

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

GELİŞİMSEL KALÇA DİSPLAZİSİ İLE İLİŞKİLİ
GEN/GENLERİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. KADRİ KARAER

TEZ DANIŞMANLARI
Prof. Dr. E. FERDA PERÇİN
Prof. Dr. A. NURTEN AKARSU

ANKARA
EYLÜL 2009

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

GELİŞİMSEL KALÇA DİSPLAZİSİ İLE İLİŞKİLİ
GEN/GENLERİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. KADRİ KARAER

TEZ DANIŞMANLARI
Prof. Dr. E. FERDA PERÇİN
Prof. Dr. A. NURTEN AKARSU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
SBE-01/2007-83 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
EYLÜL 2009

TEZ TUTANAĞI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi **Dr.Kadri Karaer'in** "Gelişimsel Kalça Displazisi ile İlişkili Gen/Genlerin Araştırılması" isimli tezi incelendi.

Adı geçen doktor tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında 18/Eylül/2009 tarihinde teslim edilen tezi, tez danışmanları **Prof.Dr.E.Ferda Perçin** ve **Prof.Dr.A. Nurten Akarsu** ve sınav jürileri tarafından incelenerek oy birliği ile uzmanlık tezi olabileceğine karar verilmiştir.



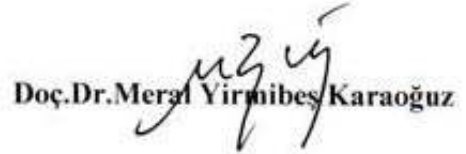
Prof.Dr.E.Ferda Perçin



Prof.Dr.Aykın Şimşek



Prof.Dr.A. Nurten Akarsu



Doç.Dr.Meral Yirmibes Karaoğuz



Doç.Dr.Mehmet Ali Ergün

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik asistanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, verimli ve destekleyici ortam için başta anabilim dalı başkanımız, Sayın Prof. Dr. E.Ferda Perçin'e, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim hocalarım Doç.Dr.Meral Yirmibeş Karaoğuz ve Doç.Dr. Mehmet Ali Ergün 'e teşekkür ederim.

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar ki süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, bilim insanı olmasının yanında benim için çok özel bir önemi olan ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Tıbbi Genetik Anabilim Dalı asistanlığım döneminde hocam olduğu için mutluluk duyduğum çok kıymetli Prof. Dr. E.Ferda Perçin'e bir kez daha teşekkür ederim.

Tez danışmanım ve değerli büyüğüm, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. A. Nurten Akarsu'ya tezime ve bilgilerime katkılarından ayrıca hiç bitmeyen enerjisi ve neşesinden dolayı teşekkür ederim.

Tıbbi Genetik A.D. 'nı tercih etmem de önemli bir yeri olan, çocukluğumdan itibaren yanımda olduğu için gurur duyduğum ağabeyim bilge insan Dr. Abdullah Karaer'e ve bugünlere gelebilmem için maddi manevi hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan canım annem ve babama teşekkür ederim.

Kendilerini tanımaktan ve aynı bölümde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum dostlarım başta Dr. Altuğ Koç olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitimim süresince birlikte olduğum tüm biyolog, teknisyen ve sekreter arkadaşlarıma dostlukları için teşekkür ederim.

...ve Tıbbi Genetik Bölümünde tanışıp, evlendiğim, hep yanımda ve destek olan canım eşim Derya Karaer'e sonsuz teşekkür ediyorum...

KIZIM DENİZ'E...

İÇİNDEKİLER

Teşekkür

Kabul ve Onay

İçindekiler

Kısaltmalar

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tanımlama	3
2.2. Tarihçe	4
2.3. Kalça Eklemi Embriyolojisi	5
2.4. Kalça Ekleminin Anatomisi	8
2.4.1. Kemik Yapılar	8
2.4.2. Eklem Kapsülü	10
2.4.3. Femur Başının Vasküler Anatomisi	10
2.4.4. Kalça Ekleminin İnnervasyonu	10
2.4.5. Patolojik Anatomik Değişiklikler	11
2.5. Gelişimsel Kalça Displazisi Sınıflaması (Tachdjian Sınıflaması)	12
2.6. İnsidans	13
2.7. Etyoloji	15
2.7.1. Ligamentöz laksisite	15
2.7.2 Prenatal pozisyon	16
2.7.3 Postnatal pozisyon	16
2.7.4 Genetik Yatkınlık	17

3. GEN HARİTALAMASI ve GELİŞİMSEL KALÇA DİSPLAZİSİ İÇİN GENETİK KANITLAR	19
3.1. Sitogenetik Haritalama	19
3.2. Fiziksel Haritalama	20
3.3. Genetik Haritalama	21
<i>3.3.1. Haritalanacak fenotipin özelliklerinin tanımlanmasının önemi</i>	24
<i>3.3.2. Gen haritalaması yapmak istenilen hastalıkla ilgili genetik epidemiyolojik araştırmalar</i>	25
<i>3.3.3. Haritalamada kullanılacak metoda karar verilmesi</i>	27
<i>3.3.4. Haritalamada kullanılacak markır'ların (genetik belirleyiciler) seçilmesi ve gen haritalarının etkin olarak kullanılması</i>	29
<i>3.3.5. İstatistiksel değerlendirmeler</i>	32
4. GEREÇ ve YÖNTEM	35
4.1. Araç-Gereçler	37
<i>4.1.1. Kullanılan Cihazlar</i>	37
<i>4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler</i>	38
<i>4.1.3. Kullanılan Çözeltiler</i>	40
4.2. Yöntem	43
<i>4.2.1. DNA izolasyonu: (Yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme yöntemi)</i>	43
<i>4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu</i>	44
<i>4.2.3. Çoğaltılmış DNA'ların Elektroforezde Değerlendirilmesi</i>	46
<i>4.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi</i>	46
<i>4.2.5. Gümüş Boyama Yöntemi ile Genotiplendirme Yapılması ve Haplotiplerin Oluşturulması</i>	50
<i>4.2.6. İstatistik Analizler</i>	50

5. BULGULAR	53
5.1. Ailelerin Fenotipik Özellikleri	53
5.2. Pedigri Analizi	58
5.3. Genetik belirleyicilerin (markırların) seçimi ve Moleküler analizler	58
<i>5.3.1. Kromozoma 13'e ait haplotip analizi</i>	59
<i>5.3.2. Kromozom 4'e ait haplotip analizi</i>	63
<i>5.3.3. Kromozom 6'ya ait haplotip analizi</i>	67
5.4. İstatistiki Analizler	71
6. TARTIŞMA	77
7. SONUÇLAR	84
8. KAYNAKLAR	85
9. ÖZET	94
10. SUMMARY	95
11. ÖZGEÇMİŞ	96

KISALTMALAR

A	Arteria
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AD	Anabilim Dalı
APC	Automatic Processor Compatible
APS	Amonyum persülfat
ark	Arkadaşları
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin
bç	Baz çifti
Bkz	Bakınız
cM	Santimorgan
CTGF	Konnektif Doku Büyüme Faktörü
dH₂O	Distile su

dk	Dakika
DKÇ	Doğumsal Kalça Çıkığı
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DPT	Devlet Planlama Teşkilatı
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FISH	Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon
GDF-5	Büyüme ve diferansiyasyon faktörü 5
GKD	Gelişimsel kalça displazisi
gr	Gram
Lig	Ligamentum
LOD	Logaritm of Odds Ratio
lt	Litre
M	Molar

mA	Miliamper
Mb	Megabaz
mgr	Miligram
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
N	Nervus
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	National Resource for Molecular Biology Information
NH₄	Amonyum
OMIM	On-Line Mendelian Inheritance in Man
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat

sf	Sayfa
Sn	Saniye
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
STR	Kısa dizi tekrar
STRP	Kısa dizi tekrar polimorfizmi
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borate/EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamin
TL	Türk Lirası
U	Ünite
U.V	Ultraviyole
V	Volt
vs	Vesaire
W	Watt

°C	Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
θ	Theta

1. GİRİŞ

Gelişimsel kalça displazisi (GKD), femur başının asetabulum'a yerleşme anomalisidir. Femur başının doğuştan asetabulum'un dışında olması en bilinen form olmakla birlikte tam çıkığın görülmediği formları da mevcuttur. Bu nedenle GKD, klinik olarak normal olup ultrasonografik veya radyolojik olarak tespit edilebilen kalça sorunlarından, klinik olarak belirgin kalça dislokasyonuna kadar uzanan geniş bir spektrum içerisindeki kalça problemlerini kapsayan bir terimdir.

Asıl etiyolojik sebep bilinmemekle birlikte; fetüs'ün anne rahmindeki pozisyon değişiklikleri ve oligohidramniyos gibi mekanik faktörler, annenin östrojen hormonun düzeyindeki değişiklikler gibi fizyolojik etkenler ve genetik faktörler üzerinde durulmaktadır. Doğum sonrası çevresel faktörler arasında bulunan; doğumdan sonraki ilk bir ayda yeni doğan bir bebeği tahta beşiklerde uygun olmayan pozisyonlarda yatırmak veya kundağa sarmak gibi alışkanlıkların, GKD görülme oranını normalden 10 kat daha fazla artırdığı da ileri sürülmektedir (1).

Etiyolojideki genetik faktörler konusundaki çalışmalar, kalıtım modelinin otozomal dominant ve/veya multifaktöriyel olabileceğini öne sürmekle birlikte henüz belirlenmiş bir gen söz konusu değildir (2). Bu güne kadar bu konuda yapılmış sınırlı sayıdaki araştırma ile bazı lokalizasyonlar tanımlanmıştır. İlk olarak Roby ve ark. (1999), kalça eklemindeki erken dejeneratif osteoartropatinin kromozom 4q35'te yerleşmiş olan 11cM büyüklüğünde bir bölge ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (3). Mabuchi ve ark. (2006) ise dört kuşakta sekiz kalça

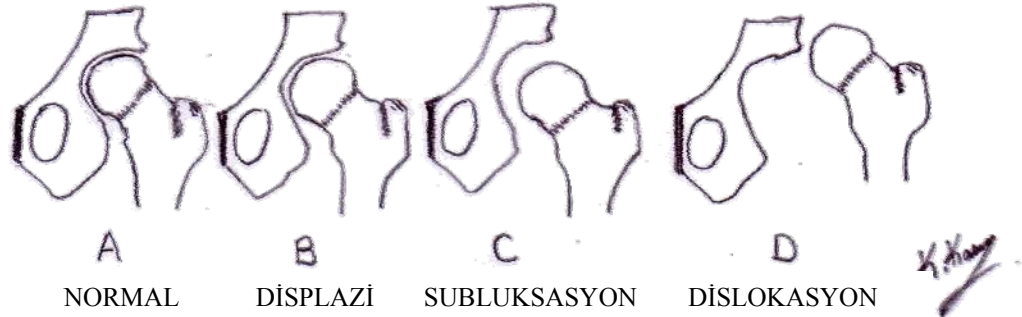
displazili birey içeren bir Japon ailesinde “Asetabular Displazi” zemininde gelişen osteoartiritin kromozom 13q22 lokalizasyonunda bulunan 6-cM'lik bir bölge ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. 4 ve 13 numaralı kromozomlarda bildirilen bu bölgelere ek olarak Mabuchi ve ark.'nın (2006) yaptığı ve genom taraması verilerini de içeren aynı çalışmada 6 numaralı kromozom da pozitif LOD skorlar (maksimum 2,26) saptanan bir bölge bulunması, bu kromozomunda incelemeye değer olabileceğini düşündürmektedir (4). Bu veriler dikkate alınarak gelişimsel kalça displazisinin gen/genlerinin bulunmasına yönelik yapılacak çalışmalarda 4., 6. ve 13. kromozomlar aday lokalizasyon yaklaşımı açısından ön plana çıkmaktadır.

Bu araştırmada, 1991-1992 seneleri arasında, Sivas Yöresinde bulunan bir GKD ailesi (*Aile 2*) ile 2005-2007 seneleri arasında, Ankara Merkez ve Çubuk ilçelerine dağılmış ikinci bir GKD ailesi (*Aile 12*) incelenmiştir. Çalışmada, toplam 16 hasta ve 15 sağlıklı bireyden oluşan bu iki ailenin söz konusu lokuslara bağlantı gösterip göstermediği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanımlama

“Gelişimsel kalça displazisi (GKD), kalçanın anatomik gelişimindeki patolojiyi ve ona bağlı bir dizi anormalliği tanımlar.” GKD tanımı kapsamındaki sorunlar üç grupta değerlendirilmektedir. *Dislokasyonda*, femur ve asetabulumun eklem yüzeyleri arasında hiç temas olmayacak şekilde, tam deplasman söz konusu iken, *subluksasyonda*, femur ve asetabulum eklem yüzleri arasında bir miktar temasın kaldığı deplasman tanımlanır. *Displazide* ise asetabulum yeterince gelişmediği için femur başının tam örtülemediği bir durum söz konusudur (Şekil 1). Klisic ve ark. tarafından (1989) yapılan bir çalışmada kalça çıkığının, çocuk büyüdükçe iyiye veya kötüye gidebilme potansiyeline sahip, dinamik bir süreç olduğu gösterilmiş ve önceleri kullanılan “konjenital/doğumsal kalça çıkığı” teriminin yerine, doğum anında var olan veya doğum sonrası dönemde ortaya çıkabilen kalça eklemi anormalliklerinin anatomik spektrumunu tanımlayan, daha genel bir terim olan “gelişimsel kalça displazisi” kullanılması önerilmiştir (5).



Şekil 1. Gelişimsel Kalça Displazisi tanımı kapsamındaki kalça eklem problemleri. A) Normal kalça eklemi B) Kalça eklemi displazisi C) Kalça eklemi subluksasyonu D) Kalça eklemi dislokasyonu

2.2. Tarihçe

Doğuştan kalça çıkığı ilk kez Hippocrates (MÖ 460-357) tanımlamış ve sebep olarak gebelik sırasındaki uterus içi basıncı ve doğum eylemi sırasındaki travmaları göstermiştir (6). Guillaume Dupuytren (1832), doğumdaki kalça çıkığını fizik muayene bulguları ile tariflemiş ve “orijinal veya konjenital kalça çıkığı” olarak adlandırmıştır (7). Dupuytren, konjenital kalça çıkığı olan hastalarda; uylukta kısıalma, abduksiyon kısıtlılığı, kaslarda zayıflama, pelviste gözle görülür genişleme olduğunu ve trokanter majorun belirginleştiğini ifade etmiştir. Aynı zamanda lomber lordozdaki artışı saptamış ve abduktor eğilmeyi de net olarak tanımlamıştır.

Putti (1927) kalça çıkığının erken tedavisinin faydalarından bahsetmiş ve tedaviye hastalar bir yaşından küçükken başladığında, kalçaların %90’ında mükemmel sonuçlar elde edilebildiğini göstermiştir (8). Ortolani (1935), annesi tarafından, bebeğinin her yıkanışında, kalçasında bir “klik” sesi duyulduğu ifade edilen bir bebeği muayene etmiştir. Anne, bunu nasıl yaptığını göstermiş ve çekilen grafide bebeğin kalçasının disloke olduğu saptanmıştır. Ortolani bu deneyimini 1937 yılında “*DKÇ’nin erken tanısında çok küçük ve önemli bir işaret*” adlı makalesinde yayınlamıştır. Ortolani’nin kullandığı “*segno del scotto*” terimi, bir hareket veya bir “klunk sesi” olarak çevrilebilir (9). Barlow’un (1962) çalışmasında da, kalça çıkığı olan hastalarda, kalça adduksiyonda iken posteriora doğru hafif bir kuvvet uygulanması ile kalçanın asetabulumun dışına kaydığı hissinin alınabileceğinden bahsedilmiştir (10). Daha sonra bu iki gözlem yeni

doğanlarda kalça çıkığı taramalarında kullanılmaya başlamış ve günümüze kadar da geçerliliğini korumuştur.

Radyolojik tetkiklerin, özellikle de kalça ultrasonografisinin, GKD'nin teşhisi ve tedavisinin izlenmesinde duyarlı ve klinik muayeneye göre daha ileri bir yöntem olduğunu ise ilk kez Graf ve ark. (1993) bildirmişlerdir (11).

2.3. Kalça Eklemi Embriyolojisi

Kalça eklemi embriyolojisi üzerine yapılan ve en büyük seriyi oluşturan araştırma Watanabe'nin 1959-1972 yılları arasında 144 embriyonun 288 kalça eklemi üzerinde yaptığı araştırmadır (12).

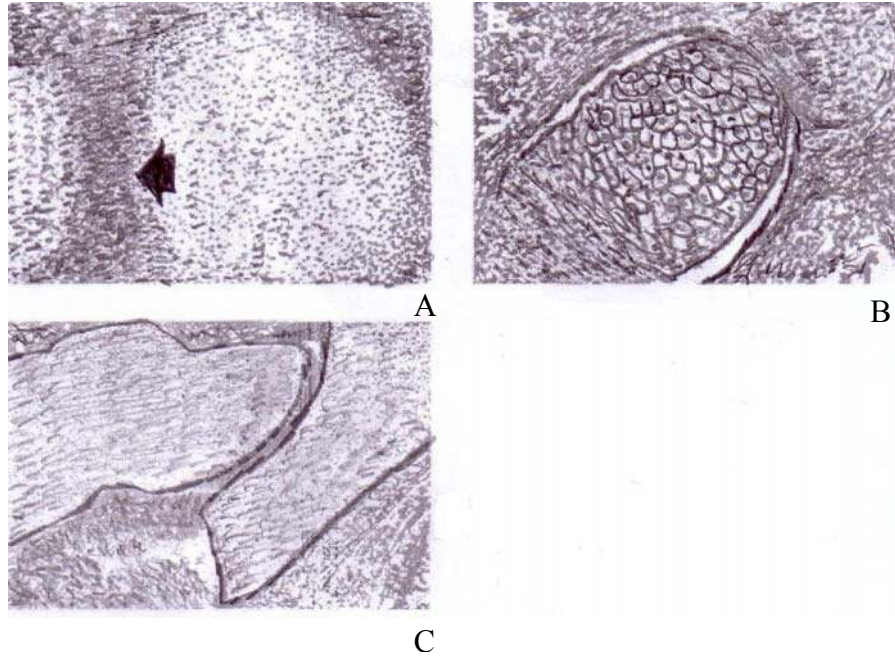
İntrauterin hayat; ovuler, embriyonik ve fetal dönem olmak üzere 3 bölüme ayrılmıştır. Kemik ve eklemlerin gelişmeye başladığı ve tamamen farklılaştığı embriyonik dönem 2-8. haftalar arasındır. Sekizinci haftadan gebeliğin sonuna kadar süren fetal dönemde ise embriyonik dönemde gelişimi başlayan organların büyüme ve olgunlaşması tamamlanmaktadır (12).

Femur başı ve asetabulum, primitif mezenşimal hücrelerden gelişir. Gebeliğin 5. haftasında iki yanlı alt taraf tomurcuklarının içinde kalça kuşağı ve alt ekstremite kemiklerinin mezenşim modelleri belirir. Kalça eklemi gelişimi gebeliğin 7. haftasında başlar. Femur başıyla ligamentum teres ve asetabulum arasındaki aralık 8.haftada artar ve bu haftanın sonunda asetabulumun erken kıkırdak modeli oluşur (Şekil 2) (12).

İntrauterin 11. haftada kalça ekleminde (femur başı ve asetabulum) tam kıkırdak formasyonu oluşmakta (13,14) ve ilk kez bu dönemde çıkık oluşabilmektedir (15). Bu haftada femur başı sferik olup femoral anteverسیون

açısı 5-10°'dir. Bu açı fetal hayatın ikinci yarısında artmakta ve doğuma doğru 35°'ye kadar ulaşmaktadır.

12-16. haftalarda; damarların dallanmaları artmakta, kemikleşme odakları yaygınlaşmakta ve asetabulum derinleşmektedir. Önce ilium'da, 4-5. aylarda da iskium ve pubisteki kemikleşme odakları büyüyerek kemik formasyonunu oluşturmaktadır (16) (Şekil 2A-2B-2C).

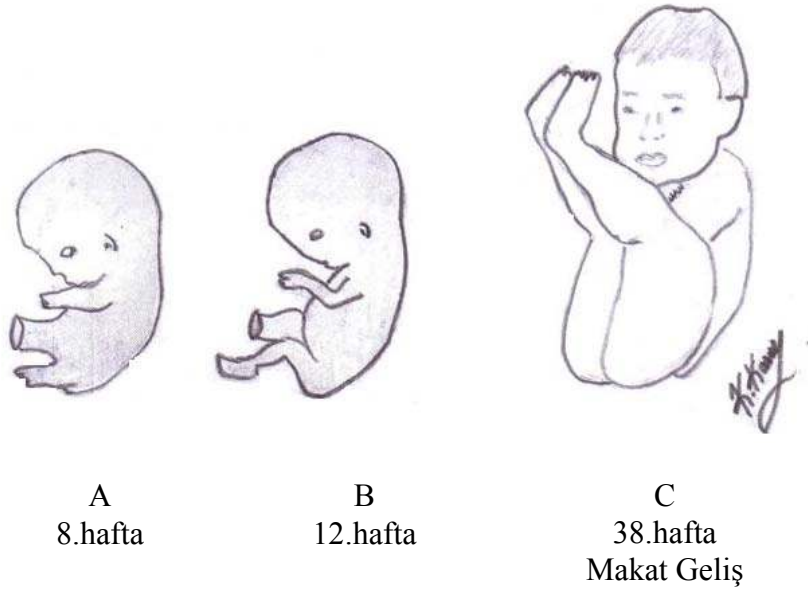


Şekil 2. A) Primitif femur başı ve asetabulum arasındaki hücre toplanmasının 5. haftadaki mikroskopik görüntüsü ok ile gösterilmiştir B) 7. haftada femur başı sferik bir yapıdadır ve asetabulum etrafında gelişmeye başlamıştır, C) 8. haftanın sonunda femur başı ve asetabulumun erken kıkırdak modelleri oluşmaya başlar.

Kalça eklemi son biçimini 16. haftadan itibaren alır. Kalça eklemine yüzeyi olgun hiyalin kıkırdakla örtülür ve 20. haftadan itibaren işlevlerini bütünüyle yapabilir duruma erişir (12). Gestasyonun 34. haftasında, fetal kalça eklemi; ultrasonografik olarak matürasyona ulaşmıştır. Kemik ve kıkırdak çatının matürasyon süreci ise gestasyonun 34. haftasıyla doğum sonrası 6. haftalar

arasında olmaktadır (17). Doğum esnasında asetabulum tamamen kıkırdaktır ve kenarında fibrokartilaj yapıdaki labrum bulunur.

Fetal dönemde GKD gelişimi yönünden üç riskli dönem vardır. İlk büyük pozisyonel değişikliğin gerçekleştiği 12. hafta, femur başını asetabulumdan çıkmaya zorlayan kapsüler zayıflık, asetabuler sıgılık veya anormal adale traksiyonlarının görülebildiği 18. hafta ve anormal mekanik kuvvetlerin intrauterin malpozisyona (dizlerin ekstansiyonda olduğu makat geliş) neden olabildiği son 4 hafta riskli dönemlerdir (Şekil 3) (12).



Şekil 3. İntrauterin pozisyonel değişiklikler ve GKD gelişimi.

- A. 8 haftalık insan embriyosunun ekstremite ve kalça ekleminin mediale rotasyonu
- B. 12 haftalık insan embriyosunda ilk pozisyonel değişiklik, kalça ekleminin mediale rotasyonu
- C. 38 haftalık insan fetüsünde makat geliş nedeniyle kalça eklemindeki hiperekstansiyon

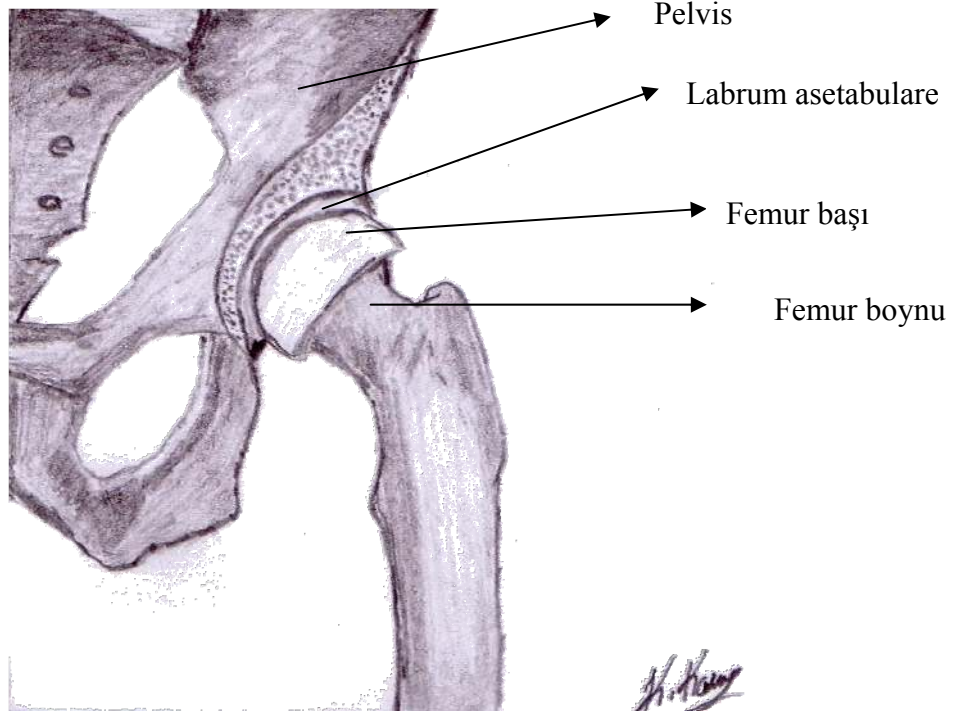
2.4. Kalça Eklemine Anatomisi

2.4.1. Kemik Yapılar

Kalça eklemi; femur başı ile asetabulum arasında transvers, sagittal ve vertikal planlarda poliaksiyel hareket sağlayan “articulatio spherioidea” grubundan, topuz-yuva tipinde bir eklemdir (18).

Asetabulum; ilium, iskium ve pubis kemiklerinden oluşur. Bu üç kemik çocuklarda “Y” kıkırdığı ile birbirine bağlıdır. Asetabulum üst kenarı daha kalın ve sağlam olup dışa doğru hafifçe taşar. Alt kenarı ise çentik şeklinde olup incisura asetabuli adını alır. Asetabulum’un arkasında ilio-iskiadic çentik, önünde ise iskio-pubik çentik bulunur. Asetabulum’un derinliği asetabuler kıkırdığın apozisyonel olarak büyümesi sonucu artar ve burası daha sonra periost aracılığı ile kemikleşerek asetabulumun kemiksel kenarını meydana getirir (19). İlium, iskium ve pubisin epifiz merkezleri, 8-9 yaşlarında ossifiye olup görünür hale gelirken, 17-18 yaşlarında füzyone olmaktadır. Asetabuler kıkırdak, hücre sayısı fazla miktarda olan hiyalin kıkırdak yapısındadır. Asetabulum kenarı, fibrokartilaj yapıdaki halka (Labrum asetabulare) ile çevrilidir (20)(Şekil 4). Labrum’un elastik yapıda olması; asetabulumun derinleşmesi ve femur üst eklem yüzünün yarısından fazlasını içine alabilecek duruma gelmesini sağlar. Ayrıca bu yapı kalçanın yerinden çıkmasına engel olacak negatif bir basınç oluşturmaktadır. Gelişimsel kalça displazili hastalarda femur başının aşırı basısı nedeni ile labrum deforme olabilmektedir. Sonuçta femur başının asetabulum içerisine redüksiyonu engellenmektedir (21).

Femur başının orta kısmında bulunan çukura (fovea capitis femoris) ligamentum teres yapışır. Femur başı, bu çukur alan dışında, eklem kıkırdağı ile örtülüdür. Femur başının femura bağlandığı bölüme collum femoris (femur boynu) denilir (Şekil 4). Femur cismi ile femur boynu arasında bulunan 130°lik açı boyun-şaft açısı (collo-diafizer)dir. Ortalama boyun-şaft açısı, 1 yaşında 136° iken, 18 yaşında bu değer 127°'ye düşmektedir. Femur boyun eksenini ile femur transkondiler eksenini arasında femoral anteversiyon açısı bulunmaktadır. Fabry ve ark.'nın, 432 sağlıklı çocuk (864 kalça) üzerinde yaptığı çalışmada femoral anteversiyon açısının ortalama değerinin, 1 yaş için 31,1 derece olduğu ve yaşla düşen bu değer 16 yaş için 15,4 derece olduğu saptanmıştır (21).



Şekil 4. Kalça eklemi anatomisi

2.4.2. Eklem Kapsülü

Eklem kapsülü, etrafındaki bağlar tarafından kuvvetlendirilmiş olup, vücudun en kuvvetli yapılarından biridir ve travmatik kalça çıkığı için önemli bir engeldir. Eklem kapsülü alt kısımda, ligamentum (lig.) transversuma yapışır. Kapsül, femura önde trokanterler arası çizgiye, içte trokanter minörün biraz üzerine, arkada ise trokanterler arası çıkıntının biraz yukarısına yapışır. Eklem kapsülü, dıştan “lig. iliofemorale”, “lig. pubofemorale” ve “lig. ischiofemorale” bağları ile desteklenmiştir. Sirküler lifler ise kapsül etrafında *zona orbikularisi* oluştururlar.

2.4.3. Femur Başının Vasküler Anatomisi

Eklem kapsülü; arkada medial sirkumfleks arter ve inferior gluteal arter, önde, lateral sirkumfleks arter (inferior metafizer arter) ve superior gluteal arter ile kanlanır. Bunlar kapsül altında, retinaküler ağ şeklinde ve femur boynu etrafında, yüzük gibi (ekstra-kapsüler halka) yayılma gösterir. Femurun proksimal bölgesinin kanlanması, primer olarak arteria femoris profunda ve bunun iki önemli dalı olan, medial sirkumfleks arter ve lateral sirkumfleks arter tarafından sağlanır.

2.4.4. Kalça Eklemine Innervasyonu

Kalça eklemi baslıca üç sinir tarafından innerve edilir.

- 1) N. Obturatorius'dan gelen dallar eklem kapsülünün ön-medial kısmını innerve eder.
- 2) N. Iskiadicus'tan gelen dallar kapsülün tüm arka yüzünü innerve eder.
- 3) N. Femoralisten gelen dallar eklem kapsülünün üst kısmını innerve eder.

2.4.5. Patolojik Anatomik Değişiklikler

Gelişimsel kalça displazisinde kalçanın patolojik anatomik spektrumu; dislokasyonun tipi, derecesi ve hastanın yaşına bağlıdır. Uzun süre tedavi edilmemiş gelişimsel kalça displazisinde, asetabulum, proksimal femur, kapsül ve yumuşak dokular daha çok deforme olur. Çoğu değişiklik başlangıçta geri dönüşlü (reversible) iken, zamanla geri dönüşümsüz (irreversible) bir hal alır. GKD’li kalçanın patolojik anatomik değişiklikleri; dislokasyonun tip ve derecesine göre 3 başlıkta incelenebilir:

İnstabil kalçada (sublukse olabilen, ancak disloke olmayan kalça), eklem kapsülü gevşek ve uzamıştır. Labrum hipertrofik ve hafif evertedir. Asetabulum’un posterosuperior kenarı, sivrilğini kaybetmiş, yassılaşmış ve kalınlaşmıştır. Femur başının şekli normaldir.

Disloke olabilen kalçada, kapsül belirgin şekilde uzamıştır ve oldukça gevşektir. Belirgin olarak evert olan labrum ile asetabulumun fibrokartilaj-hyalin bileşkesinde, hipertrofik değişiklikler (*neolimbus*) olabilir. Ortolani belirtisindeki, femur başının asetabulumuna girerken oluşturduğu “klunk sesi”, neolimbus tarafından meydana getirilmektedir (19).

Disloke olarak kalan kalçalarda, Femur başının sferikliğinin kaybolduğu gözlenir. Başlangıçta evert olan labrum zamanla femur başından kurtularak *invert* olur ve hipertrofik değişikliğe uğrar. Asetabulum’un derinliklerinde, *pulvinar* olarak bilinen yağ dokusunun kalınlaşması ve kapsülün bir kum saati şeklini alarak, femur başından daha küçük çaplı bir darlık oluşturması, redüksiyonu engellemektedir (22).

2.5. Gelişimsel Kalça Displazisi Sınıflaması (Tachdjian Sınıflaması)

Gelişimsel Kalça Displazisi, **Tachdjian’ın sınıflamasında**, kalça eklemine redükte olup olmamasına göre iki grupta toplanmaktadır.

Teratolojik tip: İntrauterin dönemde tek bir anomali olarak gelişebileceği gibi, sıklıkla myelodisplazi ve artrogripozis gibi nöromusküler bozukluklar ile birliktelik gösterir. Asetabulum, küçük, sık ve fibroadipoz bir doku ile doludur. Bu kalçalar doğum öncesi çıkıktır, hareket açıklığı sınırlıdır ve muayene sırasında Ortolani manevrası ile redükte edilemez (23).

Tipik GKD: Asetabulum genellikle normal derinliktedir. Yeni doğanda muayene eden tarafından, femur başının asetabulumdan parsiyel (sublukse) ya da tam (disloke) deplase edilebildiği ya da disloke pozisyonda duran kalçanın hekim tarafından redükte edilebildiği instabiliteyi tanımlar (23).

2.6. İnsidans

Gelişimsel kalça displazisinin insidansını saptamak, hastaların muayene edildiği yaş, kullanılan tanı yöntemlerindeki farklılıklar, araştırmacılar arasındaki deneyim farklılıkları ve çalışılan populasyonlar gibi nedenlerle oldukça zordur. Yeni doğanda çeşitli derecelerdeki kalça instabilitelerinin insidansının % 0,1- 3,4 arasında değiştiği, klinik inceleme ve ultrasonografi birlikte kullanıldığında ise bu oranın daha yüksek bulunduğu bildirilmektedir (24).

İnsidansta, yeni doğanın muayene edildiği yaşın, değişkenliğe neden olan önemli bir unsur olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır. Barlow'un 9289 infant ile yaptığı araştırmada her 60 infanttın bir tanesinin kalça eklem insitabilitesi ile doğduğu ve birinci haftanın sonunda instabil olguların % 60'ının stabil hale geldiği, ikinci aydan sonra geri kalan %40'ın, % 88'inin de stabilize olduğu, % 12'lik grupta ise insitabilitenin devam edip durumun gelişimsel kalça displazisine yol açtığından bahsedilmiştir. Bu da yaklaşık 1,55/1000 canlı doğum oranına karşılık gelmektedir (25).

GKD tanısında kalça ultrasonografisinin, duyarlılığının, klinik muayeneye göre daha etkin olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Kutlu ve ark. (1992) tarafından yapılan, klinik ve radyolojik inceleme temelli bir çalışmada yaşları 3-24 ay arasında değişen, ortopedik olmayan şikayetlerle hastaneye başvuran, 4231 bebeğin muayenesinde, pozitif muayene bulgusu taşıyan 403 bebeğe radyolojik inceleme yapılmış ve 56 bebekte patoloji saptayarak GKD sıklığını %1,34 olarak bildirmişlerdir (26). Peled ve ark. (2008); 45,497 yeni doğanı klinik muayene ve kalça ultrasonografisi ile incelemiş ve ortalama kalça çıkığı insidansını % 4,53 olarak

belirlemişlerdir (27). Ülkemizde Doğruel ve ark.'nın (2008), 3541 bebeğin klinik muayene ve kalça ultrasonografisi takibini içeren benzer bir çalışmada ise GKD sıklığı % 4,71 olarak saptamıştır (28).

İnsidansı etkileyen diğer önemli bir parametre olan cinsiyet faktörünü ele alan ilk çalışma Carter ve Wilkinson tarafından yapılmıştır. Bu araştırma sonucunda, GKD'nin görülme sıklığının, her 1000 canlı doğumda bir olduğu ve bu patolojinin kız çocuklarında 1/4000 oranında, erkek çocuklarında ise 1/6000 oranında ortaya çıktığı bildirilmiştir (29). Ülkemizde de, erkek çocuklarına oranla kız çocuklarında GKD görülme olasılığının 4-6 kat daha fazla olduğunu bildiren veriler mevcuttur (30, 31).

Gelişimsel kalça displazisinin görülme sıklığını etkileyen bir diğer faktörün de coğrafik, bölgesel ve ırksal dağılımlar olduğu ileri sürülmektedir.

GKD görülme oranı; İsveç'te 1,7/1000 bebek ve Yugoslavya'da 75/1000 bebek iken Kanada- Manitoba'da bu oran 188,5/1000 olarak bildirilmiştir (32, 33, 34)

Afrika Bantu kabilesinde incelenen 16000 bebeğin hiç birinde GKD saptanmazken, Navajo Hintlileri'nde her 50 bebekten birinde GKD görülmesi ırksal farklılığı gösteren, oldukça eski örneklerdir (35, 36). Ancak sonrasında bu durumu inceleyen başka bir araştırma da bulunmamaktadır.

2.7. Etiyoloji

Gelişimsel kalça displazisinin etiolojisinin multifaktöriyel olduğu en yaygın kabul gören görüş olup, tek başına bir etken bilinmese de pek çok predispozan faktör tanımlanmıştır. Bu faktörler 1) ligamentöz laksisite, 2) prenatal pozisyon, 3) postnatal pozisyon ve 4) ırksal/genetik yatkınlığı içerir (37).

2.7.1. Ligamentöz laksisite

Kalça eklemının kapsül ve ligamentlerinin gevşeklik ve yetersizliği tipik GKD etyopatogenezindeki önemli faktörlerden birisidir. Kapsüller ve ligamentöz gevşeklik herediter, hormonal veya mekanik kaynaklı olabilmektedir (38, 39).

Özellikle hormonal kaynaklı kapsüller ve ligamentöz gevşeklikte; maternal östrojen, relaksin ve diğer hormonların, anne pelvisinin doğuma hazırlanması için pelvik relaksasyona ve dolayısıyla plasentadan geçerek bebekte bağ gevşekliğine sebep oldukları ve bu etkinin kızlarda erkeklere göre daha kuvvetli olduğu ileri sürülmektedir (40, 41). Thieme ve ark.'nın (1968) bu gözlemden yola çıkarak yaptığı bir başka çalışmada ise, hayatın ilk 6 gününde toplanılan 24 saatlik idrar örneklerindeki östrojen miktarını, GKD'li 16 hastanın idrar örneklerindeki östrojen miktarı ile karşılaştırdıklarında, aralarında önemli bir fark bulunmadığını göstermişlerdir (42). Bu çalışma gelişimsel kalça displazili yeni doğanlarda, doğumsal östrojen metabolizmasında bir bozukluk olduğu hipotezini desteklememektedir. Hormonal etki teorisine göre ne aşırı eklem gevşekliğinin gerçek sebebi ne de kız çocuklarında fazla görülmesinin nedeni tam olarak açıklanamamıştır.

Ayrıca GKD'si olan yenidoğanlarda, kollajen tip 3'ün kollajen tip 1'e oranının, kontrollere oranla daha yüksek olduğunun bulunması, GKD'li bebeklerde bir konnektif doku anormalliğinin de olabileceğini düşündürmektedir (43).

2.7.2 Prenatal pozisyon

Fetüs'ün intrauterin pozisyonu, GKD ile kuvvetli bir şekilde ilişkilendirilmektedir. Normal popülasyonda makat gelişimi oranı sadece %2-3 iken, Muller ve Seddon, GKD'li bebeklerin %16'sının makat gelişimi ile doğduğunu tespit etmişlerdir. Buna bağlı patolojiyi de intrauterin sıkışıklığa ve kalçanın fleksiyon postüründe sabit kalmasına bağlamışlardır (44). Yine ilk gebeliklerde ve oligohidroamnios olduğunda, intrauterin sıkışıklık nedeni ile GKD görülme oranının arttığını bildiren yayınlar bulunmaktadır (29). Sol kalça'da sağdan daha fazla GKD görülmesinin nedeni olarak; en yaygın kabul edilen görüş, intrauterin pozisyonda sol kalçanın adduksiyonda ve ane sakrumuna dayanır pozisyonda bulunması olarak açıklanmaktadır (45).

2.7.3 Postnatal pozisyon

Ülkemizde bazı bölgelerde halen devam eden geleneksel kundak uygulaması, yenidoğanın normal kalça fleksiyon hareketine karşı, kalçaların tamamen ekstansiyonda tutulmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu pozisyonun GKD oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir. Kundak uygulamasının aksine, bebeklerini, gövdelerinin yan tarafında, bacakların biri önde diğeri arkada olacak

şekilde; “ata biner pozisyonda” taşıdıkları için, Afrikalılarda GKD görülme oranı düşük bulunması, bu teoriyi desteklemektedir (29).

2.7.4 Genetik Yatkınlık

GKD gelişiminde genetik etkilerin olduğu; aile hikayesi, kardeş ve ikizlerdeki çalışmalarla gösterilmiştir.

Konu ile ilgili çalışmalar çok eski yıllardan itibaren başlayıp günümüze kadar devam etmektedir. Wynne-Davies 1970’li yıllarda kalıtsal ligamentöz laksitenin, GKD kalıtımı ile ilgili iki majör mekanizmadan biri olduğunu iddia etmiştir. Asetabuler displazi ve ailesel eklem laksitesi olan erken (neonatal) ve geç tanınmış 589 gelişimsel kalça displazisi vakasında, ailede görülme sıklığı araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

1. Normal ebeveyn ve bir çocukta GKD varsa sonraki çocukta GKD görülme sıklığı % 6, 2’dir.
2. Anne ve babadan birinde GKD varsa çocukta GKD görülme sıklığı % 12,3’tür.
3. Anne veya babadan birinde ve bir çocukta GKD varsa daha sonraki çocukta GKD görülme sıklığı ise % 36’dır.

Wynne-Davies bu sonuçlar ışığında hastalığın inkomplet geçişli, otozomal dominant bir karakteri olduğunu ileri sürmüştür (46). Coleman’ın Navajo aileleri ile yaptığı çalışmasında da bir aile bireyinde kalça displazisi olmasının, diğer aile bireyleri için riski beş kat arttırdığı gösterilmiştir (47).

40 yıl öncesinden günümüze değin yapılan, bu ve buna benzer çalışmalar GKD'nin etiolojisinde genetik kalıtımın oldukça önemli bir yere sahip olduğunun kanıtları olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda GKD ile ilgili yapılan çalışmalar ve kullanılan moleküler yöntemler ise “Gen Haritalaması ve GKD için Genetik Kanıtlar” (sf. 19) bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3. GEN HARİTALAMASI ve GELİŞİMSEL KALÇA DİSPLAZİSİ İÇİN GENETİK KANITLAR

Genetik hastalıkların nesiller boyu kalıtımında; etkin olan genlerin tespit edilmesi, işlevlerinin ortaya konulması ve bu hastalıklara yönelik gen tedavisinin gerçekleştirilebilmesinde gen haritalaması önemli bir yere sahiptir.

Günümüzde, insan genlerinin haritalanması, tıbbi genetik çalışmalarının en hızlı gelişen ve oldukça önem kazanmış alanlarından biridir. Tam bir insan geni haritasına sahip olmak, 24 kromozom üzerindeki tüm genlerin kromozomlar üzerindeki lokalizasyonunun, birinin diğerine göre pozisyonunun ve aralarındaki uzaklığın bilinmesidir (48).

İnsan kromozomlarının gen haritalarının oluşturulmasında üç farklı yaklaşım kullanılmaktadır: **Sitogenetik haritalama**, **fiziksel haritalama** ve **genetik haritalama**.

3.1. Sitogenetik Haritalama

Sitogenetik bantlama tekniklerinin geliştirilmesi ile subkromozomal bölgelerin ayırt edilebilmesi sitogenetik haritalama kavramını ortaya çıkarmıştır. Bu tür haritalar düşük rezolüsyonlu (yaklaşık 6Mb) olmakla birlikte, genlerin ve diğer DNA dizilerinin haritalanmasında kullanılan kromozom *in situ* hibridizasyon yöntemi için zemin hazırlamıştır. Böylece işaretlenmiş DNA (ya da RNA) problemlerinin direkt olarak metafaz kromozomlarında gösterilmesi mümkün olmuştur. Günümüzde *in situ* hibridizasyon teknikleri floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) olarak geliştirilmiştir. Yöntem, belirli bir DNA bölgesini kullanarak tüm kromozomlar içinde eşdeğer bölgeyi bulmak esasına dayanır.

Daha yüksek rezolüsyonlu haritalama ise interfaz kromatin lifleri kullanılarak, DNA fragmentlerinin FISH haritalaması ile (fiber-FISH) gerçekleştirilmiştir. Birkaç yüz kb uzaklıkta olan belirleyiciler, farklı renkteki boyalarla işaretlendiklerinde, birbirlerine göre sıralarını belirlemek de mümkün olmaktadır (49).

Ayrıca fenotipin, gözlemlenebilir kromozomal yeniden düzenlenmeleri ya da kromozomal eksikliklerle ilişkilendirilmesiyle de sitogenetik haritalar oluşturulabilmiştir. Bunun yanında, translokasyonlar ve kromozomal delesyonlardan türemiş parçaları içeren somatik hücre hibridleri ile doğal kromozom kırık noktaları, ya da radyasyon hibridleri kullanılarak yapay kırık noktaları haritalanabilir. Aynı zamanda düşük resolusyonlu fiziksel haritalar olarak da adlandırılan bu sitogenetik haritalarda çözünürlük, genellikle birkaç megabaz uzunluğundadır (50).

3.2. Fiziksel Haritalama

Genler arasındaki fiziksel uzaklığa dayalı birimler kullanılarak genlerin bir kromozom boyunca belirli lokalizasyonlara yerleştirilmesidir. Yöntem genlerin kromozomlar üzerindeki yerlerini ve genler arasındaki uzaklıkları, DNA uzunluğu gibi gerçek fiziksel ölçümlerle belirler. Bunları gerçekleştirmek için her birinin farklı ölçüm birimleri olan farklı metotlar kullanılabilir. Bu yöntemler sonuçta tüm kromozomdan, tek bir baz çiftine kadar değişen düzeylerde çözünürlük sağlamaktadır.

Rekombinant gen teknolojisindeki, genomik DNA parçalarının klonlanması ve karakterizasyonu ile ilgili son gelişmeler sayesinde, detaylı bir gen

haritası elde etmek mümkün hale gelmiştir. Böylece genlerin yapısı hakkında bilgi edinmenin dışında, gen ve genomların evrimi hakkında da son derece değerli bir kaynak olan bir genomun tüm DNA dizisinin elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Günümüzde, pek çok model organizmanın (örneğin; bakteri, *S.cerevisiae*, *C.elegans*, *D.melanogaster*, *F.rubripes*, *D.rerio*, insan) genetik ve fiziksel haritalarını çıkararak tüm genom dizilerinin saptanmasını amaçlayan uluslararası bir işbirliği sürmektedir ve söz konusu model organizmaların bazılarının tüm genom dizi analizi tamamlanmış bulunmaktadır. Genomların haritalanması, analizi ve dizi analizi ile ilgili disipline “Genomiks” adı verilmiştir.

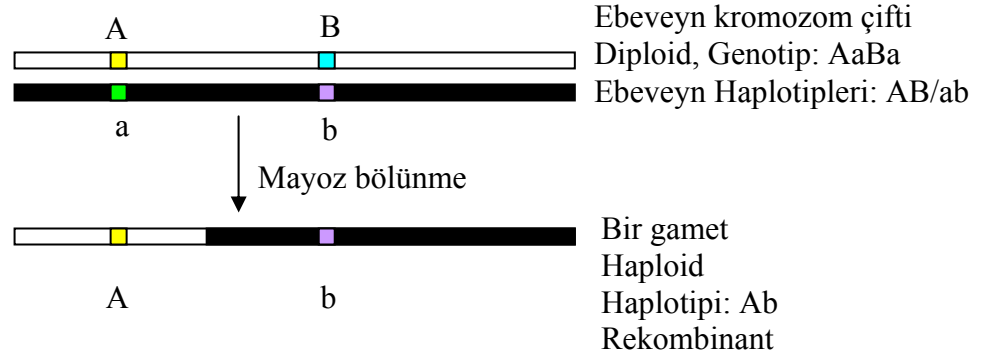
3.3. Genetik Haritalama

Genetik haritalama için genler arasındaki uzaklığı saptamak amacıyla, bağlantı analizi adı verilen bir metot kullanılmaktadır. Bağlantı analizi, mayoz bölünme yolu ile bir nesilden diğerine geçerken hangi iki genin birlikte kalıtıldığının sıklığını ölçmeye dayanır. Metot, lokalizasyonu aranan gen ile, lokalizasyonu bilinen bir genetik belirleyicinin (markır) kuşaklar arasında birlikte kalıtılmasının test edilmesi esasına dayanır. Bağlantı analizi gen ve DNA markırı arasında yapılabileceği gibi, iki DNA markırı arasında da yapılabilir. İnsan genom projesi kapsamında bu yöntem ile genomda bulunan ve polimorfik özellik gösteren DNA markırlarının birbirlerine göre lokalizasyonları ve kromozomlar üzerindeki dizilişleri üç kuşaklı geniş aileler kullanılarak haritalanmıştır. Bu haritalar, insan genom projesine katılan birkaç farklı laboratuvar tarafından ayrı ayrı oluşturulmuştur. Bu haritaların birbirleri ile karşılaştırmalı olarak hazırlanan

en detaylı olanı Marshfield Genome Merkezi tarafından hazırlanan haritadır (51) (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp>).

İnsan genom Projesinin tamamlanması ile genetik haritaların yerini, DNA markırlarının ve genlerin fiziksel pozisyonlarını gösteren haritalar almıştır (Örn; www.ensembl.org). Her iki harita da günümüzde insan genlerinin kromozom lokalizasyonlarını saptamada etkin olarak kullanılmaktadır.

Bilindiği gibi kromozomlar mayozda karşı karşıya gelerek parça değişimine uğrarlar (“crossing-over”). Bu parça değişimleri sırasında birbirine yakın genler sıklıkla bir arada kalıtılırlar. Uzak yerleşimli genler ise bağımsız tertiplenme kuralına göre rasgele olarak, birlikte kalıtılır ya da ayrılırlar. Böylelikle yavru kuşaklarda ebeveynlerde olmayan, yeni yapılanmalar ortaya çıkar. Bu olaya “rekombinasyon” olayı, ortaya çıkan ürünlere de “rekombinant” ürünler denir (Şekil 5). Rekombinasyon kavramı genetik haritalamanın önemli bir parametresidir. Temel hipotez “eğer aradığım gen kromozom lokalizasyonunu bildiğim markıra çok yakınsa mayozda birbirlerinden ayıramayacak ve kuşaklar arasında daima markır allel ile birlikte kalıtılacaktır” şeklinde özetlenebilir. Başka bir deyişle yavru kuşaklarda rekombinant bireylerin fazla sayıda bulunması aradığımız genden uzaklaştığımız anlamına gelecektir. Bu yolla markır allelin yeri bilindiğine göre (örneğin 13q21 bandı) ilgilendiğimiz genin ya da hastalığın yeri de bulunmuş olacaktır (52).



Şekil 5. Rekombinant birey oluşum mekanizması

Rekombinasyon birimi centimorgan (cM) ile ifade edilir. 1cM her 100 kişide 1 ($1/100=0.01$) rekombinant birey olduğunun göstergesidir ve θ (theta) işareti ile gösterilir. Genetik uzaklıklar fiziksel anlamda ölçülebilir uzaklıklar değildir. Teorik olarak iki lokus arasında 1cM'lik bir uzaklıktan söz edildiği zaman, yaklaşık 1 milyon baz çiftinden söz ediliyor demektir. Sık rekombinasyon yapan bölgelerde (rekombinasyon hot spot'ları) 2-3 cM'lik bölgeler fiziksel anlamda bazen beklendiğinden çok daha kısa olabilirler.

Genetik haritalama metodu ile bir hastalığın kromozom lokalizasyonunu saptayabilmek için önemli olan aşamalar aşağıda sıralanmış ve tez konusu olan GKD malformasyonu ile ilgili bilgiler üzerinden detaylandırılmıştır.

- 1-) Haritalanacak fenotipin özellikleri çok iyi tanımlanmalıdır.
- 2-) Genetik epidemiyoloji çalışmaları incelenmeli ve tek gen kalıtımı ile uygunluğu araştırılmalıdır.

3-) Örnekleme stratejisini yakından ilgilendirdiği için, haritalamada kullanılacak istatistik analiz biçimine, çalışmanın başında karar verilmelidir.

4-) Haritalamada kullanılacak DNA markırları ve bunlara ait harita bilgileri belirlenmelidir.

5-) Seçilecek DNA markır tipine göre genotipleme çalışması yapılmalıdır.

6-) Uygun istatistik analiz uygulanmalı ve haplotip analizi yapılmalıdır.

3.3.1. Haritalanacak fenotipin özelliklerinin tanımlanmasının önemi

Fenotip; bir varlığın, genler ve çevre etkileşimleri sonucu oluşmuş, gözlemlenebilen ya da ölçülebilen özelliklerinin tümüdür. Haritalamada ilk basamak fenotipin doğru tanımlanması, buna bağlı olarak ailenin diğer bireylerinden hasta ve sağlıklıların saptanmasıdır. Moleküler ve istatistik çalışmaların, doğru sonuca götürmeleri ancak fenotipe doğru olarak tanı konmasıyla gerçekleşebilmektedir. Çünkü yapılan istatistiksel analizlerde, bir ailede akrabalık dışı evlenme yolu ile aileye katılan normal eşlerin, hastalık genini ifade etmeksizin taşımaları olasılığı ile ebeveynlerinden biri hasta olan fenotipik olarak normal eşlerin hastalık geni için taşıyıcı olma olasılıkları farklılık gösterecektir. Cinsiyet ayırımı yapan hastalıklarda kadın ve erkeklerin gen taşıyıcısı olma riskleri yine farklı olacaktır. Normal bireylerdeki risk tahminleri yapılırken, fenotip hastalık için penetrans eksikliği dikkate alınmalıdır.

Bu çalışmada fenotipik modelleme, Ortopedi bölümlerince tanıları konmuş GKD'li probandlar ve probandların öyküleri doğrultusunda çıkartılan pedigrilerdeki, diğer hasta bireyler esas alınarak belirlenmiştir.

3.3.2. Gen haritalaması yapmak istenilen hastalıkla ilgili genetik epidemiyolojik araştırmalar

Genetik epidemiyoloji, bir niteliğe neden olan genetik ve çevresel faktörlerin katkı paylarını inceleyen bilim dalıdır. Toplum taramaları, prevelans, insidans, aile çalışmaları, ikiz ve evlat edinilenlerle ilgili çalışmalar bu disiplinin en önemli ilgi alanlarıdır. GKD etiyojisinde genetik yatkınlık olduğunu düşündüren en önemli bulgular ikiz çalışmaları ile gündeme gelmiştir. Bu konuda yapılan ilk çalışma Wynne-Davies'in 1970 yılında 589 kalça çıkıklı hasta ve aile bireylerinde yaptığı çalışmadır. Burada, kalıtsal ligamentöz laksisitenin, gelişimsel kalça displazisinin gelişiminde major faktörlerden birisi olduğu belirtilmiştir. Wynne-Davies'in bu hastalığın inkomplet geçişli, otozomal dominant bir karakteri olduğuna inanmasının nedeni ise, GKD riskinin tek yumurta ikizlerinde %34 olmasına rağmen, çift yumurta ikizlerinde bu oranın yalnızca %3 olmasıdır (46).

İkiz çalışmalarının yanı sıra bir hastalıkta genetik yatkınlığın saptanmasına yönelik en önemli veriler, **aile analizi** çalışmalarından elde edilmektedir. Bu çalışmalarda, sadece hastalığın genetik bir yatkınlığının olup olmadığı test edilmez, aynı zamanda hastalığa özgü kalıtım kalıpları da saptanabilir. Bir

hastalığın kalıtım kalıbının tanımlanabilmesi, daha sonra bu hastalıktan sorumlu genin bulunabilmesi için önemli bir adımdır (53). Aile çalışmaları hastalığın fenotipik olarak ifade bulması açısından da araştırmacıya yardımcı olur. Başlama yaşı, başka fenotipik bulguların olması, kuşaklar arasında hastalığın başlama yaşının daha erken olması ve hastalığın şiddetinin artması ile karakterize “antisipasyon” durumu, hastalığın bazı bireylerde ifade bulmadan bir sonraki kuşağa kalıtılabilirliği (penetrans eksikliği) gibi kavramlar aile ağacı metodu kullanıldığında izlenebilmektedir.

Coleman’ın Navajo aileleri ile yaptığı çalışmada, bir aile bireyinde kalça displazisi olmasının, diğer aile bireyleri için riski beş kat arttırdığından bahsedilmektedir (47). Carter ve Wilkinson’ın çalışmasında GKD’den sorumlu iki genetik kalıtım modeli olduğu varsayılmıştır. Bunlardan birincisinin multifaktöriyel kalıtım, ikincisinin otozomal dominant kalıtım olduğu belirtilmiştir (2). Bu varsayımla uyumlu olarak Wynne-Davies de, GKD’li 589 hasta ve aileleri üzerinde yaptığı çalışma sonucu; iki etiyolojik grup bildirmiştir. Birinci grupta asetabular displazi vardır ve kalıtımının multifaktöriyel olabileceği düşünülmüştür. Geç tanı konan olguların büyük bir kısmından displazi sorumlu tutulurken, yenidoğan döneminde saptanan olgularının büyük bir kısmından ise eklem gevşekliğinin sorumlu olduğunu ileri sürmüştür. Bu hastalarda otozomal dominant kalıtım gösteren bir genetik yatkınlık olmasına karşın, bilinmeyen dış etkenlerin de rolü olduğu düşünülmüştür (54).

Gelişimsel kalça displazisinin otozomal dominant kalıtıldığını ise ilk kez Boernfors ve ark Alman çoban köpeklerinde yaptıkları kalça displazisi incelemelerinde ortaya koymuşlardır (55). Horton ve ark.'da altı kuşaklı 16 erkek ve 16 kadının etkilendiği bir aileyi incelemişler ve erkekten erkeğe geçiş olduğunu gözlemlemişlerdir. Etkilenen 27 aile ferdindeki kalça çıkığını, eklem gevşekliği ile ilişkilendirmişler ve pedigrî analizine göre otozomal dominant kalıtım gösterdiğini düşünmüşlerdir (56). Beighton ve ark. (1984) ise, Güney Afrika'da 45 kişiden oluşan 5 kuşaklı bir aile ve yine Güney Afrika'da 6 kuşaklı 47 kişilik bir başka ailenin pedigrî analizlerinde hastalığın otozomal dominant kalıtım ile uyumlu bulunduğunu bildirmişlerdir (57).

Ülkemizde, hamile bir kadının pedigrî analizi sırasında 16 aile ferdinde GKD öyküsü olduğu saptanmış ve pedigrî analizinin yüksek penetranslı otozomal dominant kalıtımı gösterdiği saptanmıştır. GKD'li olgu sayısının yüksek olduğu bu ailede hastalığın sadece bir kuşak atladığına da dikkat çekilmiştir (58).

Sonuç olarak, bu ve buna benzer geniş aile çalışmalarında GKD etiyojisinde, tek gen kalıtımı ve eksik penetranslı otozomal dominant kalıtım kalıbı varsayımı ön plana çıkmaktadır. Hastalığın ifade bulmasında ise genetik yatkınlıkla birlikte çevre faktörlerinin etkisinin kaçınılmaz olduğu ön görülmektedir.

3.3.3. Haritalamada kullanılacak metoda karar verilmesi

Gen haritalama disiplininde başlıca iki yaklaşım vardır.

a) Parametrik metodlar: Temel olarak Bağlantı (Linkage) analizleri olarak bilinir. Bağlantı analizi lokalizasyonu bulunmak istenilen bir genin, herhangi bir kromozomda bulunması olasılığının, o kromozomda bulunmaması olasılığına oranının logaritması alınarak hesaplanır (Logarithm of Odds ratio, LOD Score). Bağlantı analizinin başarılı olabilmesi için aşağıda belirtilen parametrelerin saptanmasına ihtiyaç vardır.

1- Kalıtım kalıbı kesin olarak bilinmelidir,

2- Markır aleli ile hastalık alelinin, birarada kalıtılıp kalıtılmadığının yeterince gözlenebileceği üç kuşaklı geniş aileler tercih edilmelidir,

3- Örnek toplama yaklaşımı, kalıtım kalıbına göre olmalıdır.

Bağlantı analizi kalıtım kalıbı varsayımından doğrudan etkilenir. Sonuçta hesaplanan olasılık örneğin analiz sırasında ilgili hastalığın hangi kromozomda bulunduğu otozomal dominant kalıtım kalıbı varsayımı altında sorguladığında kalıtım kalıbının hatalı olarak tahmin edilmiş olması, sonucun da hatalı olmasına neden olacaktır. Bu nedenle kalıtım kalıbının tam olarak belirlenemediği durumlarda, istatistik analizler, aynı aile için ya farklı kalıtım kalıbı modelleri varsayılarak tekrarlanır, ya da parametrik olmayan (non-parametrik) deney yöntemleri kurgulanır.

b) Non-parametrik metodlar: Bu tip analizler için kalıtım kalıbının bilinmesine ve geniş ailelere ihtiyaç yoktur. Genel olarak ilişkilendirme (assosiasyon) analizleri olarak bilinirler. Assosiyasyon çalışmaları için farklı

istatistikî analizler önerilmişse de bunların hemen hepsinde kuşaklar arası segregasyonun test edilmesinden çok, vaka ve kontroller arasında anlamlı fark olup olmadığı test edilmektedir.

Bu metodların bağlantı analizine göre;

Avantajları:

- 1- Kalıtım kalıbının bilinmesine gerek yoktur,
- 2- Vakaların ve kontrollerin toplanması gereklidir.

Dezavantajları:

- 1- Örnek sayısı çok fazla olmalıdır,
- 2- Markır sayısı çok fazla olmalıdır
- 2- Kontrol grubu dikkatli seçilmelidir,
- 3-Sadece bu metoda dayalı gen aranması, maliyeti yüksek çalışmalardır.

GKD hastalığı ile ilgili genetik kanıtlar, eksik penetranslı otozomal dominant bir genin varlığına işaret etmektedir. İlgili tez konusunda da bu kalıtım modelini destekleyen ve üç kuşaktan analizlere yetecek sayıda bireyin örneklendiği iki büyük aileye ait analiz yapılmıştır. Güvenilirlik açısından aile çalışmalarının gücü daha yüksek olduğundan ilgili tez konusunda parametrik analizlerin uygulanmasına karar verilmiştir. Böylece genotipleme çalışması tamamlandıktan sonraki istatistikî analiz aşamasında, farklı tek gen kalıtım modelleri varsayılarak bağlantı analizi yapmak da analizlerin doğruluğunu arttıran bir parametre olmuştur.

3.3.4. Haritalamada kullanılacak genetik belirleyicilerin (markır) seçilmesi ve gen haritalarının etkin olarak kullanılması

Gen haritalama metodunda, kromozom lokalizasyonu hakkında hiçbir ön bilgiye sahip olmadığımız bir hastalığın lokalizasyonunun tahmin edilmesi hedeflenmektedir. Bu tahmin için her şeyden önce, hangi kromozomda lokalize olduğunu kesin olarak bildiğimiz genetik belirleyiciler kullanmaya ihtiyacımız vardır. Bu genetik belirleyiciler doğrudan genlerin içinde olduğu gibi, genlerle hiç ilgisi olmayan DNA parçaları üzerinde de olabilir. Ancak her iki durumda da ortak nokta belirleyicilerin polimorfik nitelik taşımalarıdır. Gen haritalamasında bu “polimorfik markırlar” kullanılmaktadır. Genetik yapıdaki değişiklikler en genel anlamı ile mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Mutasyonlar toplumda görülme frekansları nadir olan (allel frekansı $<0,0001$) ve genetik hastalıklardan sorumlu olan değişikliklerdir. Polimorfizm kavramı da yine mutasyon gibi genetik materyaldeki bir değişikliği gösterir ancak çoğu zaman mutasyonda olduğu gibi fenotipik bir değişiklikle sonlanmaz. Polimorfik değişikliklerde, nadir allel frekansı 0,01 dolayındadır ve toplumda yaygın olarak gördüğümüz değişikliklerdir. Örneğin, genomda hastalıklardan sorumlu olmayan ancak kişiden kişiye farklılık gösteren kısa DNA tekrarlarından oluşan bölgeler vardır. Bunlar STRP (Short Tandem Repeat Polymorphism: kısa dizi tekrar polimorfizmi) olarak adlandırılırlar. Bunlar ikili, üçlü ya da dörtlü nükleotid tekrarlarıdır ve içerdikleri kopya sayılarına göre çoğaltıldıklarında, farklı büyüklükte DNA örnekleri oluştururlar ve elektroforezde yürütüldükleri zaman farklı büyüklükte bantların görülmesine neden olurlar. Bu özellikten yararlanılarak bir kişiye ait DNA örneği,

genomdaki bu bölgelere özgü primerler kullanılarak “Polimeraz zincir reaksiyonu” (PZR, polymerase chain reaction) yolu ile çoğaltılır ve elektroforezde yürütülecek olursa, o kişiye ait polimorfik markırlardan oluşan bir DNA profili ortaya çıkar. Birkaç kuşaklı aile bireylerinde böyle bir amplifikasyon yapılırsa kromozomların kuşaklar arasındaki dağılımı, bu polimorfik markırlar aracılığı ile saptanabilir. Böylelikle aile bireylerini birkaç kuşak izleyerek, mayoz sırasında kromozomlarda oluşan parça değişimleri ve oluşan rekombinant ürünler belirlenebilir.

Bu polimorfik bölgeler, insan genom projesi kapsamında klonlanmış ve kromozom lokalizasyonları belirlenmiştir (www.hapmap.org). Bu bilgilerle oluşturulan haritalar kullanılarak, hangi genetik belirliyecilerin, gen haritalama çalışmasında kullanılacağına karar verilir. Markır haritalarındaki bilgileri kullanarak yapılacak bir gen haritalaması için başlıca 2 yol seçilebilir:

a- Aday lokalizasyon yaklaşımı: Bu yaklaşımda ilgili hastalıktan ya da malformasyondan sorumlu olduğu düşünülen aday bölgeler saptanmaya çalışılır. Daha önce hastalıkla bağlantılı olduğu gösterilen kromozom bölgeleri, fonksiyon açısından hastalığın oluşumunda rol alabileceği düşünülen gen bölgeleri, kromozom anomalileri ile birlikte hastalık fenotipinin gözleendiği bölgeler, farklı türlerde (örneğin farelerde) benzer fenotipin gözlenmesi ve fare-insan homoloji haritalarının kullanımı ile insanda ilgili geni barındıran bölgeler aday gen yaklaşımı altında seçilen bölgeleri oluşturur. Daha sonra bu aday gen bölgelerine isabet eden DNA markırları belirlenir. Bu amaçla genetik haritalar kullanılır

(<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp>).

Harita bilgilerinden bu markırların birbirlerine göre kromozom üzerindeki sıralanışları, pozisyonları ve aralarındaki uzaklıklar elde edilerek aday olarak seçilen bölgeyi tam olarak tarayacak bir markır haritası hazırlanır. Daha sonra bu polimorfik DNA bölgelerine özgü PCR analizleri ve genotipleme yapılarak hastalık ile markır alel arasında bağlantı analizi uygulanır. Aday bölgelerin taranması bittiğinde herhangi bir lokalizasyon saptanamazsa tüm genomun taranmasına geçilir.

b- Genom-boyu analiz: Tüm genomu belli aralıklarla tarayan hazır polimorfik markır setleri kullanarak sadece aday bölgeyi değil genomun tamamını araştırma işlemidir. Bu amaçla genomu 5-10cM aralıklarla tarayan ve kısa tekrar dizlerine yönelik markır panelleri mevcut olduğu gibi son yıllarda geliştirilen DNA çip teknolojisi ile genomu çok sık aralıklarla tarama kapasitesine sahip tek nükleotid polimorfizm (SNP) markır panelleri de mevcuttur (52).

GKD konusunda yapılmış sınırlı sayıdaki araştırmada bazı lokalizasyonlar tanımlanmıştır. Roby ve arkadaşları tarafından (1999), dejeneratif osteoartropati hastalığının kromozom 4q35'te 11-cM'lik bölge ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (3). Mabuchi ve ark. (2006) "Asetabular Displazi" zemininde familial osteoartrit gelişmiş 4 kuşaklı bir Japon ailesinde, hastalığı kromozom 13q22 lokalizasyonundaki 6-cM'lik bölge ile ilişkilendirmişlerdir (4) ve yine Mabuchi ve ark. tüm genom taraması yaptıkları aynı çalışmada, 6. kromozomda 6q16 bölgesinde LOD skoru 2,26 saptamışlardır. Tüm bu verilere dayanarak bizim

araştırmamızda öncelikle aday lokalizasyon çalışması yapılması ve bu üç çalışmada hastalıkla ilişkili bulunan 4., 6. ve 13. kromozomlardaki lokuslara bağlantının test edilmesi planlanmıştır.

3.3.5. İstatistiksel değerlendirmeler

Bağlantı analizi için; LOD Skor (Logarithm of Odds Ratio) analizi uygulanır. LOD Skor; aranılan genin, test edilen kromozom lokusunda olması olasılığının, ilgili lokusta bulunmaması olasılığına oranının logaritmik olarak ifade biçimidir. Analiz sonucunda LOD Skor'un 3 ve üstü olduğu değerler bağlantıyı desteklemesi açısından anlamlı kabul edilirken, 2 ve giderek negatifleşen değerler ise kesin olarak bağlantı yokluğunu destekler. Aradaki değerlerde lokusun ispatlanabilmesi için bir dizi farklı işlem yapılması gerekebilir (aile ve örnek sayılarının arttırılması, genomun diğer bölgelerinin araştırılması vs.). Burada önemle belirtilmesi gereken nokta; sonuçta bu analiz ile bulunan, bir olasılık değeridir ve saptanan lokus gerçek lokus olmayabilir. Hastalıktan sorumlu gen ve gen içi mutasyon gösterilinceye kadar lokus bilgisi yanıltıcı olabilir (59).

LOD Skor analizleri için yaygın olarak kullanılan program J. Ott tarafından geliştirilmiş olan LINKAGE paket programıdır. Bu program amaca göre kullanılacak 4 alt programdan oluşur (MLINK, ILINK, LODSCORE ve LINKMAP programları). İki lokusun birbirine göre test edilmesi (örneğin, hastalık lokusunun markır allel'e bağlantısı) için MLINK alt programı kullanılmakta iken, polimorfik nitelikteki markırların birbirlerine göre

lokalisasyonlarının ve sıralarının saptanmasında ILINK programı kullanılmaktadır. LODSCORE tüm olasılıkların hesaplanması yerine sadece maksimum olasılıkların hesaplanmasında, LINKMAP ise birden fazla markır içinde haritalanmak istenen genin göreceli pozisyonunun bulunmasında (“multipoint linkaj analizi”) kullanılan alt programlardır.

LINKAGE Programı, özellikle geniş genom verilerinin analizinde ve aynı anda çok sayıda markırın hastalıkla ilişkilendirilmesine yönelik multipoint linkage analizinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle farklı algoritmalar ve programlar geliştirilmiştir. MERLIN, SIMWALK, GENEHUNTER gibi programlar bu amaca yönelik geliştirilmiş olan programlardır (60).

Bu programların tamamı birbirine benzer giriş dosyaları oluşturularak çalıştırılır. Bu veriler, pedigrı verilerini içeren pedigrı dosyası, kalıtım bilgileri, gen frekansları ve markır alel frekanslarının tanıtıldığı bir parametre dosyasından oluşmaktadır. LINKAGE programı bir indeks vaka üzerinden ailedeki bütün akrabalık ilişkilerinin birbirine göre tanımlandığı ek bir dosya daha kullanmaktadır. Analizlerde farklı programların aynı genotip verilerinin analizine yönelik olarak kullanılması veri güvenliğini arttırıcı bir unsurdur.

İlgili tez çalışmasında istatistik analizler LINKAGE ve MERLIN programları kullanılarak yapılmıştır.

4.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD öğretim üyesi Prof. Dr. E. Ferda Perçin'in yöneticiliğinde, aynı bölümden Arş. Gör. Dr. Kadri Karaer'in, Ortopedi AD'dan Prof. Dr. Aykın Şimşek'in, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'dan Prof. Dr. A. Nurten Akarsu'nun, Ortopedi ve Travmatoloji Uzmanı Prof. Dr. Sıtkı Perçin'in katılımı ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin (BAP) (SBE-01/2007-83 proje numarası, Ağustos 2007) desteğiyle gerçekleşmiştir. Çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 22.01.2007 tarihinde (No: 14) onaylanmıştır. Çalışmaya katılan tüm hasta ve hasta yakınlarından, yerel etik kurulunun onayladığı "bilgilendirilmiş gönüllü olur formu" ile onamlar alınmıştır. Çalışma Ağustos 2007-Ağustos 2008 tarihleri arasında, BAP'ın 10.000 TL'lik bütçe desteği ile alınan sarf malzemeleri kullanılarak tamamlanmıştır.

Bu projede, 1994-2004 yılları arasında Cumhuriyet Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi olan Prof. Dr. Sıtkı Perçin ve Tıbbi Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. E. Ferda Perçin tarafından takip edilen 11 GKD ailesinden en geniş ve bağlantı analizinde kullanılabilecek nitelikte olan bir tanesi (Aile 2), ayrıca Gazi Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi olan Prof. Dr. Aykın Şimşek tarafından takip edilen 1 hastadan yola çıkarak ulaşılan geniş bir GKD ailesi (Aile 12) çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya **2 aileden toplam 16 hasta ve 15 sağlıklı birey** katılmıştır (Şekil 6, Şekil 7). Her iki ailede de GKD tanısı, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi ve Ankara Gazi Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji

Anabilim Dalları tarafından konulmuş, bir proband'dan yola çıkarak aile öyküsü alınmış ve ailelerin ulaşılabilen diğer hasta ve sağlıklı bireyleri, muayene edilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Sivas'ta tanımlanan ailenin kanları 1994–2004 yılları arasında toplanmış olup, DNA'ları “TÜBİTAK DNA Bankası ve Gen Araştırmaları” laboratuvarında izole edilerek saklanmıştır. Ankara'da tanımlanan ailenin kanları ise Anabilim dalımızca yürütülen ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 30.10.2006 tarihinde (No: 317) onaylanmış olan BİYONET projesi (DPT:2006K120040) kapsamında kullanılan bilgilendirilmiş onam formları kullanılarak alınmıştır. Kan örnekleri BİYONET projesi kapsamında oluşturulan, anabilim dalımız bünyesindeki DNA bankası tarafından izole edilerek saklanmıştır.

Periferik venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere (5–10 ml) alınmış ve DNA izolasyonu için yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme yöntemi uygulanmıştır. Her bir hastadan elde edilen DNA örneklerinin ilgili bölgeleri, primerler aracılığı ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak amplifiye edilmiştir. Elde edilen ampliconlar % 6'lık denatüre poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra gümüş boyama yöntemi ile boyanmış ve bantları görünür hale getirilmiştir.

4.1. Araç-Gereçler

4.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Çalkalayıcı (Fine PCR-CR 300, Kore)
- Dikey elektroforez (Life technologies S2001, ABD)
- DNA thermal cycler PZR cihazı (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD)
- Güç kaynağı (Power Station 300, Labnet Internatinal, Inc)
- Güç kaynağı (Thermo 4000P, ABD)
- Fotoğraf makinası (Canon, Japonya)
- Hassas terazi (Boeco, Almanya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- Otomatik pipetler (Gilson, France-Finnpipette, ABD)
- Reaksiyon tüpleri:
Falkon Tüpleri (50 ml) (Greiner Bio-one, Almanya)
Falkon Tüpleri (15 ml) (Greiner Bio-one, Almanya)
Mikrotüpler (1.5 ml) (Greiner Bio-one, Almanya)
Mikrotüpler (0.2 ml) (Axygen Scientific, ABD)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Sıcak su banyosu (nb5, Nuve baht, Türkiye)
- Soğutmalı santrifüj (Beckman Coulture, ABD)
- Ultraviyole (U.V) transiluminatör (Synegene, İngiltere)
- Vorteks (Combi-SpinBoeco, Almanya)

4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 50 bç DNA leadder (Fermantas, ABD)
- Agaroza (Prona, İspanya)
- Akrilamid (AppliChem, Almanya)
- Amonyum persülfat (Merck, Almanya)
- APC film kağıdı (Promega, ABD)
- Bromofenol mavisi (Riedel-de Haen, Almanya)
- Bisakrilamid (AppliChem, Almanya)
- dNTP (Fermantas, ABD)
- dH₂O
- Etanol (Merck, Almanya)
- Etidyum bromür (AppliChem, Almanya)
- Formamid (Ambresco, ABD)
- Glasiyel asetik asit (Merck, Almanya)
- Gümüş nitrat (AppliChem, Almanya)
- Ksilen siyanol (Ambresco, ABD)
- MgCl₂ (Fermantas, ABD)
- NaCl (AppliChem, Almanya)
- Na₂EDTA (AppliChem, Almanya)
- NH₄ Asetat (Ambresco, ABD)
- Orange G (AppliChem, Almanya)
- PZR tamponu (Fermantas, ABD)
- Proteinaz K (AppliChem, Almanya)

- Sodyum dodesil sülfat (Merck, Almanya)
- Sodyum karbonat (AppliChem, Almanya)
- Sodyum Tiyosülfat (Ambresco, ABD)
- Taq DNA polimeraz (Fermantas, ABD)
- 1× TBE tamponu (AppliChem, Almanya)
- TEMED (Sigma, ABD)
- Trimetaksilen (Sigma, ABD)
- Tripsin EDTA enzimi (Biological Industries)
- Tris-HCl (Ambresco, ABD)
- Üre (Merck, Almanya)

4.1.3. Kullanılan Çözeltiler

4.1.3.1. DNA izolasyonu için gerekli çözeltiler

Nüklei lizis tamponu

- 10 mM Tris-HCl 1,576 gr
- 400 mM NaCl 23,4 gr
- 2 mM Na₂EDTA 0,7 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve otoklavda sterilize edilir (pH=8,2).

Sodyum dodesil sülfat solüsyonu

- 10 g SDS

100 ml distile suda çözünür, filtre ile sterilize edilir.

TE tamponu

- 10 mM Tris-HCl 0,394gr
- 1 mM EDTA(Na₂) 0,093gr

Distile su ile 250 ml'ye tamamlanır ve otoklavda 20 dakika sterilizasyonu yapılır.

(pH=7,5)

10 M NH₄ asetat tampon çözeltisi

- 148 gr NH₄ Asetat

Distile su ile 200 ml'ye tamamlanır.

%2'lik agaroz jel

- 2 gr agaroz
- 100 ml 1xTBE

4.1.3.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi için gerekli çözeltiler

Yükleme boyası (loading dye)

- Formamid (%95) 9,5ml
- Ksilen siyanol (%0,5) 0,05gr
- Bromofenol mavisi (%0,5) 0,05gr

Akrilamid bisakrilamid çözeltisi (%40)

- Bisakrilamide 2gr
- Akrilamid 38gr

60 ml distile suda çözülür.

Yapıştırıcı çözelti 25ml

- Metaksilen 125µl
- Glasiyel asetik asit 125 µl
- %95'lik etanol 24,750 µl

Çözelti +4 derecede saklanır.

Amonyum persülfat (APS) (%10'luk)

- 0,1 gr APS

Distile su ile 1 ml'ye tamamlanır, her jel için taze olarak hazırlanır.

Sodyum tiyosülfat (10mg/ml)

- 0,05 mgr sodyum tiyosülfat

5 ml distile suda çözülür.

Sodyum karbonat çözeltisi

- 60 gr sodyum karbonat

2 lt bidistile suda çözülür.

Gümüş nitrat çözeltisi

- 3gr Gümüş Nitrat

2 lt bidistile suda çözülür.

60 ml %6 lık akrilamid/bisakrilamid (19:1), 8M üre jelin hazırlanması

- Üre 25,2 gr
- %40 Akrilamid/Bis (19:1) 9 ml
- 10XTBE 6 ml
- H₂O 24 ml
- %10 APS 300 µl
- TEMED 30 µl

4.2. Yöntem

4.2.1. DNA izolasyonu: (Yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme yöntemi)

Çalışma kapsamına giren bireylerden EDTA'lı tüplere 5-10 ml periferik venöz kan alındı. Kan örneklerinin DNA izolasyon işlemi yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme yöntemi kullanılarak aşağıda yazılı protokole göre yapıldı.

1. EDTA'lı tüplere alınan 5-10 ml. kan 15 ml'lik steril falkon'a alınıp üzerine önceden hazırlanmış otoklavlanmış soğuk bidistile su ilave edilerek 2-3 dakika karıştırıldı.
2. 2200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldıktan sonra geri kalan pellet homojenize edildi.
3. Üzerine 15 ml'ye tamamlayacak şekilde soğuk bidistile su ilave edilerek santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
4. Pelletin üzerlerine 35µl Proteinaz K (20 mg/ml), 1500 µl Lysis buffer, 1000 µl %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS) eklendi ve köpürtmeden alt üst edilerek çalkalandı.
5. Bir gece 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra üzerlerine 1000 µl Amonyum asetat (10mM) eklenip 20 kez hızla karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda ısısında bırakıldı.
6. 3500 rpm de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant 15 ml'lik başka tüpe aktarıldı ve içindeki sıvı miktarının iki katı kadar absölü etanol eklendi.
7. Görünür hale gelen DNA'lar pipet ucu yardımıyla, içerisinde 250µl TE Buffer bulunan eppendorflara alındı.

8. 1 gün oda sıcaklığında bekletilip çözünmesi sağlanan DNA'ların miktarları spektrofotometrede ölçüldü ve konsantrasyonları kaydedildi. Elde edilen DNA'lar moleküler analizlerde kullanılıncaya kadar -20 ya da -80°C'deki derin dondurucuda saklandı.

4.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmada belirlenen aday gen bölgeleri sırasıyla 4q35, 6q16 ve 13q22 kromozom bölgeleridir. Gen bölgeleri uygun primerler kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Kullanılan primerlerin dizileri ve PZR ürün büyüklüğü Tablo 1'de verilmiştir.

PZR karışımı

• Primer (10 pmol)	0,5µl
• dNTP (25 mM)	2,5 µl
• 25 mM MgCl ₂	1,7 µl
• PZR tamponu	2,5 µl
• 5 U/µl konsantrasyonda Taq DNA polimeraz	0,3 µl

Toplam reaksiyon hacmi distile su ile 25 µl'ye tamamlandı. Her reaksiyonda kontaminasyon kontrolü için DNA içermeyen bir negatif kontrol tüpü de çalışmaya eklendi.

Tablo 1-Kullanılan primerlerin dizileri ve PZR ürün büyüklüğü

4. Kromozom (4q35)		Primer Dizileri	PZR ürün büyüklüğü:
D4S1554	Forward primer:	TTATTGAAATGCTGGTCCTC	167 (bç)
	Reverse primer:	GAATGATGTACTGATCACCCA	
D4S408	Forward primer:	GGTCTGATGAAAATGTTCTCAAGC	229-243 (bç)
	Reverse primer:	TAGACTGGGTTGTTAGGGACTCTC	
D4S1540	Forward primer:	TGAACCCGTGAAGTGG	185-193 (bç)
	Reverse primer:	GGTGGGATATGTTAATTGC	
6. Kromozom (6q16)		Primer Dizileri	PZR ürün büyüklüğü:
D6S2418	Forward primer:	TGGTCTCCAGCTAGCAAAC	216-244 (bç)
	Reverse primer:	TCTTAGTGAAGTTTCTCAGATCTCC	
D6S434	Forward primer:	CAGGTAGTCCCCCAAAATCA	193-234 (bç)
	Reverse primer:	AGCTCAGGGCTTATGCCAGT	
D6S1692	Forward primer:	CAGCCATAACCACTCTGA	212-230 (bç)
	Reverse primer:	TCCTTTGTGGGAGGTAG	
D6S457	Forward primer:	CTGAGAATTGGCAATAGTTACG	247 (bç)
	Reverse primer:	TCAGGTCGAGTGAGAGATGT	
13.Kromozom (13q22)		Primer Dizileri	PZR ürün büyüklüğü:
D13S1296	Forward primer:	TGCAGAAATGTGAGCC	206-228 (bç)
	Reverse primer:	TCCACCTAGAGCAACTACC	
D13S279	Forward primer:	TGGTTTGTTCAGAAAGCACAC	241-257 (bç)
	Reverse primer:	TTGGGCCTTGTC AACCTTCATA	
D13S800	Forward primer:	AGGGATCTTCAGAGAAACAGG	295-319 (bç)
	Reverse primer:	TGACACTATCAGCTCTCTGGC	
D13S156	Forward primer:	CTACTCAACAGGCTGAGGTG	242 (bç)
	Reverse primer:	GCTGTGGTATGAGTTACTTAAACA	
D13S162	Forward primer:	GCAATCTGAAACATTCTCCA	182-202 (bç)
	Reverse primer:	TTTCATCACAGATAATGCATGATAC	

PZR tepkimesi

Başlangıç Denatürasyonu; 94°C 'de 2dk (1 Döngü)

Denatürasyon aşaması;	94 °C' de 2dk	} (30-40 Döngü)
Hibridizasyon aşaması;	55-60 °C' de 30 sn	
Sentez (Uzama) aşaması;	72 °C' de 5 dk	

Son sentez aşaması; 72 °C' de 5 dk (1 Döngü)

4.2.3. Çoğaltılmış DNA'ların Elektroforezde Değerlendirilmesi

PZR reaksiyonları sonucu oluşan DNA'ları yürütmek için %2 lik agaroz jel hazırlandı. Örnekler (10µl PZR ürünü + 2µl yükleme tamponu) kuyucuklara yüklendi ve 90 Voltta 90 dakika yürütüldü. Bantlar ultraviyole lamba altında değerlendirildi.

4.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

a)Cam "Plate" lerin hazırlanması

- % 70'lik etanol ile her iki camın jel ile temas edecek yüzleyeri 3'er kez silindi.
- Kısa camın üzerine, jelin yüzeye yapışmasını sağlayan 1ml yapışkan (*sticky*) solüsyon sürüldü.

- Uzun camın üzerine, jelin yüzeye yapışmasını önleyecek olan 1 ml “*RainX*” solüsyonu yayıldı.
- 10 dk beklendikten sonra her iki cam da %70’lik etanol ile silindi.
- Araya separatörler yerleştirildi ve kısa cam uzun camın üzerine kapatıldı.
- Kauçuk tutucu ile düzenek fiske edildi. H₂O terazisi ile dengesine bakıldı.

b)%6’lık Denatüre Poliakrilamid Jel’in hazırlanması ve yürütülmesi

- %6’lık denatüre poliakrilamid jel için; 25,2 gr ürenin üzerine 9 ml akrilamid bisakrilamid çözeltisi, 6 ml %10’luk TBE solüsyonu ve 24 ml bidistile su eklendi. Çözününceye kadar karıştırıldı ve polimerleşmesini sağlamak amacıyla içine 300µl %10’luk APS ve katalizör olarak 30µl TEMED eklendi.
- Hazırlanan çözelti 50’lik enjektörün pistonu çıkarılıp hava kabarcığı oluşturmada enjektörün içine konuldu ve kauçuk fiksatörde bulunan özel bölümden içeri enjekte edildi.
- Jel döküldükten sonra tarak jelin üst kısmına yerleştirildi ve mandallarla sıkıştırıldı.
- Polimerizasyonun tamamlanması için çalışma saatlerine göre 3-12 saat beklenildi.
- Kısa cam iç tarafa gelecek şekilde elektroforez cihazına yerleştirildi.
- Cihazın hem üst hem de alt kısmına %10’luk TBE tamponu ilave edildi.
- Taraklar çıkartıldı ve bölgeye çöken üre pipetle yıkanarak uzaklaştırıldı.

- Elektroforez güç kaynağına bağlandı. Böylece jele örnekler yüklenmeden önce 30 dakika süreyle 1650V 125mA 125W akım uygulanarak (prerun) porların açılması sağlandı.

c)Yüklenecek PZR Ürünlerinin Hazırlanması

- PZR ürünleri 6µl olacak şekilde hazırlandı ve üzerlerine 4 µl loading dye eklendi. Örnekler 95 °C'de 3 dk denatüre edildi. Denatürasyondan sonra örnekler buza konularak renatürasyonu engellendi.
- “Pre-run”dan sonra taraklar jele yerleştirildi ve her bir kuyuya, 10µl örnek yüklendi. Örnekler, 1650V 300mA 125W'ta PZR ürününün büyüklüğüne göre 2-4 saat kadar yürütüldü.

d)Gümüş Boyama

- Jel yürütüldükten sonra, jelin yapışık olduğu kısa cam %10'luk gliasial asetik asit solüsyonu içinde 30 dakika fiske olması için tutuldu ve dışarı alınan jel 3-4 kez kısa aralıklarla deiyonize distile su ile yıkandı.
- %3'lük gümüş nitrat solüsyonu içerisine 3 ml formaldehit eklendi ve jel gümüş nitrat solüsyonunda 30 dakika çalkalandı. Hızlı bir durulamanın ardından camın arkası kurulandı.
- Gümüş nitratla boyanan jelde bantların görünür hale gelmesi için, jel; içine 3 ml formaldehit ve 400µl sodyum-tiyosulfat eklenmiş sodyum karbonat solüsyonunda (60gr/lt) bantlar görünür hale gelinceye kadar çalkalandı.

- Bantlar görünür hale geldiği zaman cam %10'luk gliasial asetik asit solüsyonunun içine konularak, bantlar fiske edilene kadar (5-10 dk) bekletildi. Daha sonra asetik asitin uzaklaştırılması için, bidistile su ile yıkandı ve cam kurumaya bırakıldı.

e)Fotoğraflama

- Gümüş boyama ile boyanan jellerin; direkt fotoğraflama tekniği ile ve tarayıcıda jelin taranması yöntemleri kullanılarak görüntülenerek genotiplendirildi.

1) Direkt fotoğraflama tekniği

- Beyaz ışık kaynağı üzerine konulan jel üzerine fotoğraf kâğıdı (APC film-Promega) konarak, duruma göre 40 saniye- 2 dakika arası bekletildi.
- Alınan fotoğraf kâğıdı sırasıyla developer (Ilford Ilfotec DD-X Film Developer), su ve fixer (Ilford Rapid Fixer) solüsyonlarından geçirilerek görünür hale getirildi.

2) Tarayıcıda jelin taranması

- Tarayıcı üzerine konulan jel uygun program (HP ScanJet Photo and Imaging Software) sayesinde bilgisayara aktarılarak tarama işlemi gerçekleştirildi.

4.2.5. Gümüş Boyama Yöntemi ile Genotiplendirme Yapılması ve Haplotiplerin Oluşturulması

Gümüş boyama sonrası APC film üzerinde görüntülenen DNA bantları büyüklük farklılıklarına göre numaralandırıldı. Genotiplemenin ardından aynı bölgeden seçilen birden fazla genetik belirleyici gen haritasında yer aldıkları sıraya dikkat edilerek pedigrinin üzerine nakledildi ve anne-babadan gelen aleller tahmin edilmeye çalışılarak haplotipler oluşturuldu.

4.2.6. İstatistik Analizler

Sonuçlar bağlantı (linkage) ve haplotip analizi yapılarak değerlendirildi. Bağlantı analizi için iki farklı istatistik programı kullanıldı. Hastalık ve markır alel arasındaki bağlantıyı (two-point linkage) ölçmek için Ott tarafından geliştirilmiş olan Linkage programı (61, 62) ve MLINK alt programı (Fastlink Versiyon 2.0) , kullanılırken bölgeden seçilen çok sayıda markır ile hastalık aleli arasındaki bağlantıyı (multipoint linkage) ölçmek için Goncalo Abecasis tarafından geliştirilmiş olan MERLIN (Sürüm 3.0) programı (63, 64) kullanıldı.

Bağlantı analizinde sonuçlar belirli rekombinasyon oranları varsayılarak aranılan genin test edilen kromozom lokusunda olma olasılığının, ilgili lokalizasyonda bulunmama olasılığına oranı: Logarithm of Odds Ratio (LOD Skor) olarak ifade edildi ve iki noktalı bağlantı analizinde tablo; çok noktalı bağlantı analizinde ise bölgeye özgü grafik haline getirildi (Tablo 4-5-6-7 ve Şekil 17-18) Rekombinasyon fraksiyonu varsayılan rekombinasyon oranlarını göstermektedir ve birimi cM'dır. Örnek: Hastalık ile markır alelinin daima birlikte

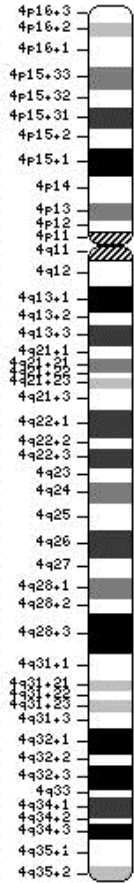
kalıtılması durumu, yani tam bağlantı olduğu varsayımında rekombinasyon fraksiyonu $\theta = 0,0$ cM'dır.

Analizler otozomal dominant ve otozomal resesif varsayımlar altında tamamlandı. Otozomal dominant varsayım altında maksimum genetik etkiyi saptayabilmek için penetrans oranı 0,90 olarak varsayıldı. Eşit alel frekansları öngörüldü ve hastalık alel frekansı 0,0001 olarak kodlandı. Otozomal resesif varsayım altında tam penetrans varsayılarak analizler tekrarlandı.

Aday bölgelerden seçilen DNA markırları, birbirlerine göre kromozom üzerinde sıralanma düzenleri ve genetik pozisyonları (cM cinsinden) Şekil 6'da sunulmuştur. Markırlar seçilirken daha önce bu bölgelere bağlantı bildirilen yayınlardaki DNA markırları referans alınmış, ya aynı markır çalışılmış ya da harita üzerinde ilgili markıra en yakın yerleşimli markır seçilmiştir.

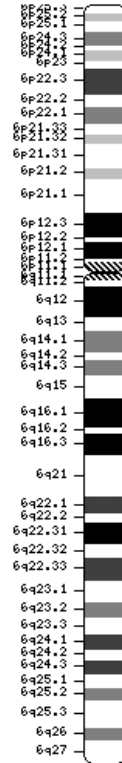
Haplotip analizi için genotip sonuçları CYRILLIC Programına aktarıldı. Rastgele seçilmiş bir hasta birey proband kabul edilerek hastalık haplotipi belirlendi. Diğer bireylere ait haplotipler bu hastalık haplotipi ile karşılaştırılarak ailedeki hasta bireylerin aynı haplotipi alıp almadığı izlendi. Eş zamanlı olarak normal bireylerin de kalıtım kalıbı varsayımı ile uyumlu olarak hastalık alelini kalıtmaması şartı arandı.

Kromozom 4



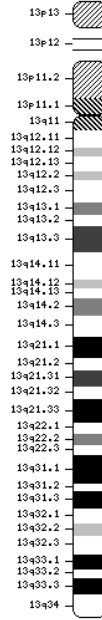
<u>Markır</u>	<u>Het.</u>	<u>Pozisyon</u>
D4S1554	0,86	192,12 (cM)
D4S408	0,78	195,06 (cM)
D4S1540	0,60	199,93 (cM)

Kromozom 6



<u>Markır</u>	<u>Het.</u>	<u>Pozisyon</u>
D6S2418	0,83	107,9 (cM)
D6S434	0,86	109,2 (cM)
D6S1692	0,83	111,2 (cM)

Kromozom 13



<u>Markır</u>	<u>Het.</u>	<u>Pozisyon</u>
D13S1296	0,86	52,6 (cM)
D13S279	0,82	53,2 (cM)
D13S800	0,75	55,3 (cM)
D13S156	0,80	55,9 (cM)
D13S162	0,86	58,5 (cM)

Şekil 6. Kullanılan markırların kromozomlar üzerindeki lokalizasyonu, cM cinsinden pozisyonları ve heterozigote oranları

5. BULGULAR

Bu araştırmada, fenotipin iyice detaylandırılabilmesi amacıyla çalışmaya katılmayı kabul eden **2 aileden (Aile 2 ve Aile 12), toplam 16 hasta ve 15 sağlıklı birey** ile görüşülmüştür (Ailelerin pedigripleri şekil 7 ve şekil 8’de sunulmuştur).

Görüşmeler sonucunda, Sivas–Zara bölgesi kökenli ikinci aile ve Ankara-ubuk bölgesi kökenli onikinci ailenin hasta bireylerinin GKD tanısı, Sivas Cumhuriyet niversitesi ve Ankara Gazi Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalları tarafından konulmuş bir probanddan, yola çıkararak saptamıştır.

5.1. Ailelerin Fenotipik zellikleri

Aileler “Hasta grubu” ve “Hasta yakınları grubu” olarak ikiye ayrılmıştır (Tablo 1).

Aile bireylerinin fenotipik özelliklerinin dökümü Tablo 2, 3A ve 3B’de gösterilmiştir.

Her iki ailedeki toplam 31 bireyden, Tachdjian Sınıflaması’na göre basit tipte oldukları öngörülen 16 hasta bireyin 13’ kadın, 3’ erkekti. Toplam 15 sağlıklı bireyin 9’u kadın, 6’sı erkekti (Tablo 2). Aile 2’nin hasta grubunda ebeveynleri arasında akrabalık olan sadece bir birey varken, Aile 12’de akraba evliliği yapan hiçbir birey yoktu. Aile 2’de hasta olan 8 bireyin, 3’nn sağ kalça ekleminde, geri kalan 5’inin ise her iki kalça ekleminde GKD saptanırken, Aile 12’de hasta olan 8 bireyin, 3’nn sol kalça ekleminde, 2’sinin sağ kalça ekleminde, geri kalan 3’nn de her iki kalça ekleminde GKD saptandı (Tablo 3A-3B).

Tablo 2. Hasta ve yakınlarının cinsiyetlerine göre dağılımı

Cinsiyet	Hasta Grubu Aile 2	Hasta Yakınları Grubu Aile 2	Hasta Grubu Aile 12	Hasta Yakınları Grubu Aile 12
Kadın	5	2	8	7
Erkek	3	1	0	5
Toplam	8	3	8	12

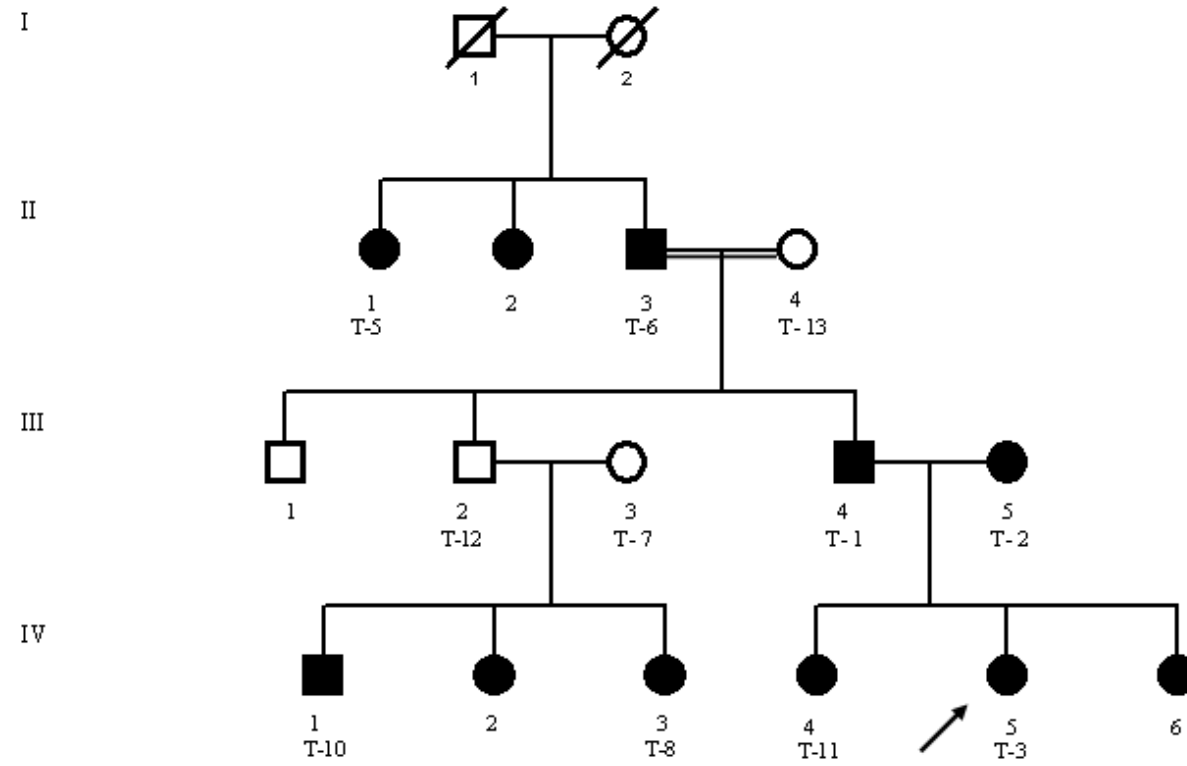
Tablo 3A. Ailelerdeki hasta grubun, ebeveynleri arasındaki akrabalık ve GKD'nin saptandığı kalça eklemi

Aile 2 Pedigri Numarası	Cinsiyet	Ebeveynleri arasında akrabalık	GKD'nin görüldüğü kalça eklemi
T1	E	+	Sağ
T2	K	-	Bilateral
T3	K	-	Bilateral
T5	K	-	Sağ
T6	E	-	Bilateral
T8	K	-	Bilateral
T10	E	-	Sağ
T11	K	-	Bilateral

Tablo 3B: Ailelerdeki hasta grubun, ebeveynleri arasındaki akrabalık ve GKD'nin saptandığı kalça eklemi

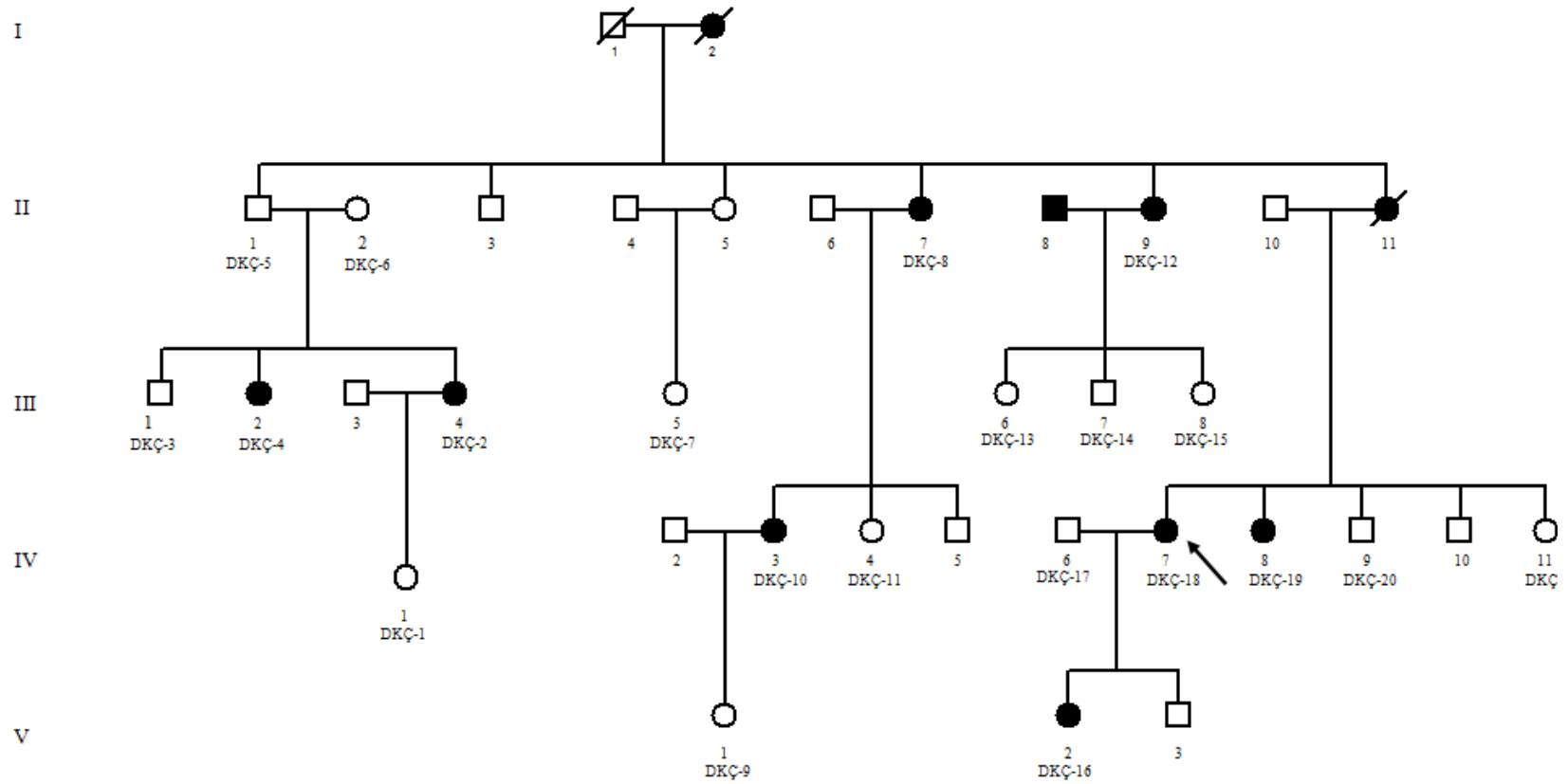
Aile 12			
Pedigri Numarası	Cinsiyet	Ebeveynleri arasında akrabalık	GKD'nin görüldüğü kalça eklemi
DKC2	K	-	Sağ
DKC 4	K	-	Sol
DKC 8	K	-	Sol
DKC 10	K	-	Sol
DKC 12	K	-	Bilateral
DKC 16	K	-	Bilateral
DKC 18	K	-	Bilateral
DKC 19	K	-	Sağ

Aile 2



Şekil 7. Aile 2'nin pedigrisi

Aile 12



Şekil 8. Aile 12'nin pedigrisi

5.2. Pedigri Analizi

Her iki pedigrinin formal genetik incelemeleri hastalığın otozomal dominant eksik penetranslı bir genle kalıtıldığını düşündürmektedir. İki ailede kalıtımın izlenebildiği toplam 8 birey vardır ve bunların 6 adedi hasta olup niteliği bir sonraki kuşağa aktarmış, 3 adedi ise kendileri normal oldukları halde malformasyonu bir sonraki kuşağa iletmiş durumdadırlar. Bu durumda hastalığın penetransı $6/8 = 0,80$ dolayında görünmektedir.

Analizler ilk planda otozomal dominant eksik penetrans varsayımlarıyla tamamlanmıştır. Tam olarak dışlanamadığı için, resesif kalıtım varsayımı altında alınan sonuçlar da tez içeriğinde gösterilmiştir.

5.3. Genetik belirleyicilerin (markırların) seçimi ve Moleküler analizler

Bu çalışmada öncelikle gelişimsel kalça displazisi bozukluğunda daha önce bildirilmiş 4q35 ve 13q21 kromozom bölgelerinin taranması hedeflenmiştir. Bu bölgelere ek olarak LOD skoru yüksek saptanmış olan 6q16 kromozom bölgesinin de çalışılması uygun görülmüştür. Taranacak olan kromozomlara karar verildikten sonra bu kromozomlardaki GKD ile ilişkili olduğu belirtilen genetik belirleyiciler saptanmıştır (Tablo 1, Şekil 5).

Haplotip değerlendirmeleri ise şekiller üzerinde gösterilmiştir (Şekil 9-10-11-12-13-14-15).

5.3.1. Kromozoma 13'e ait haplotip analizi (Şekil 9-10-11):

-Aile 12'deki 1 ve 2 numaralı bireylerin varsayılan haplotipi, bir sonraki kuşağa bakarak, genetik belirleyiciler arasında en az rekombinasyon düzeyi verecek şekilde oluşturulmuştur ve tahmini haplotiplerdir.

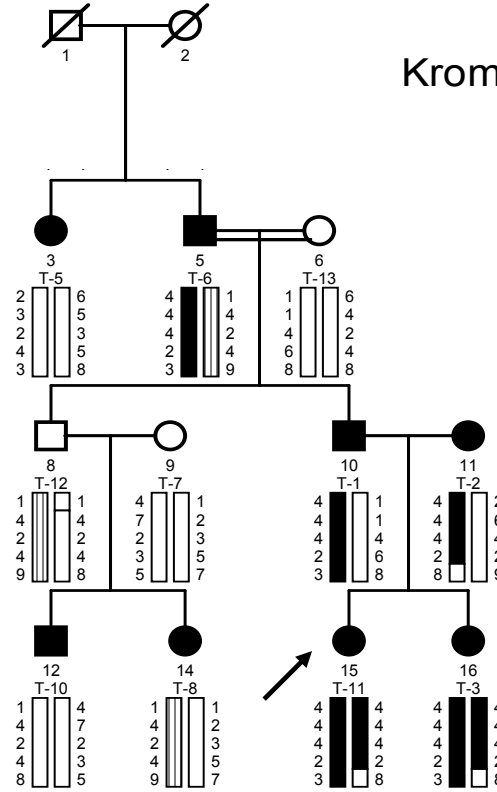
-Pedigrielerde yer alan bu haplotipler bir sonraki kuşakta her kromozom ayrı ayrı görülecek şekilde içi tamamen dolu, içi tamamen boş ve enine çizgili olan sütunlar şeklinde her bir bireyin altında gösterilmiştir.

-İçi dolu sütunlar varsayılan hastalık allelini taşıyan bireyleri, içi boş sütunlar da normal allelleri taşıyan bireyleri göstermektedir.

-Hastalık alleli Aile 2 için 4-4-4-2-3, Aile 12 için ise 5-2-3-7-3 haplotipi olarak belirlendiğinde her iki ailede de çok sayıda hasta bireyin ilgili haplotipi taşımadığı ve ailelerde hastalıkla birlikte kalıtılan ortak bir haplotip izlenmediği görülmüştür. Bu varsayıma göre Aile 2 için 3, 12, 14 numaralı bireylerin, Aile 12 için ise 9, 15, 20, 27 ve 34 numaralı bireylerin tahmini allelleri taşımadıkları görülmektedir. Dolayısı ile 2 ailede de 13. kromozomun assosiasyon bildirilen bu bölgesine bağlantı gösterilmemiştir.

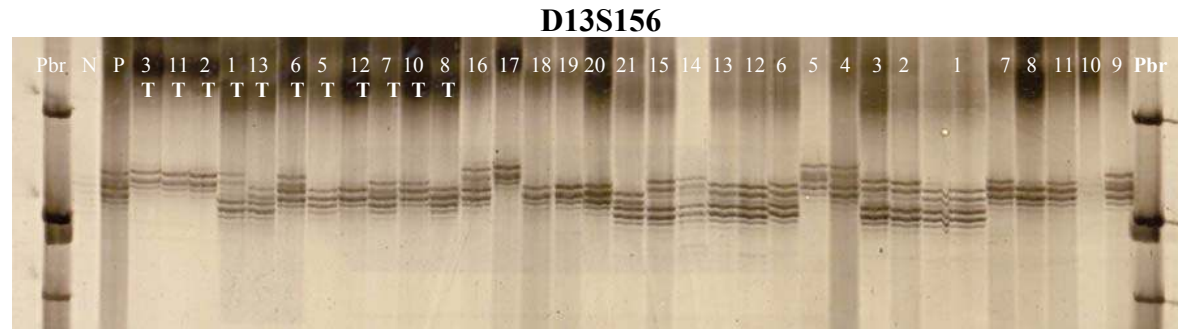
Markır sıra ve pozisyonu
D13S1296 (69.55 Mb)
D13S278 (70.49 Mb)
D13S800 (72.77 Mb)
D13S156 (73.55 Mb)
D13S162 (74.87 Mb)

Aile 2
Kromozom 13q21



Şekil 9: Sağ üst köşede kromozom lokalizasyonu (13q21), sol üst köşede çalışılan genetik belirleyiciler (markır)

(D13S1296, D13S278, D13S800, D13S156, D13S162) ve pozisyonları



Şekil 9a: D13S156 numaralı genetik belirleyicisine ait allel dağılımını gösteren fotoğraf

Markır sıra ve pozisyonu

D13S1296 (69.55 Mb)

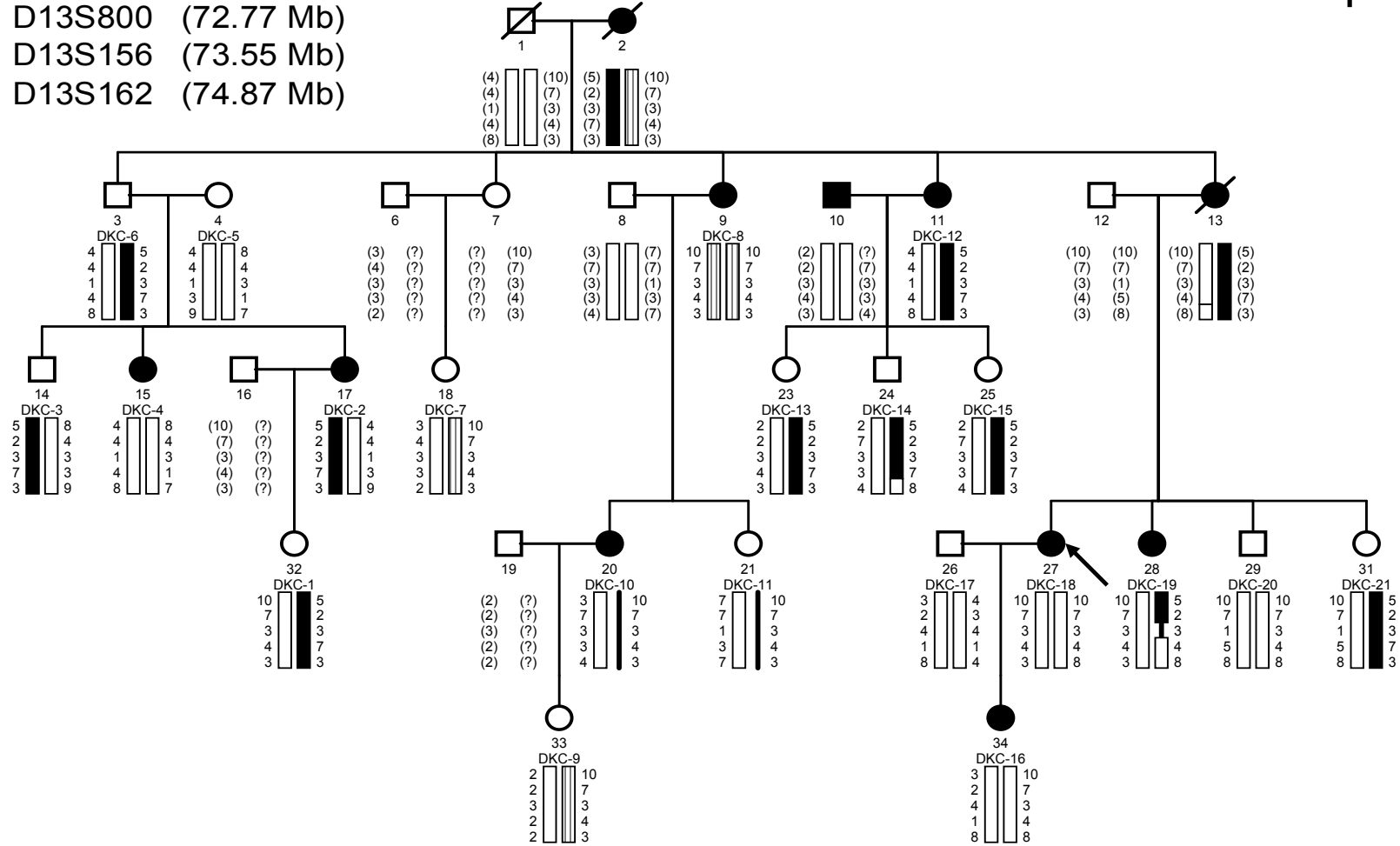
D13S278 (70.49 Mb)

D13S800 (72.77 Mb)

D13S156 (73.55 Mb)

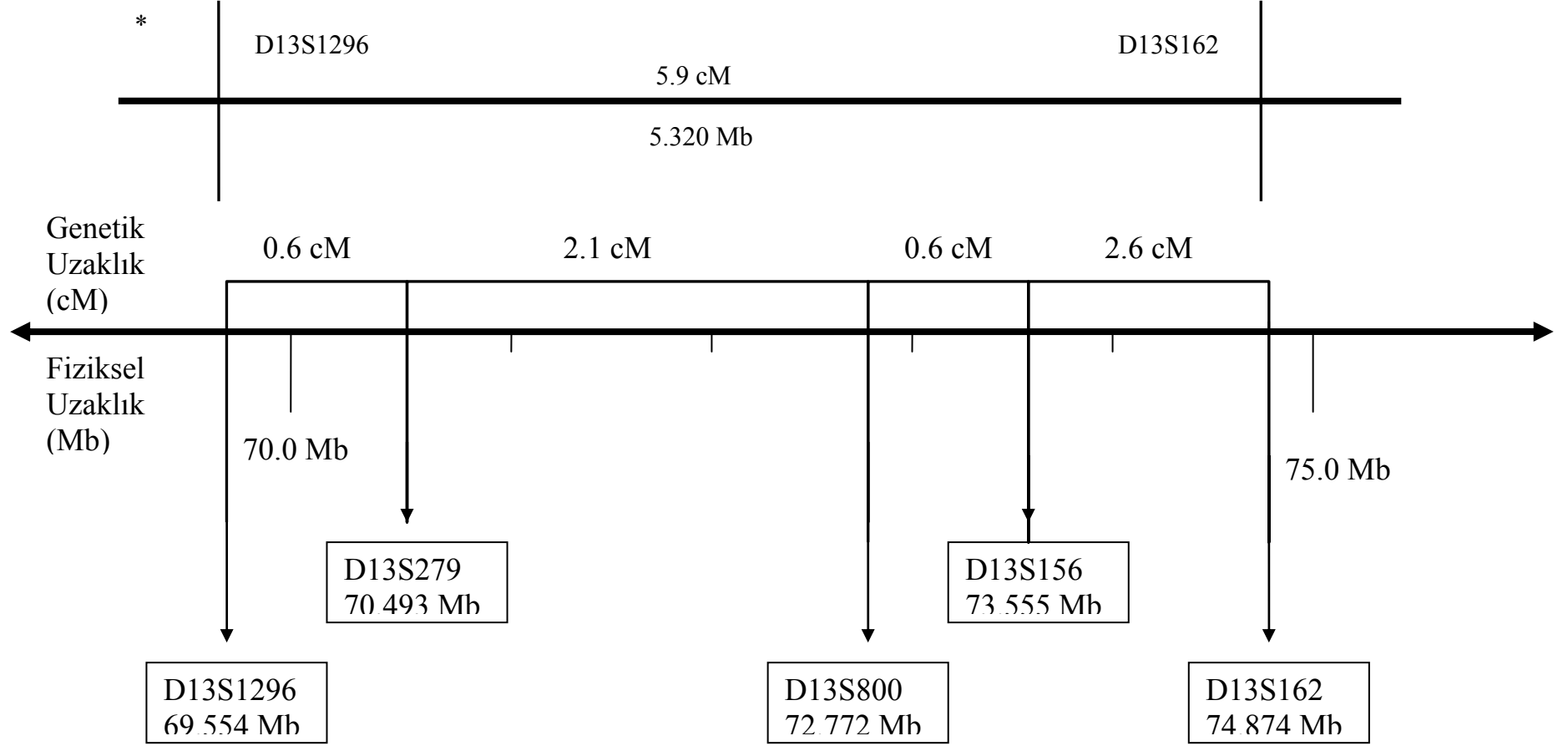
D13S162 (74.87 Mb)

Aile 12 Kromozom 13q21



Şekil 10: Sağ üst köşede kromozom lokalizasyonu (13q21), sol üst köşede çalışılan genetik belirleyiciler (markır) (D13S1296, D13S278, D13S800, D13S156, D13S162) ve pozisyonları

13q21



Şekil 11: D13S1296, D13S278, D13S800, D13S156, D13S162 numaralı genetik belirleyicilerin (markır) harita üzerinde birbirine göre lokalizasyonları:

Çalışılan kromozom lokalizasyonu (13q21) en üstte belirtilmiştir. Onüçüncü kromozomun bu bölgesinde tezimizde yer alan genetik belirleyicilerin birbirlerine göre lokalizasyonları skalanın alt kısmında gösterilmiştir. Genetik belirleyicilerin konumu skalanın üst kısmında genetik uzaklık (cM) cinsinden verilmiştir. Skalanın alt kısmında ise bu yerleştirme fiziksel uzaklık megabaz (Mb) cinsinden yapılmıştır.

* Mabuchi ve ark.'nın (2006) dört jenerasyonda sekiz kalça displazili birey içeren bir Japon ailesinde "Asetabular Displazi" zemininde gelişen osteoartrit ile ilişkilendirdikleri 5.9-cM'lık kritik bölge (4).

5.3.2. Kromozom 4'e ait haplotip analizi: (Şekil 12-13-14)

-Aile 12'deki 1 ve 2 numaralı bireylerin varsayılan haplotipi bir sonraki kuşağa bakarak, genetik belirleyiciler arasında en az rekombinasyon düzeyi verecek şekilde oluşturulmuştur ve tahmini haplotiplerdir.

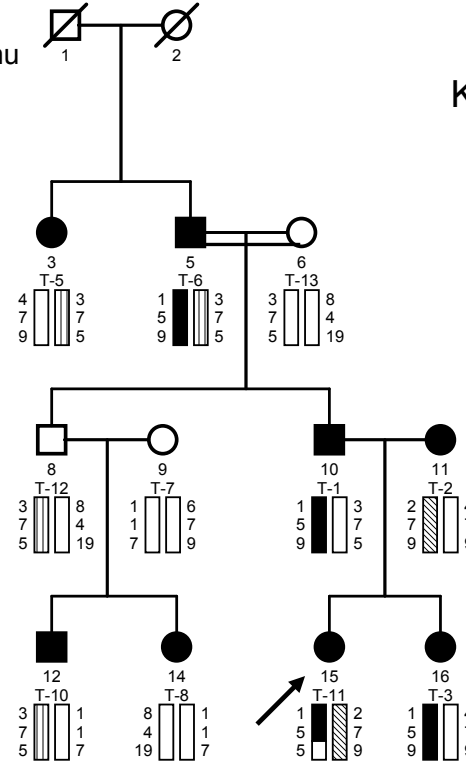
-Pedigrilerde yer alan bu haplotipler bir sonraki kuşakta her kromozom ayrı ayrı görülecek şekilde içi tamamen dolu, içi tamamen boş, enine çizgili ve yanına çizgili olan sütunlar şeklinde her bir bireyin altında gösterilmiştir.

-İçer dolu sütunlar varsayılan hastalık allelini taşıyan bireyleri, içi boş sütunlar da normal allelleri taşıyan bireyleri göstermektedir.

-Hastalık alleli Aile 2 için 1-5-9, Aile 12 için ise 6-7-9 haplotipi olarak belirlendiğinde her iki ailede de çok sayıda hasta bireyin ilgili haplotipi taşımadığı ve ailelerde hastalıkla birlikte kalıtılan ortak bir haplotip izlenmediği görülmüştür. Bu varsayıma göre Aile 2 için 3, 12, 14 numaralı bireylerin, Aile 12 için ise 9, 15, 17, 20, 28 ve 34 numaralı bireylerin tahmini allelleri taşımadıkları görülmektedir. Dolayısı ile 2 ailede de 4. kromozomun assosiasyon bildirilen bu bölgesine bağlantı gösterilmemiştir.

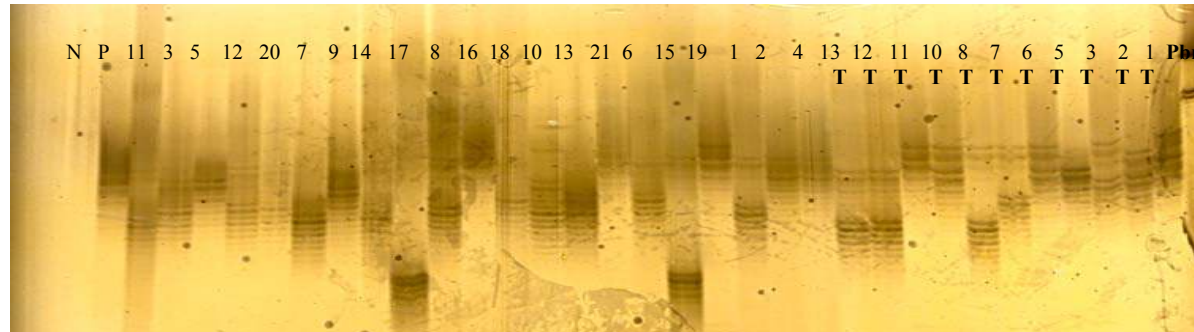
Markır sıra ve pozisyonu
D4S1554 (184.92 Mb)
D4S408 (185.38 Mb)
D4S1540 (186.49 Mb)

Aile 2
Kromozom 4q35

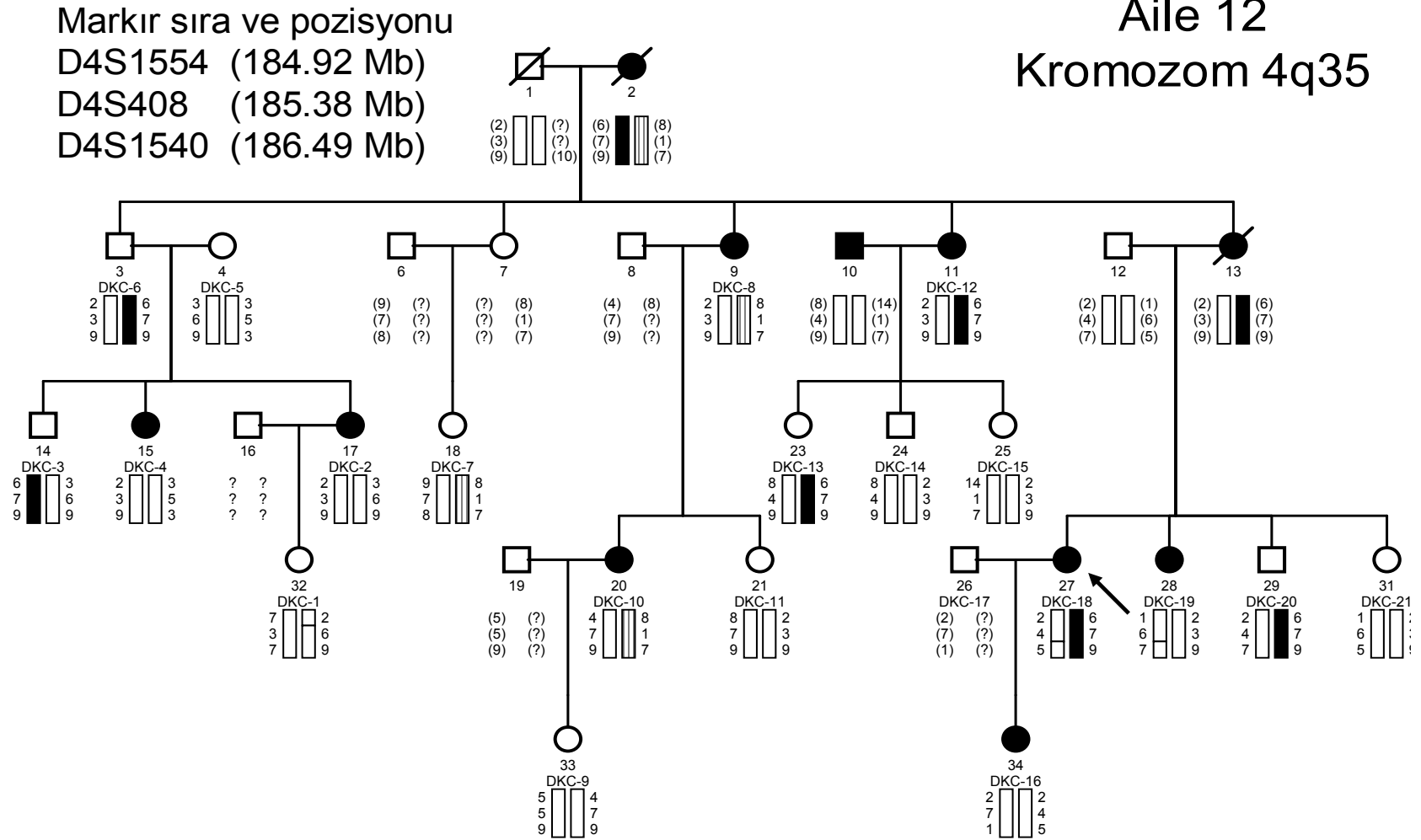


Şekil 12: Sağ üst köşede kromozom lokalizasyonu (4q35), sol üst köşede çalışılan genetik belirleyiciler (markır) (D4S1554, D4S408, D4S1540) ve pozisyonları

D4S1554

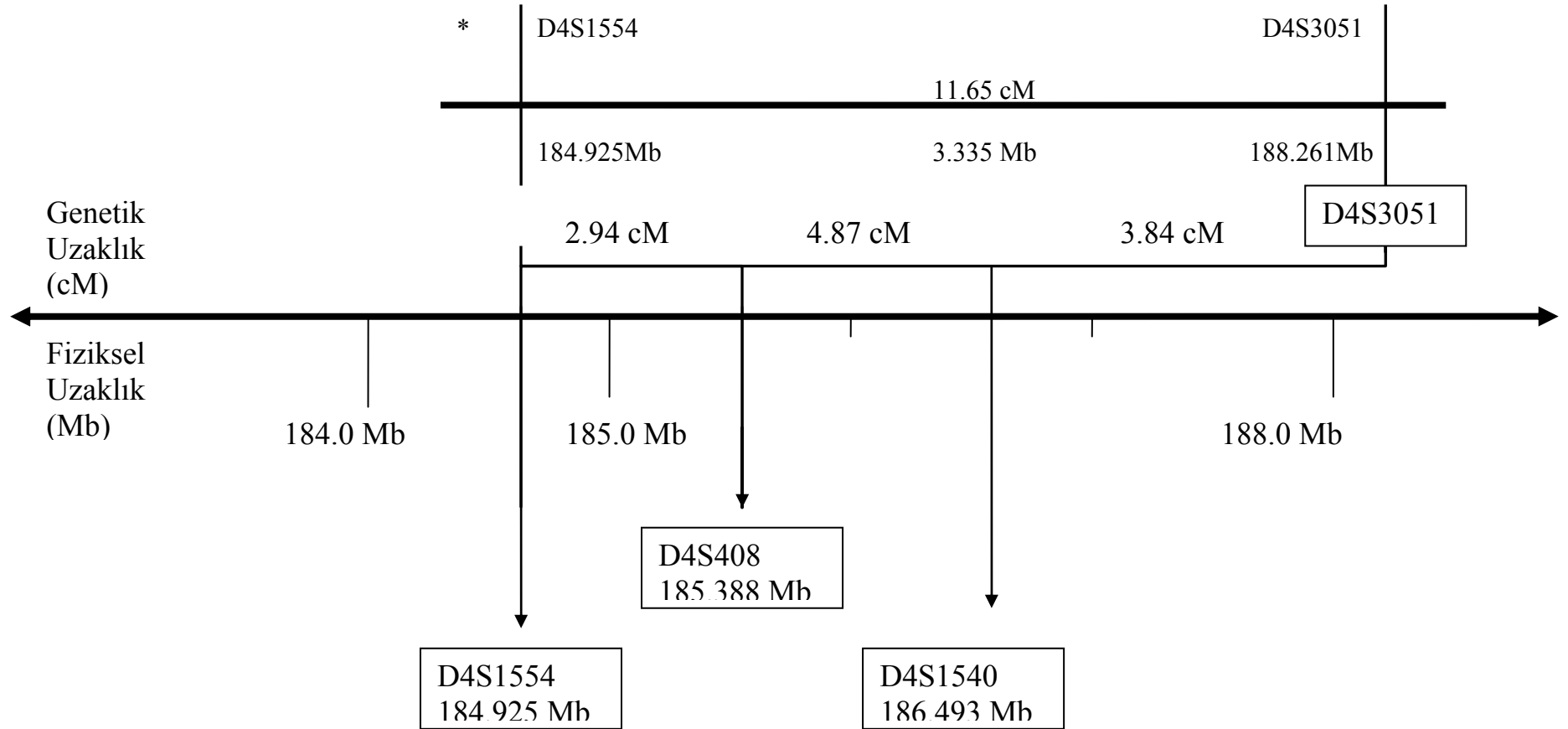


Şekil 12a: D4S1554 numaralı genetik belirleyicisine ait allel dağılımını gösteren fotoğraf



Şekil 13: Sağ üst köşede kromozom lokalizasyonu (4q35), sol üst köşede çalışılan genetik belirleyiciler (markır) (D4S1554, D4S408, D4S1540) ve pozisyonları

4q35



Şekil 14: D4S1554, D4S408, D4S1540 numaralı genetik belirleyicilerin (markır) harita üzerinde birbirine göre lokalizasyonları

Çalışılan kromozom lokalizasyonu (4q35) en üstte belirtilmiştir. Dördüncü kromozomun bu bölgesinde tezimizde yer alan genetik belirleyicilerin birbirlerine göre lokalizasyonları skalanın alt kısmında gösterilmiştir. Genetik belirleyicilerin konumu skalanın üst kısmında genetik uzaklık (cM) cinsinden verilmiştir. Skalanın alt kısmında ise bu yerleştirme fiziksel uzaklık megabaz (Mb) cinsinden yapılmıştır.

* Roby ve ark.'nın (1999) kalça eklemindeki erken dejeneratif osteoartropati ile ilişkilendirdikleri 11.65 cM'lık kritik bölge (3).

5.3.3. Kromozom 6'ya ait haplotip analizi: (Şekil 15-16-17)

-Aile 12'deki 1 ve 2 numaralı bireylerin varsayılan haplotipi bir sonraki kuşağa bakarak, genetik belirleyiciler arasında en az rekombinasyon düzeyi verecek şekilde oluşturulmuştur ve tahmini haplotiplerdir.

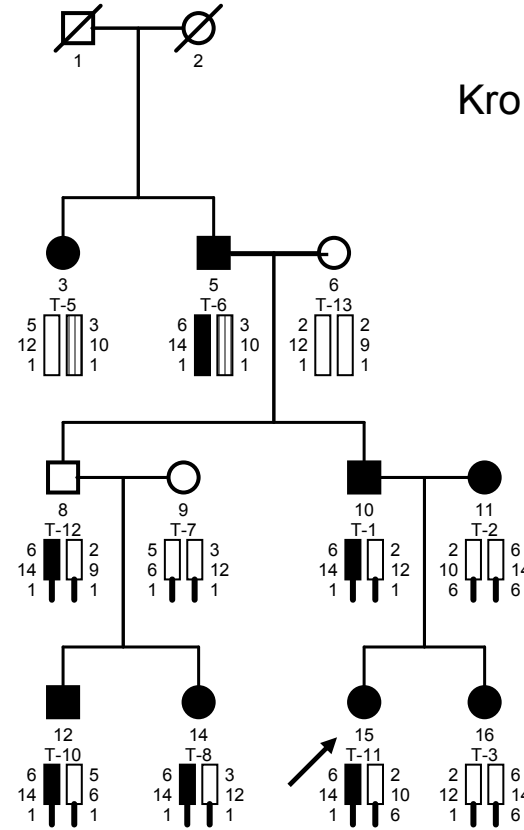
-Pedigrilerde yer alan bu haplotipler bir sonraki kuşakta her kromozom ayrı ayrı görülecek şekilde içi tamamen dolu, içi tamamen boş, enine çizgili ve yanına çizgili olan sütunlar şeklinde her bir bireyin altında gösterilmiştir.

-İçer dolu sütunlar varsayılan hastalık allelini taşıyan bireyleri, içi boş sütunlar da normal allelleri taşıyan bireyleri göstermektedir.

-Hastalık alleli Aile 2 için 6-14-1, Aile 12 için ise 3-14-9 haplotipi olarak belirlendiğinde her iki ailede de çok sayıda hasta bireyin ilgili haplotipi taşımadığı ve ailelerde hastalıkla birlikte kalıtılan ortak bir haplotip izlenmediği görülmüştür. Bu varsayıma göre Aile 2 için 3 numaralı bireyin, Aile 12 için ise 15, 17, 20, 27, 28 ve 34 numaralı bireylerin tahmini allelleri taşımadıkları görülmektedir. Dolayısı ile 2 ailede de 6. kromozomun assosiasyon bildirilen bu bölgesine bağlantı gösterilmemiştir.

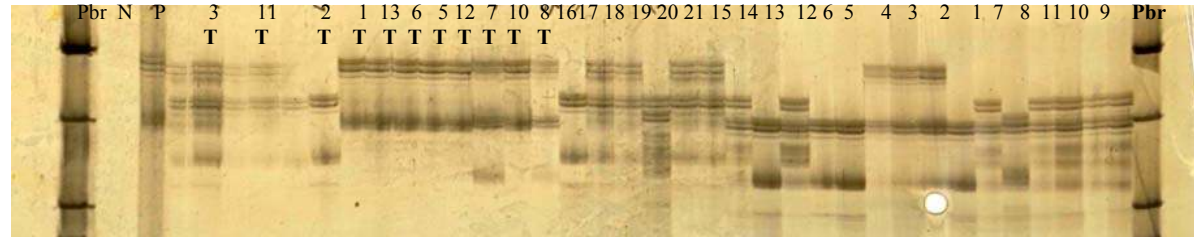
Markır sıra ve pozisyonu
D6S2418 (101.45 Mb)
D6S434 (102.54 Mb)
D6S1692 (103.90 Mb)

Aile 2
Kromozom 6q16



Şekil 15: Sağ üst köşede kromozom lokalizasyonu (6q16), sol üst köşede çalışılan genetik belirleyiciler (markır) (D6S2418, D6S434, D6S1692) ve pozisyonları

D6S1692



Şekil 15a: D6S1692 numaralı genetik belirleyicisine ait allel dağılımını gösteren fotoğraf

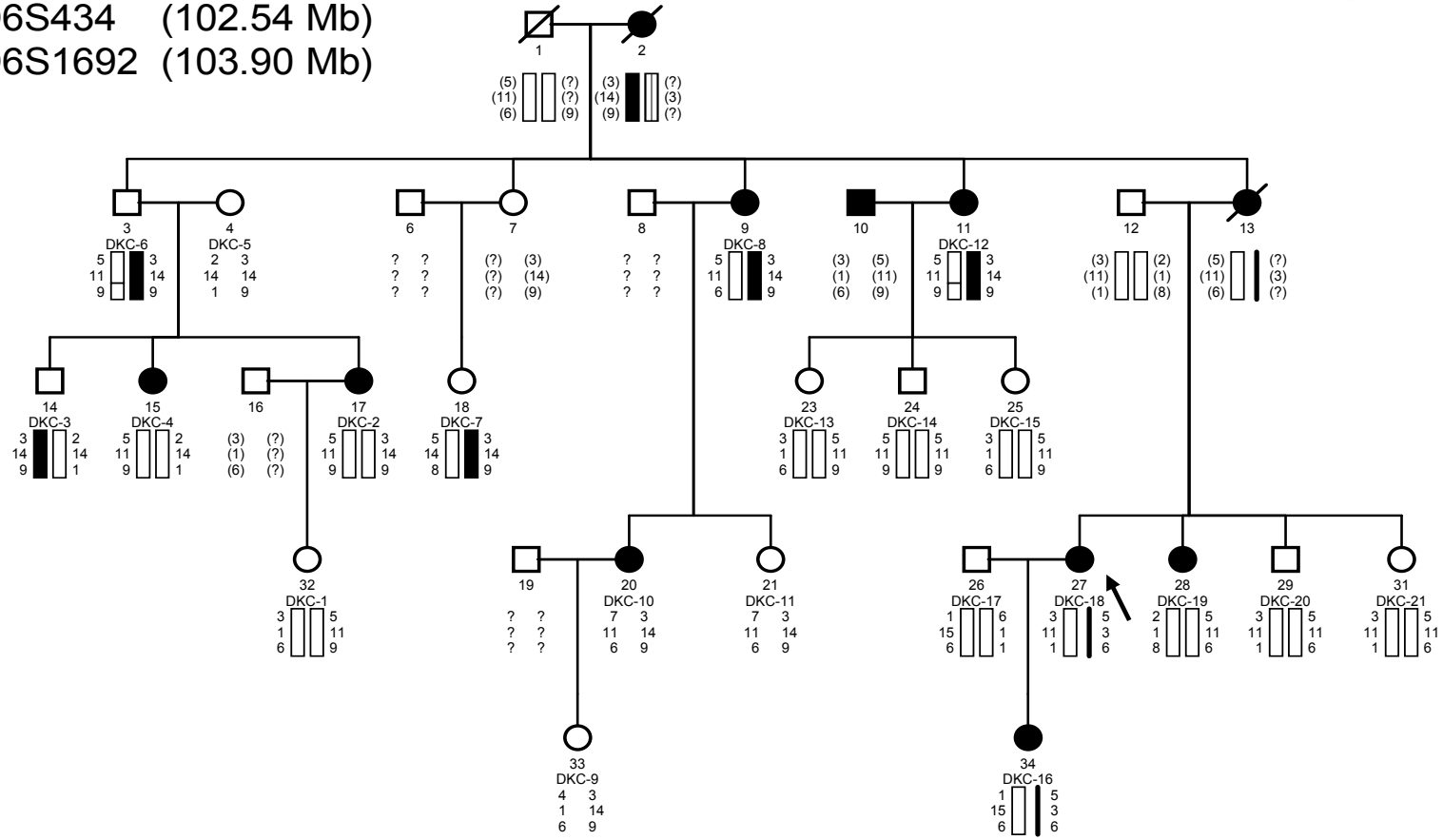
Markır sıra ve pozisyonu

D6S2418 (101.45 Mb)

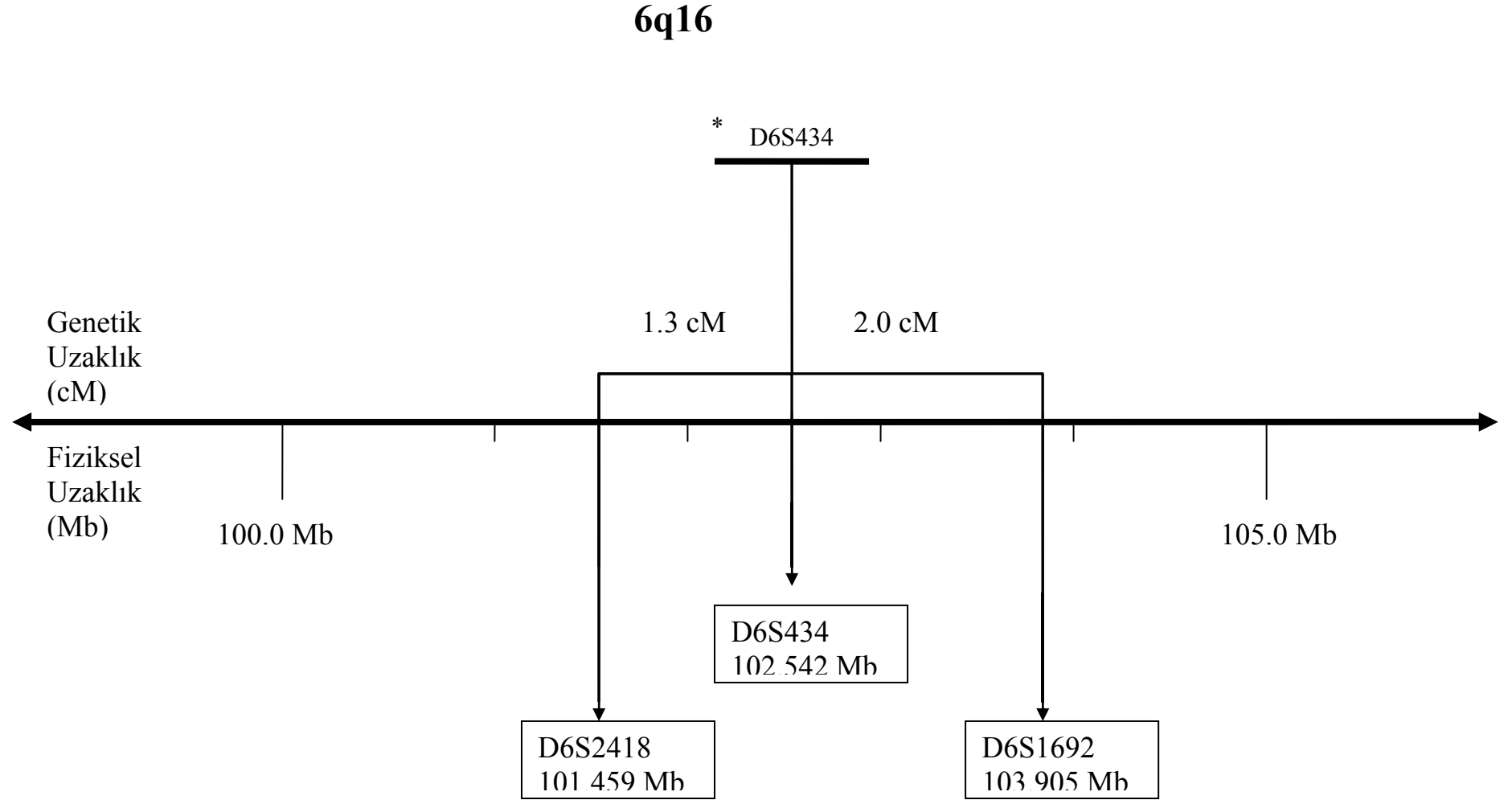
D6S434 (102.54 Mb)

D6S1692 (103.90 Mb)

Aile 12 Kromozom 6q16



Şekil 16: Sağ üst köşede kromozom lokalizasyonu (6q16), sol üst köşede çalışılan genetik belirleyiciler (markır) (D6S2418, D6S434, D6S1692) ve pozisyonları



Şekil 17: D6S2418, D6S434, D6S1692 numaralı genetik belirleyicilerin (markır) harita üzerinde birbirine göre lokalizasyonları:

Çalışılan kromozom lokalizasyonu (6q16) en üstte belirtilmiştir. Altıncı kromozomun bu bölgesinde tezimizde yer alan genetik belirleyicilerin birbirlerine göre lokalizasyonları skalanın alt kısmında gösterilmiştir. Genetik belirleyicilerin konumu skalanın üst kısmında genetik uzaklık (cM) cinsinden verilmiştir. Skalanın alt kısmında ise bu yerleştirme fiziksel uzaklık megabaz (Mb) cinsinden yapılmıştır.

* Mabuchi ve ark.'nın (2006) genom taraması verilerini de içeren dört jenerasyonda sekiz kalça displazili birey içeren bir Japon ailesinde “Asetabular Displazi” zemininde gelişen osteoartrit çalışmasında pozitif LOD skoru 2.26 saptanan index markır (4).

5.4. İstatistikî Analizler

Yapılan LOD skor analizleri 4q35, 6q16 ve 13q21 numaralı kromozom bölgelerinden seçilen belirleyici alleller ile tiplendirdiğimiz ailelerdeki GKD fenotipi arasında bağlantı olmadığını gösterdi.

a) İki noktalı LOD skor analiz sonuçları

Tablo 4: 2 numaralı ailede hastalık aleli ile markır aleli arasında iki noktalı (two point) lod skor sonuçları.

DNA Markır	Pozisyon (Mb)	Pozisyon (cM)	Rekombinasyon fraksiyonu (θ cM)				Dışlanma (cM) $Z > -2,0$
			0.00	0.01	0.05	0.10	
D4S1554	184.92	192.12	- ∞	-2.65	-1.29	-0.74	2
D4S408	185.38	195.06	- ∞	-2.61	-1.26	-0.72	2
D4S1540	186.49	199.93	- ∞	-2.61	-1.27	-0.74	2
D6S2418	101.45	107.88	- 3.75	-0.47	0.13	0.32	----
D6S434	102.54	109.19	-3.85	-0.57	0.05	0.25	----
D6S1692	103.90	111.17	0.23	0.22	0.19	0.16	----
D13S1296	69.55	52.64	- ∞	-2.56	-1.21	-0.68	1
D13S279	70.49	53.17	- 4.45	-1.16	-0.49	-0.24	----
D13S800	72.77	55.31	- 4.58	-1.57	-0.86	-0.55	----
D13S156	73.55	55.85	- 4.27	-1.28	-0.59	-0.31	----
D13S162	74.87	58.54	- ∞	-2.65	-1.28	-0.73	2

*Analiz dominant kalıtım kalıbı ve %90 penetrans oranı varsayılarak yapılmıştır.

Markırların fiziksel ve genetik pozisyonları yanlarında verilmiştir. Dışlanma aralığı cM cinsinden $Z > -2,0$ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5: 2 numaralı ailede hastalık aleli ile markır aleli arasında iki noktalı (two point) LOD skor sonuçları.

DNA Markır	Pozisyon (Mb)	Pozisyon (cM)	Rekombinasyon fraksiyonu (θ cM)				Dışlanma (cM) $Z > -2,0$
			0.00	0.01	0.05	0.10	
D4S1554	184.92	192.12	- ∞	-2.02	-0.76	-0.31	1
D4S408	185.38	195.06	- ∞	-1.98	-0.72	-0.28	----
D4S1540	186.49	199.93	- ∞	-0.32	0.22	0.34	----
D6S2418	101.45	107.88	- ∞	-2.04	-0.73	-0.25	1
D6S434	102.54	109.19	- ∞	-1.68	-0.42	-0.08	----
D6S1692	103.90	111.17	0.47	0.45	0.39	0.33	----
D13S1296	69.55	52.64	- ∞	-5.61	-2.88	-1.77	8
D13S279	70.49	53.17	- ∞	-3.92	-1.91	-1.12	4
D13S800	72.77	55.31	- ∞	-2.39	-1.08	-0.59	1
D13S156	73.55	55.85	- ∞	-2.34	-1.03	-0.55	1
D13S162	74.87	58.54	- ∞	-4.00	-1.98	-1.18	4

* Analiz resesif kalıtım kalıbı ve tam penetrans oranı varsayılarak yapılmıştır.

Markırların fiziksel ve genetik pozisyonları yanlarında verilmiştir. Dışlanma aralığı cM cinsinden $Z > -2,0$ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 6: 12 numaralı ailede hastalık aleli ile markır aleli arasında iki noktalı (two point) LOD skor sonuçları.

DNA Markır	Pozisyon (Mb)	Pozisyon (cM)	Rekombinasyon fraksiyonu (θ cM)				Dışlanma (cM) Z>-2,0
			0.00	0.01	0.05	0.10	
D4S1554	184.92	192.12	- ∞	-3.46	-1.88	-1.15	4
D4S408	185.38	195.06	- ∞	-4.89	-2.63	-1.60	7
D4S1540	186.49	199.93	- ∞	-2.85	-1.44	-0.84	2
D6S2418	101.45	107.88	- 5.08	-1.24	-0.46	-0.12	----
D6S434	102.54	109.19	- ∞	-5.85	-3.73	-2.47	12
D6S1692	103.90	111.17	- 4.17	-2.40	-1.42	-0.88	2
D13S1296	69.55	52.64	- ∞	-4.65	-2.59	-1.61	7
D13S279	70.49	53.17	- ∞	-4.72	-2.65	-1.65	7
D13S800	72.77	55.31	- 1.82	-1.34	-0.35	0.01	----
D13S156	73.55	55.85	- ∞	-2.19	-1.18	-0.65	1
D13S162	74.87	58.54	- ∞	-5.37	-3.49	-2.46	13

* Analiz dominant kalıtım kalıbı ve %90 penetrans oranı varsayılarak yapılmıştır. Markırların fiziksel ve genetik pozisyonları yanlarında verilmiştir. Dışlanma aralığı cM cinsinden Z> -2,0 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 7: 12 numaralı ailede hastalık aleli ile markır aleli arasında iki noktalı (two point) LOD skor sonuçları.

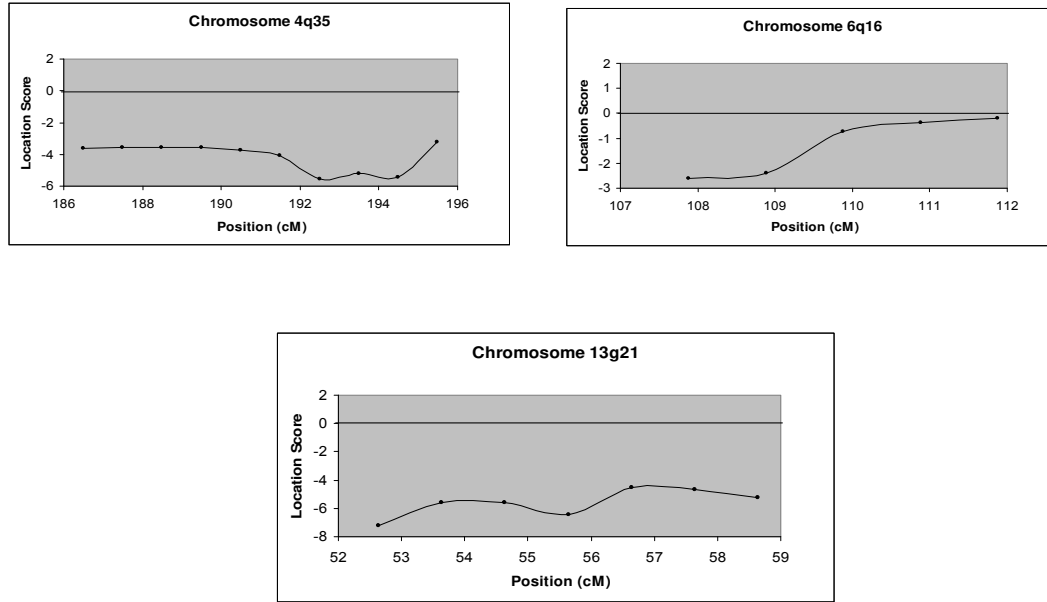
DNA Markır	Pozisyon (Mb)	Pozisyon (cM)	Rekombinasyon fraksiyonu (θ cM)				Dışlanma (cM) Z>-2,0
			0.00	0.01	0.05	0.10	
D4S1554	184.92	192.12	- ∞	-3.07	-1.46	-0.79	2
D4S408	185.38	195.06	- ∞	-7.14	-3.63	-2.17	10
D4S1540	186.49	199.93	- ∞	-4.66	-2.79	-1.83	8
D6S2418	101.45	107.88	- ∞	-2.54	-1.39	-0.82	2
D6S434	102.54	109.19	- ∞	-4.07	-1.95	-1.08	4
D6S1692	103.90	111.17	- ∞	-3.77	-2.01	-1.22	5
D13S1296	69.55	52.64	- ∞	-4.71	-2.55	-1.58	7
D13S279	70.49	53.17	- ∞	-4.13	-2.48	-1.63	7
D13S800	72.77	55.31	1.19	1.17	1.04	0.87	----
D13S156	73.55	55.85	- ∞	-2.82	-1.35	-0.71	2
D13S162	74.87	58.54	- ∞	-3.06	-1.65	-1.04	3

* Analiz resesif kalıtım kalıbı ve tam penetrans oranı varsayılarak yapılmıştır.

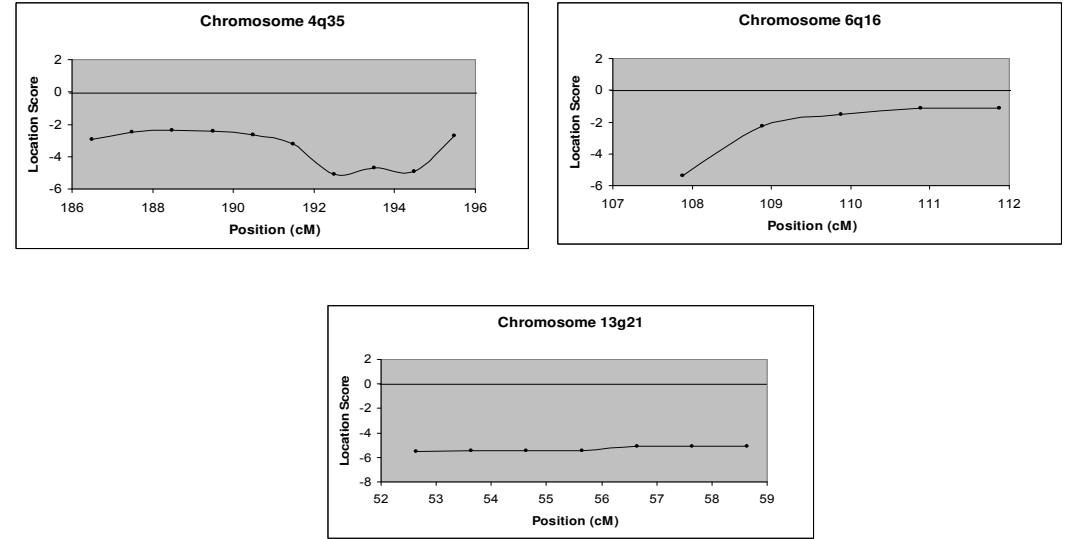
Markırların fiziksel ve genetik pozisyonları yanlarında verilmiştir. Dışlanma aralığı cM cinsinden Z> -2,0 olarak hesaplanmıştır.

b) Multipoint LOD skor analiz sonuçları

AİLE 2 DOMİNANT MODEL



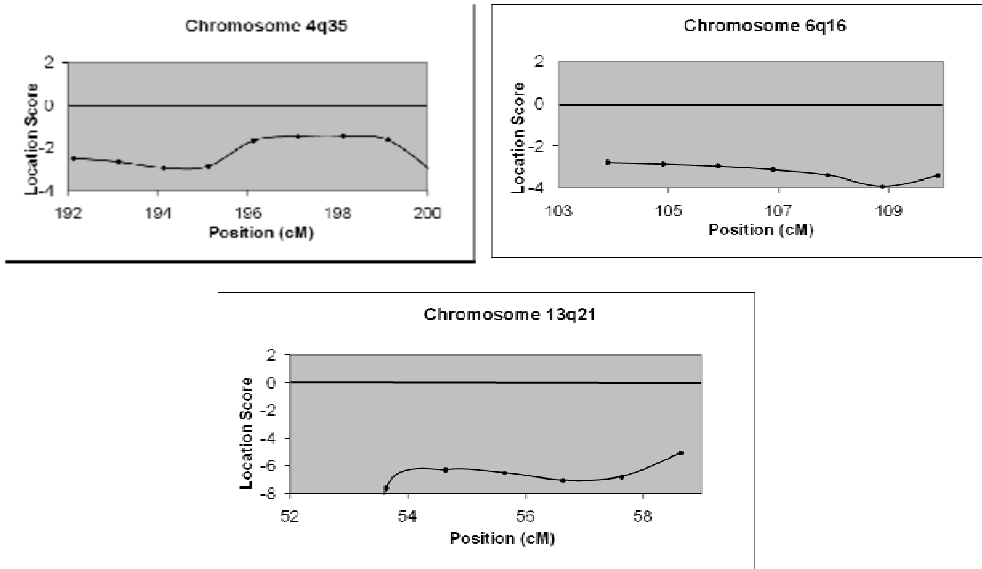
AİLE 2 RESESİF MODEL



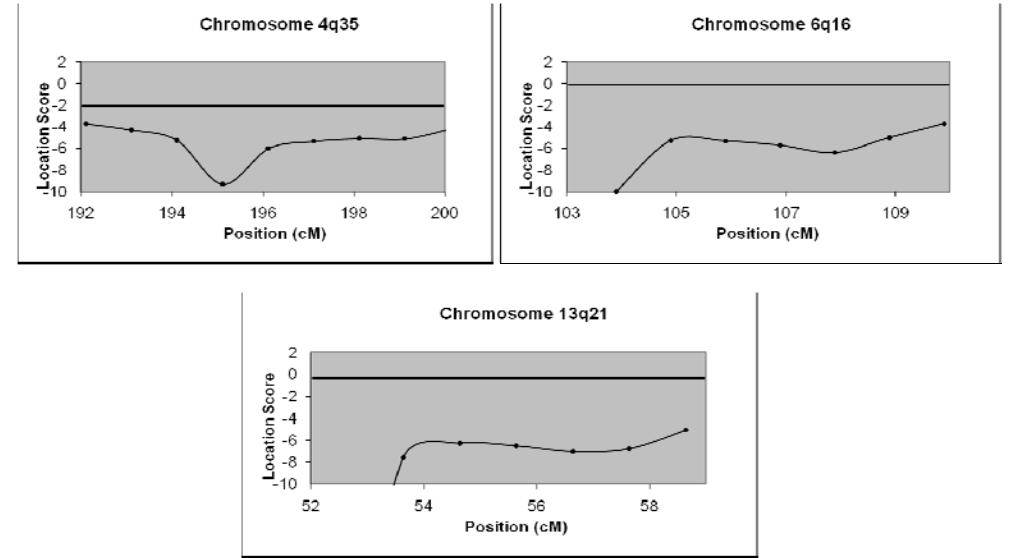
Şekil 18: Aile 2 için MERLIN programı kullanılarak hem resesif hem de dominant modele göre yapılan multipoint LOD skor analiz sonuçları.

Y axis'de LOD skor değerleri X-axis'te ise rekombinasyon fraksiyonu (θ cM) verilmiştir. Çok noktalı analizde tüm bölgeye özgü markırlara yönelik analiz yapıldığı için LOD skor yerine Lokalizasyon skoru tanımı kullanılır. Gerek dominant gerekse resesif kalıtım varsayımı altında test edilen her üç aday bölgede de kritik bölgenin tamamını kapsayacak şekilde negatif LOD skorları elde edildiği görülmektedir.

AİLE 12- DOMİNANT MODEL



AİLE 12- RESESİF MODEL



Şekil 19: Aile 12 için MERLIN programı kullanılarak hem resesif hem de dominant modele göre yapılan multipoint LOD skor analiz sonuçları.

Y axis'de LOD skor değerleri X-axis'te ise rekombinasyon fraksiyonu (θ cM) verilmiştir. Çok noktalı analizde tüm bölgeye özgü markırlara yönelik analiz yapıldığı için LOD skor yerine Lokalizasyon skoru tanımı kullanılır. Gerek dominant gerekse resesif kalıtım varsayımı altında test edilen her üç aday bölgede de kritik bölgenin tamamını kapsayacak şekilde negatif LOD skorlar elde edildiği görülmektedir.

6.TARTIşMA

Hippocrates'in, doğuştan kalça çıkığını ilk kez tarif ettiği ve sebep olarak da gebelik sırasındaki uterus içi basıncı ve doğum eylemi sırasındaki travmaları gösterdiği, MÖ 400'lü yıllardan günümüze değin kalça problemleri çocukluk ve adolesan yaş grubu içerisinde, oldukça sık görülen bozukluklar olarak önemini korumaktadır. GKD, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sık görülen kalça sorunlarının başında yer almaktadır. Özellikle erken dönemde tanısı ve tedavisi mümkün olan bir hastalıktır. Bu nedenle tüm yeni doğanların muayene edilmesi, hastalığın risk faktörlerinin bilinmesi ve riskli hastaların taranması, aynı zamanda önemli bir sosyal sorun olan bu hastalığın önlenmesini mümkün kılacaktır.

Son yıllarda GKD hastalığının patofizyolojisini ortaya çıkarmak amacıyla genetik metotlar kullanılmaya başlanmıştır. Son 40 yıl içinde, birden fazla bireyin etkilendiği geniş aile ve ikiz çalışmaları sonucunda kalça eklemi ilgilendiren pek çok rahatsızlığın etiyolojisinde genetik yatkınlık olduğu anlaşılmıştır (29).

Özellikle son 10 yıl içinde, söz konusu patolojilere yatkınlık yaratan genlerin saptanabilmesi amacıyla bağlantı analizleri başta olmak üzere araştırmalar yapılmış ve ilgili birkaç lokus saptanmıştır (3,4). Ancak belirlenen bu lokuslarda hastalıktan sorumlu tek bir gen etkisi ortaya konamamıştır. Bunun en önemli nedeni; bu hastalığın kompleks bir doğasının olması, klasik mendeliyen kalıtım göstermemesi, etiyolojisinde birden fazla genin (poligenik) ve ayrıca gen + evre (multifaktöriyel) etkileşiminin söz konusu olmasıdır. Kompleks kalıtım gösteren ve gen + evre ilişkilerinin söz konusu olduğu hastalıkların genetik modellemesi tam olarak yapılamadığı için bu hastalıklara yatkınlık yapan genlerin

saptanması güçtür. Ancak bu hastalıklar için de, ailede kalıtsallığın gösterilebildiği ve tek gen kalıtımının modellenenebildiği geniş aileler büyük avantaj olarak kabul edilmektedir. Buna en iyi örnek, bilinen en kompleks hastalık olan kanserlerin genetiğidir. Meme kanserlerinde ailevi yatkınlıklar üzerinden BRCA gen mutasyonlarının tespiti (65), mide kanserinde E-Cadherin gen mutasyonlarının kalıtsal “diffuse gastric” kansere yol açtığına gösterilmesi gibi pek çok örnek kompleks etiyolojili hastalıklarda tek gen kalıtımının rolüne işaret etmektedir. Bu nedenle tez konusu olan aileler GKD malformasyonunun kalıtsal etiyolojisini araştırmada kritik öneme sahiptir.

Pedigri analizi ile genetik kökenli bir hastalığın kalıtım kalıbının saptanması hem araştırmayı planlama hem de sonuca ulaşılması açısından önemlidir. Temel olarak **Aile 2’nin pedigrisi analizi**, otozomal dominant kalıtımı düşündürmekle birlikte otozomal resesif kalıtım da dışlanamamıştır. **Otozomal dominant** kalıtımın özelliği olan; hastalığın kuşak atlamaması, hastalığın hem kızlarda hem de erkeklerde görülmesi ve hasta bireylerin çocuklarında hastalığın %50 oranında ortaya çıkması Aile 2’nin pedigrisinde izlenmektedir (Şekil 7). Birinci kuşaktaki 1 ve 2 numaralı bireyler (I-1, I-2) ile üçüncü kuşaktaki 2 ve 3 numaralı bireylerin (III-2, III-3), çocuklarında hastalığın gözlemlenip, kendilerinde olmaması da bu kalıtım tipinin diğer önemli bir özelliği olan “penetrans eksikliği” ile açıklanabilmektedir. **Otozomal resesif kalıtım** kalıbı açısından incelendiğinde Aile 2’nin pedigrisinde, akraba evliliği yapan tek bir çift olmasına karşın Sivas ilinde akraba evliliğinin yüksek olması (66), birinci (I-1, I-2) ve üçüncü (III-2, III-3) kuşaktaki bireylerin hasta olmamalarına rağmen

çocuklarının hasta olması ve yine 3. kuşaktaki bireylerin (III-4, III-5) her ikisinin ve tüm çocuklarının (IV-4, IV-5, IV-6) hasta olmaları bu kalıtım modelinin de söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Diğer kalıtım kalıpları göz önüne alındığında; babadan oğula kalıtımın gözlenmesi nedeni ile aile 2'nin pedigrisi hem **X'e bağlı resesif kalıtım** modeline hem de **X'e bağlı dominant kalıtım** modeline uymamaktadır.

Aile 12, Ankara'da yerleşmiş ve rölatif olarak Aile 2'den daha büyük bir ailedir. **Pedigri analizinde**, hastalığın her kuşakta görülmesi nedeni ile kalıtım kalıbı otozomal dominantta daha çok uymaktadır (Şekil 8). İkinci kuşakta (II-1) bir bireyde hastalığın gözlemlenmeyip çocuklarında (III-2, III-4) ortaya çıkması OD kalıtımının penetrans eksikliği ile açıklanabilir. **Otozomal resesif kalıtım** kalıbından ise ikinci kuşakta akraba olmayan ancak hasta olan (II-8, II-9) bireylerin çocuklarının (III-6, III-7, III-8) hiçbirinin hasta olmaması nedeniyle uzaklaşılmasına rağmen, hastalığın genetik heterojenitesinin yüksek olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca ikinci kuşaktaki sağlam bireylerin (II-1, II-2) çocuklarında hasta bireylerin (III-2, III-4) olması da resesif kalıtım kalıbını desteklemektedir. Bu nedenle kalıtım modeline net olarak karar verilemediğinden, istatistiksel analizler yapılırken resesif model de incelenmiştir.

X'e bağlı resesif kalıtım modelinde, normal bir erkekle evlenen hasta bayanların, kız çocuklarında bu hastalığın görülmesi beklenemeyeceğinden Aile 12'nin pedigri analizi bu kalıtım kalıbına uyum göstermemektedir. İkinci kuşaktaki eşinin (II-2) ve kendisinin (II-1) sağlıklı olduğu varsayılan bireyin, kızlarının (III-2, III-4) hasta olması nedeni ile daha çok babadan oğla kalıtım

gözlenmesi ile ekarte edilebilen **X'e bağılı dominant kalıtım** modeli, erkek hasta görülmeyen Aile 12 pedigrisinde de ekarte edilebilmiştir.

Bu durumda, literatür bilgileri de kullanılarak bu ailelerde hastalığı oluşturan tek bir major gen olduğu varsayımı üzerinde durulmuş ve istatistikî analizleri, hem otozomal dominant, hem de otozomal resesif kalıtım kalıpları ön görülerek yapılmıştır.

Çalışmada aday lokalizasyon yaklaşımı kullanılarak daha önce GKD malformasyonu ile ilgili olduğu bildirilen toplam üç lokalizasyon için bağlantı analizi çalışması yapılmıştır. Bu lokalizasyonlardan ilki Roby ve arkadaşlarının (1999), Beukes tipi GKD ile ilişkilendirdikleri kromozom 4q35 loküsüdür. Roby ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada GKD loküsü D4S1554 ile D4S3051 DNA markırları arasındaki 11-cM'lik bölgeye haritalanmıştır (Şekil 14). Fiziksel olarak bu bölge 4 numaralı kromozomun 184,9-188,0 megabazları arasında bulunan bölgedir ve fiziksel büyüklüğü 3,1 Mb'dir. Çalışmamızda bölgeyi tamamen kapsayan üç adet DNA markırı, D4S1554 (184,92 Mb)-D4S1408 (185,38Mb) ve D4S1540 (186,49 Mb) kullanılmış ve bağlantı analizinde her üç markır içinde hastalık ve markır alelleri arasında negatif LOD skor oranları elde edilmiştir (Tablo 4-5-6-7) . Bu markırlardan en çok bilgi alınan DNA markırı D4S408 dir ve sadece bu markıra ait sonuçlar bölgeyi hem telomerik hem de sentromerik tarafından 7 cM (toplam 14cM) olacak şekilde dışlamıştır.

GKD için ikinci aday bölge Mabuchi ve arkadaşlarının (2006), tanımladığı kromozom 13q22'de yeralan D13S1296 ve D13S162 markırları arasındaki 6cM'lik bölgedir (Şekil 11). Bölgeden seçilen altı adet DNA markırı ile negatif

LOD skorlar elde edilmiş, D13S1296 ve D13S162 markırları bölgeyi sentromerik tarafta 7cM, telomerik tarafta da 13cM olacak şekilde dışlamıştır. Bu durum 69-75 megabazlar arasında yer alan bölgenin tamamen dışlandığı anlamına gelmektedir. Analizlerde test edilen üçüncü bölge ise yine Mabuchi ve arkadaşları tarafından yapılan genom taraması çalışmasında (2006) maksimum LOD skorun 2,26 saptanması nedeniyle seçilen ve kromozom 6q16'da yer alan D6S2418 ile D6S1692 markırları arasındaki 3,3 cM'lik bölgedir (Şekil 17). Bölge fiziksel olarak 101,4-103,5 megabazlar arasında kalan 2 Mb'lik bir alandan ibarettir ve bu bölgeyi taramak için seçilen üç markır da negatif LOD skor vermiştir.

LOD skor analizlerine eş zamanlı olarak yapılan haplotip analizleri de her üç bölgenin dışlanmasını teyid etmiştir. İlgili bölgeler olası bir otozomal resesif kalıtım varsayımı altında da test edilmiş ve her üç bölge bu varsayım altında da dışlanmıştır (Tablo 5 ve Tablo 7)

Günümüze kadar bildirilen, GKD ile ilişkilendirilmiş kromozom bölgelerinin tezimizde dışlanması, yani bağlantı göstermediğinin anlaşılması başka bir lokus/lokusların varlığını, yani hastalığın genetik heterojenite gösterdiğini düşündürmektedir. Bu durumda ya farklı aday gen yaklaşımı ile bağlantı analizlerine devam etmek ya da tüm genomun rastgele taraması prensibine dayalı genom-boyu tarama çalışması planlanması uygun olacaktır. İlgili tez çalışması, kullanılan ailelerin genom boyu analiz için gücünün çok yüksek olduğunu da ispatlamıştır. Özellikle dışlanma analizinde markırlar informatif olduğu durumda istatistik açıdan dışlanma için anlamlılık ölçütü olan $Z_{max} = -2$ değerine rahatlıkla ulaşılabilmektedir. Bu durum genom boyu

analizlerde Tip I hata (bağlantı olmaması halinde bağlantı varmış sonucu alınması) olasılığını düşürmektedir.

İleriye yönelik yapılması planlanan çalışmalarda aday gen yaklaşımı benimsendiği takdirde GKD etiyojisinde fonksiyon açısından önemi olabilecek genler şu şekilde özetlenebilir. Bilindiği gibi eklem oluşumu hücresel olayların karmaşık bir düzende meydana gelmesiyle ortaya çıkmaktadır. Kıkırdak yapının ossifikasyonu ve uzun kemik taslağı eşzamanlı olarak belirlenmektedir. Moleküler teknikteki ilerlemeler sayesinde “bone morfojenik proteinlerin” (BMPs-gelişimde anahtar rol oynayan bir hücre sinyal molekülleri ailesi), eklem oluşumunun çok önemli bir komponenti olduğu anlaşılabilmektedir. Büyüme ve diferansiyasyon faktörü 5 (GDF-5), üzerinde en çok çalışılan ve uygun eklem gelişimi için gerekli olan BMP’dir. Kromozom 20q11.2 de lokusu bulunmuş olan GDF-5, hücresel yoğunlaşmanın erken dönemlerinden hücre kavitasyonuna kadar, ekstremitenin gelişmekte olan eklemlerinin hemen hepsinde tespit edilmiştir (67). Kollajen bağların oluşumundan sorumlu 17q21.3 lokalizasyonlu COL1A1, 17q22 lokalizasyonlu COL1A2 ve 2q31 lokalizasyonlu COL1A3 genleri ve konnektif doku oluşumundan sorumlu 6q23.1 lokalizasyonlu CTGF geni ilk olarak çalışılması planlanan aday gen bölgeleridir (68).

Bu bölgelerin negatif çıkması durumunda genom-boyu tarama çalışmalarına geçilmesi zorunlu olacaktır. Son yıllarda SNP çip teknolojisinin gelişmesi tek bir deneyde genomu 10.000-1.000.000 SNP ile çalışılabilecek boyuta getirmiştir. Bu denli büyük bir rezolüsyonun tez içeriğinde kullanılan STR markırları ile elde edilebilmesi mümkün değildir. Yine gerek zaman gerekse efor

açısından çip analizleri büyük avantajlar sunmaktadır. Genom boyu analiz yapıldığında tüm kromozomların çok sık aralıklarla taranması hem parametrik ve non-parametrik linkage analizlerinin eş zamanlı olarak kullanılmasını olanaklı kılmakta, hem de sitogenetik analiz ile tespit edilemeyecek ölçüdeki mikrolelesyon ve duplikasyonların tespit edilebilmesini olanaklı kılmaktadır. Maliyet açısından aday gen yaklaşımına göre daha pahalı bir yöntemdir. Ancak kazandıracağı avantajlar açısından tartışılmaz bir üstünlüğe sahiptir. Tüm bu yönleri ile düşünüldüğünde ilgili tez çalışması genom boyu analizleri başlatacak yeterli ön veriye sahiptir ve GKD etiyolojisine yol açan gen/genlerin bulunması yolunda kritik bir aşamayı tamamlamıştır.

7. SONUÇLAR

- Gelişimsel kalça displazisi (GKD), femur başının asetabulumu yerleşme anomalisidir. Asıl etiyolojik sebep bilinmemekle birlikte; mekanik faktörler, fizyolojik etkenler ve genetik faktörler üzerinde durulmaktadır.
- Kalıtsal GKD etiyolojisinde otozomal dominant, eksik penetrans varsayımı genom taramalarında kullanılabilecek etkin bir varsayımdır.
- Kalıtsal GKD genetik olarak heterojen bir hastalıktır.
- Çalışmamızda, GKD ile ilişkili olduğu düşünülen kromozom 4q35'te, D4S1554 ile D4S3051 markırları arasındaki 8-cM'lik bölge, kromozom 13q22'te, D13S1296 ve D13S162 markırları arasındaki 6-cM'lik bölge ve kromozom 6q16'da D6S2418 ile D6S1692 markırları arası 3,3-cM'lik bölge dışlanmıştır.
- Genetik heterojenitesi yüksek ve kompleks kalıtıldığı düşünülen GKD hastalığı için asosiyasyon çalışmaları planlanmadan önce tek gen varsayımını destekleyen ailelerin bulunması ve üç kuşak boyunca örneklenebilmesi bu hastalığa yol açan genlerin saptanabilmesinde tartışmasız öneme sahip çalışmalardır.

8. KAYNAKLAR

1. Kutlu A, Memik R, Mutlu M, Kutlu R, Arslan A.: Congenital dislocations of hip and its relation to swaddling used in Turkey. *J of Pediatr. Orthop.* 1992;12:598-602
2. Carter C, Wilkinson J. Persistent joint laxity and congenital dislocation of the hip. *J Bone Joint Surg [Br]* 1964;46:40-5
3. Philip Roby, Stephen Eyre, Jane Worthington, Rajkumar Ramesar, Hendrik Cilliers, Peter Beighton, Michael Grant, And Gillian Wallis, Autosomal Dominant (Beukes) Premature Degenerative Osteoarthropathy of the Hip Joint Maps to an 11-cM Region on Chromosome 4q35. *Am. J. Hum. Genet.* 64:904–908, 1999
4. Akihiko Mabuchi, Shigeru Nakamura, Yoshio Takatori, Shiro Ikegawa. Familial osteoarthritis of the hip joint associated with acetabular dysplasia maps to chromosome 13q. *Am J Hum Genet.* 2006 Jul; 79:163-8 16773577
5. Klisic P. Congenital dislocation of the hip: a misleading term. *J Bone Joint Surg* 1989;71-B:136
6. Hass J. Congenital dislocation of the hip. Springfield, Ill., Thomas 1951
7. Dupuytren G. Original or congenital displacement of the heads of the thigh bones. *Clin Orthop* 1964; 33:3
8. Putti V.: Per. Ia cura. precoce. della. lussazione. congenita. dell'anca. *Arch Ita/Chir* 1927; 18:653-68

9. *Ortolani M: Congenital hip dysplasia in the light of early and very early diagnosis. Clin Orthop. 1976;119:6*
10. *Barlow T: Early diagnosis and treatment of congenital dislocation of the hip. J Bone Joint Surg 1962;44-B:262*
11. *Graf R, Tschanner C, Klopsch W. Progress in prevention of late developmental dislocation of the hip by sonographic newborn hip 'screening': results of a comparative follow-up study. J Pediatr Orthop Part B 1993;2:115-21*
12. *Watanabe,R.S.: Embryology of the human hip. Clin Orthop. 98:8,1974*
13. *Kapıcıoğlu S., Ömeroğlu H., Köse N., Sarısözen B., Senaran H., TOTBGD Dördüncü 0-6 ay arası Gelismisel Kalça Displazisi (GKD) ve Dogustan Çarpık Ayak(PEV) tanı ve tedavisi uygulamalı kursu kitapçığı Haziran-2006 Konya,*
14. *Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 1998*
15. *Stuart L Weinstein; Scott J Mubarak; Dennis R Wenger Developmental hip dysplasia and dislocation: Part I Journal of Bone and Joint Surgery; Sep 2003; 85, 9; Health & Medical Complete pg. 1824*
16. *Weinstein SL.Natural history of congenital hip dislocation (CDH) and hip dysplasia. Clin Orthop Relat Res. 1987 Dec;(225):62-76*
17. *Jones G, Schoenecker P, Dias L. Developmental hip dysplasia potentiated by inappropriate use of the Pavlik harness. J Pediatr Orthop 1992;12:722*

18. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi 1.-2. Cilt. Günes Kitabevi, Ankara, 2001.*
syf:22,75,201
19. Ponseti IV: *Growth and development of the acetabulum in the child: Anatomical, histological and roentgenographic studies. J Bone J Surg 60-A: 575-585, 1978*
20. Stuart L Weinstein; Scott J Mubarak; Dennis R Wenger *Developmental hip dysplasia and dislocation: Part I Journal of Morrissey RT, Weinstein SL: Development hip dysplasia and dislocation. I: Morrissey RT, Weinstein SL, editors Lovell and Winter's pediatric Lippincott Williams and Wilkins, p.905-934, 2001 Orthopaedics Vol 2, 5th ed. Philadelphia: L Bone and Joint Surgery; Sep 2003; 85, 9; Health & Medical Complete pg.1824*
21. Fabry G, MacEwen GD, Shands AR. *Torsion of the femur. J Bone Joint Surg Am 1973;55:1726-38*
22. Ishi Y, Weinstein S, Ponseti I. *Correlation between arthrograms and operative findings in congenital dislocation of the hip. Clin Orthop 1980;9:391*
23. Tachdjian *Pediatrics Orthopedics, Developmental Dysplasia of the Hip, Vol. 1, 3rd edition, W. B. Saunders Co, p:513-704, 2002*
24. Rosendahl K, Markestad T, Lie RT: *Developmental dysplasia of the hip: a population- based comparison of ultrasound and clinical findings. Acta Paediatr 1996; 85:64*
25. Barlow T: *Early diagnosis and treatment of congenital dislocation of the hip. J Bone Joint Surg 1962; 44-B:262*

26. Kutlu A, Memik R, Mutlu M, Kutlu R, Arslan A., *Congenital dislocation of the hip and its relation to swaddling used in Turkey. J Pediatr Orthop* 1992;12:598-602
27. Eli Peled MD, Mark Eidelman MD, Alexander Katzman MD, Viktor Bialik MD *Clin Orthop Relat Res* (2008) 466:771–775
28. Doğruel, H., Atalar H., Yavuz O.Y., Uraş İ., Günay C., Şaylı U., *Türkiye’de Gelişimsel Kalça Displazisi Sıklığının Ve Tarama Programlarının Değerlendirilmesi Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008, 28:357-360
29. Carter C, Wilkinson J: *Genetic and environmental factors in the etiology of CDH. Clin Orthop* 1964;33:119
30. Özdemir N.: *Doğumdan sonra gelişen kalça çıkığı ve etyopatolojisi. Kalça cerrahisi ve sorunları (Ed) R. Ege S:193-200 THK Basımevi Ankara, 1994)*
31. Kutlu A, Memik R, Mutlu M, Kutlu R, Arslan A. *Congenital dislocation of the hip and its relation to swaddling used in Turkey. J Pediatr Orthop* 1992;12:598-602
32. Rosen SV: *Diagnosis and treatment of congenital dislocation of the hip joint in the newborn. J Bone Joint Surg* 1962;44-B:28,
33. Von Rosen S. *Diagnosis and treatment of congenital dislocation of the hip joint in the new born. J Bone Joint Surg Br* 1962;44:284-91,

34. Walker J. *A preliminary investigation of congenital hip disease in the Island Lake Reserve population, Manitoba. Winnipeg, University of Manitoba, Department of Anthropology, 1973*
35. Edelstein J. *Congenital dislocation of the hip in the Bantu. J Bone Joint Surg 1966;48-B:397*
36. Coleman S. *Congenital dysplasia of the hip in the Navajo infant. Clin Orthop 1968; 56:179*
37. Saunders W. B., Tachdjian Pediatrics Orthopedics, *Developmental Dysplasia of the Hip, Vol. 1, 3.th edition, p:513-704, 2002*
38. E. A Roovers; M M Boere-Boonekamp; T S A Geertsma; G A Ziethuis; A H M Kerkhoff *Ultrasound screening for developmental dysplasia of the hip in infants Journal of Bone and Joint Surgery; Jul 2003; 85, 5; Health & Medical Complete pg.726,*
39. Rosenberg, Henrietta Kotlus M.D.; Losik, Steve B. M.D.; Smergel, Eleanor M.D. *Developmental Dysplasia of the Infant Hip. Contemporary Diagnostic Radiology. 29(4):1-7, February 15, 2006*
40. Kapıcıoğlu S., Ömeroğlu H., Köse N., Sarısözen B., Senaran H., *TOTBGD Dördüncü 0-6 ay arası Gelismisel Kalça Displazisi(GKD) ve Dogustan Çarpık Ayak (PEV) tanı ve tedavisi uygulamalı kursu kitapçığı Haziran-2006 Konya,*
41. Smergel, Eleanor MD; Losik, Steve B. MD; Rosenberg, Henrietta Kotlus MD, *FACR, FAAP Sonography of Hip Dysplasia Ultrasound Quarterly.20(4):201-216, December 2004*

42. Thieme WT, Wynne-Davies R.: *Clinical examination and urinary oestrogen assays in newborn children with congenital dislocation of the hip. J. Bone J Surg. 50-B(3):546-550. 1968*
43. Jensen B, Reimann I, Fredensborg N. *Collagen type III predominance in newborns with CDH. Acta Orthop Scand 1986;57:362*
44. Muller G, Seddon H. *Later results of treatment of CDH. J Bone Joint Surg 1953;35-A:342*
45. Dunn P: *Prenatal observation on the etiology of congenital dislocation of the hip. Clin Orthop 1976;119:11*
46. Wyne-Davies R. *Acetabular dysplasia and familial joint laxity: two etiological factors in congenital dislocation of the hip. A review of 589 patients and their families. J Bone Joint Surg Br. 1970 Nov;52(4):704-16.*
47. Coleman S. *Congenital dysplasia of the hip in the Navajo infant. Clin Orthop 1968;56:179*
48. Nussbaum R., McInnes R., Willard H. *Thompson&Thompson Genetics in Medicine, 2006, Sf 46-48*
49. Nussbaum R., McInnes R., Willard H. *Thompson&Thompson Genetics in Medicine, 2006, Sf 117-118*
50. Terrence S. Furey* and David Haussler *Integration of the cytogenetic map with the draft human genome sequence Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, No. 9 1037-1044*
51. KW Broman, JC Murray, VC Sheffield, RL White and JL Weber (1998) *Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-specific variation*

- in recombination. American Journal of Human Genetics 63:861-689.) ve Mamalian Genotyping Center, National Heart, Lung and Blood Institute, Marshfield Clininics, USA*
52. Akarsu.N.,Lüleci,G.: *Gen haritalaması: Ne demek, haritalar nasıl oluşturuluyor, neler içeriyor, nasıl yorumlanıyor. DEU Tıp Fakültesi Dergisi özel sayısı 29–39, 2002*
53. Akarsu N.(1999) *Genetik Hastalıklara neden olan genlerin saptanmasında aile ağacı (pedigri) analizlerinin önemi.Hacettepe Tıp Dergisi, 30(1): 85-9*
54. Wynne-Davies R. *A family study of neonatal and late diagnosis congenital dislocation of the hip. J Med Genet 1970;7.315–33*
55. Boernfors S, Palsson K, Skude G. *Hereditary aspects of hip dysplasia in German shepherd dogs. J Am Vet Med Assoc 1964;145,15–20*
56. Horton WA, Schimke RN, Kennedy J, DeSmet A. *Autosomal dominant inheritance of congenital dislocation of the hip. Am J Hum Genet 1979;31:74A*
57. Beighton P, Christy G, Learmonth ID *Namaqualand hip dysplasia: an autosomal dominant entity. Am J Med Genet. 1984 Sep;19(1):161–9)(Ciliers, H. J.; Beighton, P. : Beukes familial hip dysplasia: an autosomal dominant entity. Am. J. Med. Genet. 36: 386-390, 1990*
58. Ceylaner G., Ceylaner S., Üstünkan F., İnan M., *Autosomal dominant inheritance of congenital dislocation of the hip in 16 members of a family. Acta Orthop Traumatol Turc, Vol 42, No 4 (2008)*

59. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1993).
"Chapter 5". *An Introduction to Genetic Analysis* (5th ed.). New York:
W.H. Freeman and Company
60. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease.
Science. 2008 Nov 7;322(5903):881-8. Review, Akarsu.N., Lüleci, G.: Gen
haritalaması: Ne demek, haritalar nasıl oluşturuluyor, neler içeriyor, nasıl
yorumlanıyor. *DEU Tıp Fakültesi Dergisi özel sayısı* 29–39, 2002
61. Lathrop GM, Lalouel JM. Easy calculations of LOD scores and genetic
risks of small computers. *Am. J. Hum. Genet* 1984; 36:460-465.
62. Ott J. Computer simulation methods in human linkage analysis *Proc. Natl.
Acad. Sci USA* 1989; 86; 4175-4178.
63. Abecasis GR, Wigginton JE. Handling marker-marker linkage
disequilibrium: Pedigree analysis with clustered markers. *Am. J. Hum.
Genet* 2005; 77: 754-767.
64. Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin rapid analysis
of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet*; 2002; 30;
97-101
65. Öztürk M. Meme kanserinin genetiği ve risk faktörleri İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp
Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi Aralık 2006
sf.15-26
66. Düzcan F., Sezgin İ., Çolak A., Çınar Z., Perçin F.: Sivas Populasyonunda
Akraba Evliliği Sıklığı ve İlk Evlenme Yaşı ile Eğitim Düzeyi Arasındaki

İlişkiler. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 17(3): 157-161, 1995.

67. Storm EE, Kingsley DM. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol* 1999;209(1):11-27

68. Jia L, Ho NC, Park SS, Powell J, Francomano CA Comprehensive resource: Skeletal gene database. *Am J Med Genet.* 2001 Winter;106(4):275-81

9.ÖZET

“Gelişimsel kalça displazisi ile ilişkili gen/genlerin araştırılması”

Gelişimsel Kalça Displazisi (GKD), femur başının asetabulumuna yerleşmesi ile ilgili sık rastlanılan bir anomalidir. Kapsüler laksiyite ile femoral başın hafif insitabilitesinden, femoral başın asetabulumdan tam çıkığına kadar değişen şiddette görülebilmektedir. Genelde bilateral olup, kadınlarda, erkeklere oranla daha sık (5:1) görülmektedir. GKD daha çok izole olarak karşımıza çıkmakla birlikte, farklı sendromların bulgusu ya da kromozomal anomalilerle birlikte de görülebilmektedir. Görülme sıklığını etkileyen önemli bir diğer faktör de, coğrafik ve ırksal dağılımlardır.

Literatürde, bu hastalığının kalıtım modeli olarak sıklıkla otozomal dominant ve/veya multifaktöriyel kalıtım ifade edilmekle beraber, ortak olarak tek bir gen veya birkaç gen tanımlanamamaktadır. Bu tez çalışması ile bağlantı analizi tekniği kullanılarak GKD hastalığının etiyolojisinde sorumlu olabilecek aday gen ve/veya genlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışma kapsamına, penetrans eksikliği ile birlikte giden otozomal dominant kalıtım modeline sahip, 16 hasta ve 15 sağlıklı bireyden oluşan iki geniş aile alınmıştır. Hastalık ile ilişkili olabileceği düşünülen 3 aday bölgenin (4q32, 6q16 ve 13q23) çalışılması yapılmış ve yapılan haplotip ve iki noktalı LOD skor analizleri sonucunda, GKD ile bu bölgelerin hiçbirine bağlantı gösterilememiştir.

Sonuç olarak, bu tez ile iki büyük ailede bağlantı analiz çalışması yapılarak, günümüze kadar GKD ile birlikteliği sunulan 3 aday bölgenin ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Bu da genetik heterojen olan bu hastalıkta, başka aday genlerin sorumlu olabileceği düşüncesini doğrulamaktadır. Bu nedenle hastalıkla ilişkili olabilecek genleri belirlemek için, bağlantı analiz çalışmalarının devam edilmesinin veya tüm genomun rastgele taranması prensibine dayalı genom-boyu tarama çalışmalarının yapılmasının anlamlı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gelişimsel Kalça Displazisi, aday gen, bağlantı analizi, genetik heterojenite

10.ABSTRACT

“Research of the gene/genes associated with developmental hip dysplasia”

Developmental dysplasia of the hip (DDH) is a common location abnormality of the femoral head in the acetabulum. Its severity ranges from mild instability of the femoral head with slight capsular laxity, through the moderate lateral displacement of the femoral head from the acetabulum. DDH, often bilateral, is more frequent in females than in males, with a ratio of 5:1. It mostly occurs as an isolated anomaly or as a component of the genetic syndromes or chromosomal disorders. The other factors affecting the frequency of the DDH are the geographic and the ethnic differences.

In the literature, genetic inheritance pattern of the DDH was mostly reported as autosomal dominant and/or multifactorial, without a common addressed gene or genes related with this disease. In this project, we aimed to detect the candidate gene or genes accompanying the DDH disease by usage of linkage analysis. Two large family; a total of 16 patients and 15 healthy individuals, autosomal dominantly inherited with reduced penetrance, were studied. Three common reported susceptibility regions (4q32, 6q16 and 13q23) were screened. No linkage could be detected for these regions after the result of haplotype and two-point LOD score analysis.

In this thesis, by using linkage analysis, the chromosomal regions reported until today related with DDH were excluded. As a genetic heterogeneous disorder DDH, could be related with new candidate gene or genes. Linkage analyses studies going on different candidate genes and the genome-wide screening analysis of the genome length based on the principle of random scan will help to evaluate the genetic origin of the disease.

Key Words: Developmental hip dysplasia, linkage analysis, candidate gene, genetic heterogeneity

11.ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı : Kadri
Soyadı : KARAER
Doğum Tarihi ve Yeri : 07.07.1979, Ankara
Eğitimi :2004-2009 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Genetik AD’de Araş. Gör. Dr.
1997-2003 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
1990-1997 Gazi Anadolu Lisesi
Yabancı Dili : İngilizce
Üye Olduğu
Bilimsel kuruluşlar : Tıbbi Genetik Derneği

Bilimsel Etkinlikleri

Tamamlanmış Projeler:

2005-2006 “Fibrillin-1 Gen Polimorfizmi ve Mitral Kapak Hastalığı Riski”

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi 01/2005-56, 2005. **Araştırmacı**

2006- 2007 “Doğumsal Siyanotik Kalp Hastalıklarında Ve Situs Anomalili

Hastalarda CFC1 Geninin R78W Polimorfizm Sıklığı”

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi. **Araştırmacı**

2007- 2008 “Doğuştan Kalça Çıkığı Hastalığında Bağlantı Analizi”

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi. **Araştırmacı**

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

- 1- **Karaer K.**, Karaoğuz M.Y., Ergün M.A., Yeşilkaya E., Bideci A., Perçin E.F.: Floating-Harbor syndrome: A first female turkish patient. Genetic Counseling 17(4):465-468, 2006.
- 2- Koç. A., **Karaer K.**, Cinaz P., Perçin E.F.: A new case of hairy elbows syndrome (hypertrichosis cubiti). Genetic Counseling, 18(3):325-30, 2007.
- 3- Koç. A., Kan D., **Karaer K.**, Ergün M.A., Karaoğuz M, Gücüyener K., Hinreiner S.,Liar B., Perçin E.F.: An unexpected finding in a child with neurological problems: Mosaic ring chromosome 18 European Journal of Pediatrics Jun;167(6):655-9. Epub 2007
- 4- Koç A., Karaoğuz M., Pala E., Kan D., **Karaer K.**, Gücüyener K., Perçin E.F.: A boy with small supernumerary marker chromosome X identified by FISH. Genetic Counseling, 18 (4): 393-399, 2007.
- 5- Akin Sari B, **Karaer K.**, Bodur S, Soysal AS. Case report: autistic disorder in Kabuki syndrome. J Autism Dev Disord. 2008 Jan;38(1):198-201. Epub 2007 Aug 25.
- 6- Koç A., **Karaer K.**, Ergün MA., Karaoğuz MY., Kan D., Cansu A., Perçin F. : A case with a ring chromosome 22. The Turkish Journal of Pediatrics, 50: 193-196, 2008.

- 7-Koç A., Kaymak Öztürk A., **Karaer K.**, Ergün M.A., Aksu T., Perçin E. F.: A case with bilateral radio-ulnar synostosis. Genetic Counseling 2008;19(2):193-8. (Review).
- 8- Karaoguz MY, Pala E, Kula S, **Karaer K.**, Kan D, Nas T, Tunaoglu S. Transposition of great arteries in an infant born after prenatal diagnosis of trisomy 20 mosaicism. Genet Couns. 2007;18(4):437-43.
- 9- Karaer A, **Karaer K.**, Ozaksit G, Ceylaner S, Percin EF. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and recurrent pregnancy loss. Am J Obstet Gynecol. 2008 Dec;199(6):662.e1-5. Epub 2008 Sep 25.
- 10- Yeşilkaya E, **Karaer K.**, Bideci A, Camurdan O, Perçin EF, Cinaz P. Dubowitz syndrome: a cholesterol metabolism disorder? Genet Couns. 2008;19(3):287-90.
- 11- Karaer A, **Karaer K.** Reply. Am J Obstet Gynecol. 2009 Jun 25.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. **Karaer K.**, Yirmibeş Karaoguz M., Pala E., Erdem A.: The Relationship Between Prenatally Determined Familial Reciprocal Translocations (1q23;19q13.3) Breakpoints and Malignancies and Genetic Counseling. Journal Of The Turkish-German Gynecological Association Vol. 7(4) 2006:356-358

2. **Karaer K.**, Koç A., Karaoğuz Y. M., Cansu A., Perçin EF A.: Case of Wolf-Hirschhorn Syndrome with a Characteristic EEG Pattern ; Clinical And Molecular Cytogenetic Diagnosis. Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi (In press)

Ulusal hakemsiz dergilerde yayımlanan makaleler :

1. **Karaer K.**, Ergün M.A. Down Sendromu (Trizomi 21) Çoluk Çocuk Dergisi Aralık 2008 Sayı:85 sf:12-15

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:

- 1) Perçin F.E., **Karaer K.**, Karaoğuz M.Y., Ergün M.A., Özdek S., Özdemir O.: A case with Toriello- Carey syndrome. *European Human Genetics Conference 2006. May 6-9, 2006, Amsterdam, The Netherlands, P0277. (Poster sunusu)*
- 2) **Karaer K.**, Koç A., Ergun M.A., Perçin E.F.: Severe clinical manifestations with inv(3) (p24p13)dn in a girl. *Sixth European Cytogenetics Conference, İstanbul, Türkiye, 7-10 Temmuz 2007. (Poster sunusu)*
- 3) Ergun M.A., Koç A., Kan D., **Karaer K.**, Gucuyener K., Perçin E.F.: A girl with a mosaic ring chromosome 18. *Sixth European Cytogenetics Conference, İstanbul, Türkiye, 7-10 Temmuz 2007. (Poster sunusu)*
- 4) **Karaer K.**, Koç A., Ergün M.A., Perçin F.E.: A patient with de novo duplication of chromosome 13(q31.1→qter) *European Human Genetics*

Conference 2009. May 23-26, 2009, Viyana, Avusturya, P03.104. (Poster sunusu)

Ulusal bilimsel toplantılarda bildiri kitaplarında basılan sözlü sunumlar

1. Perçin EF., **Karaer K.**, Törüner F., Yeşilkaya E., Bideci A.: Ağır Ektodermal Ve Hafif El-Ayak Bulgularına Over Yokluğunun Eşlik Ettiği Bir Aile: Adult Sendromu? EEC3 Sendromu?: Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 83.
2. Pala E., Yırmıbeş Karaoğuz M., Kan D., **Karaer K.**, Erdem A.: Spontan abortusta triploidi ile birlikte seyreden iki ayrı anöploidinin oluşum mekanizmaları Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 71.
3. Perçin EF., **Karaer K.**, Perçin S., Akarsu N., Tıp I Sindaktilide Genetik Heterojenite 8. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi Çanakkale 06-09 Mayıs 2008. Kongre Bildiri Kitabı, s: 119.
4. **Karaer K.**, Yüksel N., Perçin EF. Du Pan Syndrome: The first Turkish patient Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi Çanakkale 06-09 Mayıs 2008. Kongre Bildiri Kitabı, s: 137. **(Birincilik Ödülü)**
5. **Karaer K.**, Yeşilkaya E., Bideci A., Şahin F., Perçin E.F. Oliver-Mcfarlane Sendromlu bir olgu. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi Çanakkale 06-09 Mayıs 2008. Kongre Bildiri Kitabı, s: 138.

6. Ergün M.A., **Karaer K.**, Tuğ E., Koç A., Perçin E.F. De novo inv dup del(8p) olan dismorfik bir vakanın sunumu. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi Çanakkale 06-09 Mayıs 2008. Kongre Bildiri Kitabı, s: 139.
7. **Karaer K.**, Yirmibeş Karaoğuz M., Perçin E.F.: Monosomy 1p36 Syndrome: The first Turkish patient, 4. Dismorfoloji Günleri Taksim, 2009, İstanbul.
8. Erkal Ö., **Karaer K.**, Ergün M.A., Perçin E.F.: A case with Treacher Collins Syndrome, 4. Dismorfoloji Günleri Taksim, 2009, İstanbul.
9. Çavdarlı B., **Karaer K.**, Perçin E.F.: Five cases with FGFR-related craniosynostosis syndrome. 4. Dismorfoloji Günleri Taksim, 2009, İstanbul.
10. Özgen G., **Karaer K.**, Baykaner K., Perçin E.F.: A Turkish case with Cranio-Fronto-Nasal Syndrome 4. Dismorfoloji Günleri Taksim, 2009, İstanbul.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- 1) **Karaer K.**, Yirmibeş Karaoğuz M., Ergün M.A., Yeşilkaya E., Bideci A., Perçin E. F.: Floating-Harbor Sendromu: Olgu Sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s:151.

- 2) **Karaer K.**, Koç A., Serdaroğlu A., Perçin E. F.: Char Sendromlu İki Olgu: Olgu Sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006. Kongre Bildiri Kitabı, s: 156.
- 3) **Karaer K.**, Koç A., Ergün M.A., Perçin E. F.: Ring 14 Sendromu: Olgu Sunumu : Olgu Sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 151.
- 4) **Karaer K.**, Karaoğuz Y. M., Cansu A., Perçin E. F.: Wolf-Hirschhorn Sendromlu Bir Olgu; Klinik Ve Moleküler Sitogenetik Tanı: VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 15.
- 5) **Karaer K.**, Yirmibeş Karaoğuz M., Pala E., Erdem A.: Prenatal Tanıda Ailesel T(119) (q23q13.3) Belirlenen Fetüsün Kırık Bölgelerinin Malignansilerle İlişkisi Ve Genetik Danışma. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 157.
- 6) Koç A., Yirmibeş Karaoğuz M., Pala E., Kan D., **Karaer K.**, Gücüyener K., Ferda E. Perçin: Markır Kromozom X Olgusu: Olgu Sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 151.
- 7) Koç A., **Karaer K.**, Ergün M.A., Yirmibeş Karaoğuz M., Kan D., Cansu A., Perçin E.F.: Halka (Ring) Kromozom 22 Sendromu: VII. Ulusal

Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 157.

- 8) Koç A., **Karaer K.**, Pehlivanlı Aktaş Z., Gücüyener K., Perçin E.F.: Warburg Micro Sendrom'lu Bir Olgu: Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 158.
- 9) Hirfanoğlu İ., Samsa H., Ergenekon E., Koç E., Önal E., Gücüyener K., Perçin. EF., **Karaer K.** Serebro-Okulo-Fasio-Skeletal (COFS) Sendrom 14. Ulusal Neonatoloji Kongresi Antalya 12-16 Nisan 2006. Kongre Bildiri Kitabı, PS-161
- 10) Yeşilkaya E, **Karaer K.**, Bideci A, Camurdan O, Perçin EF, Cinaz P. Dubowitz Sendromu: Olgu Sunumu. 12. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi. Eskişehir 25-28 Ekim 2007. Kongre Bildiri Kitabı, PP-X11
- 11) Çavdarlı B., **Karaer K.**, Ünlüsoy A., Perçin E.F. Anhidrozisli konjenital ağrı duyarsızlığı. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi Çanakkale 06-09 Mayıs 2008. Kongre Bildiri Kitabı, s: 248 (**İkincilik Ödülü**)

Bildirisiz katılan ulusal bilimsel toplantılar:

1. 3. Ulusal Tıbbi Genetik Sempozyumu, Bursa, 27-29 Mayıs 2005.
2. 4. Ulusal Tıbbi Genetik Sempozyumu, I. Norogenetik Sempozyumu, İzmir, 4-6 Kasım 2007.