH GCSF
PDH deficiency/312170 Smith-Lemli-Opitz syndrome/270400 Zellweger syndrome (Cerebro-Hepato-Renal syndrome)/214100	Partial ACC ACC ACC, Hypoplastic, Lissencephaly	Xp22 11q12-q13 6q23-q24	PDHA1 DHCR7 PEX3
Miscellaneous			
Wolf-Hirschhorn syndrome/194190	Hypoplastic, partial ACC (caudal)	4p16.3	WHSC1
Deleman syndrome (Oculocerebrocutaneous syndrome)/164180	ACC, Hypoplastic		

2.3.2 Çevresel Faktörler

Çevresel faktörler de KK displazilerine neden olabilir. Genetik faktörlere oranla çevresel faktörlerin KK'a nasıl etki ettiği hakkındaki veriler daha azdır. Çevresel faktörlerden kollasal gelişime etki ettiği bilinen bir örnek Fetal Alkol Sendromudur (FAS) (48).

Klinik ve deneysel araştırmalara dayanarak alkolün uteroda gliojenezisi (56), glial-nöron etkileşimini (57) ve KK'un gelişimi için gerekli hayati prosesleri (58) azalttığı kanıtlanmıştır. Buna ilaveten etanolün L1CAM'in (KK displazisi ile ilişkili olduğu düşünülen genlerden biri (Tablo 1.2)) transkripsiyonel ve biyokimyasal fonksiyonuna zarar verdiği görülmüştür (59, 60). FAS'ta görülen ACC insidansı yaklaşık olarak %6.8'dir (61). Bir çok FAS vakalarında KK'un gelişimi yetersizdir. Bu yetersizliğin yalnızca kallosal oluşumun erken evrelerinde alkolün verdiği tahribattan dolayı değil aynı zamanda daha sonraki safhalarda da aksonal regülasyonların sağlıklı bir şekilde yapılamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Böyle mekanizmalar şizofreni, otizim gibi diğer hastalıklarda kollasal hipoplasia'ya neden olabilir (62, 63).

2.4 Korpus Kallosum ve Epilepsi

Epilepsi, baş ağrısından sonra nöroloji hekimleri tarafından ikinci en sıklıkta görülen kronik nörolojik bir durumdur. Epileptik nöbetler beyindeki nöronların anormal ve yoğun deşarjları sonucu ortaya çıkan, şuur değişiklikleri ile birlikte olan ya da psişik semptomlarla karakterize bir durumdur (64).

KK homotopik ve heterotopik kortikal bölgeler arasında iletişimi sağlayan en önemli interhemsiferik birleşme noktasıdır. Anatomik çalışmalar ve görüntüleme teknolojileri ile elde edilen veriler sonucu biliniyor ki KK'un burun tarafındaki (rostral pozisyon) aksonlar *frontal lobla*, kuyruk tarafını

(kaudal yön) izleyen aksonlar da *parietal*, *temporal* ve *occipital loblarla* bağlantılıdır (65, 66).

KK'un iktal ve interiktal epileptik aktivitelerin yayılmasında etkili olduğu bilinir. Kediler üzerine yapılan bir araştırmada bir grup kedinin KK'larının tamamı, başka bir grup kedinin KK'larının bir kısmı, diğer bir grup kedinin ise KK'larına dokunulmadan çeşitli kortikal bölgeleri çıkarılmıştır. Ameliyatlarından 2 hafta sonra KK'ları tam olarak çıkarılan kedi grubunda epileptik boşalmanın bilateral senkronu tamamen bozulmuş, kısmi KK'ları çıkarılan kediler de ise kısmen bozulmuştur. Fakat KK'ları korunan kedi grubunda epileptik boşalmanın bileteral senkronu korunduğu görülmüştür(67).

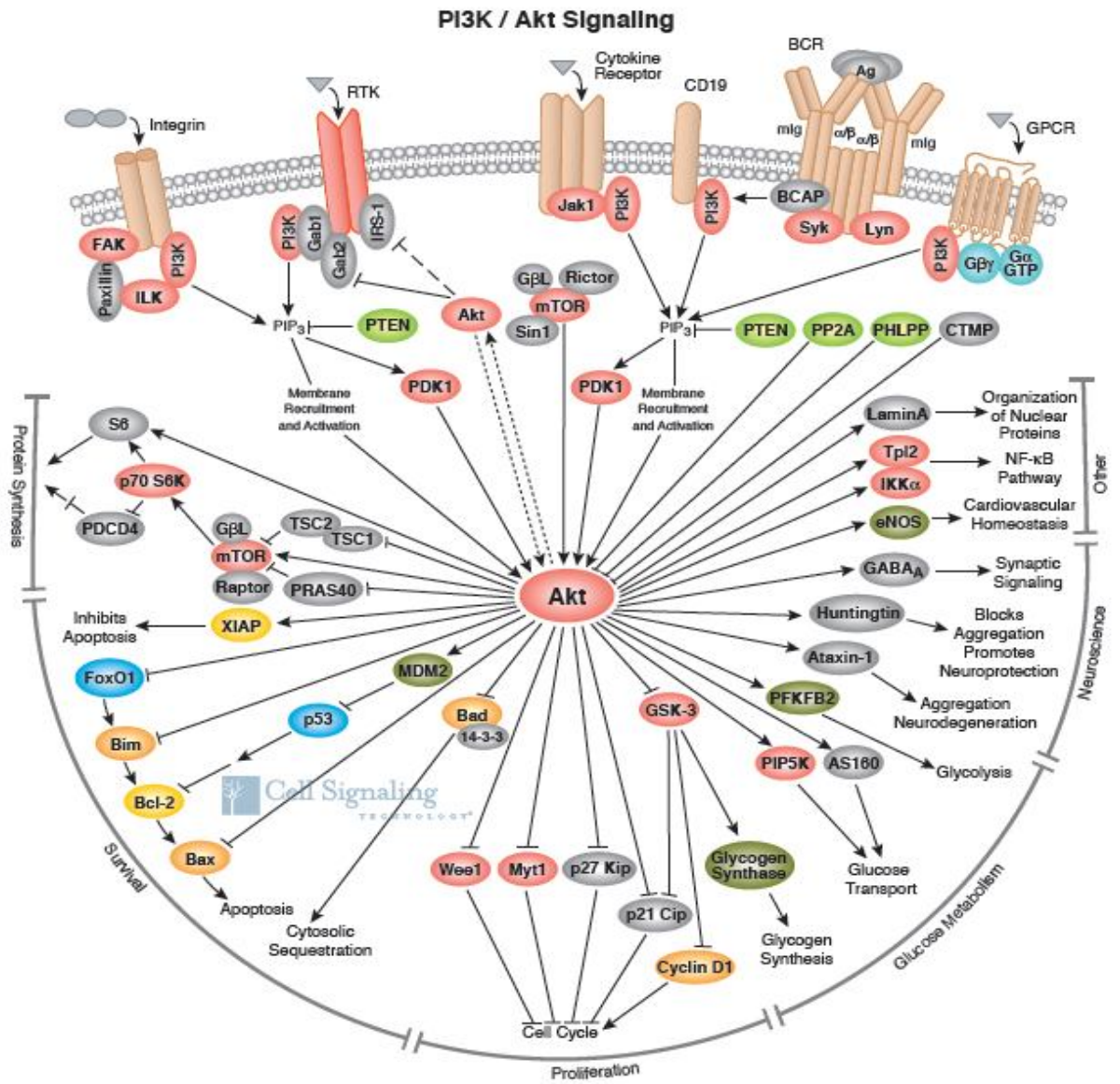
Bu sonuca rağmen KK, epileptik deşarjın artışını sağlayan tek yol değildir. Çünkü kallostomi tedavisinden¹ aylar sonra bile epileptik aktivitenin kronik epilepsi olarak tekrar ortaya çıktığı bilinmektedir (68). Bunun üzerine kediler üzerine yapılan bir başka çalışmada KK'un tamamen alınmasından sonra korteksten yükselen epileptik boşalmanın *ipsilateral talamus* üzerinden karşı kortekse yayıldığı gözlenmiştir (69). *Dorsal hipokampal* birleşme noktası epileptik deşajın yayılımı için olası bir diğer yoldur (70).

Epilepsili hastalarda KK'un hacmi ile sağlıklı bireylerdeki KK'un hacmi kıyaslandığı zaman hacimsel artışların (71) ve azalışların (72, 73) görülmesi ve hacimsel olarak bir değişikliğin saptanmadığı (74) durumların rapor edilmesi kendi içinde bir çelişki yaratır.

¹ Korpus Kallostomi: Korpus kallosumun bir kısmının veya tamamının kesilerek ayrıldığı cerrahi bir prosedürdür. Bu işlem sonrası krizler tamamen sonlanmaz fakat kaynaklandığı yarımkürede kalır. Bu nedenle bu prosedüre 'split-brain' prosedürü adı da verilir (29).

2.5 AKT Gen Ailesi ve AKT3 Hakkında Genel Bilgiler

AKT protein kinaz ailesi, protein kinaz B veya serin/treonin protein kinaz ailesi olarak da adlandırılır. AKT kinazlar, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) tarafından uyarılan hücre sağkalım sürecinin genel regülatörleri olarak da bilinir. AKT kinazlar, hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptoz, anjiogenez, tümörjenez, adiposit ve kasların farklılaşması, glikojen sentezi, glikoz gerialımı gibi birçok biyolojik proseste yer alırlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 AKT Gen Ailesinin görev aldığı biyolojik prosesler (86)

AKT kinaz ailesinin memelilerde 3 izoformu bulunur; (1/alpha, 2/beta and 3/gamma). *AKT1* ve *AKT2* izoformları, proteinin karboksi terminal ucunda regülatör serin fosforilasyon bölgesi içerirler. Fakat sıçan *AKT3* (RAC-gamma serine/threonine-protein kinase) proteininde diğer izoformlardan farklı olarak C terminal ucundaki serin fosforilasyon bölgesinde 25 amino asidin eksik olduğu tespit edilmiştir. Günümüz çalışmaları ise insan *AKT3* porteininin, insüline yanıt olarak fosforilenen bir serin fosforilasyon bölgesi içerdiğini göstermiştir. *AKT3*'ün fosforilasyonun gerçekleştiği bir diğer regülatör bölgesi katalitik domaininde bulunan treonin'dir. Bu sonuçlar da insanda *AKT3*'ün *AKT1* ve *AKT2* izoformlarına benzer şekilde regüle edildiğini göstermektedir (75). *AKT3* gen (Tablo 2.3) ve protein (Tablo 2.4) özellikleri aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir.

Tablo 2.3. *AKT3* Gen Özellikleri (85)

<i>AKT3</i> GEN ÖZELLİKLERİ:	
AÇIK İSMİ:	V-akt murine thymoma viral oncogen homolog 3
SİTOGENETİK BANTI:	1q44
GENOMİK LOKALİZASYONU:	Başlangıç: pter'den 243,651,535 bp
	Bitim: pter'den 244,013.430 bp
GENOMİK BOYUTU:	361,896 bp

Tablo 2.4. *AKT3* Protein Özellikleri (85)

<i>AKT3</i> PROTEİN ÖZELLİKLERİ:	
ÖNERİLEN İSMİ:	RAC-gamma serine/treonin-protein kinaz
PROTEİN BOYUTU:	479 amino acids; 55775 Da
ALTBİRİMİ:	PH domaini üzerinden TCL1A ile ilişkilidir. Bu alt birim <i>AKT3</i> 'ün fosforilasyonunu ve aktivasyonunu artırıcı özelliktedir. Aynı zamanda TRAF6 ile de etkileşim halindedir.
SÜPERAİLE:	Protein Kinaz süperailesi
AİLE:	AGC Ser/Thr Protein Kinaz ailesi
ALTFAMİLYA:	RAC
DOMAİN:	- Plekstrin Homoloji domaini - Ser/Thr Protein Kinaz benzeri domain - Protein Kinaz, C-terminal
KATALİTİK AKTİVİTE:	ATP + a protein = ADP + a fosfoprotein
ENZİMATİK REGÜLASYONU:	İki sipesifik bölgeden gerçekleşir; biri kinaz domaininde bulunan Thr-305, diğeri C terminal regülasyon bölgesindeki Ser-472.
LOKALİZASYONU:	Ökaryotik plazma membranı
DOKU SPESİFİKLİĞİ:	Yetişkin dokuda, beyin, akciğer ve böbreklerde yüksek derecede; kalp, testis ve karaciğerde düşük derecede eksprese olur. Fetal dokularda kalp, karaciğer ve beyinde yüksek derecede eksprese olur.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın tipi

Tanımlayıcı nitelikte bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın yeri: Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.

Araştırmanın zamanı: 01.09. 2010- 01.09.2011

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nörolojisi Bilim Dalına tedavi amaçlı gelen, Korpus Kallosum Displazili çocuklar ve bu çocukların ebeveynleri olgu grubunu oluşturmaktadır. Bu çalışmada tedavi amaçlı gelen hasta ve ebeveynlerinin kan örnekleri kullanıldı. Gönüllü kontrol grubu ise korpus kallosum abnormalitesi olmayan kişilerden oluşturuldu.

Kafa travması, enfeksiyon, tümör, alkol ve ilaç kullanımı gibi dış etkenler sonucu merkezi sinir sisteminin gelişimsel bozukluğu oluşmuş hastalar dahil edilmemiştir.

Gönüllü kontrol grubu 100 kişilik sağlıklı bireylerden oluşmaktadır. Çalışmada, olgu grubuna 47 korpus kallosum displazisi olan hasta çocuklar ve ebeveynleri dahil edildi. Hasta grubunun 23'ü (%48,9) kız, 24'ü (%51,1) erkek bireylerden oluşmaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalına tanı ve tedavi amaçlı gelen hastaların kan örnekleri

kullanıldı. Olgu ve kontrol grubunu oluşturan tüm bireylere, yapılacak olan çalışmanın amacı ve detayları açık bir dille anlatıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Etik komitesinin onay verdiği ve Ek-1’de sunulan bilgilendirilmiş onam formları imzalatılarak izinleri alındı. Çalışmayı kabul eden hastalar ve ebeveynlerinden başka bir test için kan aldirmaya geldikleri bir günde ayrıca bu çalışma için de Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Merkez Labarotuvâr’ında HEPARİN’li ve EDTA’lı “vacutainer” tüplere ikişer ml periferik kan örnekleri alındı.

HEPARİN’li tüpler, işlem görecekleri güne kadar +4°C’de; EDTA’lı tüpler ise -20°C’de muhafaza edildi.

Gönüllü hastaların kan örnekleri 03.08.2010-03.06.2011 tarihleri arasında alınmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmamızda tanımlanabilen bağımlı, bağımsız ve kontrol değişkenleri mevcut değildir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1 Hasta-Kontrol Gruplarının Belirlenmesi ve Periferik Kan Örneklerinin Alımı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nörolojisi Bilim Dalına tedavi amaçlı gelen, Korpus Kallosum Displazisi olan çocuklar ve bu çocukların ebeveynlerinden, Ek-1’de sunulan etik kurul kararları dahilinde imzalı onam formlarıyla birlikte ikişer ml Heparin’li tüplere steril koşullarda kan alındı ve hemen sitogenetik analiz için kullanıldı. Ayrıca aynı hastalardan PCR için ikişer ml EDTA’lı tüplere steril koşullarda kan alındı ve DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20C’de saklandı.

3.6.2 Periferik Kandan Kromozom Analizi

3.6.2.1 Ortam Hazırlama

Hastalardan ve ebeveynlerinden alınan Heparin’li “vacutainer” tüplerdeki kan örneklerinden kromozom analizi için ortamlar hazırlandı. Ortam içeriği Tablo 3.1’de verilmiştir. Ortam hazırlama prosedürü şöyledir:

- 1-) Kullanımdan önce tüm şişeler otaklavlandı.
- 2-) Daha önceden 56°C’de 30dk bekletilerek inaktivasyonu gerçekleştirilmiş olan Fetal Bovin Serum (FBS) (Biochrom AG, S 0113) kullanımdan önce -20°C ‘den alınıp ağzı parafilmle sarılarak 37°C ’lik inkübatörde (Gallenkamp) ergimesi için yaklaşık 4 saat bekletildi.
- 3-) Tüm işlemler steril kabinette (Holten, HBB 2448) gerçekleştirildi. Steril kabin kullanılmadan önce 10dk ultraviyole ışık ile steril edildi ve tüm yüzeyler %70’lik etanol ile temizlendi.
- 4-) Liyofilize halde +4°C’de saklanan L- Glutamin (BioChrome AG, K0281), Fitohemaglutinin-L (BioChrome AG, M 5030), Penisilin/Streptomisin (BioChrome AG, A 2210) ve Amfoterisin-B’nin (BioChrome AG, A 2610) üzerlerine 5ml steril su ilave edilip iyice çalkalanarak çözünmeleri sağlandı.
- 5-) 500ml’lik RPMI 1640 Medium (1X) (BioChrome AG,FG 1215)’in üzerine 150ml FBS ilave edildi. FBS kullanımdan önce iyice karıştırıldı.
- 6-) Daha sonra sırası önemli olmamakla birlikte 6,5ml L-Glutamin, 19ml Fitohemaglutinin-L, 5ml Penisilin/Streptomisin, 5ml Amfoterisin-B ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

7-) İyice karıştırdıktan emin olduktan sonra karışım, 10ml'lik steril serolojik pipetler (Biofil) yardımıyla 12 ml'lik steril hücre kültür tüplerine (CELLSTAR, 164 160) 5'er ml koyularak paylaştırıldı.

Bu şekilde hazırlan 5ml'lik ortamlar -20 °C'ye kaldırıldı. Ortam hazırlama esnasında kontaminasyonun olup olmadığını anlamak için ortam içeren bir tüp örneği 37°C'ye bırakıldı.

Tablo 3.1. Kan örneklerinin ekildiği ortam içeriği

Ortam İçeriği	Yüzdeleri
RPMI 1640 Medium (1X)	%73
Fetal Bovin Serum	%22
L- Glutamin	%9
Fitohemaglutinin-L	%2,8
Penisilin/Streptomisin	%0,7
Amfoterisin-B	%0,7

3.6.2.2 Kan Örneklerinin Ortamlara Ekimi

Heparin'li “vacutainer” tüplerde gelen hastaya, anne ve babasına ait kan örnekleri geldikleri gün steril kabinette ortamlara ekildi.

Bunun için ilk olarak hasta kan örneği için 2, anne ve babaya ait kan örnekleri için 1'er ortam, -20°C'den alınıp çözünmesi için 37°C'lik inkübatöre yerleştirildi. Ortamlar çözündükten sonra steril kabin %70'lik alkolle iyice temizlendi. Kabinete yerleştirilecek olan malzemeler de %70'lik alkolle silindi. Steril kabinde ortamlar homojen hale getirildi ve numaralandırıldı. Kan örneklerinden yaklaşık 300µl kadar ortamlara ekim yapıldı. Ekim yapılan ortamlar köpürmeyecek şekilde karıştırıldı ve 37°C'lik inkübatöre 30 derecelik açıyla yerleştirildi ve ekim saati kaydedildi. Açılı

yerleştilmesinin nedeni ise ortam ile temas eden kan yüzey alanını artırmaktır.

Ekim yapılan ortamlar 3 gün boyunca (72 saat) Harvest işlemine kadar 37°C’lik inkübatörde bekletilmeye devam edildi. Bu esnada kanın tüpün dibine yapışmaması ve daha çok hücrenin ortamla temas edebilmesi için her gün birkaç kez yavaşça karıştırıldı.

3.6.2.3 Periferik Kandan Hücre Eldesi (Harvest İşlemi)

Ekim saatinden 71 saat sonra ekim yapılan tüplere hücre bölünmesini metafaz safhasında durdurabilmek için 80µl kolşisin (Biological Industries, 12-003-1C) ilave edildi. Kolşisin ilave edilmeden önce tüpler birkaç kez altüst edildi ve kolşisin ilavesinden sonra da köpürtmeden hafifçe karıştırılarak tekrar açılı konumda 37°C’lik inkübatöre koyuldu. Daha sonra hücreleri şişirmek için kullanılacak olan hipotonik solüsyon 0,075M KCl (Biochrome AG, L6413) ağzı parafilm ile sarılarak inkübatöre yerleştirildi. Örnekler ve hipotonik solüsyon 0,075 KCl yaklaşık 45dk inkübatörde bekletildi. Bekleme süresi dolduğunda örnekler inkübatörden alınarak santrifüje (Sigma 2-5) yerleştirildi ve 10dk 1200 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan serum ucunda pastör pipeti (ISOLAB, 108-03-002) takılı olan vakum aleti (Hospira, 43445-61-01) ile çekilerek uzaklaştırıldı.

Örneklerin dipte kalan agregatlarına orta hızdaki vorteks (1200-1500 rpm) (Janke Kuntel) üzerinde hipotonik solüsyon 0,075 KCl’den ilk 1 ml’si damla damla olacak şekilde 6’şar ml ilave edildi. Örneklerin ağızları parafimle iyice sarılarak hızlı bir şekilde daha önceden 37°C’ye ayarlanmış su banyosuna (Pharmacia Biotech) koyuldu. Örnekler, su banyosunda 12dk bekletildi. Bekleme işleminin ardından su banyosundan alınan örnekler yine vakit kaybetmeden santrifüje yerleştirildi ve 10dk, 1200rpm’de santrifüj edildi.

Bu adımların hızlı olması önemlidir. Aksi halde hücrelerin dekompozisyonu olması gereken zamandan daha önce gerçekleşebilir.

Bu esnada çeker ocakta (Köttermann, 2-453) yıkama işlemi için kullanılacak olan fiksatif hazırlandı. Fiksatif oranı şöyledir;

1 Asetik Asit (MERCK, 1.00063.2500): 3 Metanol (MERCK, 1.06018.2500).

3.6.2.4 Yıkama İşlemi

Santrifüj edilen örneklerin üst kısmında toplanan süpernatantları vakum aleti ile çekilerek uzaklaştırıldı. Yalnız süpernatantların tamamının çekilmesine dikkat edildi, agregatların üzerinde yaklaşık 1,5cm yüksekliğinde süpernatant bırakıldı. Örnekler, orta hızdaki vorteks üzerinde ilk 1 ml'si damla damla olacak şekilde 5'er ml'lik fiksatif koyulmasıyla ilk yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Fiksatif ilavesinin ardından örnekler 10dk 1200rpm'de santrifüj edildi. Üst kısımda toplanan süpernatantlar vakumlanarak uzaklaştırıldı. Bu kez agregatlara dokunmayacak şekilde mümkün olduğu kadar süpernatant çekilmeye çalışıldı.

Fiksatif ile yıkama işlemi 4 kez tekrar edildi. En sonunda dipte beyaz çökelek olarak görülen lökosit hücreleri elde edildi.

En son yıkama ve santrifüj işlemlerinden sonra toplanan süpernatantların az bir kısmı çekilerek uzaklaştırıldı. Harvest işleminin kalitesini görebilmek için her bir tüpten örneklerin numaraları ile işaretlendirilmiş lamalar (Isotherm, CLD0000000) üzerine damlatma yapıldı. Damlatıktan 3 sn sonra lamalar dik konuma getirildi ve kurumaları için bekletildi. Kuruyan lamaların

yeterli sayıda hücre ve metafaz alanlarına sahip olup olmadıkları inverted mikroskopta (Nikon DIAHOT, 200) kontrol edildi.

Mikroskop incelemesinin ardından yeterli sayıda hücre ve metafaz alanlarına sahip olan örnekler ağızları parafilm ile sarılarak -20°C'ye kaldırıldı. Yeterli sayıda hücre ve metafaz alanlarına sahip olmayan örnekler tekrar ekilip harvest ve yıkama işlemlerine tabi tutuldu.

Periferik kandan hücre eldesi için bir seferde en fazla 8 örnek ile çalışılmıştır ve her işlem sonrası işlem kalitesi inverted mikroskop yardımıyla kontrol edilmiştir.

3.6.2.5 G Bantlama İle Konvansiyonel Sitogenetik Analiz

Yalnızca hasta örnekleri için G bantlama ile konvansiyonel sitogenetik analiz gerçekleştirildi.

3.6.2.5.1 Damlatma İşlemi

Harvest işlemleri ile periferik kandan elde ettiğimiz hücreler, G bantlama işleminden 1 gün önce damlatma işlemine tabi tutuldu. Damlatma presedürü aşağıdaki gibidir;

1-) Damlatılacak örnekle aynı isimi taşıyan lamlar 1'den 6'ya kadar numaralandırıldı ve gazlı bezle silinerek temizlendi.

2-) Damlatılacak olan örnek, 10dk 1200 rpm'de santirifüj edildi.

3-) Üstte toplanan supernatantın bir kısmı vakumlanarak uzaklaştırıldı. Geri kalan kısımla, dipteki hücre çökeleği yavaş hareketlerle iyice karıştırıldı.

4-) Homojenize olan örnekten birinci lam üzerine iki damla damlatıldı. 3sn bekledikten sonra lam, çok fazla yaklaştırmamak koşulu ile ateşin karşısında yavaş yavaş kurutuldu.

5-) Kurutulan lam inverted mikroskopta incelendi. Bu aşamada metafaz alanlarındaki kromozomların dolgun ve mat görünmesi önemlidir. Eğer kromozomlar parlak görünüyorsa bu durum, damlatma koşullarının yani sıcaklık ve nemin uygun olmadığını gösterir. Olması gerek sıcaklık yaklaşık 25°C, nem ise 45-48 derecedir.

6-) İnverted mikroskopta yapılan kontrol sonucu geri kalan diğer 5 lama da aynı şekilde damlatma yapıldı.

7-) Damlatılan preparatlar, şalelere yerleştirilip 65 °C'ye ayarlanmış kurutma fırınına (Gallenkamp) koyuldu. Yaklaşık 17 saat 65°C'de bekledikten sonra kurutma fırınının sıcaklığı 80°C'ye çıkarıldı ve preparatlar 1 saat 80°C'de bekletildi.

Ardından soğutulan preparatlar boyama için hazır hale geldi.

3.6.2.5.2 Boyama İşlemi

Boyama işleminden önce aşağıdaki ön hazırlıklar yapıldı;

Stok Boyanın Hazırlanması

Stok boya, boyama işleminden en az 1 gün önce hazırlandı ve boyanın iyice karıştığından emin olundu. İyi çözünmeyen boyanın, kromozomların düzgün şekilde bant almasını engellediği gözlenmiştir.

Boyama işlemi için toz halinde oda sıcaklığında saklanan Leishman (Sigma, L6254-256) boya kullanıldı.

0,2gr toz Leishman boya üzerine 100 ml absolut metanol ilave edildi. İyice çalkalandıktan sonra bir gece magnetik karıştırıcı (Torrey Pines Scientific) üzerinde karışmaya bırakıldı.

Gurr Tamponlarının Hazırlanması

a-) pH:7 Gurr Tamponu Hazırlanması

1 tane pH:7 Gurr Tampon Tableti (BDH Lobaratory, 332002U) ve 8 gr NaCl (Sigma, 7647-14-5) 1 litre distile suda çözüldü ve +4°C’de saklandı.

b-) pH:6.8 Gurr Tamponu Hazırlanması

1 tane pH:6,8 Gurr Tampon Tableti (BDH Lobaratory, 331992P) 1 litre distile suda çözüldü ve +4°C’de saklandı.

Ön hazırlıkları tamamladıktan sonra boyama işlemi için aşağıdaki prosedür izlendi;

1-) Stok boya, 1:3 (1 Boya: 3 Tampon) oranında pH:6.8 Gurr tamponu ile seyreltildi. İyice karıştırılarak homojenize edildi.

2-) Buz içerisine yerleştirilen 2 şaleden birincisine 80ml pH:7 Gurr tamponu ve 250µl Tripsin enzimi (Bacto, 144458KA) koyuldu. 2. şaleye yıkama amaçlı yaklaşık 80ml pH:7 Gurr tamponu ilave edildi.

3-) İlk preparat ortalama 1 dk birinci şalede bekletildikten sonra 2-3 sn kadar ikinci şalede yıkanarak fazla tripsinden arındırıldı. Daha sonra preparat ortalama 3 dk boyunca boyada bekletildi. Sürenin dolmasının ardından preparat çeşme suyunda yıkandı ve kurutuldu.

4-) Kuruyan preparat floresans mikroskopunda incelenerek kromozomların doğru şekilde bant alıp almadığı kontrol edildi.

Mikroskop incelemesinin ardından preparatın geneli doğru şekilde bantlanan kromozom alanları ile dolu ise geri kalan preparatların birinci şalede ve boyada bekleme süreleri değiştirilmedi. Fakat preparatın geneli iyi bantlanmamışsa geri kalan preparatların birinci şalede ve boyada kalma süreleri optimize edildi.

Mikroskop incelemesi esnasında immersiyon yağı ile bulaş olan preparatlar bir gece ksilolde (MERCK, 1.08685.2500) bekletildi. Ertesi gün ksilolden alınan preparatlar kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan (MERCK, 1.07961.0100) kullanılarak lamellerle (Deckglaser, CLML002450) kapatıldı.

3.6.2.5.3 Kromozom Analizi (Karyotipleme)

G bantlama ile boyanan preparatların PSI görüntüleme analiz sisteminde (Nikon Eclipse E 600 Mikroskop ve Entegre Macintosh Bilgisayar Sistemi) analizleri yapıldı.

Mikroskop incelemesi sonucu saptanan, analize uygun kromozom alanlarının görüntüleri alındı. Mac bilgisayarında bu alanların karyotiplemeleri yapıldı ve kromozomlarda herhangi bir mikroskobik değişikliğin olup olmadığı kontrol edildi.

3.6.3 Alınan Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Hasta ve ebeveynlerine ait periferik kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu için kit kullanılmıştır (NucleoSpin® Blood L, 740954.20). Büyük hacimle çalışılabilir özellikte olan kit içerikleri ile 2ml kan örneğinden DNA izolasyonu yapıldı.

Kit içeriğinde tanımlanmış olan protokol, en yüksek verimlilikte DNA eldesini sağlayacak şekilde modifiye edilerek hasta periferik kan örneklerine uygulandı. Her bir izolasyon işlemi en fazla 8'er örnek ile yapıldı.

Kit ile DNA izolasyon işlemine başlamadan önce kit içeriği aşağıdaki şekilde hazırlandı;

Proteinaz K: Kit içerisinde bulunan liyofilize durumdaki proteinaz K, kit tarafından sağlanan, 3.15ml proteinaz tamponu ile çözüldü.

BQ2 Tamponu: 20ml konsantre durumda gelen BQ2 tamponu, kitte belirtildiği şekilde 80 ml saf etanol (Applichem, A3678) ile seyreltilti.

Ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra aşağıdaki protokol izlenmiştir:

1. -20°C'de saklanan kan örneklerinin, oda sıcaklığında ergimesi sağlandı.
2. Oda sıcaklığına gelmiş olan kan örnekleri hafifçe vortekslenerek homojenize edildikten sonra 2ml kan örneği alınıp, 15 ml'lik steril tüplere aktarıldı.
3. Her bir kan örneğine, Proteinaz K solüsyonundan 150µl ekledikten sonra tüpler 10'ar saniye vortekslendi.
4. Tüplere, BQ1 tamponundan 2ml eklenildi ve 30 saniye vortekslendi.
5. Vortekslenen tüplerin kapakları parafilm ile sarıldıktan sonra, önceden 56°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda 45 dakika bekletildi.
6. Tüpler tekrar vortekslenerek oda sıcaklığına gelene kadar yaklaşık 1 saat bekletildi.

7. Oda sıcaklığına gelen tüplere, 2ml saf etanol eklendi ve 30 saniye vortekslendi.
8. Oluşan lizattan 2ml alınarak, 15 ml'lik toplama tüplerinin içine yerleştirilmiş olan kolona aktarıldı. Kolondan süzölmeyi sağlamak için, 4,500 rcf hızda 3 dakika santrifüj edildi. (Santrifüj cihazı; Sorvall RC 3C, Heraeus; Labofuge 4400R)
9. Kalan lizatta, kolon içersine aktarıldı ve tekrar 4,500 rcf hızda 5 dakika santrifüj edildi.
10. Toplama tüpünde biriken lizat ise atıldı.
11. Kolonların yıkanması için üzerine BQ2 tamponundan 2'şer ml eklendi ve 4,500 rcf hızda 5 dakika santrifüj edildi.
12. Yıkama işlemi BQ2 tamponundan her bir tüpe 2'şer ml eklenerek tekrarlandı.
13. Kolonların yıkama işleminin ardından kurutulması için tüpler 4,500 rcf hızda 10 dakika santrifüj edildi.
14. Kolonlar yerleşik olduğu toplama tüplerinden çıkarılarak yeni steril toplama tüplerine yerleştirildi.
15. Yeni toplama tüplerine yerleştirilen ve DNA'nın tutulduğu kolonlara su banyosunda önceden bekletilerek 70°C'ye getirilmiş olan elüsyon tamponundan 100 µl eklendi ve 4,500 rcf hızda 3 dakika santrifüj edildi.
16. Elüsyon tamponunun eklenme ve santrifüj işlemi aynı şekilde bir kez daha tekrarlandı.

Toplam 200µl elüsyon tamponu içerisinde elde edilen DNA örnekleri, önceden nuralandırılıp hazır hale getirilen 1,5ml'lik steril tüplere alınarak stok DNA'lar hazırlanmış oldu. İzolasyonu yapılan DNA'ların miktar ve saflıklarının belirlenmesi için yapılacak spektrofotometrik ölçümlere kadar örnekler +4°C'de muhafaza edildi.

3.6.3.1. İzole Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Saflığının Saptanması

DNA'nın miktarı ve saflığı, pikodrop cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen absorpsiyon değerlerinin birbirlerine oranları ile belirlenmektedir. DNA 260nm, protein ise 280nm dalga boylarında en yüksek absorpsiyon göstermektedir. Bundan dolayı saf DNA'nın A260 / 280 oranı yaklaşık olarak 1.80 olmalıdır (83).

Elde edilen olgu grubu DNA'larının miktarlarının ve saflıklarının belirlenmesi için, elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı. Ardından iyice çözünmüş olan DNA örneklerinden 2 µl kadar cihaza yerleştirildi. Cihaz, DNA örneklerinin 260nm ve 280nm dalga boylarındaki absorpsiyon değerlerini, bu değerlerin birbirine oranlarını (260/280) ve ng/µl cinsinden DNA miktarlarını sonuç olarak vermiştir.

Miktarları belirlenen tüm stok DNA örneklerinden, polimeraz zincir reaksiyonunda (Polymerase Chain Reaction, PCR) kullanılma sırasında standartizasyonu sağlamak için 25ng/µl konsantrasyonlu ara stoklar hazırlandı. Stok DNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilmiştir. Ara stoklar ise PCR'da kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

3.6.4 PCR İle Belirlenen Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

Çalışmada 13 çift primer, *AKT3* geninde ekson ve ekson/intron sınırlarının çoğaltılması için kullanılmıştır. PCR için yalnızca hasta örnekleri kullanılmıştır.

3.6.4.1 PCR'da Kullanılan Komponentler

Tüm PCR reaksiyonlarında aşağıda belirtilen malzemeler kullanıldı. Kullanılan tüm malzemeler -20°C'de muhafaza edildi.

DNA Taq Polimeraz Enzimi: (Fermentas, EP0402)

Konsantrasyonu 5U/μl olan enzimden, 30μl'lik reaksiyon için 1 ünite, 15μl reaksiyon için ise 0,5 ünite olacak şekilde eklendi.

Hot Start Taq DNA Polimeraz Enzimi: (Fermentas, EPO602)

Konsantrasyonu 5U/μl olan enzimden, 30μl'lik reaksiyon için 2 ünite, 15μl reaksiyon için ise 1 ünite olacak şekilde eklendi.

10X Hot Start PCR Tamponu (KCl'li): (Fermentas, EPO602)

AKT3 geninin 3. ekzonunun çoğaltılmasında son konsantrasyonu 1X olacak şekilde kullanıldı.

10X Taq KCl'li (MgCl₂ 'siz) Tamponu: (Fermentas, EP0402)

AKT3 gen bölgelerinin çoğaltılmasında (3. ekzon haricinde) son konsantrasyonu 1X olacak şekilde kullanıldı.

25 mM MgCl₂ : (Fermentas, EP0402)

PCR optimizasyonu sırasında farklı her primer çifti için 1-4mM arasında farklı konsantrasyonlarda optimizasyon çalışmaları yapıldı ve optimize konsantrasyonları reaksiyon içerisine eklendi.

dNTP Karışımı Hazırlanması: (Fermentas, R0182)

100 mM konsantrasyonundaki her bir dNTP'den (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10'ar µl alınıp 460 µl steril distile su ile 500µl'ye tamamlanarak 2mM konsantrasyonlu dNTP karışımı hazırlandı. 100'er µl küçük hacimlere bölünerek -20°C'de muhafaza edildi. Reaksiyonundaki son konsantrasyonu 0,2 mM olacak şekilde eklendi.

DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Applichem;A3672)

AKT3 geninin 2. ekzonun çoğaltılmasında, PCR optimizasyonunu sağlamak için DMSO kullanılmıştır. Kalıp DNA'nın oluşturduğu ikincil yapıları çözmesi ve özellikle GC oranı yüksek olan hedef bölgelerin çoğaltılmasında verimliliği arttırdığı bilinmektedir.

3.6.4.2. Primerlerin Dizayn edilmesi

AKT3 geninin, eksprese olan tüm ekzonlarının ve ekzon/intron sınırlarının dizi analizlerinin yapılabilmesi için, belirlenen bölgeler PCR işlemi ile çoğaltıldı. Çoğaltılacak bölgeye spesifik olan tüm primerler "Oligo" programı kullanılarak dizayn edilmiştir.

AKT3 geni için kullanılan tüm primerlerin listesi Tablo 3.2' de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. Çoğaltılan bölgelerin ve kullanılan primer dizilerinin listesi

oğalttığı Bölge:	Primer Adı: F: Forward R: Reverse Primer	Primer Dizisi (5'-3')	PCR ürün Uzunluğu (bp)
1. Ekzon	AKT1F	GGGAAGTGCTTTCATTATAGAA	578
	AKT1R	CGCTACACACAACATACCAG	
2. Ekzon	AKT2F	GCCAGTGTTGTAGGACATA	313
	AKT2R	AGGTTTCTCATATAGCCTAAGA	
3. Ekzon	AKT3F	AAGCTGTGAGTTCGCACTG	363
	AKT3R	GCCAGAAGCAAGAATTTAGAGA	
4. Ekzon	AKT4F	TGCTACTACAGACTTTAGGCAT	586
	AKT4R	GTCACACATGAGCCCTATC	
5. Ekzon	AKT5F	CTAATGAGACAGCCAAT	399
	AKT5R	GTTTAATGGAATTTGCATACA	
6. Ekzon	AKT6F	TTCAATCTCTGGGCTTAACCT	492
	AKT6R	CAGCCATTTCTCAATAGTCTC	
7. Ekzon	AKT7F	CTTTTCATCTTTCATGCTTACT	323
	AKT7R	GCTCCCATTTGTTCAATAG	
8. Ekzon	AKT8F	TCCCCCACTAAATCAGTAAT	276
	AKT8R	ATCTGCTTTTCTCAAACTGTA	
9. Ekzon	AKT9F	AAGTACTGAGCGTTCTATTAGC	434
	AKT9R	GATCCTACAATACCCCATTTATA	
10. Ekzon	AKT10F	TAGGCTTTGAAAGTTAAGATTC	445
	AKT10R	GTGGGAAGATGTCTACACC	
11. Ekzon	AKT11F	TTGCCTCTTCCAGATCTATC	472
	AKT11R	TCAATAATCACTTAAATGTCGG	
12. Ekzon	AKT12F	GCGACTCAGCATTGTAGACTT	342
	AKT12R	GTCAGTGTGGAATTTGATCTTG	
13. Ekzon	AKT13F	AAGTTTATGGGAGCTATTGCC	397
	AKT13R	AACTGGAGTGTATTTGCGTGTA	

3.6.4.3 Primerlerin Hazırlanması

Liyofilize olarak gelen primerler (TibMolbiol) çözülecekleri güne kadar +4°C’de muhafaza edildi. Liyofilize primerler 100 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde, firmanın önerdiği miktarda steril distile su eklenerek çözüldü. Tüpler yaklaşık 30 saniye vortekslendi ve 30 dakika buzun üzerinde bekletildiler. Primerlerin tamamen çözülmesi sağlandıktan sonra, 100 pmol/µl konsantrasyondaki primer ana stokları, 1:10 oranında dilüe edilerek 10 pmol/µl konsantrasyonlu 100 µl ara stoklar hazırlandı. Hazırlanan ara stoklar, ana stoklar ile birlikte -20°C’de muhafaza edildi.

3.6.4.4 PCR ’ın Hazırlanışı

PCR reaksiyonu için kullanılacak olan tüm bileşenler 0,2µl hacimli steril ve tüm enzimlerden arındırılmış tüplere (Greiner; 683201) kondu. Farklı örneklerde aynı bölgelerin çoğaltılması durumunda bileşenlerden kalıp hariç diğerleri karışım halinde hazırlanıp daha sonra kalıbı önceden konmuş PCR tüplerine bölündü. Kurulan her bir PCR grubu için, mutlaka negatif kontrol olarak kalıp yerine suyun konulduğu reaksiyon ile deney kontrol edilmiştir.

Reaksiyon karışımı hazırlanırken, tüm bileşenler buz üzerinde muhafaza edildiler. Taq polimeraz enzimi karışıma en son eklendi. Karışım iyice homojenize edildikten sonra önceden kalıp eklenmiş PCR tüplerine bölündükten sonra, reaksiyon karışımı ile kalıbın iyice karışması sağlandı ve daha sonra tüpler “Thermal cycler”’a yerleştirildi.

Bütün primerlerin optimizasyonu sırasında, cihazın gradient (farklı anealing sıcaklıklarında aynı anda PCR yapabilme) özelliği kullanıldı. Sekiz farklı annealing sıcaklığının aynı anda denenebilmesi optimizasyonun kısa sürede yapılmasını sağlamıştır.

3.6.4.4.1 *AKT3* geninin ekzonlarının ve ekzon/intron sınırlarının Çoğaltılması

DNA dizi analizi yapılacak olan *AKT3* gen bölgelerinin çoğaltılma işlemleri için total reaksiyon hacmi 30µl olacak şekilde hazırlandı. *AKT3* ekzon ve ekzon/intron sınırlarının çoğaltılması için 13 ayrı primer çifti kullanılmıştır. Aşağıda her primer çifti için kurulan PCR reaksiyonları tablolastırılmıştır.

Tablo 3.3. *AKT3* geninin 1, 5, 6, 7, 8, 10 ve 13. ekzonları için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	30µl Reaksiyon(µl)
KCl'li tampon	10X	1X	3
MgCl ₂	50mM	2.5mM	1.5
dNTP Karışımı	10mM	0.2Mm	0.6
Taq Polimeraz Enzimi	5U/µl	1U/30µl	0.2
Forward Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Reverse Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Kalıp DNA	25 ng/µl	1 ng/µl	1.2
H ₂ O(Streil nükleaz içermeyen)	□	□	21.5

Tablo 3.4. *AKT3* geninin 2. ekzonu için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	30µl Reaksiyon(µl)
KCl'li tampon	10X	1X	3
MgCl ₂	50mM	2.5mM	1.5
dNTP Karışımı	10mM	0.2Mm	0.6
Taq Polimeraz Enzimi	5U/µl	1U/30µl	0.2
Forward Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Reverse Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Kalıp DNA	25 ng/µl	1 ng/µl	1.2
DMSO	□	□	0.5
H ₂ O(Streil nükleaz içermeyen)	□	□	21

Tablo 3.5. *AKT3* geninin 12. ekzonu için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	30µl Reaksiyon(µl)
KCl'li tampon	10X	1X	3
MgCl ₂	50mM	1.5mM	0.9
dNTP Karışımı	10mM	0.2Mm	0.6
Taq Polimeraz Enzimi	5U/µl	1U/30µl	0.2
Forward Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Reverse Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Kalıp DNA	25 ng/µl	1 ng/µl	1.2
H ₂ O(Streil nükleaz içermeyen)	□	□	20.3

Tablo 3.6. *AKT3* geninin 3. ekzonu için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	30µl Reaksiyon(µl)
Hot Start tampon	10X	1X	3
MgCl ₂	50mM	2.5mM	1.5
dNTP Karışımı	10mM	0.2Mm	0.6
Hot Start Taq Polimeraz Enzimi	5U/µl	2U/30µl	0.4
Forward Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Reverse Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Kalıp DNA	25 ng/µl	1.7 ng/µl	2
H ₂ O(Streil nükleaz içermeyen)	□	□	20.5

Tablo 3.7. *AKT3* geninin 4. ekzonu için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	30µl Reaksiyon(µl)
KCl'li tampon	10X	1X	3
MgCl ₂	50mM	2.5mM	1.5
dNTP Karışımı	10mM	0.2Mm	0.6
Taq Polimeraz Enzimi	5U/µl	1U/30µl	0.2
Forward Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Reverse Primer	10 pmol/ µl	0.3 pmol/ µl	1
Kalıp DNA	25 ng/µl	2.5 ng/µl	3
H ₂ O(Streil nükleaz içermeyen)	□	□	19.7

Tablo 3.8. *AKT3* geninin 9 ve 11. ekzonları için kurulan PCR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	30µl Reaksiyon(µl)
KCl'li tampon	10X	1X	3
MgCl ₂	50mM	2.5mM	1.5
dNTP Karışımı	10mM	0.2Mm	0.6
Taq Poimeraz Enzimi	5U/µl	2.5U/30µl	0.5
Forward Primer	10 pmol/ µl	0.26 pmol/ µl	0.8
Reverse Primer	10 pmol/ µl	0.26 pmol/ µl	0.8
Kalıp DNA	25 ng/µl	1 ng/µl	1.2
H ₂ O(Streil nükleaz içermeyen)	□	□	21.6

Optimizasyon sonuçlarına göre belirlenmiş sıcaklıklar ve süreler Tablo 3.9.'da özetlenmiştir.

Tablo 3.9. *AKT3* gen bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan PCR profilleri

Primerler→ Basamaklar ↓	<i>AKT1</i>		<i>AKT2</i>		<i>AKT3</i>		<i>AKT4</i>		<i>AKT5</i>	
	Isı(° C)	Süre	Isı(° C)	Sür e	Isı(° C)	Sür e	Isı(° C)	Sür e	Isı(° C)	Sür e
Başlangıç Denatürasyonu	95	5dk	95	5dk	95	5dk	95	5dk	95	5dk
Denatürasyon	95	30s	95	30s	95	30s	95	30s	95	30s
Anealing	57	30s	55	30s	62	45s	62	30s	58	30s
Extension (Uzama)	72	30s	72	30s	72	30s	72	30s	72	30s
Final Extension	72	5dk	72	5dk	72	5dk	72	5dk	72	5dk
Siklus Sayısı	35		35		35		35		35	

Tablo 3.9'un devamı

Primerler→ Basamaklar ↓	<i>AKT6</i>		<i>AKT7</i>		<i>AKT8</i>		<i>AKT9</i>	
	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	95	5dk	95	5dk	95	5dk	95	5dk
Denatürasyon	95	30s	95	30s	95	30s	95	30s
Anealing	62	30s	61	30s	58	30s	60	30s
Extension (Uzama)	72	30s	72	30s	72	30s	72	30s
Final Extension	72	5dk	72	5dk	72	5dk	72	5dk
Siklus Sayısı	35		35		35		35	

Tablo 3.9'un devamı

Primerler→ Basamaklar ↓	<i>AKT10</i>		<i>AKT11</i>		<i>AKT12</i>		<i>AKT13</i>	
	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre	Isı(°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	95	5dk	95	5dk	95	5dk	95	5dk
Denatürasyon	95	30s	95	30s	95	30s	95	30s
Anealing	62	30s	60	30s	63	30s	63	30s
Extension (Uzama)	72	30s	72	30s	72	30s	72	30s
Final Extension	72	5dk	72	5dk	72	5dk	72	5dk
Siklus Sayısı	35		35		35		35	

3.6.4.5 PCR Ürünlerinin Agoroz Jelde Görüntülenmesinde Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

5X TBE (Tris Buffer EDTA) Stok Tampon Hazırlanışı

1lt 5X TBE tamponu hazırlamak için, 54 gr Tris- Base (Sigma, T6066), 27,5 gr Borik Asit (Sigma, B6768) ve aşağıda ayrıca hazırlanışı anlatılan 0.5M EDTA (pH 8) solüsyonundan 20 ml kullanıldı. Katı kimyasallar hassas terazi (Presica 205A SCS) kullanılarak tartıldı. Gerekli tüm kimyasallar mezür içerisine konuldu. Mezüre 1lt steril distile su eklenip magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak çözeltinin homojenize olması sağlandı.

0.5 M EDTA (pH:8) Hazırlanışı

100 ml 0.5 M EDTA'nın hazırlanması için; 23,26 gr EDTA (Sigma, E5134) tartılarak üzerine 80 ml steril distile su eklendi. Magnetik karıştırıcı üzerinde çözeltinin pH'sı 8 olana kadar yaklaşık 2,5 gr NaOH eklendi. pH ölçümü, magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılan çözeltinin içerisine daldırılan pH metre ile yapıldı ve pH değişimine dikkat edilerek çözelti hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

Agoroz Jelin Hazırlanışı ve Jel Elektroforezi

Agoroz jelin hazırlanması ve elektroforez tankının (Biorad-Sub-Cell GT) doldurması için 0.5X konsantrasyonlu TBE tamponu hazırlandı. Bunun için 5X konsantrasyonunda hazırlananan stok TBE tamponu 1:10 oranında seyreltildi. Tankın içi, jeli örtecek kadar 0,5X TBE tampon ile dolduruldu.

Agoroz jel ise yürütülecek nükleik asit özelliğine göre değişik yüzdelerde hazırlandı. İzole edilen genomik DNA'nın intakt olup olmadığını kontrolü için %1'lik, PCR ürünlerinin gösterilmesi için ise %2'lik agoroz jeller hazırlandı.

%2'lik, 40 ml hacimli hazırlanan jel örneği üzerinden yapılan işlemler şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

40ml hacimli jel teknesi için 40ml 0,5X TBE tampon ile 0,8 gr agaroz tartılarak (Applichem, A2114) erlen içerisine konuldu. Mikrodalga yardımı ile agarozun tampon içerisinde tamamen çözülüp, sıvı hale gelmesi sağlandı ve oda sıcaklığında el yakmayacak kadar soğuması sağlandı. Daha sonra 3µl EtBr (Etidyum Bromür) ilave edilerek, EtBr'ün tamamen dağılması için erlen çalkalandı. Tamamen homojenize iken jel yatağına döküldü. Daha önceden konumları jel yatağına göre ayarlanmış olan taraklar jel teknesine yerleştirildi ve jel katılaşana kadar oda sıcaklığında yaklaşık 10-15 dakika beklendi. Katılaşan jelden taraklar kuyulara zarar vermeden dikkatlice çıkarılıp, örneklerin yüklenmesi için 0,5X TBE tampon ile dolu jel tankına yerleştirildi.

Yükleme Tamponu Hazırlanışı

10ml yükleme tamponu hazırlaması için; 0,025 gr bromofenol Blue (BF Blue) ve 0,025 gr xylene cyanol FF (XCFF) 15ml steril tüp içerisinde karıştırılarak, üzerine 3 ml gliserol (Applichem, A0567) eklendi ve karışım steril distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Homojenize olana kadar yüksek devirde vortekslendi.

PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

PCR ürünlerinden 5µl ve yükleme tamponundan 1µl karıştırılarak örnekler kuyulara yüklendi. PCR ürünlerinin uzunluklarının kıyaslanması açısından PCR ürünün uzunluğuna göre ise 50 bp (Fermentas, SM0613) ya da 100 bp (Fermentas, SM0241) DNA belirteçlerinden biri kullanıldı. 2µl DNA belirteci (Marker), 1µl yükleme tamponu ile birlikte kuyulara yüklendi.

Jele yüklenen PCR ürünleri, jel tank sistemi güç kaynağına (Biorad PowerPac Basic) bağlanarak, 80-120 V arası sabit gerilim ve 30-40mA arası

akım koşullarında yürütüldü. Süre PCR ürünlerinin moleküler ağırlığına göre ve jelin konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama 20-35 dakika arasında değişti. Yürütülen PCR ürünleri ultraviyole ışık altında transilüminatör ile görüntülendi.

3.6.5. Kullanılan malzeme listesi

Tez çalışmasında kullanılan malzemelerin ayrıntılı listesi aşağıda tablolandırılmıştır.

Tablo 3.10 Kullanılan malzemelerin listesi

Sıra No	Malzemenin Cinsi	Miktarı	Fiyatı(TL)
1	Steril pipet ucu (1000ul)	40 rac	600
2	Steril pipet ucu (200ul)	80 rac	1.200
3	Steril pipet ucu (10ul)	100 rac	1.500
4	Cryogenic vials steril (2ml)	100 adet	50
5	Crybox (2ml)	4 adet	60
6	PCR-strept 8 well 0.2ml ince duvarlı PCR tüpü, düz kapaklı	1000 adet	400
7	High Pure PCR template preparation Kit (DNA İzolasyon kiti)	100 reaksiyon	1.500
8	Taq Polimeraz	1 x2000U	600
9	dNTP seti(dATP,dCTP,dGTP, dTTP) her birinden 1ml(100umol)	1x 1000ul	200
10	Primer	16 çift	3.200
11	Ultrapure Agarose	1 x100g	100
12	BioLabs 100bp ladders Moleküler ağırlık marker	1 x50ug	210
13	BioLabs 50 bp ladders Moleküler ağırlık marker	1 x50ug	240

Tablo 3.10'un devamı

14	Dizileme (nükleotid değişiklikleri için)	40 hasta 16 ekzon için	7.040
15	5XTBE	5lt	200
16	otomatik mikropipet	3 adet	2.500
17	Rpmı 1640 (500ml)	6 adet	246
18	Fetal bovine serum (100ml)	10 adet	810
19	Fitohemaglutinin (1.2mg)	18 adet	680
20	L-glutamin (250mM)	12 adet	450
21	Amfoterisin-B (250ug)	12 adet	450
22	Penisilin/streptomisin (10.000ug/5ml)	12 adet	450
23	5 ml steril serolojik pipet	150 adet	45
24	10 ml steril serolojik pipet	150 adet	52
25	Enjektör	100 adet	60
26	12 ml steril tüp	600 adet	920
27	Lam	50x200 kutu	2.000
28	Lamel	100x10 kutu	40
29	Deoksitimidin (1gr)	1 adet	80
30	Hipotonik solüsyon, 0.075 M KCL (100ml)	18 adet	306
31	Kolçisin (25ml)	1 adet	650
32	Metanol (2,5 lt)	5 adet	265
33	Asetik asit (2,5 lt)	3 adet	265
Toplam			27.369 TL

3.7. Araştırma planı

Tez çalışması için yapılan araştırma planı ayrıntılı bir şekilde aşağıda tablolaştırılmıştır.

Tablo 3.11 Araştırma planı

Araştırma basamakları:	AYLAR (01.09.10-01.09.11)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hasta kanlarının toplanması	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
DNA İzolasyonu					×	×	×	×	×	×		
Sitogenetik Analiz	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)						×	×	×	×	×	×	×
Sekans Analizi ile mutasyonların belirlenmesi										×	×	×
Tez yazımı									×	×	×	×

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.1 PCR Ürünlerinin Sekans Analizleri

Dizi analizinin sorunsuz gerçekleşebilmesi için PCR ürünlerinin hepsi jel elektroforezi sonucu görüntülendi ve spesifik olmayan bantların olup olmadığı kontrol edildi. PCR optimizasyonları spesifik tek bant elde edilene kadar tekrarlandı.

PCR tüplerinin üzerine yazılan hasta ve primer kodları kontrol edildikten sonra kapakları parafilm ile iyice sarıldı. Örnekler “Macrogen” firmasının Amsterdam şubesine kargo yolu ile gönderildi ve bu gönderim ve dizi analizi hizmet alımı ile karşılandı.

Her gönderilen PCR ürünü için firma tarafından ilk önce saflaştırma işlemi gerçekleştirilmesi istendi. 8. ekzon haricindeki ekzonların hepsi için “Forward” primer kullanılarak dizi analizleri gerçekleştirildi. Fakat 8. ekzonun dizi analizi “Reverse” primer ile gerçekleştirildi. Daha sonraki aşamalarda ise rastlanan nükleotid değişimlerinden emin olmak için “Reverse” primerler kullanılarak tekrar dizi analizleri yapıldı.

Örneklerin Amsterdam'a gönderilmesinden 2 hafta sonra, firma tarafından elektronik posta yolu ile kapiller elektroforez sonuçları ve kromatogramlar gönderildi. Sonuçlar; pdf, gif, ve metin formatlarında gönderildi. Dizi analizi için sırası ile aşağıdaki yöntemler uygulandı:

3.8.1.1 Karşılaştırma (BLAST) Analizi

Her hastanın gelen sekans sonuçları, "NCBI/Blast" veritabanı kullanılarak tüm genom dizisi ile karşılaştırıldı ve istenilen bölgenin PCR ile çoğaltılıp çoğaltılmadığı doğrulandı. Bu işlem için FASTA formatında gelen dizi ve www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi internet adresi kullanıldı. Nükleotid düzeyinde yapılan bu karşılaştırma işlemi ile homozigot veya heterozigot baz değişikliklerinin olup olmadığı kontrol edildi.

3.8.1.2 Dizi Analiz Programının Kullanılması

Gelen kromatogram sonuçlarının analizleri için "Mutation Surveyor V3.30 (35-Day Trial)" programı kullanıldı. Programa bir seferde 47 hasta birden yüklendi ve bu işlem tüm sekans sonuçları için tekrar edildi. Analizler, program yardımıyla ve göz ile kontrol edilerek gerçekleştirildi.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

İstatistiksel olarak anlamlı hasta sayısına ulaşamaması ve hastalıkla ilişkilendirebileceğimiz bir nükleotid değişikliğinin bulunamaması.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırmada hastalarımız "**Mikroskopik Kromozomal Değişikler İçin Tüm Genomu Tarayarak, Santral Sinir Sisteminin Gelişimsel Anomalileri İle İlgili Aday Gen ve Bölgelerin Belirlenmesi**" isimli projenin etik kurul onayına göre toplandı. Etik Kurul Onayı Ek-1'de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Olgu Grubunun Oluşturulması

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Nörolojisi Bilim Dalına tedavi amaçlı başvuran ve aynı anabilim dalı tarafından Korpus Kallosum Displazisi tanısı konulan bireyler olgu grubumuzu oluşturdu. Çalışmada olgu grubunu oluşturan bireylerin tüm klinik bilgileri yine aynı anabilim dalı tarafından sağlanan hasta dosyalarından temin edildi. Olgu grubunu oluşturan bireylerin klinik bilgilerine göre bu bireyler korpus kallosum displazisi ile birlikte değişik sendromlar da (Aicardi sendromu, Wolf-Hirschhorn sendromu vb.) taşımaktadır.

Çalışmada, olgu grubuna 47 korpus kallosum displazisi olan hasta çocuklar dahil edildi. Olgu grubunun 23'ü (%48,9) kız, 24'ü (%51,1) erkek bireylerden oluşmaktadır.

Olgu grubundaki hastalardan HEPARİN'li tüplere alınan 2'şer ml kan örneklerinden HARVEST işlemi sonucu elde edilen hücreler -20°C'de saklandı. Bu hücrelerden G bantlama ile konvansiyonel sitogenetik analiz gerçekleştirildi. Hastalara ait karyotipler incelenerek mikroskopik düzeyde bir değişiklik olup olmadığı kontrol edildi ve hastaların kromozom analiz formları dolduruldu. Hastalara ait karyotip görüntüleri ve preparatlar muhafaza edildi.

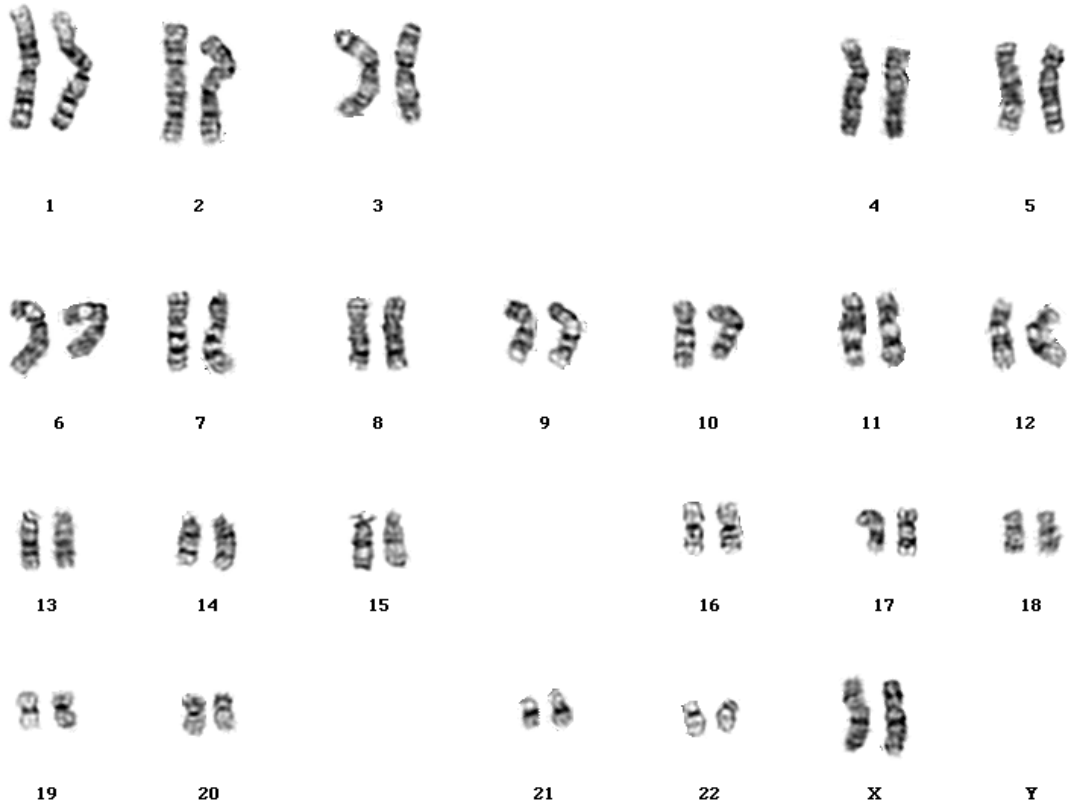
Olgu grubundaki tüm bireylerden EDTA'lı tüplere alınan 2'şer ml kan örnekleri, DNA izolasyonuna kadar -20°C'de muhafaza edildi. İzolasyonlarının ardından, spektrofotometrik ölçümleri yapıp konsantrasyon ve saflıkları belirlenen DNA örnekleri %2'lik (w/v) agaroz jelde yürütülüp transilüminatör ile görüntülenerek teyid edildi.

4.2 G Bantlama İle Konvansiyonel Sitogenetik Analiz Sonuçları

Olgu grubundaki hastalara ait HEPARİN'li tüplerde gelen kan örneklerinden elde edilen kromozomlar Leishman boya ile boyandıktan sonra mikroskopik incelemeleri ve karyotiplemeleri yapıldı. Örnek bir çalışma Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Olgu grubunu oluşturan hastaların karyotip analizleri sonucunda hiçbir hastada mikroskopik kromozomal değişiklik saptanmamıştır.

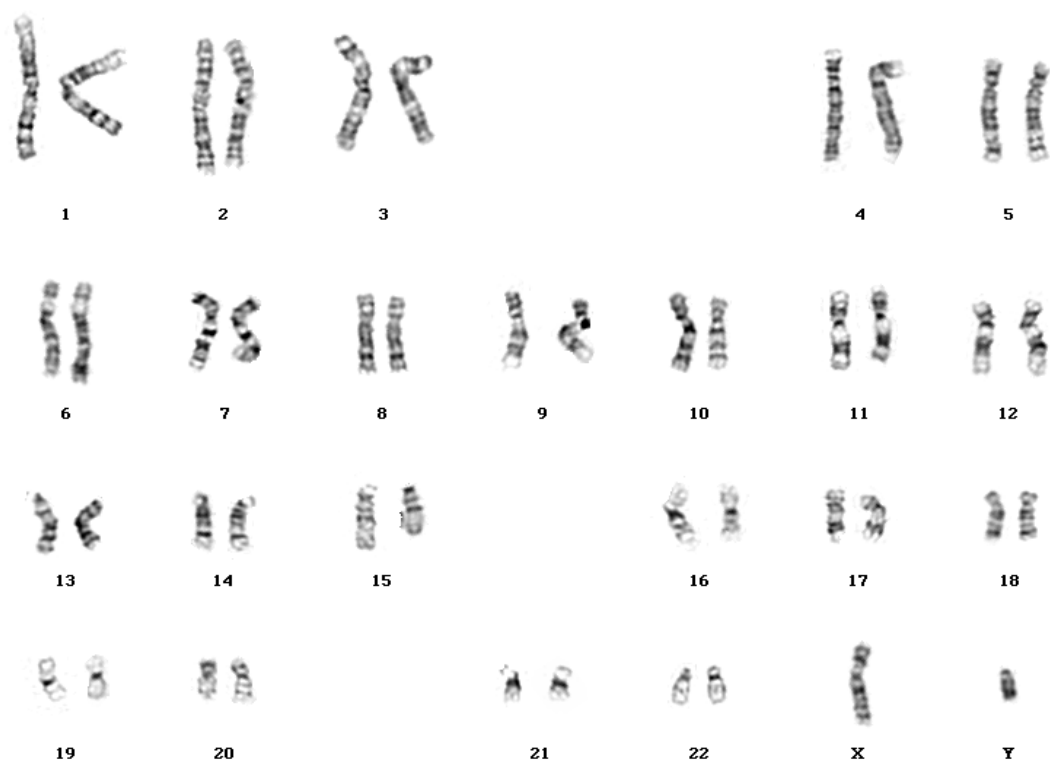
A



B



C



D



Şekil 4.1 G bantlama. A-) Ep-10-208 numaralı cinsiyeti kız olan hastanın karyotipi. B-) Ep-10-208 numaralı hastanın metafaz alanı. C-) Ep-11-287 numaralı cinsiyeti erkek olan hastanın karyotipi. D-) Ep-11-287 numaralı hastanın metafaz alanı.

4.3 Belirlenen bölgelerin PCR ile çoğaltılması ve görüntülenmesi

Spektrofotometrik ölçümleri yapılan DNA örneklerinden 25ng/μl konsantrasyonlu ara alikatlar hazırlandı. PCR için kalıp DNA olarak hazırlanan bu ara alikatlar kullanıldı. Tüm PCR sonuçları %2'lik (w/v) agoroz jelde yürütüldü.

4.3.1 Çoğaltılan AKT3 Gen Bölgelerinin Jel Görüntüleri

AKT3 geninin bütün ekzonları ve ekzon-intron sınırları PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgelerin FASTA formatları ve jel görüntüleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

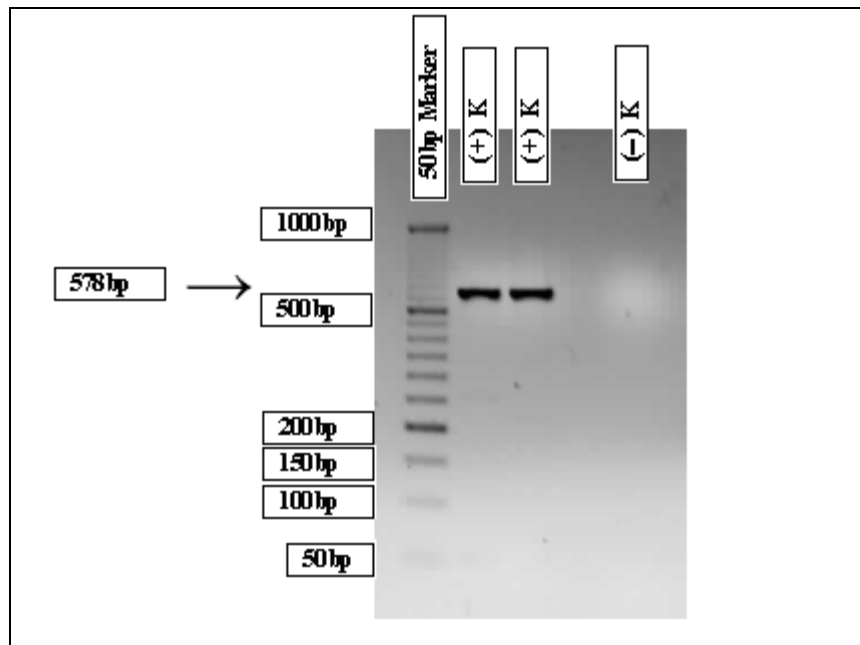
A

```

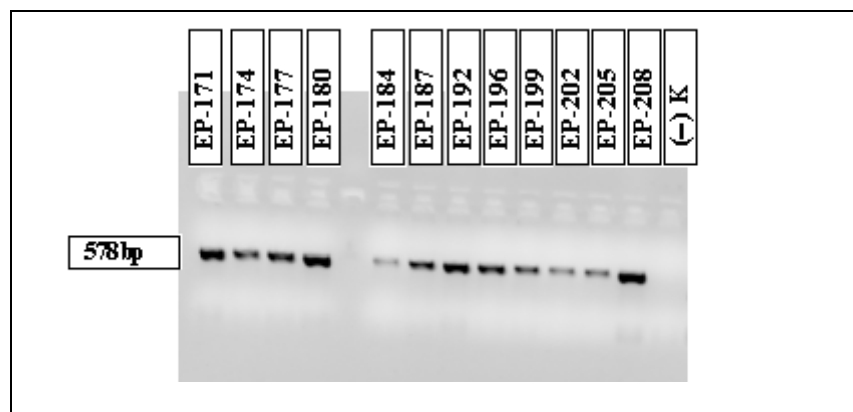
1      gggaagtgctttcattatagaactattttaataaataagttccccagtttgcaggccagttgaag
65     acatttacaaagaattagttgtttgttattgtctgtgagttgcaagaatggaaaaaaattct
129    ttcttcaatacttccttccaggctgagtcactagagagtggaagggcagcagcagcagag
193    aatccaaaccctaaagctgatatcacaaagtaccatttctccaagttgggggctcagaggggag
257    tcatcatgagcgatgttaccattgtgaaagaaggttgggttcagaagaggggtaagtgtccgc
321    aaacaaaaataatacggttggtaagagtgtctagcagtgagtggtgtcttagaagttgatcttt
385    tttctgatactgttaaactgtgtcatgtctagtaagagagaaaatgatataatttaacgtg
449    tgtaggaatttgcttggttattaagggatttttttgtaattcttgattttgagcatttataatc
513    tagttaagttaggtttgactttctggatatgttggtgtagcg

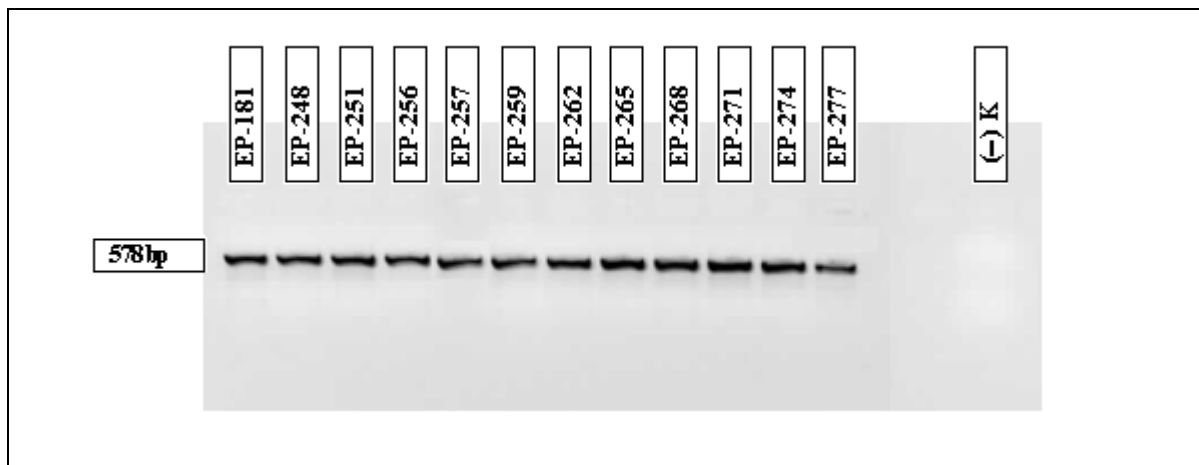
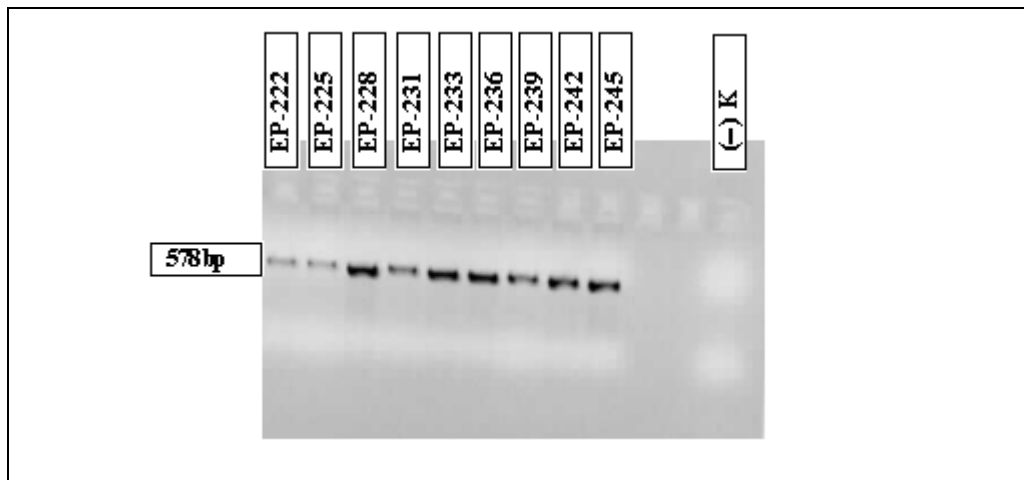
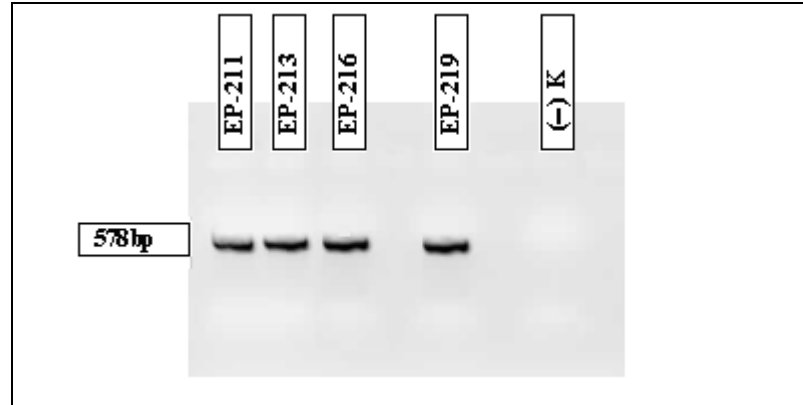
```

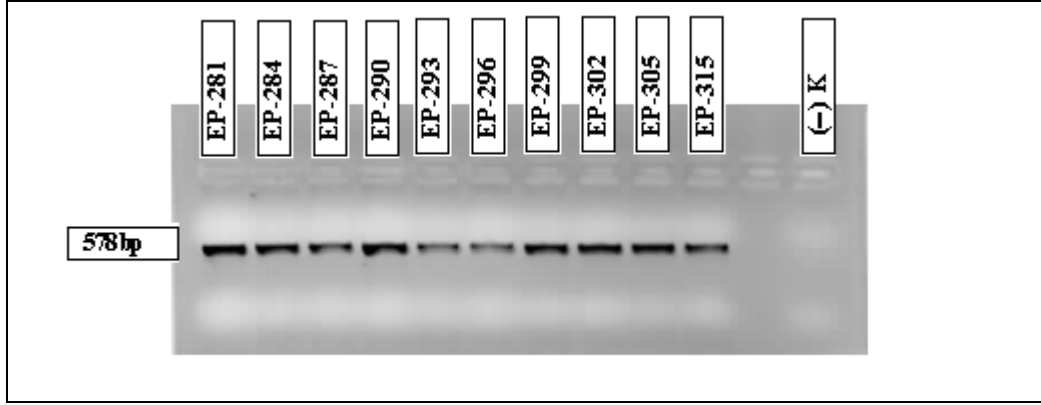
B



C







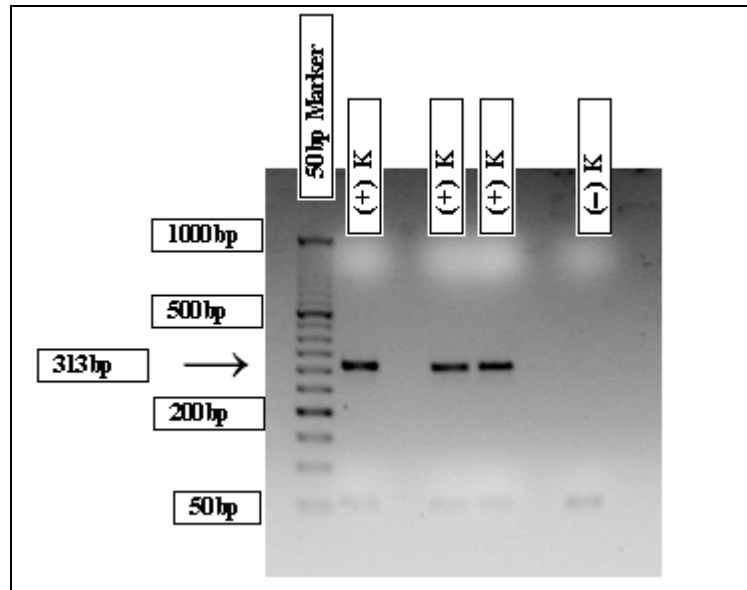
Şekil 4.2 AKT3 geninin 1. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. Gölgeleme ile yazılan bölge ise başlangıç kodonudur. **B** AKT1 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT1 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

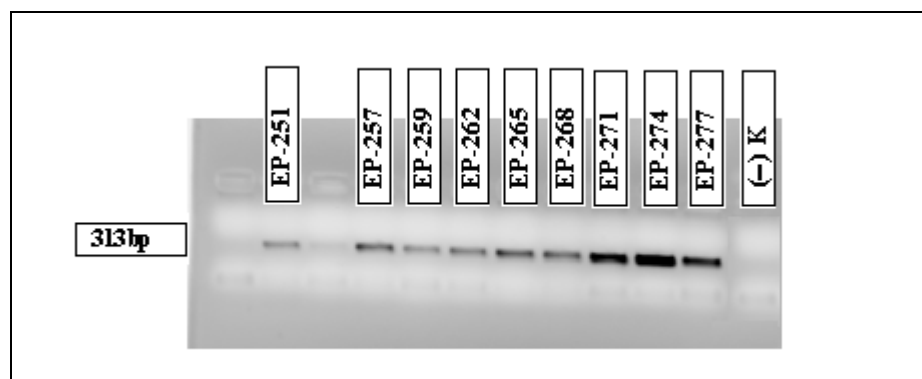
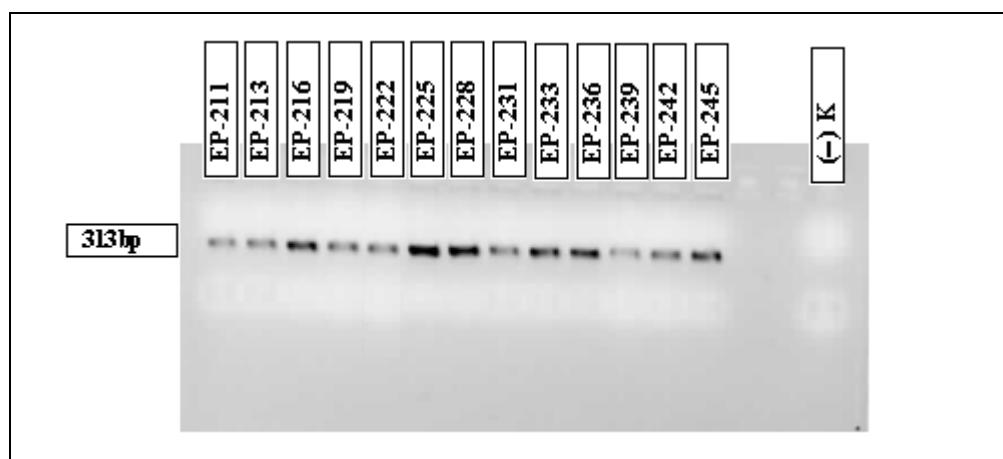
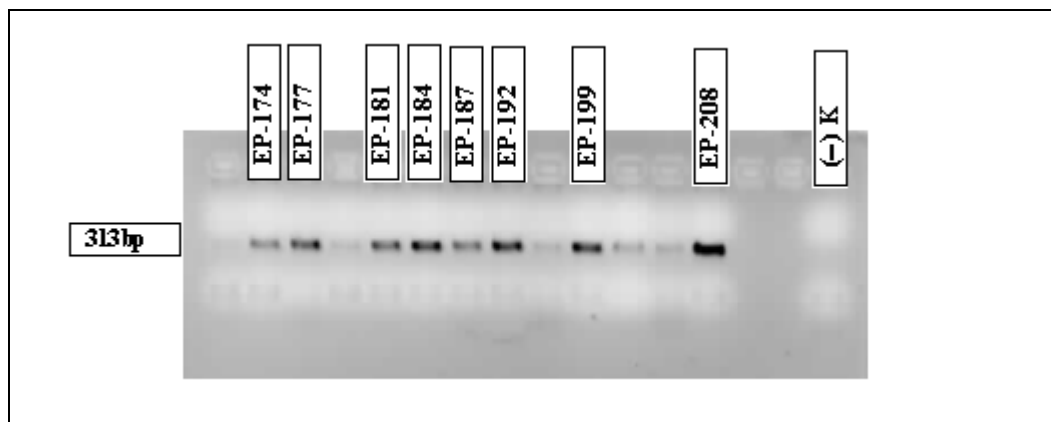
A

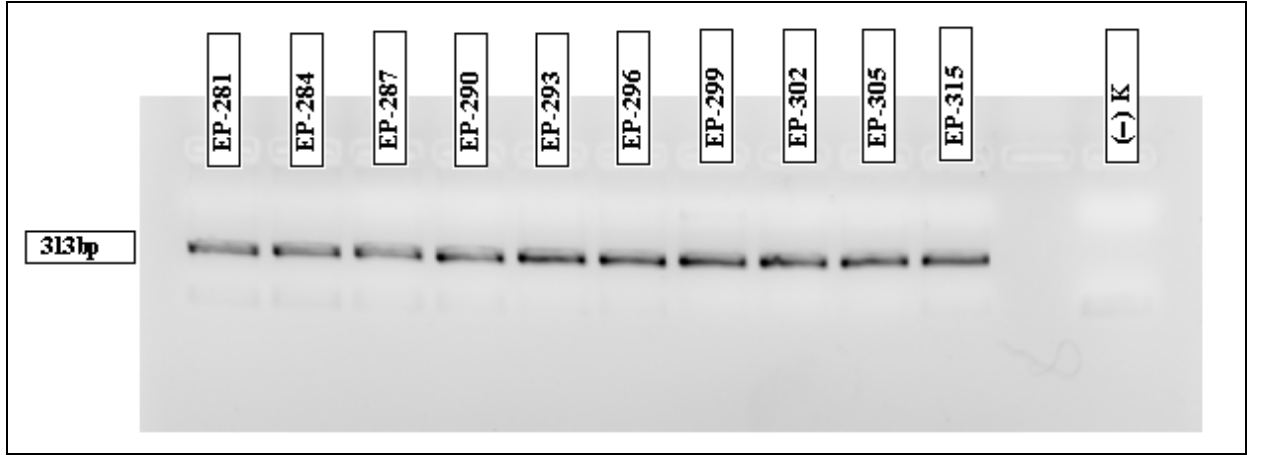
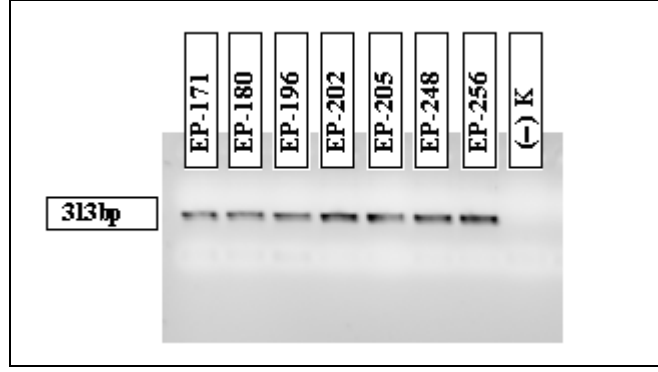
1 gccagtgttgtaggacata tattgtaccataattttat ttttttgcataaaaagctgctgttcattt
65 ttttcagcattaacatgctgcttttctcatgtaggagaatataaaaaactggaggccaaga
129 tacttccttttgaagacagatggctcattcataggaataaaagagaaacctcaagatgtggatt
193 taccttatcccctcaacaacttttcagtggaagtaagtaattataattgttgattcatcttg
257 tatttattttat tttttatgat ttttatgtgtcagata tcttaggctatatgagaaacct

B



C





Şekil 4.3 AKT3 geninin 2. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT2 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT2 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

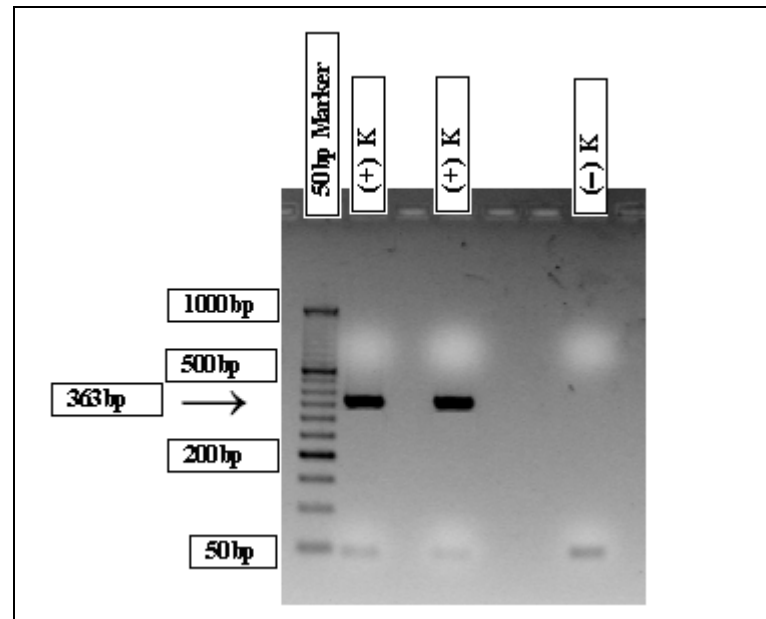
A

```

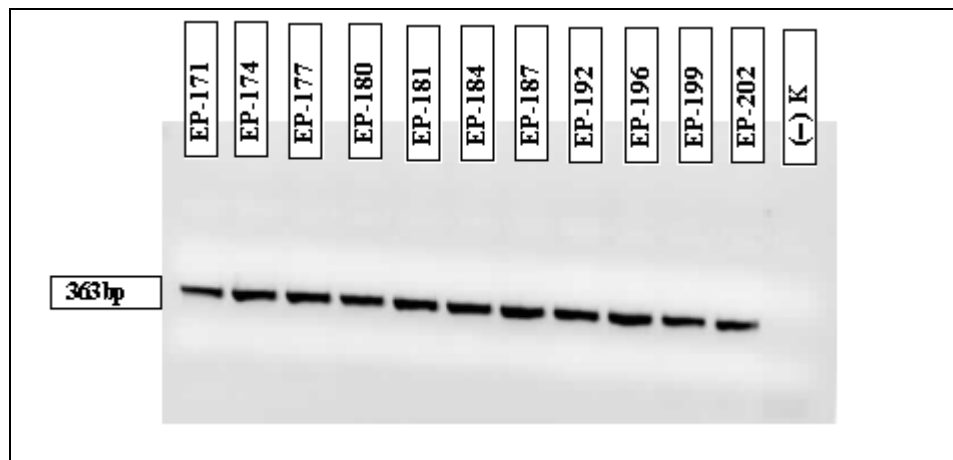
1   aagctgtgagttcgcaactgggtttttgtttaaaatagaactctgtagttctcaattatttacttc
65  ttgttttaaatatatccatatatttaaagaacattttattttattcttagaatgccagttaatga
129 aaacagaacgaccaaagccaaacacattttataatcagatgtctccagtggactactggttataga
193 gagaacatttcatgtagatactccagaggaaaggtaagaaattcacttggttttcattttgtgaa
257 aaagcaacactcaatctaaagatgtatttgtagtctgactttattatttgtaaatatataaat
321 atatttttttaaatgctataggtctctaaattcttgccttctggc

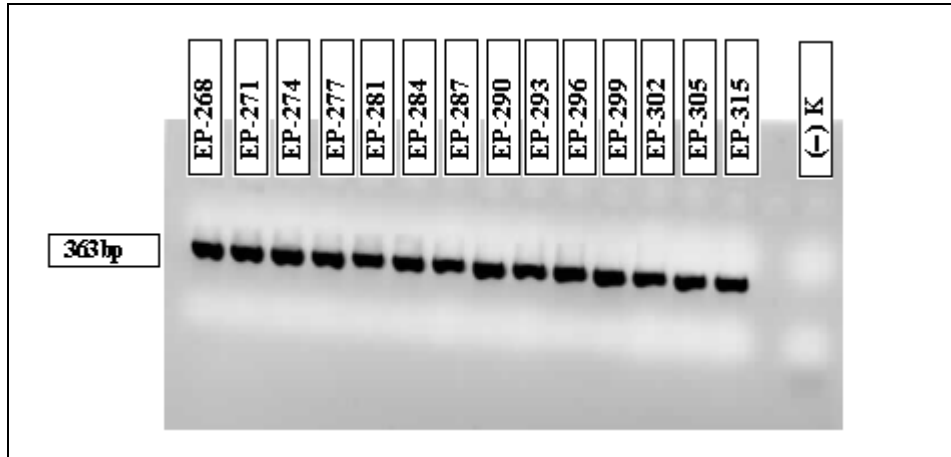
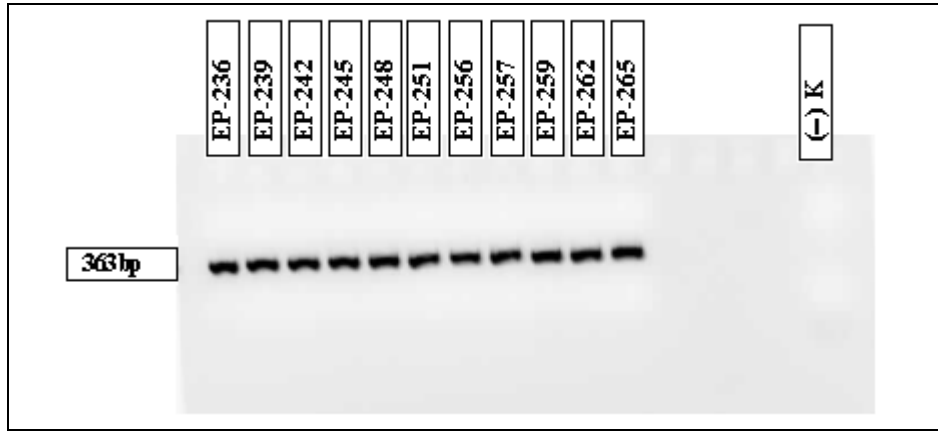
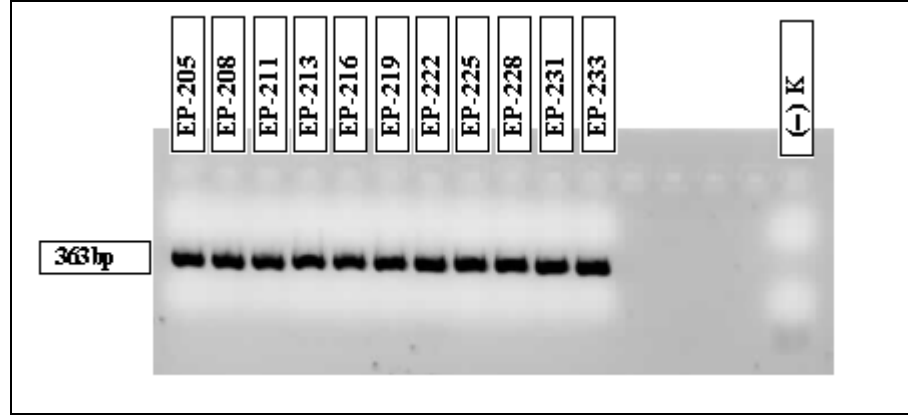
```

B



C





Şekil 4.4 AKT3 geninin 3. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT3 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT3 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

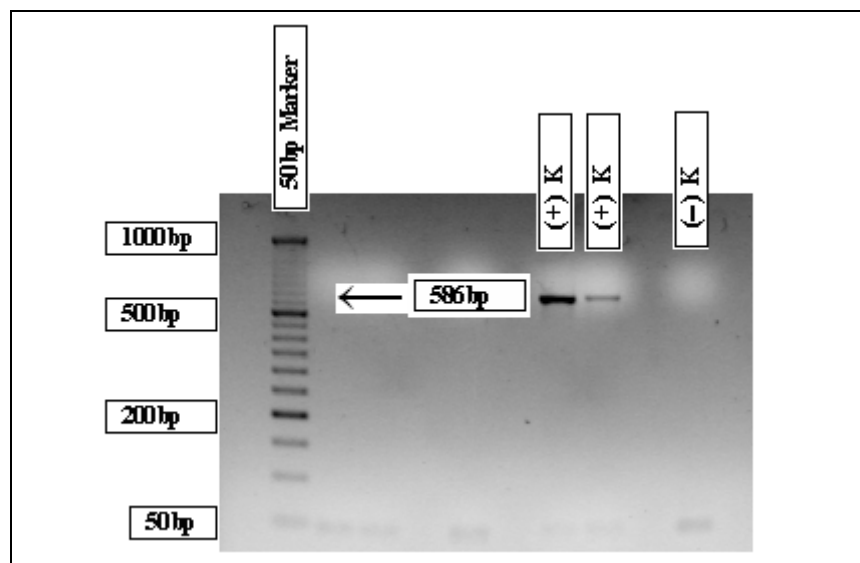
A

```

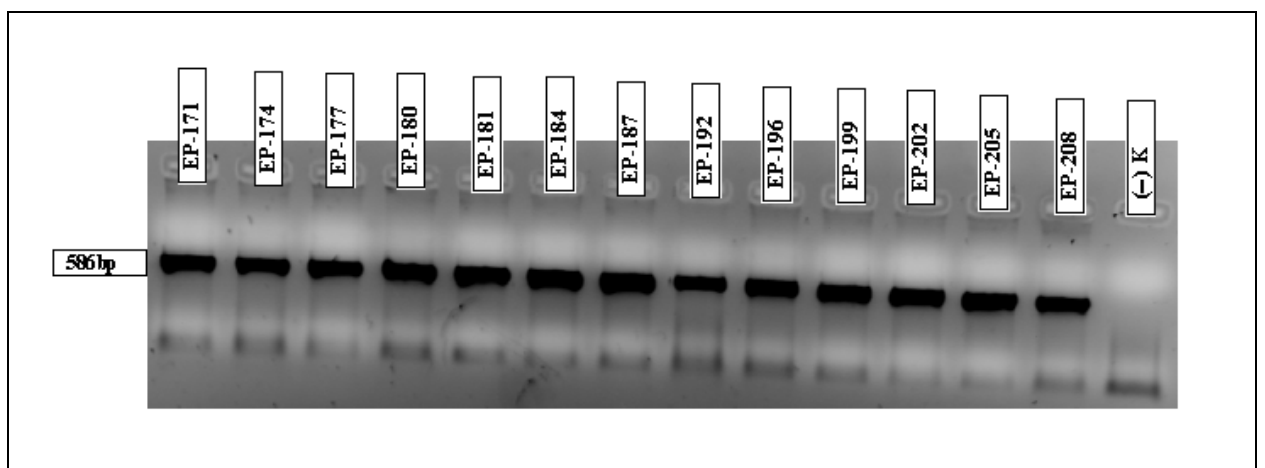
1      tgctactacagaacttttaggcatgtggtgaatgaaatgctcttaggattatcttcactttgggggt
65     gatggtgagagtgtatgcttatctgtgttgagtgtgtttgatctctgaatagattttatttgta
129    ttgatttcatagttttataaaaaggaaaaatatttaaaccatttaccatcttctattaatgggaaat
193    tttactcatttttataggaagaatggacagaagctatccaggctgtagcagacagactgcaga
257    ggcaagaagaggagagagaatgaattgtagtccaacttcacaaattgataatataggagaggaaga
321    gatggatgcctctacaacccatcataaaaagaaaggtagaaaataataaacttattcccagcacag
385    cattcatttgtctggaagaaacatatataaaagctaccatttgcagaaagatgtcagccagtttt
449    cttacgatatgtaaatatattggtgggtcttattcacatgaatctgaaatacctgttgttgttt
513    aaaaccaaataggtgaacattgtttcagtgatccagcacttttagcactgaatgctgatagggt
577    catgtgtgac

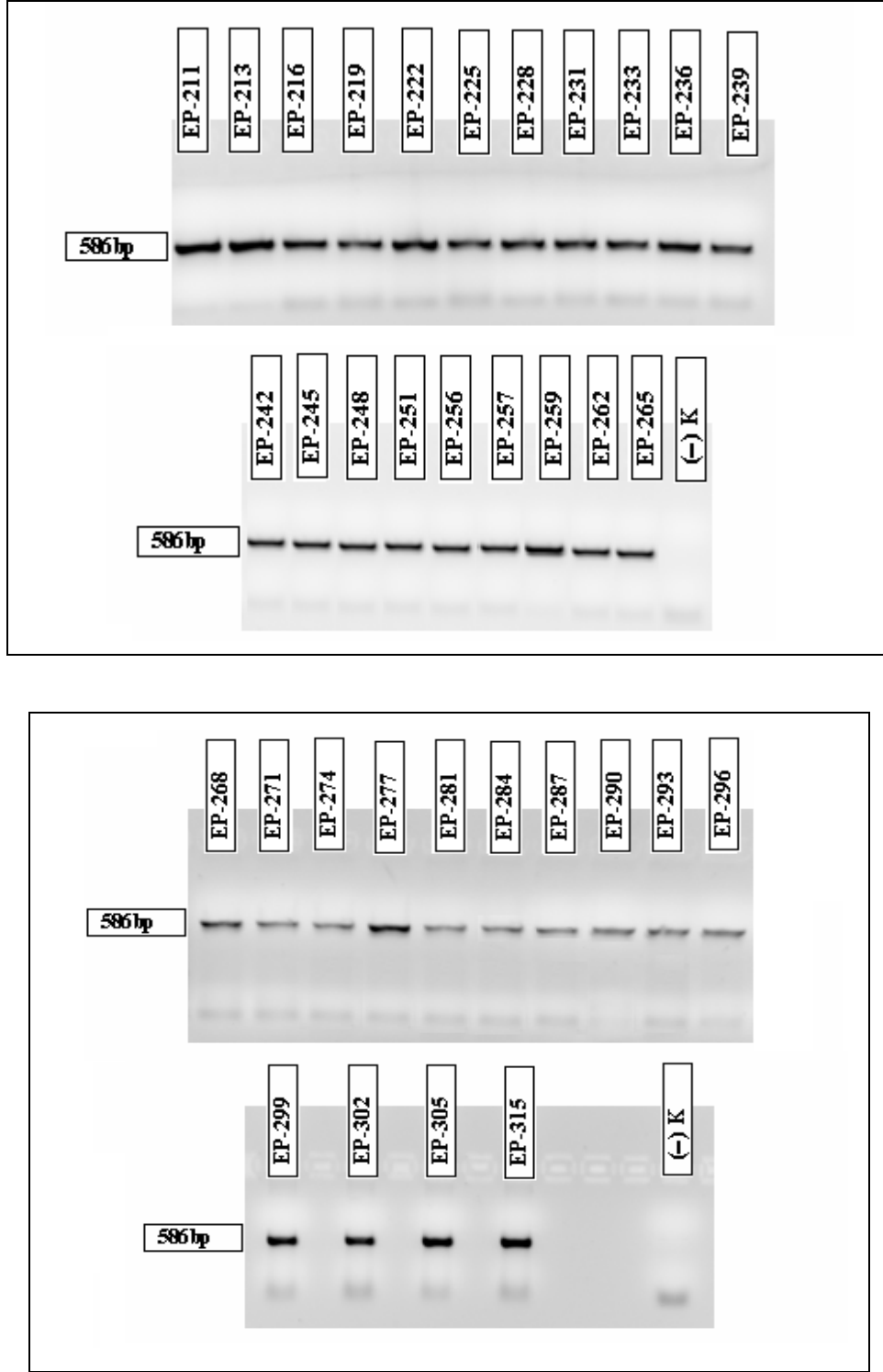
```

B



C





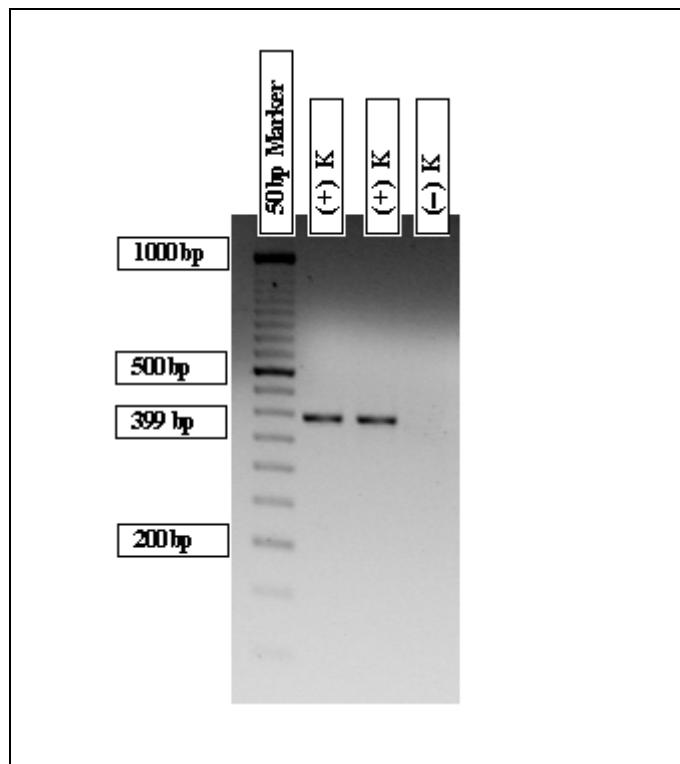
Şekil 4.5 AKT3 geninin 4. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT4 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT4 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

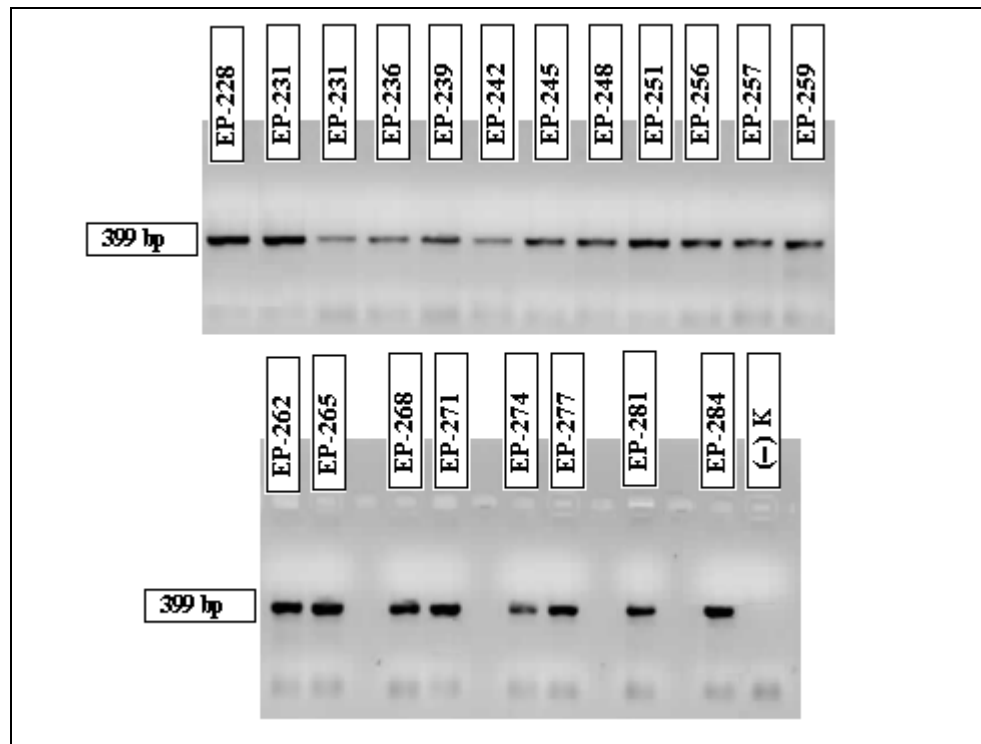
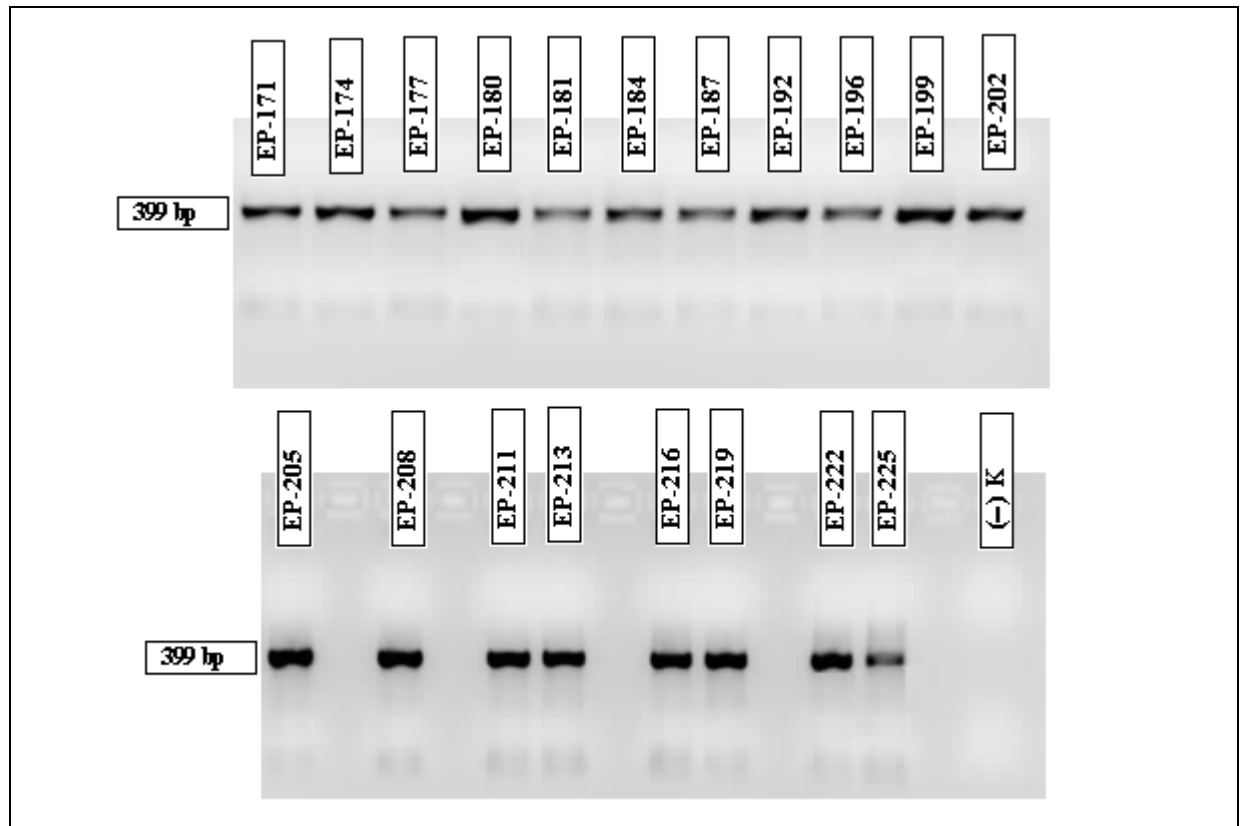
A

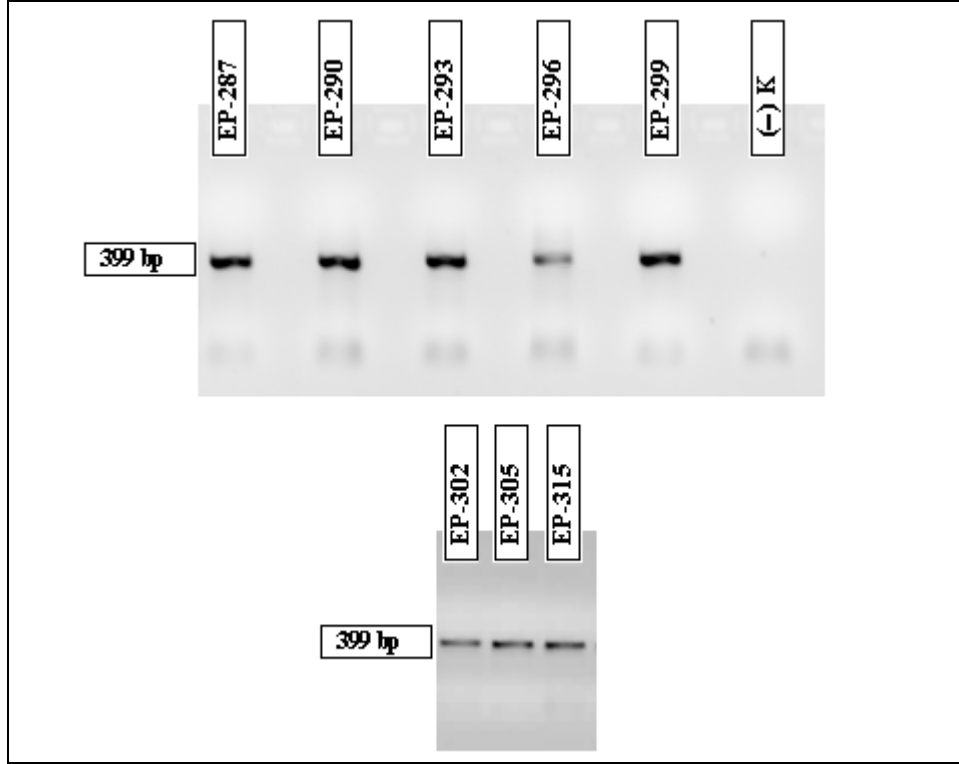
1 ctaatgagacagccaatgccagtctgattcttttttcatttaaattgtgcttataaaattggtaaaa
65 tttggtttttgagtggatattgcaaacacatatatatatgctaacaaataaattgcatcaaatac
129 ttcataattatattttttaatttgtatttttcagacaatgaatgattttgactatttgaaactac
193 taggtaaaggcactttttgggaaagtatttttggttcgagagaaggcaagtggaaaatactatgc
257 tatgaagattctgaagaaagaagtcattattgcaaaggtaactgatttattaaagttgattact
321 aaatttttgtttgacagtgtgcatgtgtttgtgggctcatgaatttacatgctaattgtatgcaaa
385 ttccattaaac

B



C





Şekil 4.6 AKT3 geninin 5. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT5 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT5 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

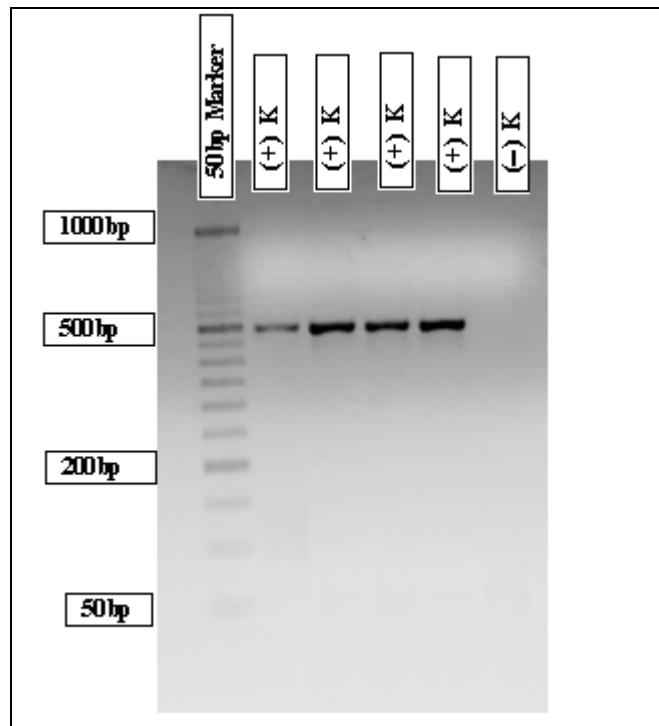
A

```

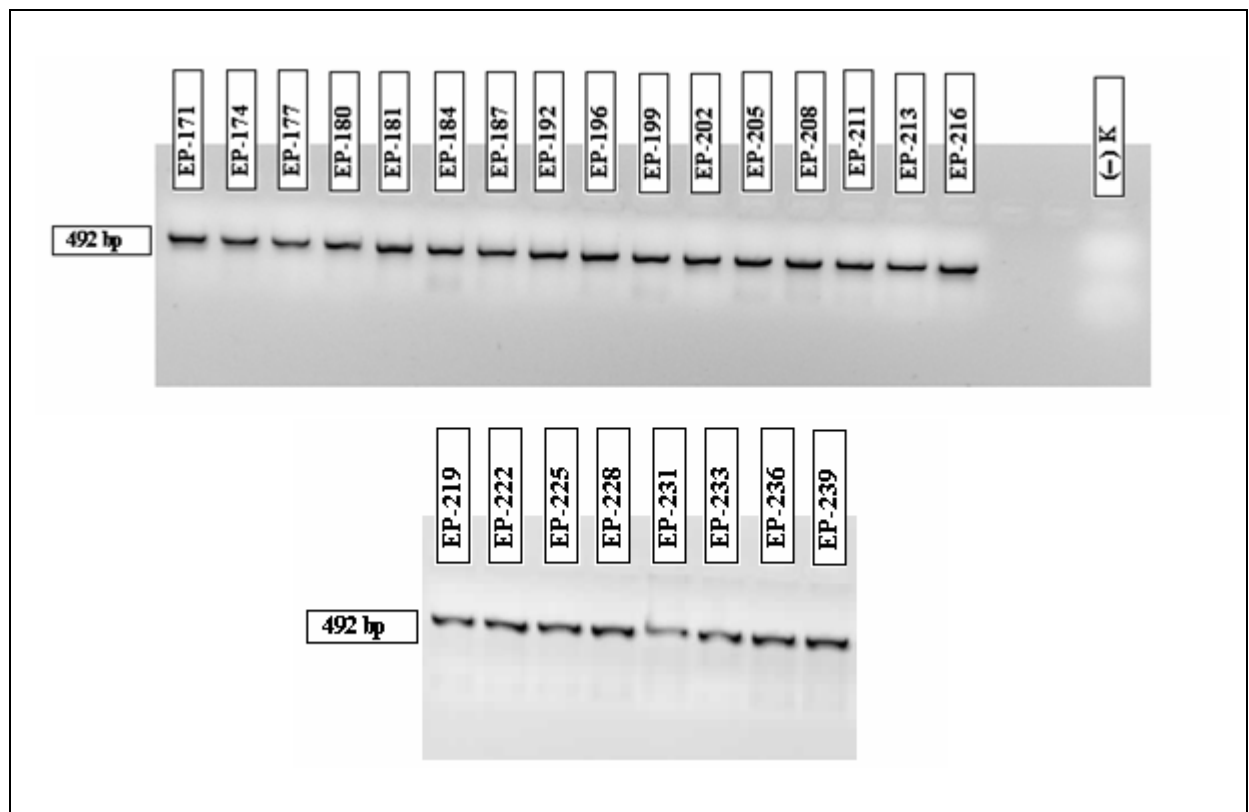
1      ttcaatctctgggcttaacctcttccaatttttagagaaatagtgaattattattatcagtgct
65     caaaacatatattgaaggtttgcttttttctttttaggatgaagtggcacacactctaactg
129    aaagcagagtattaaagaacactagacatccctttttaacagtaagtgactagaggacagatgt
193    tataatcgtaacatttgaaatttaaggaattttatgttagaaattaaattgtgaaaaatactat
257    tcatttagatatctcattttctttgtggaaagaacgtaagtcaaatttcttataacttattaga
321    atgtatggatttttacagtggtgatgcattgataattcctccattatgcatttattacttttt
385    tgagaatttttttctcccatgaatctcttgccattaaaaaacaacaaaccatagaggttaac
449    acattacctctggcatttttaaggagactattgaggaaatggctg

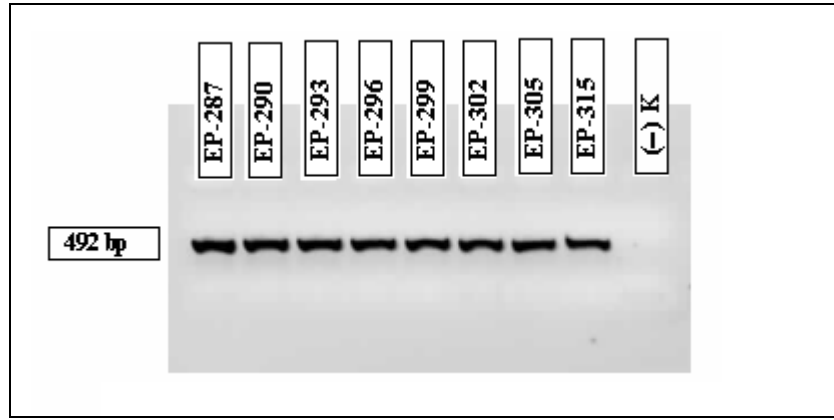
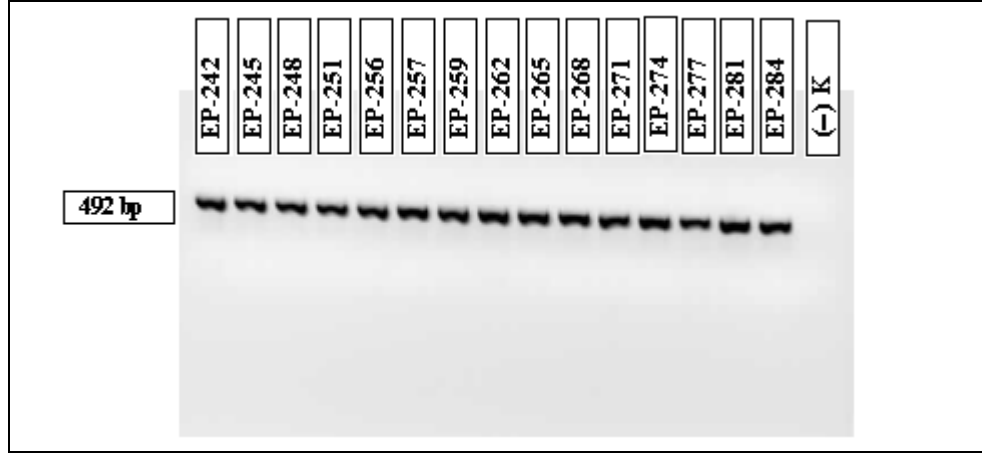
```

B



C





Şekil 4.7 AKT3 geninin 6. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT6 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT6 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

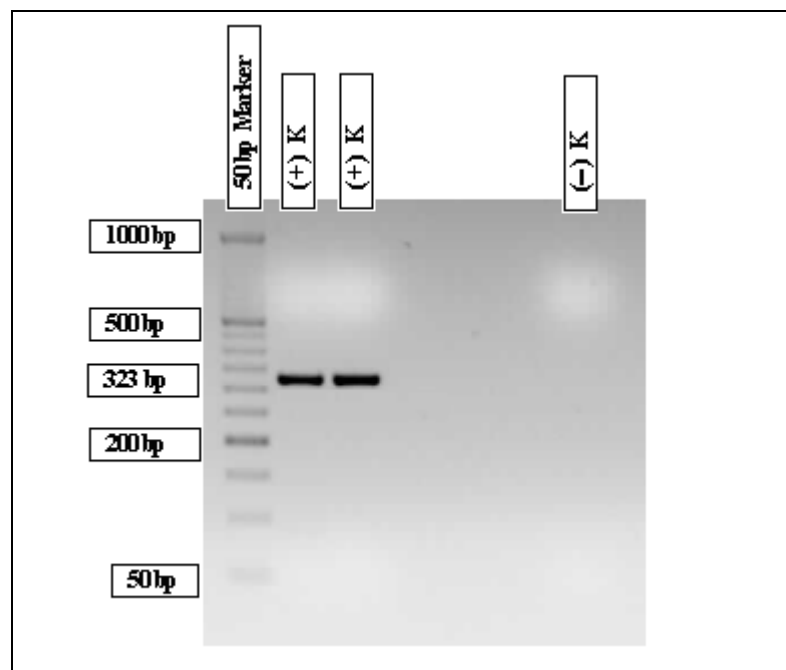
A

```

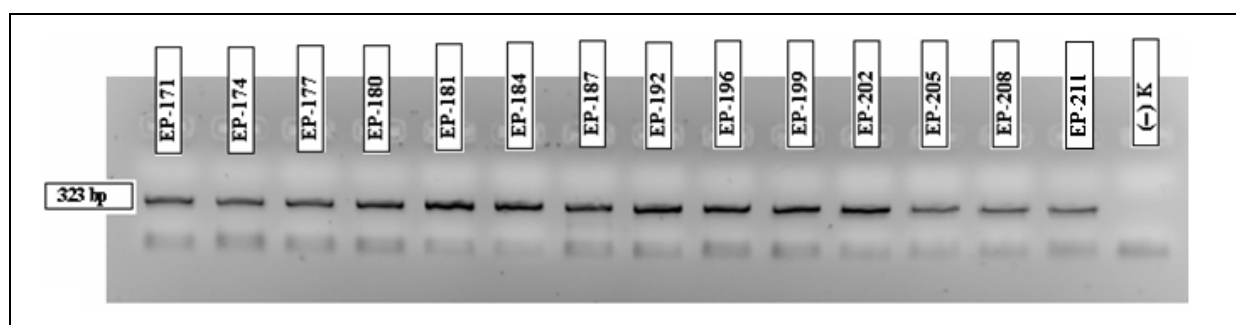
1      cttttcacatcttttcacatgcttactatatttctatgtgttctatatttttagtactattataaattataaga
65    atacaggattataatgtaacatttttttctttttttttattttcaagtccttgaaatattccttcca
129   gacaaaagaccgtttgtgttttgtgatggaatatgttaatgggggagaggtgagtcagaagta
193   aatccagtatttgcacatggttagtattttcattatttttaaaaacattactttaaatacaagttaca
257   atatagcagttctccattttcttgataggaatttatgtagctcttaatactattgaacaaatggg
321   agc

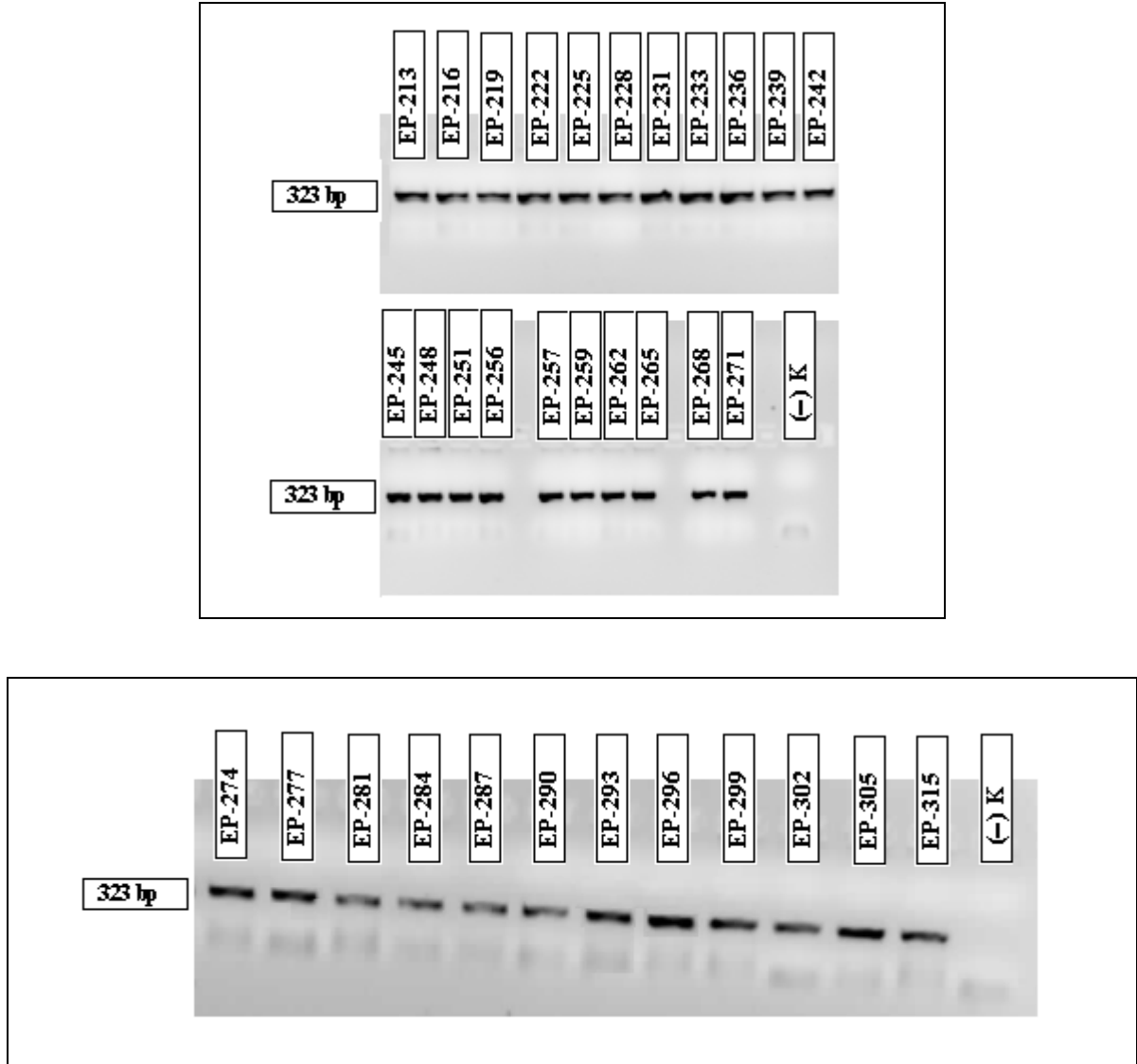
```

B



C





Şekil 4.8 AKT3 geninin 7. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT7 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT7 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

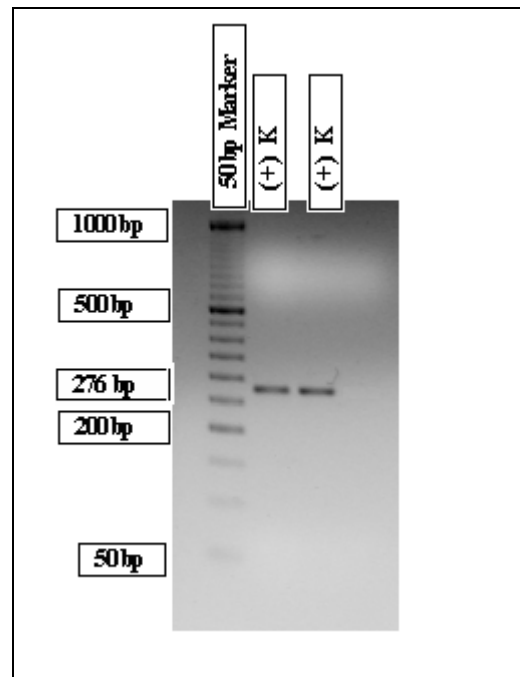
A

```

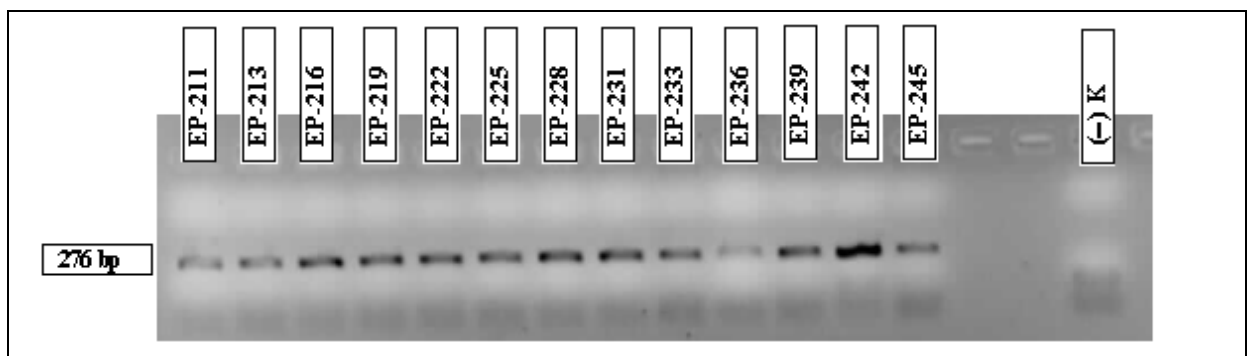
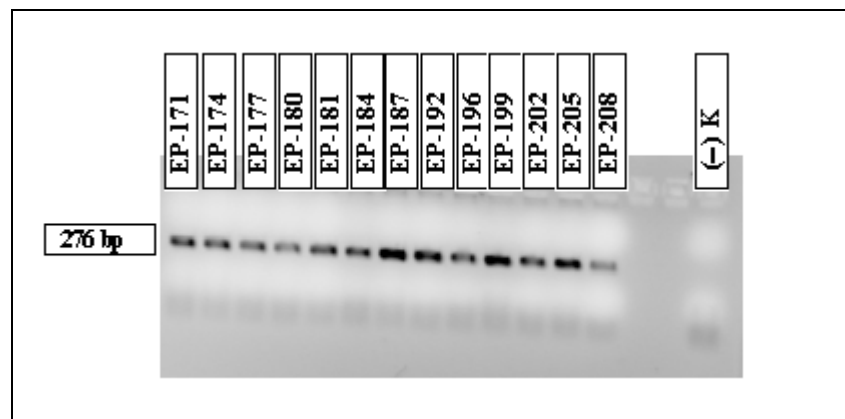
1  tccccactaaatcagtaattattacaatcctgtccctgctgtttaccctgcagctgtttttcc
65  atttgtcgagagagcggtgttctctgaggaccgcacacgtttctatggtgcagaaattgtctc
129  tgccttggactatctacattccggaaagattgtgtaccgtgatctcaaggtaaaaaaaaaaaaa
193  aagtaataaaaattgttttttcagagactatagggacaaacataaagtaattacaaagttata
257  cagttttgagaaaagcagat

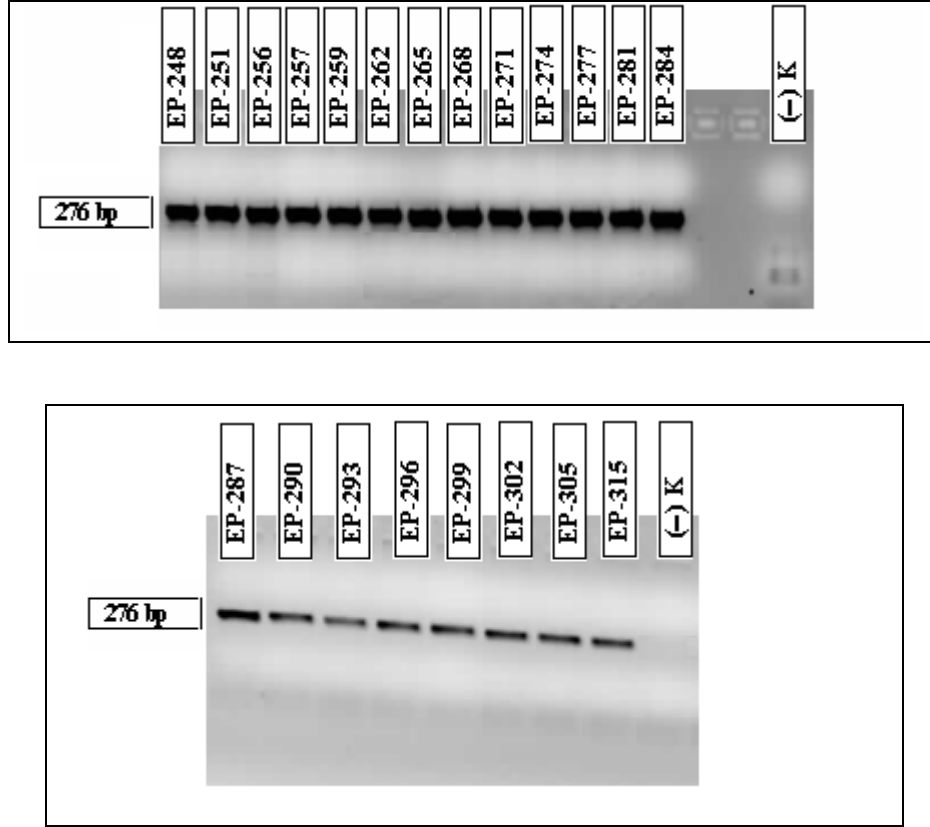
```

B



C





Şekil 4.9 AKT3 geninin 8. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT8 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT8 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

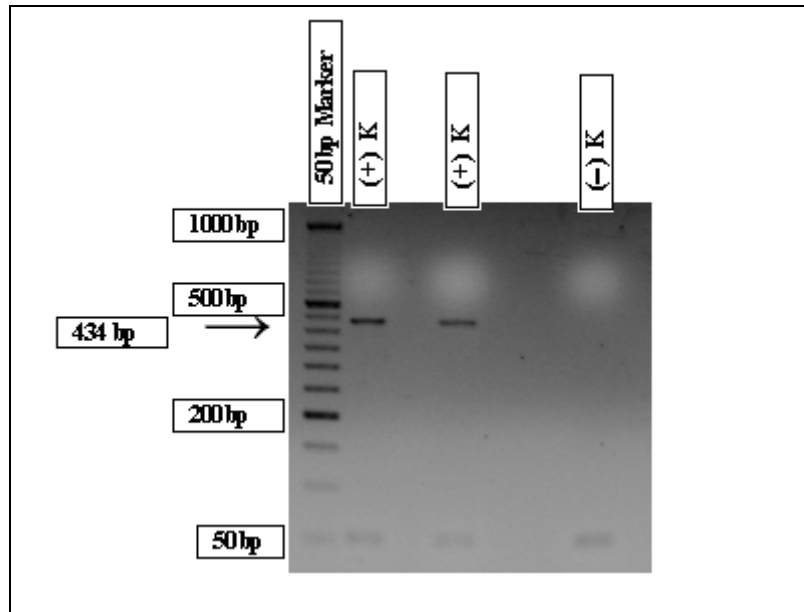
A

```

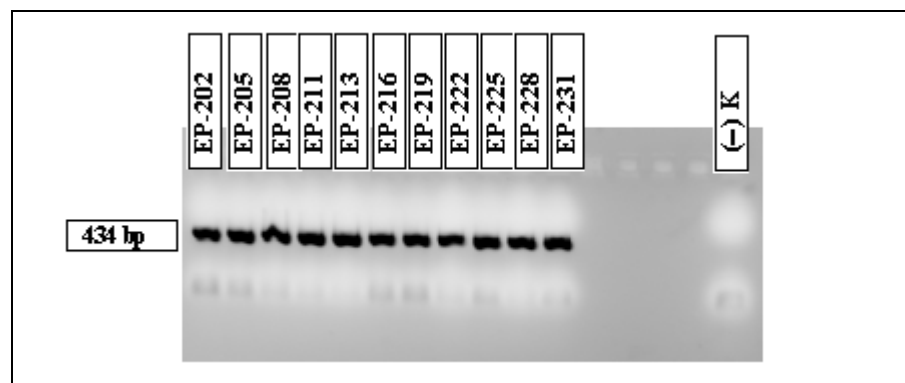
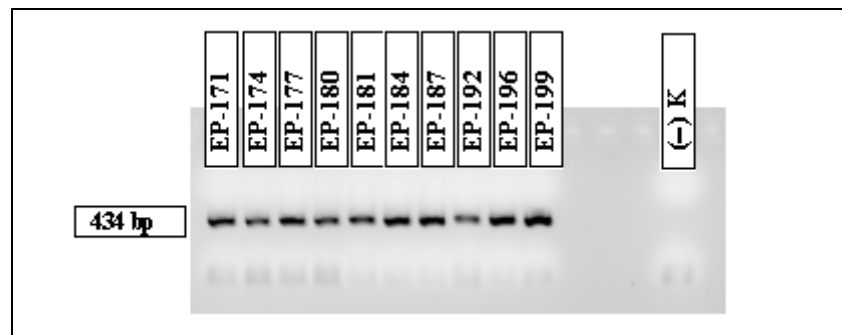
1   aagtactgagcggttctattagctacaactatgtcctgtttccaaaataccttactcagcattca
65  gtagttttttaaaatggtatttttcatgttggtgaagactatagaacaaattatgtcatttttct
129 taatacacagttggagaatctaatagtcggacaaagatggccacataaaaattacagattttgga
193 ctttgcaaagaagggatcacagatgcagccaccatgaagacattctgtggcactccagaatatc
257 tggcaccagaggtaggcttcggttccattaataggaaagtaacattgacataatgatttgcaa
321 gtaaaccattttaagcattaaaagttaactgtagtatctactacttttatctatatatttcaacctg
385 aatcaaaatttttttggtcttaatttgttataatgggggtattgtaggatc

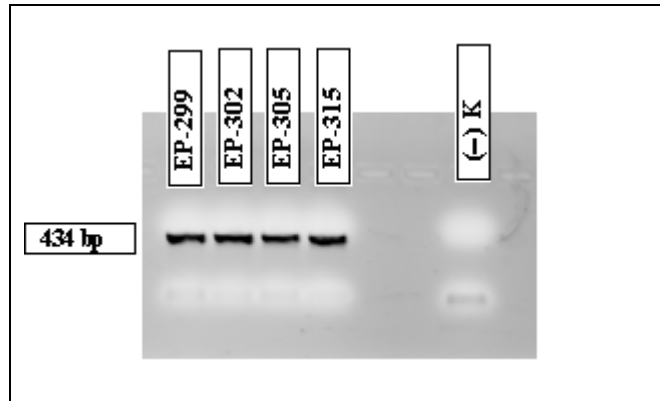
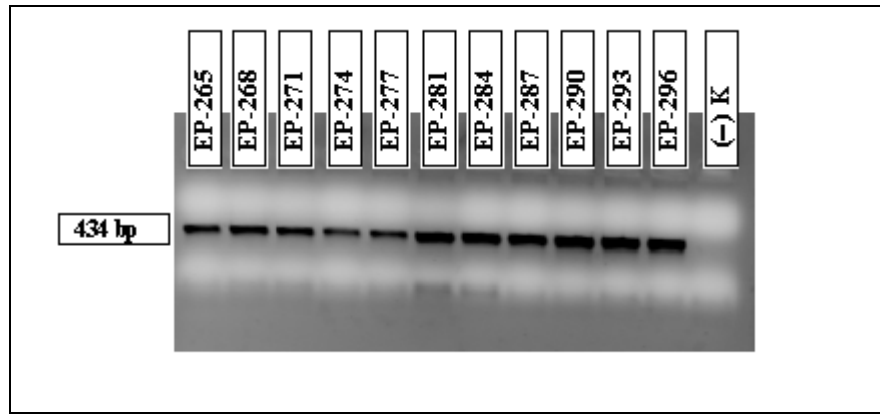
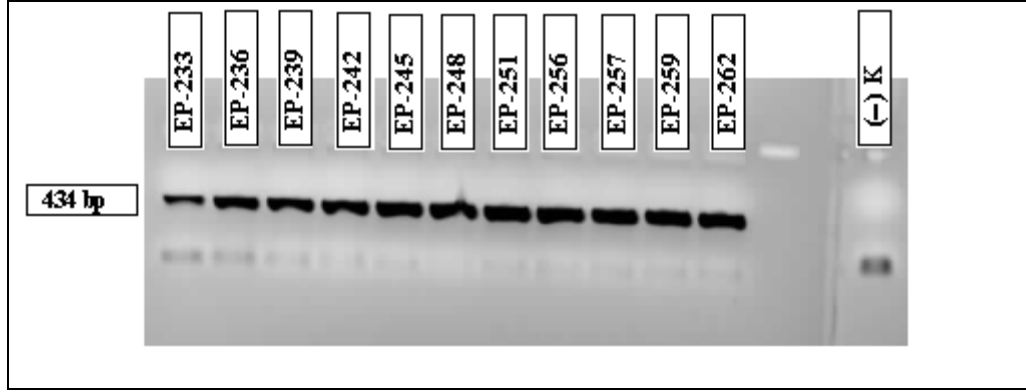
```

B



C





Şekil 4.10 AKT3 geninin 9. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması.

A Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT9 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT9 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

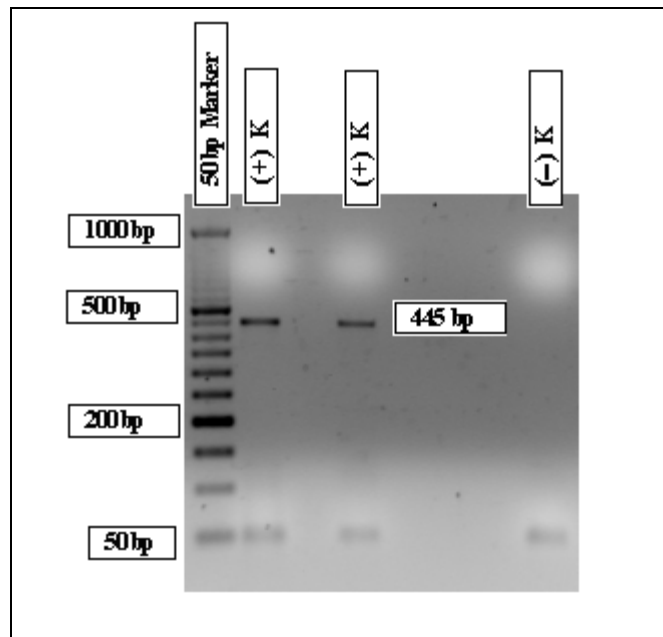
A

```

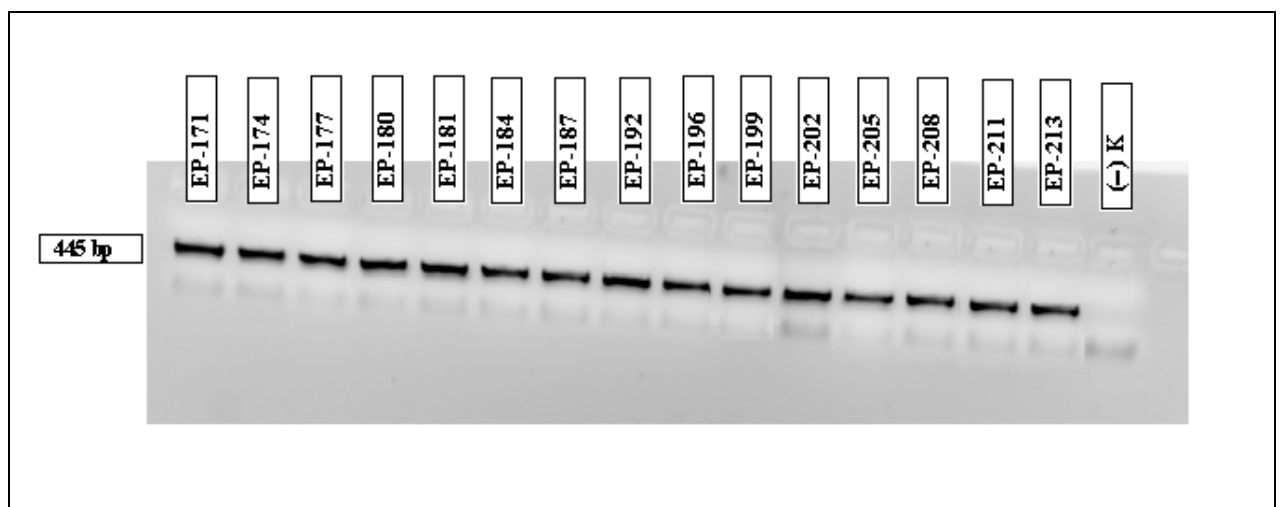
1   taggctttgaaagttaagattcatcttttatgtaaaaatcttatgtttttatgaataatgctttta
65  aagttaacatgtaataattaatctttttactgatttcacttttaggtgttagaagataatgact
129 atggccgagcagtagactggtggggcctaggggtgtcatgtatgaaatgatgtgtgggaggtt
193 acctttctacaaccaggaccatgagaaactttttgaattaatattaatggaagacattaaattt
257 cctcgaacactctcttcagatgcaaaatcattgctttcagggtcttgataaaggatccaaata
321 aacggtaagcctcaaataacgcttagtgaattactgatgaatgtgggttaaaaattgagatatgg
385 aaattaattcaaataataactcaagaagcaatgtatttgggtgtagacatcttcccac

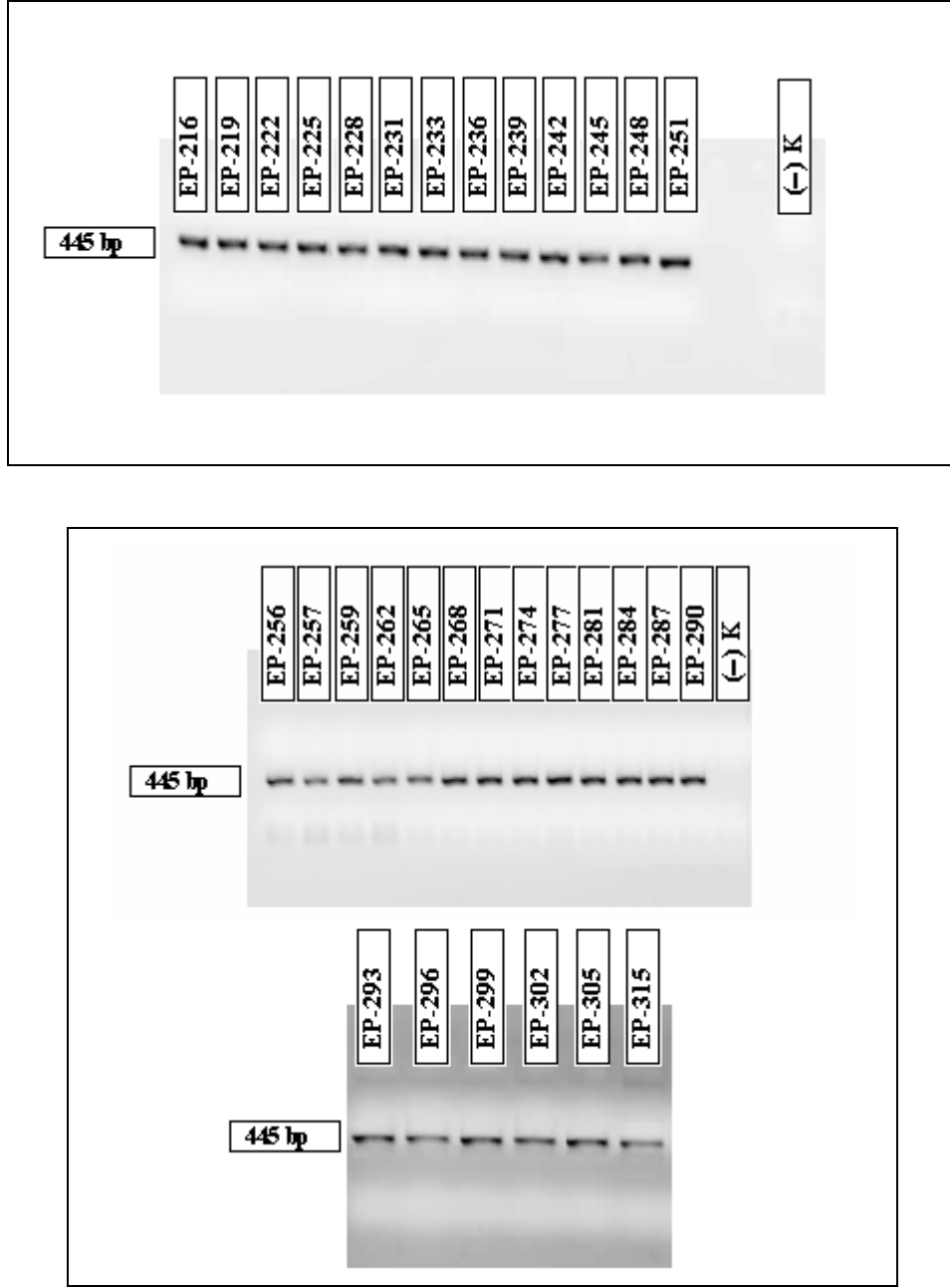
```

B



C



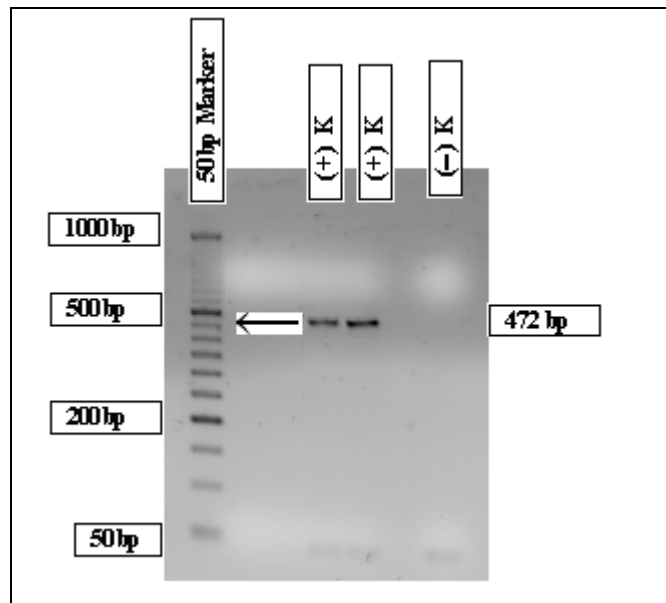


Şekil 4.11 AKT3 geninin 10. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması. **A** Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT10 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT10 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

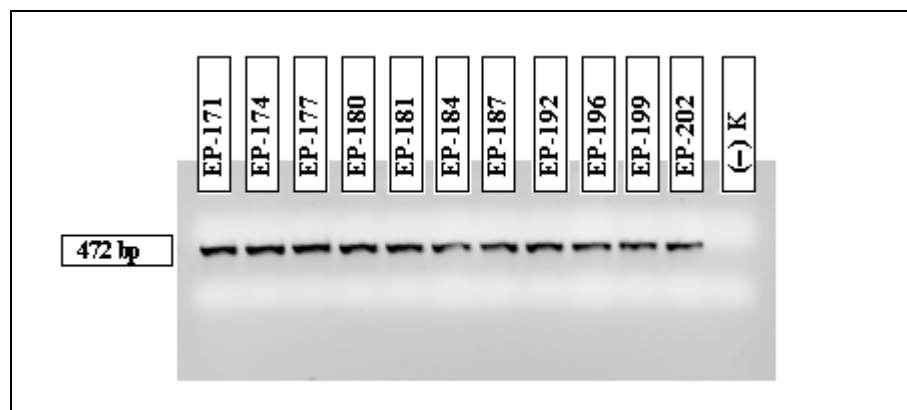
A

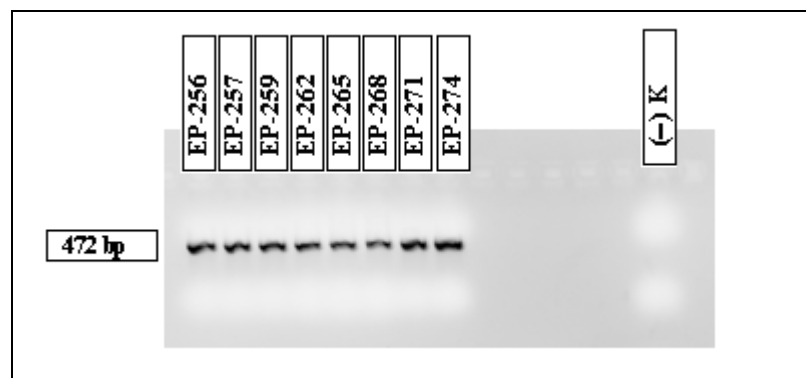
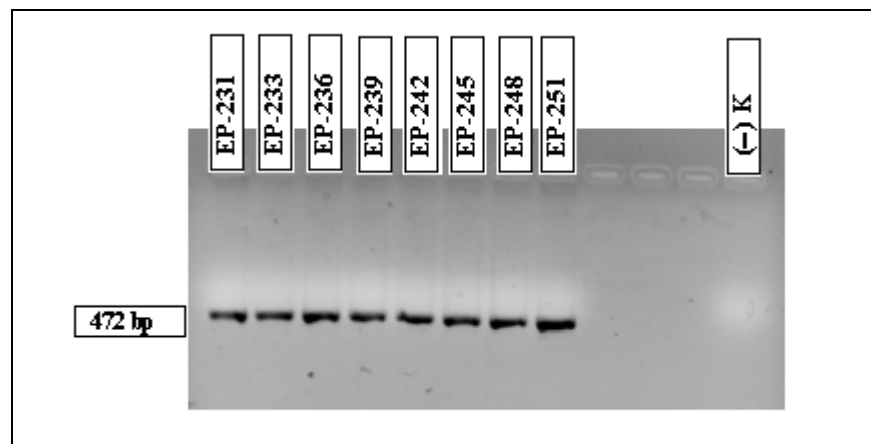
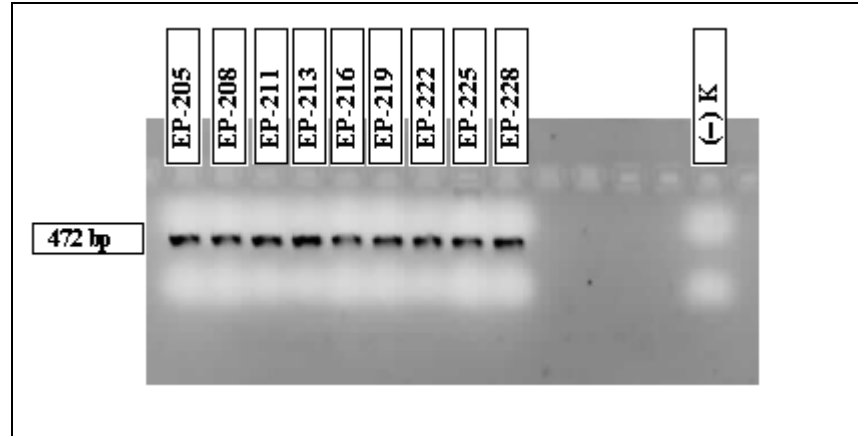
1 ttgcctcttccagatctatctctaaagcctctgctctttttccaaataccatactgttctgaagc
65 tagttcttacaagcatattagggaaaaatagatccttatagcaaaagctttttacttttagagcta
129 tttatccaagaactgtttattacacagaaaattacactttcacaaaatattttttgttatgct
193 ttgagcttatgtaaatgttttatacttacttaattttattttctgttctcatagccttggtggag
257 gaccagatgatgcaaaagaaattatgagacacagtttcttctctgagtaaaactggcaagatgt
321 atatgataaaaaggtaagatttctttatggcatagtgtgtatatattttggctgcactgctaaa
385 atgaatttatagcaaaaatattttaagtgaataaaaagttaatgatgtaatgatactttccattt
449 taccgacatttaagtgattattga

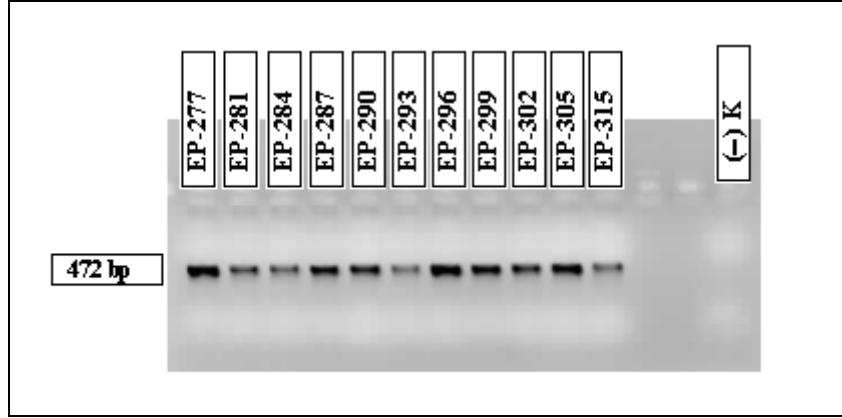
B



C







Şekil 4.12 AKT3 geninin 11. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması. **A** Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT11 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT11 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

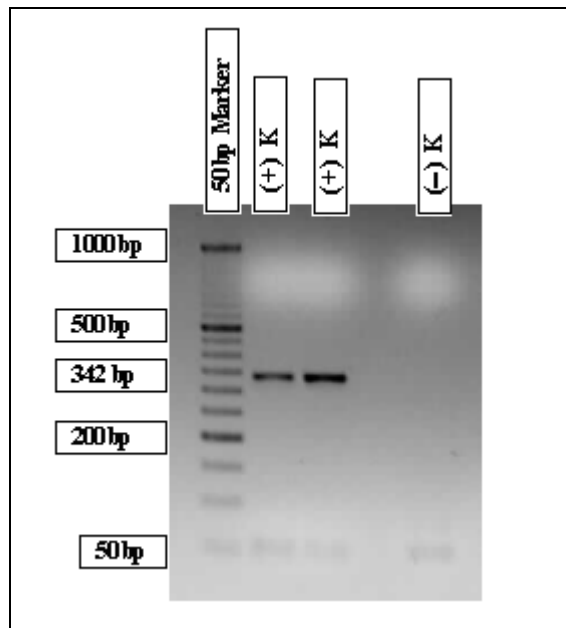
A

```

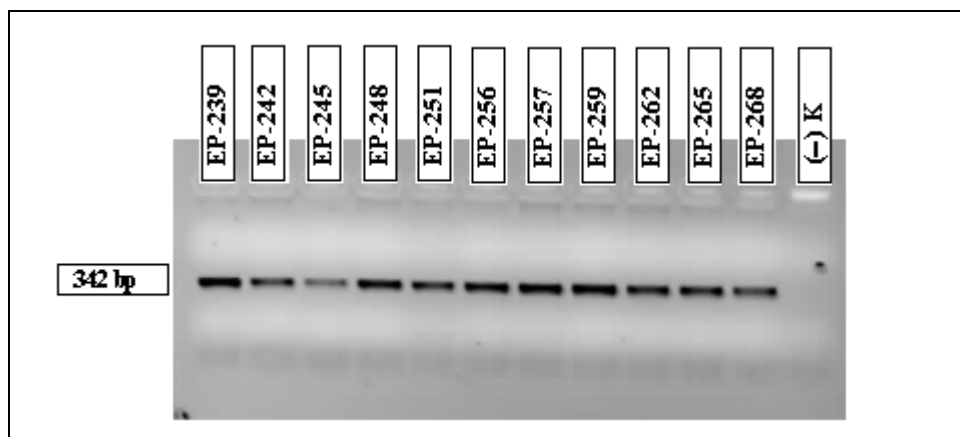
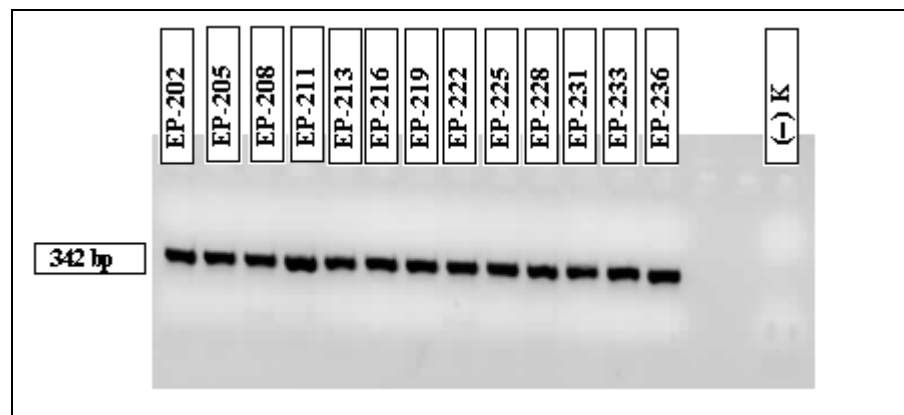
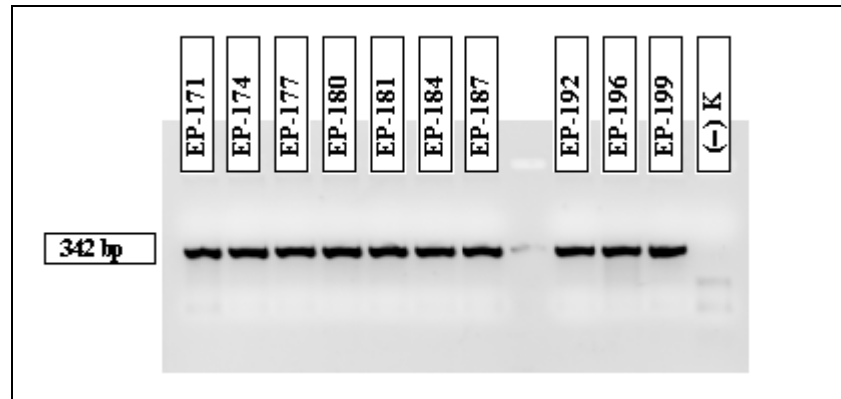
1   gcgactcagcattgtagacttttgttctgttcatttaactacgtgctctctgcttttttcttag
65  aaaggaattttcctgaattgaaatcagttaataaaactcttttcttttctttttacagcttgta
129 cctcctttttaaacctcaagtaacatctgagacagatactagatattttgatgaagaatttacag
193 ctgagactattacaataacaccacctgaaaaatgtaagtaaatttagaaggcaattgataaatt
257 tctaataataatttctcctaattgtaattgaagaaaacagtcttttaaaaactcatctgatattt
321 caagatcaaattccacagtgc

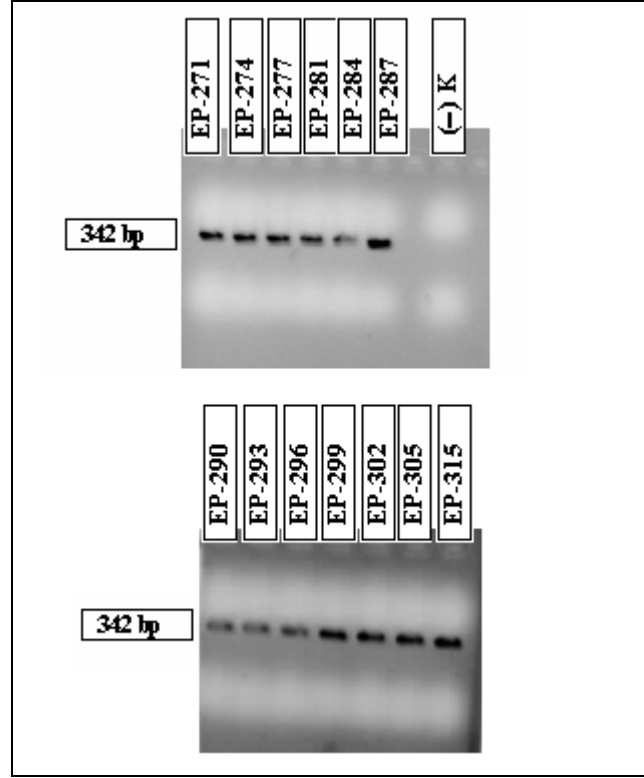
```

B



C





Şekil 4.13 AKT3 geninin 12. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması. **A** Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. **B** AKT12 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT12 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

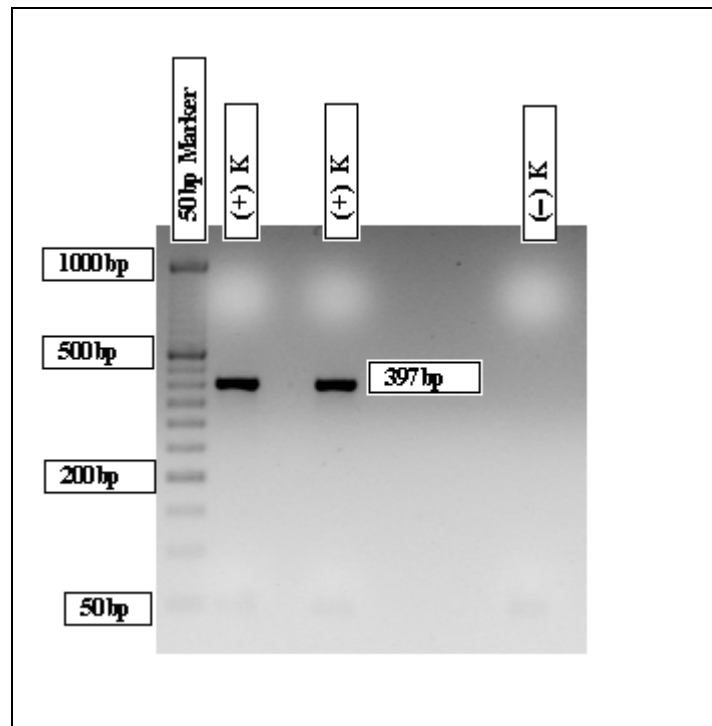
A

```

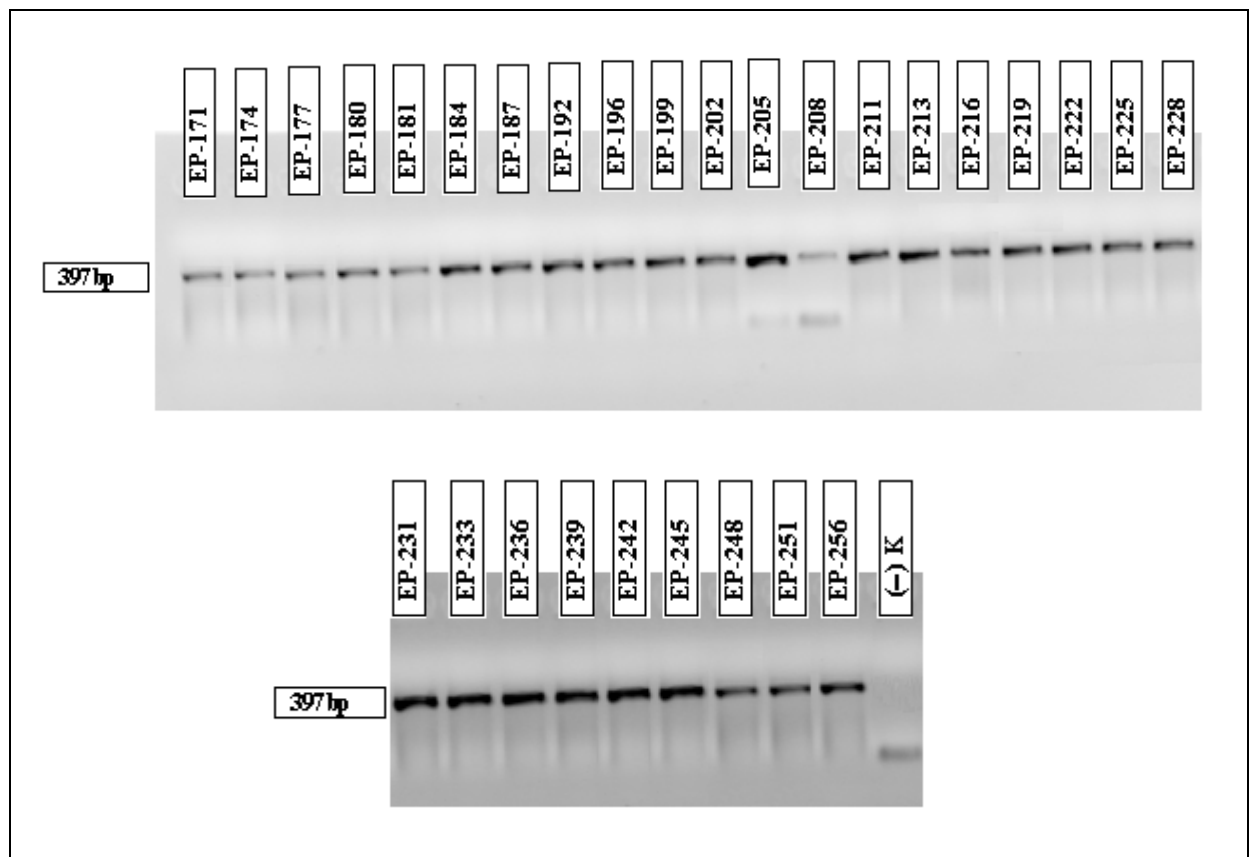
1   aagtttatgggagctattgcctctgttcattctttcctatgttcagagtttaaaaaacatagact
65  agagataatgttgcaaaaaatgaatgtgtataaaattaaaatagatgtttcctgcccacagatgat
129 gaggatggatatggactgcatggacaatgagaggcgccgcatttccctcaattttcctactctg
193 caagtggacgagaataagtctctttcattctgtacttcactgtcatcttcaatttattactga
257 aaatgattcctggacatcaccagtcctagctcttacacatagcaggggcaccttccgacatccc
321 agaccagccaagggtcctcaccctcgccacctttaccctcatgaaaacacacatacacgcaa
385 atacactccagtt

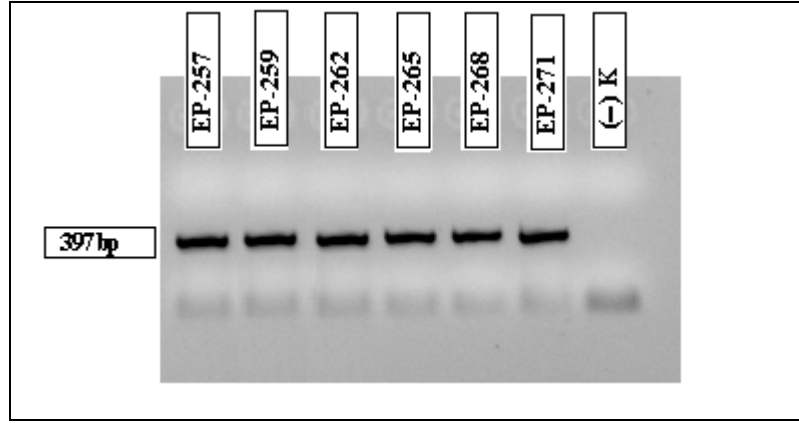
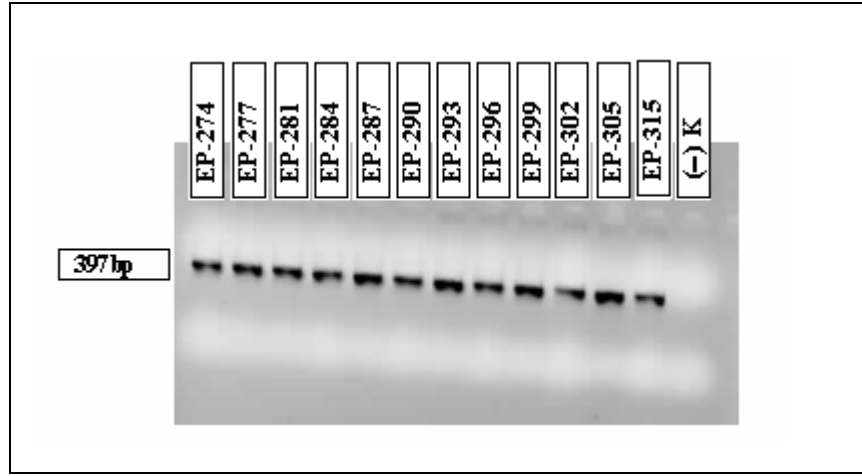
```

B



C





Şekil 4.14 AKT3 geninin 13. ekzonunu içeren bölgenin çoğaltılması. **A** Çoğaltılan bölgenin genomik dizisi. Altı çizili olarak belirtilen dizi primerlerin oturma bölgeleridir. Gölgeleme ile yazılan bölge ise bitiş kodonudur. **B** AKT13 primerlerinin optimizasyon sonucu. +K; Pozitif Kontrol, -K; Negatif Kontrol **C** Olgu grubunu oluşturan hastaların AKT13 primerleri ile kurulan PCR görüntüleri.

4.3 DNA Dizi Analizi Verileri

Olgu grubundaki bireylerin DNA dizi analizlerinin değerlendirilmesi ile belirlenen nükleotid değişiklikleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Değerlendirme

sonucunda, olgu grubunda daha önceden tanımlanmamış olan iki nükleotid değişikliği saptandı.

Bu nükleotid değişikliklerinden biri 2. ekzondadır ve amino asit değişikliğine neden olmamaktadır. Diğer nükleotid değişikliği ise, genin 4. ve 5. ekzonları arasındaki intronik bölgede bulunmaktadır.

Tablo 4.1. Dizi analizi yapılan bölgelerde saptanan nükleotid değişiklikleri

HASTA NO:	Mutasyon Tipi	Kodon	Amino Asit Pozisyonu	Amino Asit Değişimi	Nükleotid Değişimi	Kromozomal Pozisyon
Ep-11-251	Sessiz (Silent) T>TA:42P>42P	CCT → CCA	42	Pro {P} → Pro {P}	T>A	243858939
Ep-11-277	İntron T>TA	-	-	-	T>A	243801079

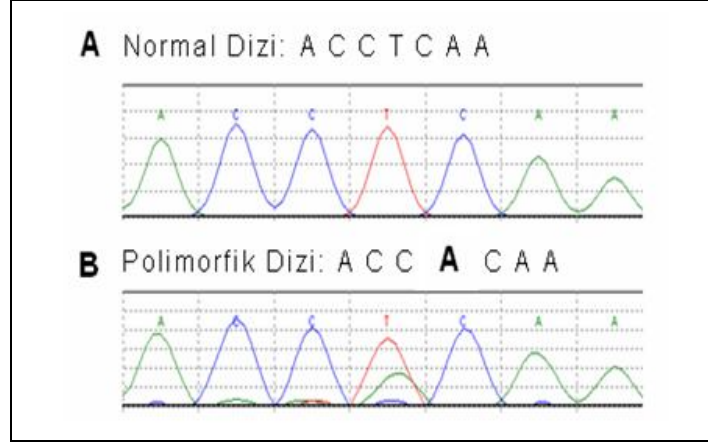
DNA dizi analiz verilerinin değerlendirilmesi ile Ep-11-251 no'lu hastanın 2. ekzonunda T>TA:42P>P/P değişikliği ve Ep-11-277 no'lu hastanın 4. ve 5. ekzonları arasındaki intronik bölgede T>TA nükleotid değişikliği saptanmıştır. Bu iki nükleotid değişikliğinin 47 hasta bireyden oluşan olgu grubundaki görünme sıklığı hesaplanmış ve Tablo 4.2'te özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Nükleotid değişikliklerinin olgu grubundaki genotip ve allel yüzdeleri

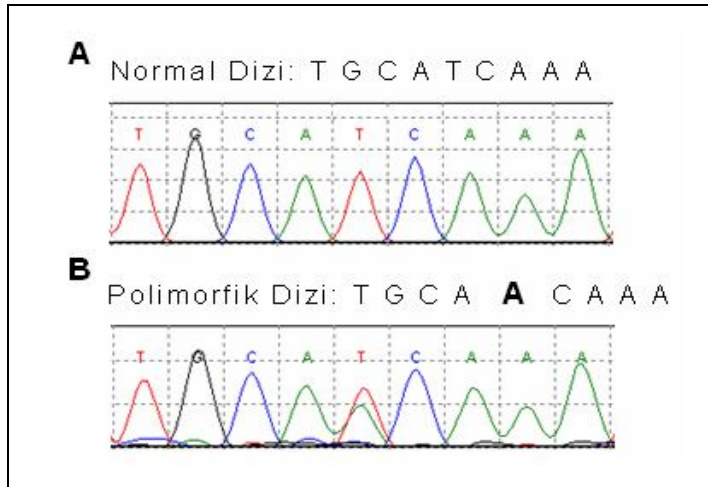
Mutasyon	Hasta Sayısı	Genotip	Genotip	Genotip	Allelik Frekans
Sessiz (Silent) (T>A)	47	T/T(%) 46(97.87)	A/A(%) -	T/A(%) 1(2.13)	T(%) A(%) 93(98.9) 1(1.06)
İntron (T>A)	47	T/T(%) 46(97.87)	A/A(%) -	T/A(%) 1(2.13)	T(%) A(%) 93(98.9) 1(1.06)

Dizi analizi yapılmak istenen ve PCR ile çoğaltılmış tüm bölgeler MacroGen firmasına gönderildikten sonra elektronik-posta yolu ile ulaşan dizi analiz sonuçlarının kromatogram görüntüleri incelenerek, nükleotid

değişiklikleri saptandı. Saptanan tüm nükleotid değişikliklerinin kromatogram örnekleri aşağıda sunulmuştur.



Şekil 4.15 2. ekzonda saptanan nükleotid değişikliğinin kromatogram görüntüsü. **A.** Referans dizi. **B.** Ep-11-251 no'lu hastada saptanan T>TA:42P>P/P heterozigot nükleotid değişikliğinin kromatogram görüntüsü.



Şekil 4.16 4. ve 5. ekzonlar arasındaki intronik bölgede saptanan nükleotid değişikliğinin kromatogram görüntüsü. **A.** Referans dizi. **B.** Ep-11-277 no'lu hastada saptanan T>TA heterozigot nükleotid değişikliğinin kromatogram görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Korpus Kallosum (KK) Displazili bireylerde epileptik nöbetlerle birlikte zeka geriliği, davranışsal ve nöropsikiyatrik problemler, öğrenme güçlüğü, uyku bozuklukları, dil ve sosyal iletişim problemleri, görme ve beslenme problemleri görülmektedir. Bütün bu klinik özellikler hasta bireylerin yaşam kalitelerini düşürmektedir ve hala KK abnormalitelerinin oluşumunda genetik değişikliklerin yeri tartışma konusudur.

Bir önceki çalışmada KK Displazili iki olgumuzda karyotipleme, array CGH ve FISH yöntemleri ile 1q terminal delesyonlarının 1q43-44 bölgesinde çakıştığı ve bölgedeki genlerden birinin de *AKT3* olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda *AKT3* geninin Korpus Kallosum Displazileri için aday olduğu görülmektedir. Fakat bu konu ile ilişkili literatürlerde çelişkili ifadeler mevcuttur. Literatür bilgileri değerlendirilirken iki açıdan ele alınmıştır.

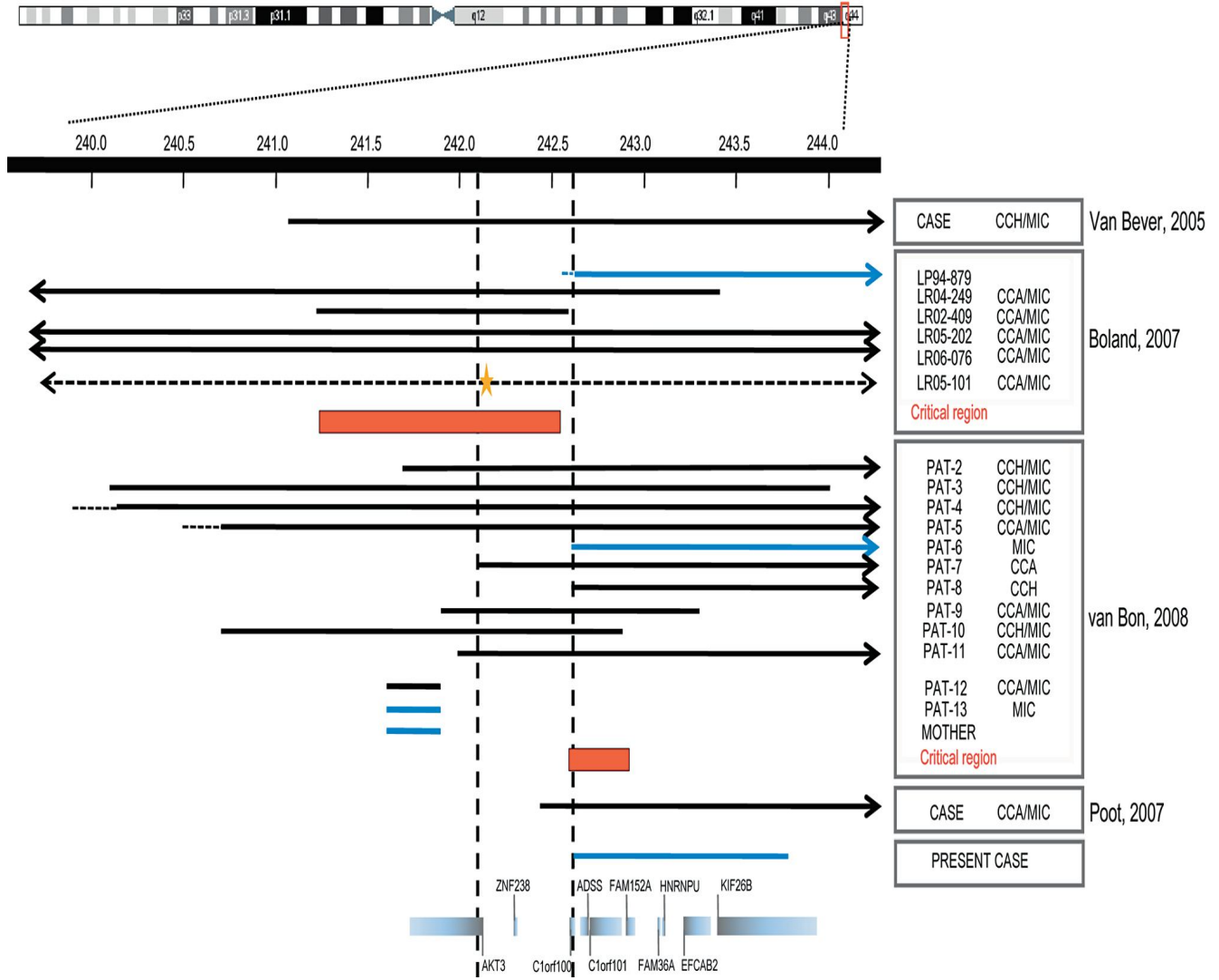
AKT3 ile KK Displazileri Arasında İlişkiyi Gösteren Veriler

Andrieux ve arkadaşları gelişim geriliği ve bozukluğu, yüz bölgesinde deformasyon, vermis hipoplazisi, polimikrogiri ve Korpus Kallosum agenezi olan bir vakada, konvensiyonel sitogenetik ve yüksek çözünürlüklü oligonükleotid array-CGH analizi ile, 1qter'de 6,9Mb'lık bir delesyon ile 18pter'de 4.4Mb'lık dublikasyon (de nova) saptamıştır. Andrieux ve arkadaşlarına göre terminal 1q delesyonları ile beyin malformasyonları arasında ilişki olduğunu gösteren birçok bulgu vardır ve 1q44 delete genler arasında *AKT3*, *vermis hipoplasia* ve KK agenezi için en kuvvetli aday genler (76). *AKT3* geni susturulmuş bir farede beyin fonksiyonlarının da azaldığı bilinmektedir (78).

Boland ve arkadaşları mikrosefali, KK agenezi, serebral vermis hipoplazisi ve polimikrogiri gibi çeşitli beyin malformasyonlarına sahip 6

hasta bireyin 1q42-44 bölgelerindeki yeniden düzenlenmeleri haritalamışlardır. Haritalama sonucu *AKT3*'ün mikrosefali ve Korpus Kallosum Agenezi için ideal bir aday gen olduğunu önermişlerdir. (77).

1q44-qter submikroskopik delesyonları birçok hastada şiddetli mental ve gelişim geriliğine, mikrosefaliye, KK hipo/agenezine neden olmaktadır. 44K oligonukleotid array-CGH ile saptanan 1,152 kb'lık (de novo) 1q44 delesyonuna sahip diğer bir vakada, fenotipe orta derecede yansıyan KK abnormaliteleri saptanmıştır. İlk delete oligonükleotid'in (ADSS geni içinde) 242.638 Mb'lık bir bölgeye, son delete oligonükleotid'in ise (KIF26B geni içinde) 243.791 Mb'lık bir bölgeye lokalize olduğu not edilmiştir. İlave olarak postnatal mikrosefali ve KK agenezi tanısı konulan bir hastada resiprokal t(1; 13) translokasyonu tanımlanmış ve 1q44'deki kırılma noktalarının *AKT3* ve *ZNF238* genleri arasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.1). Orellana ve arkadaşları ellerindeki bu verilere göre, *AKT3* geninin KK gelişiminde ve mikrosefalide fonksiyonel açıdan önemli rol oynadığını savunmaktadır (79).

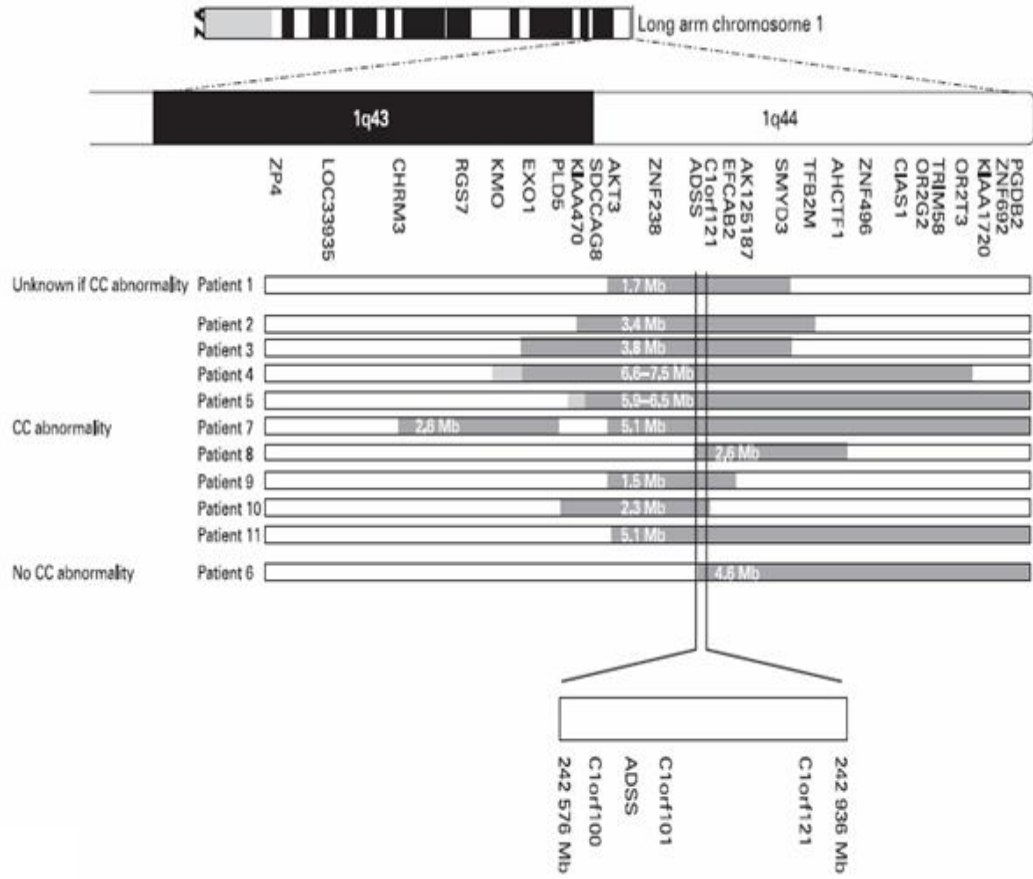


Şekil 5.1 Farklı 1q44 submikroskopik delesyonları. KK abnormaliteleri görülmeyen hastalardaki delete bölgeler mavi bant olarak, KK agenezi ve hipogenezi görülen hastalardaki delete bölgeler siyah bant ile gösterilmiştir. Yatay kesik çizgiler kırılma noktasındaki turuncu yıldızla dengeli translokasyonu, kırmızı kutular ise kritik bölgeleri temsil etmektedir. Dikey kesik çizgiler, aday bölgenin sınırlarını belirtir. Dipteki gri kutular da o bölgelerdeki genleri gösterir. Kısaltmalar: CCA: Korpus Kallusum Agenezi, MIC: Mikrosefali (79).

AKT3 ile KK Displazileri Arasında İlişki Olmadığını Gösteren Veriler

Rapor edilen bir vakanın klinik özellikleri; psikomotor geriliği, mikrosefali, KK'un yetersiz gelişimi, vermiş hipoplazisi'dir. Bu vaka 1q44 bölgesinde terminal 4.8 Mb'lık bir delesyon taşımaktadır. Bu delesyonun kırılma notası *ZNF238* geni ile *HNRPU* geni arasındadır (80). Aynı zamanda bu hastanın kırılma noktası *the Infinium HumanHap300 Genotyping BeadChip* kullanılarak haritalanmış ve kırılma bölgesinin 242,447,016. ve 242,447,174. nükleotitleri arasında olduğu saptanmıştır . Böylece 1q44 delesyonunun *AKT3* geninin 30 bp distalinde; 373,810 ve 373,968 baz çiftleri arasından başladığı görülmüştür. Sonuç olarak hem *AKT3* geni hem de *ZNF238* geni bu hastada delete olmamıştır (82).

Aynı zamanda van Bon ve çalışma arkadaşları birbiri ile akraba olmayan KK anomalili dokuz hastada 1q44 delesyonu saptamış ve 360kb'lık çakışan hedef bölge tanımlamışlardır. Bu bölge *Clorf100*, *ADSS*, *Clorf101* ve *Clorf12* (*Alias: CGI-146, PNAS-4*) genlerini içerirken *ZNF238* ve *AKT3* genlerini kapsamamaktadır (Şekil 5.2). Buna ilaveten van Bon ve arkadaşları ailesel *AKT3* delesyonuna rastlanmışlar, iki kız kardeşte ve hasta olmayan annelerinde *AKT3* delesyonu saptamışlardır (81). Tüm bu verileri göz önünde bulundurarak araştırmacı, *AKT3* geni ile KK abnormaliteleri arasında ilişki olmadığını savunmaktadır.



Şekil 5.2 MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) ve farklı mikroarray platformları ile tanımlanmış farklı uzunluktaki 1q delesyonları. Koyu gri bantlar, mikroarray analizleri sonucu bulunan delete bölgelerdir. Açık gri bantlar, MLPA ile saptanan yaklaşık kırılma noktalarını gösterir. CC: Korpus Kallosum (81).

Bu tez kapsamında yapılan araştırma sonucu 47 hasta bireyden oluşan olgu grubunda DNA dizi analiz verilerinin değerlendirilmesi ile Ep-11-251 no'lu hastanın 2. ekzonunda T>TA:42P>P/P nükleotid değişikliği ve Ep-11-277 no'lu hastanın 4. ve 5. ekzonları arasındaki intronik bölgede T>TA nükleotid değişikliği saptanmıştır.

Ep-11-251 no'lu hastanın 2. ekzonunda saptanan T>TA:42P>P/P nükleotid değişikliği amino asit değişikliğine neden olmamaktadır (Tablo 5.1).

Tablo 5.1 Ep-11-251 no’lu hastanın 2. ekzonunda saptanan T>TA:42P>P/P nükleotid değişikliği’nin değerlendirilmesi

KODON DEĞİŞİKLİĞİ:		PROTEİN DEĞİŞİLİĞİ:	MUTASYON ADI:
ÖNCEKİ KODON:	MUTASYON KODUNU:		
CCT	CCA	DEĞİŞİKLİK YOK (P→P) (Prolin→Prolin)	SILENT (SESSİZ) MUTASYON

Ep-11-277 no’lu hastanın 4. ve 5. ekzonları arasındaki intronik bölgede saptanan T>TA nükleotid değişikliği ‘splicing’ ile ilişkili konsensus dizileri kapsamamaktadır (Şekil 5.3).

GGAAGAATGGACAGAAGCTATCCAGGCTGTAGCAGACAGACTGCAGAGGCAAGAA GAGGAGAGAATGAATTGTAGTCCAACTTCACAAATTGATAATATAGGAGAGGAAG AGATGGATGCCTCTACAACCCATCATAAAAGAAAGgtagaaaaataataacttatt Cccagcacagcattcattttgtctggaagaaacatattaaaagctaccatttgcag aaagatgtcagccagttttcttacgatatgtaaatatattggtggg.....	4 .Ekzon
ctaatgagacagccaatgccRgtctgattctttttcatttaaattgtgcttataaa ttggtaaaatttggttttgagtggatattgcaaacacatatatatatgctaaca ataaattgcat/acaaatacttcatattatattttttaatttgtatttttcag	intronik bölge
ACAATGAATGATTTTGACTATTTGAACTACTAGGTAAAGGCACTTTGGGAAAG TTATTTTGGTTCGAGAGAAGGCAAGTGGAAAATACTATGCTATGAAGATTCTGAA GAAGAAAGTCATTATTGCAAAGgtactgatttattaaagttgattactaaatttt Tgtttgcagtgtgcatgttttggtggctcatgaatttacatgctaatgatgcaa attccattaaac	5 .Ekzon

Şekil 5.3. Ep-11-277 no’lu hastanın 4. ve 5. ekzonları arasındaki intronik bölgede saptanan T>TA nükleotid değişikliği’nin değerlendirilmesi. Kırmızı renk: değişikliğin olduğu nükleotid. Turuncu renk: Donör Bölge(87) Mavi renk: Akseptör Bölge(87). Yeşil renk: AKT5F (Forward) ve AKT5R (Reverse) primerleri.

Bu verilere göre saptanan değişikliklerin korunmuş bölgelerde olmayışı ve AKT3 proteininde yapısal bir değişiklik yaratmaması göz önünde bulundurulduğunda AKT3 geninin KK displazileri ile ilişkili olma ihtimali düşük görünmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Korpus Kallosum (KK) Displazileri, çok sayıda konjenital sendromlarla birlikte görülebilen ve birçok patolojik vakadan önemli derecede etkilenerek oluşabildiği bilinen kompleks bir durumdur. Ayrıca KK Displazileri, psikiyatrik ve gelişimsel bozukluklarla olan ilişkisi nedeniyle de dikkat çeken bir araştırma konusudur.

KK Displazilerinin insidansı tahmin edilenden daha yüksektir. Bunun nedeni rutin muayenelerde saptanamayan asemptomatik vakaların da bulunmasıdır. Ülkemizde KK Displazileri üzerine yapılmış bir insidans çalışması bulunmamaktadır. KK Displazileri üzerinde yapılan her bir çalışmanın daha iyi yorumlanabilmesi için Türkiye’de de ne kadar sıklıkta görüldüğü bilinmelidir.

Hala genetik nedenleri aydınlatılamamış olmakla beraber birçok gen KK Displazileri için aday olarak gösterilmiştir. Bunlardan biri de *AKT3* genidir. Baştaki hipotezimizde belirtildiği gibi *AKT3* geninin KK Displazileri ile ilişkisi araştırılmış fakat ilişkili olabileceğine dair veriler elde edilememiştir.

Diğer tüm beyin malformasyonları ile beraber KK Displazileri için yapılan her bir çalışma, tedavi ve tanı protokollerinin geliştirilebilmesi için oldukça önemlidir. Bu amaçla sonraki çalışmalarda, KK Displazileri için aday gösterilen diğer genlerin daha ileri düzeyde geniş hasta grupları ile çalışmaları yapılmalıdır. Bu şekilde hastalığın genetik nedenleri üzerinde daha ayrıntılı bilgi edinmek mümkün olabilecektir.

KAYNAK LİSTESİ

- 1.Jeret JS, Serur D, Wisniewski KE, Lubin RA. Clinicopathological findings associated with agenesis of the corpus callosum. *Brain Dev* 1987; 9: 255–264.
- 2.Wisniewski KE, Jeret JS. Callosal agenesis: review of pathological and cytogenic features, in clinical description and related disorders. Callosal agenesis: a natural split brain. (Lassonde M, Jeeves MA, ed). New York: Plenum Press, 1991.
- 3.Norman MG, McGillivray BC, Kalousek DK, Hill A, Poskitt KJ. Congenital malformations of the brain: pathological, embryological, clinical, radiological, and geneteic aspects (Becker LE, Cochrane DD, Muenke M, eds). New York: Oxford University Press, 1995.
- 4.Schell-Apacik, C. C., Wagner, K., Bihler, M., Ertl-Wagner, B., Heinrich, U., Klopocki, E., Kalscheuer, V. M., Muenke, M., von Voss, H. Agenesis and dysgenesis of the corpus callosum: clinical, genetic and neuroimaging findings in a series of 41 patients. *Am. J. Med. Genet.* 146A: 2501-2511, 2008.
- 5.Bruyer R, Dupuis M, Ophoven E, Rectem D, Reynaert C: Anatomical and behavioral study of a case of asymptomatic callosal agenesis. *Cortex* 21:417-430, 1985.
- 6.Dobyns, W. B. Absence makes the search grow longer. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 7-16, 1996.
- 7.Egaas, B., Courchesne, E., and Saitoh, O. (1995). Reduced size of the corpus callosum in autism. *Arch. Neurol.* 52(8): 794–801.

- 8.**Wang, P. P.,Doherty, S., Hesselink, J. R., and Bellugi,U. (1992).Callosal morphology concurs with neurobehavioral and neuropathological findings in two neurodevelopmental disorders. *Arch. Neurol.* 49: 407–411
- 9.**Lyoo, K., Noam, G. G., Lee, C. K., Lee, H. K., Kennedy, B. P., and Renshaw, P. F. (1996). The corpus callosum and lateral ventricles in children with attention-deficit hyperactivity disorder: A brain magnetic resonance imaging study. *Biol. Psychiatr.* 40: 1060–1063.
- 10.**Duara, R.,Kushch, A., Gross-Glenn, K., Barker,W., Jallad,B., Pascal, S., Loewenstein, D. A., Sheldon, J., Rabin, M., Levin, B., & Lubs, H. (1991). Neuroanatomic differences between dyslexic and normal readers on magnetic resonance imaging scans. *Arch. Neurol.* 48: 410–416.
- 11.**Hynd, G. W., Hall, J., Novey, E. S., Eliopoulos, D., Black, K., Gonzalez, J. J., Edmonds, J. E., Riccio, C., & Cohen, M. (1995). Dyslexia and corpus callosum morphology. *Arch. Neurol.* 52: 32–38.
- 12.**Mary C. O’Driscoll, Graeme C. M. Black, Jill Clayton-Smith, Elliott H. Sherr, and William B. Dobyns (2010). Identification of Genomic Loci Contributing to Agenesis of the Corpus Callosum. *Am J Med Genet Part A* 152A:2145–2159.
- 13.**Aboitiz F, Montiel J. 2003. One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum. *Braz J Med Biol Res* 36:409–420.
- 14.**Funnell MG, Corballis PM, Gazzaniga MS. 2000. Cortical and subcortical interhemispheric interactions following partial and complete callosotomy. *Arch Neurol* 57:185–189.

- 15.**Houzel JC, Carvalho ML, Lent R. 2002. Interhemispheric connections between primary visual areas: beyond the midline rule. *Braz J Med Biol Res* 35:1441–1453.
- 16.**Johnson JI, Kirsch JA, Switzer III RC. 1982. Phylogeny through brain traits: fifteen characters which adumbrate mammalian genealogy. *Brain Behav Evol* 20:72–83.
- 17.**Abbie A. 1939. The origin of the corpus callosum and the fate of the structures related to it. *J Comp Neurol* 70:9–44.
- 18.**Rakic P, Yakovlev PI. 1968. Development of the corpus callosum and cavum septi in man. *J Comp Neurol* 132:45–72.
- 19.**Heath CJ, Jones EG. 1971. Interhemispheric pathways in the absence of a corpus callosum. An experimental study of commissural connexions in the marsupial phalanger. *J Anat* 109:253–270.
- 20.**Muñller G, Wagner G. 1991. Novelty in evolution: restructuring the concept. *Ann Rev Ecol Syst* 22:229–256.
- 21.**Robin M, 2006. The Corpus Callosum as an Evolutionary Innovation. *Journal of Experimental Zoology (mol dev evol)* 306B:8–17
- 22.**Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi. 2. Baskı. METU PRESS (Ankara), ODTÜ Yayıncılık, 1999; 277
- 23.**Lynn K. Paul, Warren S. Brown, Ralph Adolphs, J. Michael Tyszka, Linda J. Richards, Pratik Mukherjee and Elliott H. Sherr, 2007. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci* 8(4):287-99.

24. Gilles, F. H., Leviton, A., and Dooling, E. C. (1983). *The Developing Human Brain: Growth and Epidemiologic Neuropathology*, Great Road, Littleton, MA: John Wright & Sons.
25. Hellige, J. B. (1993). *Hemispheric Asymmetry: What's Right and What's Left*, Harvard University Press, Cambridge, MA.
26. Hynd, G. W., Hall, J., Novey, E. S., Eliopoulos, D., Black, K., Gonzalez, J. J., Edmonds, J. E., Riccio, C., & Cohen, M. (1995). Dyslexia and corpus callosum morphology. *Arch. Neurol.* 52: 32–38.
27. Banich, M. T. (1995). Interhemispheric processing: Theoretical considerations and empirical approaches. In Davidson, R. J., and Hugdahl, K. (eds.), *Brain Asymmetry*, MIT Press, Cambridge, MA. pp. 427– 450.
28. Yazgan, M. Y., Wexler, B. E., Kinsbourne, M., Peterson, B., and Leckman, J. F. (1995). Functional significance of individual variations in callosal area. *Neuropsychology* 33(6): 769–779.
29. Richards LJ, Plachez C, Ren T. (2004) Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet* 2004; 66: 276–289.
30. Polleux F, Giger RJ, Ginty DD et al. Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 1998; 282 (5395): 1904–1906.
31. Uziel D, Garcez PP, Henrique NP et al. Transiently bifurcated callosal axons during cortical development in mice. 2003 Program No 35.10 Abstract Viewer/Itinerary Planner Washington DC. Society for neuroscience.

- 32.**Garel S, Yun K, Grosschedl R, Rubenstein JL. The early topography of thalamocortical projections is shifted in *Ebf1* and *Dlx1/2* mutant mice. *Development* 2002; 129 (24): 5621–5634.
- 33.**Dufour A, Seibt J, Passante L et al. Area specificity and topography of thalamocortical projections are controlled by ephrin/Eph genes. *Neuron* 2003; 39 (3): 453–465.
- 34.**Seibt J, Schuurmans C, Gradwohl G et al. *Neurogenin2* specifies the connectivity of thalamic neurons by controlling axon responsiveness to intermediate target cues. *Neuron* 2003; 39 (3): 439–452.
- 35.**Norris CR, Kalil K. Guidance of callosal axons by radial glia in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 1991; 11 (11): 3481–3492.
- 36.**Koralek KA, Killackey HP. Callosal projections in rat somatosensory cortex are altered by early removal of afferent input. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1396–1400.
- 37.**Chiarello, C. (1995). Does the corpus callosum play a role in the activation and suppression of ambiguous word meanings? In Kitterle, F. L. (ed.), *Hemispheric Communication: Mechanisms and Models*, Erlbaum, Hillsdale, NJ. pp. 271–300.
- 38.**Gazzaniga MS. 2000. Cerebral specialization and interhemispheric communication: does the corpus callosum enable the human condition? *Brain* 123(Part 7):1293–1326.
- 39.**Deng J, Elberger AJ. 2001. The role of pioneer neurons in the development of mouse visual cortex and corpus callosum. *Anat Embryol (Berl)* 204:437–453.

- 40.**Houzel JC, Milleret C. 1999. Visual inter-hemispheric processing: constraints and potentialities set by axonal morphology. *J Physiol Paris* 93:271–284.
- 41.**Schalomon PM, Wahlsten D. 2002. Wheel running behavior is impaired by both surgical section and genetic absence of the mouse corpus callosum. *Brain Res Bull* 57:27–33.
- 42.**Milleret C, Houzel JC. 2001. Visual interhemispheric transfer to areas 17 and 18 in cats with convergent strabismus. *Eur J Neurosci* 13:137–152.
- 43.**Schuz A, Preissl H. 1996. Basic connectivity of the cerebral cortex and some considerations on the corpus callosum. *Neurosci Biobehav Rev* 20:567–570.
- 44.**Barkovich AJ. 2002. Magnetic resonance imaging: Role in the understanding of cerebral malformations. *Brain Dev* 24:2–12.
- 45.**Hetts SW, Sherr EH, Chao S, Gobuty S, Barkovich AJ. 2006. Anomalies of the corpus callosum: An MR analysis of the phenotypic spectrum of associated malformations. *AJR Am J Roentgenol* 187:1343–1348.
- 46.**Grogono JL. Children with agenesis of the corpus callosum. *Dev Med Child Neurol* 1968; 10: 613–616.
- 47.**Jeret JS, Serur D, Wisniewski KE, Lubin RA. Clinicopathological findings associated with agenesis of the corpus callosum. *Brain Dev* 1987; 9: 255–264.
- 48.**Parrish ML, Roessmann U, Levinsohn MW. Agenesis of the corpus callosum: a study of the frequency of associated malformations. *Ann Neurol* 1979; 6: 349–354.

- 49.**Gupta JK, Lilford RJ. Assessment and management of fetal agenesis of the corpus callosum. *Prenat Diagn* 1995; 15: 301–312.
- 50.**Mordefroid M, Grabar S, Andre Ch, Merzoug V, Moutard M, Adamsbaum C. Partial corpus callosum agenesis. *J Radiol* 2004; 85: 1915–1926.
- 51.**Parraga HC, Parraga MI, Jensen AR. Cognitive, behavioral, and psychiatric symptoms in two children with Development of the corpus callosum and its agenesis agenesis of the corpus callosum: case report. *Int J Psychiatry Med* 2003; 33 (1): 107–113.
- 52.**Nielsen T, Montplaisir J, Lassonde M. Sleep architecture in agenesis of the corpus callosum: laboratory assessment of four cases. *J Sleep Res* 1992; 1 (3): 197–200.
- 53.**Paul LK, Van Lancker-Sidtis D, Schieffer B, Dietrich R, Brown WS. Communicative deficits in agenesis of the corpus callosum: nonliteral language and affective prosody. *Brain Lang* 2003; 85 (2): 313–324.
- 54.**Hines RJ, Paul LK, Brown WS. Spatial attention in agenesis of the corpus callosum: shifting attention between visual fields. *Neuropsychologia* 2002; 40 (11): 1804–1814.
- 55.**Bedeschi, M. F. et al. Agenesis of the corpus callosum: clinical and genetic study in 63 young patients. *Pediatr. Neurol.* 34, 186–193 (2006).
- 56.**Rubert, G. Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 84, 483–496 (2006).
- 57.**Evrard, S. G. Altered neuron–glia interactions in a low, chronic prenatal ethanol exposure. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 147, 119–133 (2003).

- 58.**Guerri, C., Pascual, M. & Renau-Piqueras, J. Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology* 22, 593–599 (2001).
- 59.**Greenberg, D. A. Linking acquired neurodevelopmental disorders to defects in cell adhesion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 8043–8044 (2003).
- 60.**Wilkemeyer, M. F. Differential effects of ethanol antagonism and neuroprotection in peptide fragment NAPVSIPQ prevention of ethanol-induced developmental toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 8543–8548 (2003).
- 61.**Roebuck, T. M., Mattson, S. N. & Riley, E. P. A review of the neuroanatomical findings in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22, 339–344 (1998).
- 62.**Innocenti, G. M. & Price, D. J. Exuberance in the development of cortical networks. *Nature Rev. Neurosci.* 6, 955–965 (2005).
- 63.**Innocenti, G. M. Schizophrenia, neurodevelopment and corpus callosum. *Mol. Psychiatry* 8, 261–274 (2003).
- 64.**Erhan O. Klinik Nöroloji. 1. Baskı. Motif Basım (İstanbul), Nobel & Güneş, 2002; 131
- 65.**Witelson SF. Hand and sex differences in the isthmus and genu of the human corpus callosum. A postmortem morphological study. *Brain* 1989;112(Pt 3): 799–835.
- 66.**Abe O, Masutani Y, Aoki S, et al. Topography of the human corpus callosum using diffusion tensor tractography. *J Comput Assist Tomogr* 2004;28:533–9.

- 67.**Musgrave J, Gloor P. The role of the corpus callosum in bilateral interhemispheric synchrony of spike and wave discharge in feline generalized penicillin epilepsy. *Epilepsia* 1980;21:369–78.
- 68.**Pressler RM, Binnie CD, Elwes RD, Polkey CE. Return of generalized seizures and discharges after callosotomy. *Adv Neurol* 1999;81:171–82.
- 69.**Kusske JA, Rush JL. Corpus callosum and propagation of afterdischarge to contralateral cortex and thalamus. *Neurology* 1978;28:905–12.
- 70.**Gloor P, Salanova V, Olivier A, Quesney LF. The human dorsal hippocampal commissure: an anatomically identifiable and functional pathway. *Brain* 1993;116 (Pt 5):1249–73.
- 71.**Conlon P, Trimble MR. A study of the corpus callosum in epilepsy using magnetic resonance imaging. *Epilepsy Res* 1988;2:122–6.
- 72.**Pulsipher DT, Seidenberg M, Morton JJ, Geary E, Parrish J, Hermann B. MRI volume loss of subcortical structures in unilateral temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2007;11:442–9.
- 73.**Atkinson DS, Abou-Khalil B, Charles PD, Welch L. Midsagittal corpus callosum area, intelligence, and language dominance in epilepsy. *J Neuroimaging* 1996;6:235–9.
- 74.**O'Kusky J, Strauss E, Kosaka B, et al. The corpus callosum is larger with right hemisphere cerebral speech dominance. *Ann Neurol* 1988;24:379–83.
- 75.**Brodbeck D, Cron P, Hemmings BA. A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem*. 1999 Apr 2;274(14):9133–6.

76.Joris Andrieux , Jean-Christophe Cuvellier , Be'ne'dicte Duban-Bedu , Sylvie Joriot-Chekaf , Anne Dieux-Coeslier , Sylvie Manouvrier-Hanu , Bruno Delobel , Louis Vallee. A 6.9 Mb 1qter deletion/4.4 Mb 18pter duplication in a boy with extreme microcephaly with simplified gyral pattern, vermis hypoplasia and corpus callosum agenesis. *European Journal of Medical Genetics* 51 (2008) 87-91

77.E. Boland, J. Clayton-Smith, V.G. Woo, S. McKee, F.D. Manson, L. Medne, E. Zackai, E.A. Swanson, D. Fitzpatrick, K.J. Millen, E.H. Sherr, W.B. Dobyns, G.C. Black, Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum, *Am. J. Hum. Genet.* 81 (2007) 292e303.

78.R.M. Easton, H. Cho, K. Roovers, D.W. Shineman, M. Mizrahi, M.S. Forman, V.M. Lee, M. Szabolcs, R. de Jong, T. Oltersdorf, T. Ludwig, A. Efstratiadis, M.J. Birnbaum, Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 1869e1878.

79.C. Orellana M. Roselló S. Monfort S. Oltra R. Quiroga I. Ferrer F. Martínez. Corpus Callosum Abnormalities and the Controversy about the Candidate Genes Located in 1q44. *Cytogenet Genome Res* 2009;127:5–8

80.M. Poot, H.Y. Kroes, S.E.V.D. Wijst, M.J. Eleveld, L. Rooms, R.A. Nievelstein, D. Olde Weghuis, R.C. Vreuls, G. Hageman, F. Kooy, R. Hochstenbach, DandyWalker complex in a boy with a 5 Mb deletion of region 1q44 due to a paternal t(1;20)(q44;q13.33), *Am. J. Med. Genet. A* 143A (2007) 1038e1044.

81.B.W. van Bon, D.A. Koolen, R. Borgatti, A. Magee, S. Garcia-Minaur, L. Rooms, W. Reardon, M. Zollino, M.C. Bonaglia, M. De Gregori, F. Novara, R. Grasso, R. Ciccone, H.A. van Duyvenvoorde, A.M. Aalbers, R. Guerrini, E. Fazzi, W.M. Nillesen, S. McCullough, S.G. Kant, C.L. Marcelis, R. Pfundt,

N. de Leeuw, D. Smeets, E.A. Sistermans, J.M. Wit, B.C. Hamel, H.G. Brunner, F. Kooy, O. Zuffardi, B.B. de Vries, Clinical and molecular characteristics of 1qter microdeletion syndrome: delineating a critical region for corpus callosum agenesis/hypogenesis, *J. Med. Genet.* 45 (2008) 346-354.

82.M. Poot, H. Y. Kroes, R. Hochstenbach. AKT3 as a candidate gene for corpus callosum anomalies in patients with 1q44 deletions. *European Journal of Medical Genetics* 51 (2008) 689-690

83.Sambrook J and Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory MAnual*, 3rd edition New Tork Cold Spring Harbor Lab. Pres 2001

84.Juliana S. Bloom and George W. Hynd. The Role of the Corpus Callosum in Interhemispheric Transfer of Information: Excitation or Inhibition? *Neuropsychol Rev.* 2005 Jun;15(2):59-71.

85.<http://www.ensembl.org/index.html>

86.www.cellsignal.com

87. <http://www.ebi.ac.uk/asd>

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: ELİF KURT

TC Kimlik No / Pasaport No:	30883138576
Doğum Yılı:	18.04.1987
Yazışma Adresi :	Yenigün Mah. 265/3 Sok. No:45 BUCA/İZMİR
Telefon :	0 (507) 219 57 40
Faks :	-
e-posta :	kurt.elif@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya Bölümü	Lisans	2009
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD	Yüksek Lisans	2011

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	Takdir Belgesi (Biyokimya Bölümünden ikincilikle Mezum Olduğum için)	Ege Üniversitesi	2009

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel (Invaziv) Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu

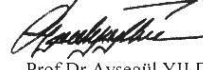
Sayı: 224
Konu: Karar hk.

12.8.2010

Doç.Dr.Sultan Cingöz

Komisyonumuz tarafından 03.08.2010 tarih ve 48-İÖÇ protokol numaralı 2010/09-17 karar ile onayı alınan **"Mikroskobik Ve Submikroskobik Kromozomal Değişikler İçin Tüm Genomu Tarayarak, Santral Sinir Sisteminin Gelişimsel Anomalileri İle İlgili Aday Gen Ve Bölgelerin Belirlenmesi"** konulu araştırmanıza ilişkin Komisyonumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.



Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ
Başkan

Ek: Komisyon Kararı

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
AÇIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 1. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	48 -İOÇ
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Mikroskopik Ve Submikroskopik Kromozomal Değişikler İçin Tüm Genomu Tarayarak, Santral Sinir Sisteminin Gelişimsel Anomalileri İle İlgili Aday Gen Ve Bölgelerin Belirlenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Sultan Cingöz
	ARAŞTIRMA MERKEZİ ve AÇIK ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D İnciraltı-İZMİR 35340
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ ÇOK MERKEZLİ ☒

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2010/09-17	Tarih:03.08.2010
	Doç.Dr.Sultan Cingöz sorumluluğunda yapılması tasarlanan “Mikroskopik Ve Submikroskopik Kromozomal Değişikler İçin Tüm Genomu Tarayarak, Santral Sinir Sisteminin Gelişimsel Anomalileri İle İlgili Aday Gen Ve Bölgelerin Belirlenmesi” isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	DEU Girişimsel (İnvaziv) Olmayan Klinik Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu Yönergesi , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof. Dr. Ayşegül YILDIZ (Başkan)	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Ecz.İskender İNCE (Başkan yardımcısı)	Eczacı	Ege Üniversitesi ARGEFAR	Erkek	E ☐	H ☒	İzmir
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr..Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Derya ERÇAL	Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	İzmir
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Preventif Onkoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	İzmir
Doç Dr.Yeşim ÖZTÜRK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Av. Tayfun OZANKAYA	Hukuk	Serbest	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı