
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

TÜRK TOPLUMUNDA SENDROMSUZ DUDAK DAMAK YARIKLI HASTALARDA BAZI GEN DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE HASTALIKLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ

Deniz AŞLAR ÖNER

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2018

Deniz AŞLAR ÖNER tarafından hazırlanan "TÜRK TOPLUMUNDA SENDROMSUZ DUDAK DAMAK YARIKLI HASTALARDA BAZI GEN DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE HASTALIKLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum ...

Başkan: Prof. Dr. Yusuf KALENDER

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum ……

Üye: Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum ...

Üye: Doç. Dr. M. Türker DUMAN

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum ...

Üye: Doç. Dr. Suna CEBESOY

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum ...

Tez Savunma Tarihi: 02/02/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

……

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Deniz AŞLAR ÖNER

02/02/2018

TÜRK TOPLUMUNDA SENDROMSUZ DUDAK DAMAK YARIKLI HASTALARDA BAZI GEN DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE HASTALIKLA İLİŞKİLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Deniz AŞLAR ÖNER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2018

ÖZET

Sendromsuz dudak ve damak yarıkları, dünya genelinde görülen en yaygın ve önemli doğum anomalilerinden birisidir. Görülme sıklığı, coğrafik köken, ırk, etnik geçmiş ve sosyo-ekonomik duruma göre değişkenlik göstermektedir. Çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi sonucu oluşan sendromsuz dudak ve damak yarıklarının genetik açıdan incelenmesi için birçok aday gen araştırılmıştır. Çalışmamızda bu aday genler arasında yer alan MTR, MTRR, PVRL1 ve TGFβ1 gen bölgelerinin analizleri yapılarak, yarık dudak ve damak oluşumu üzerine etkisinin olup olmadığının ortaya konulması, sendromsuz dudak ve damak yarıklığı ile ilişkilendirilmesi ve daha sonra yapılacak araştırmalara katkı sağlanması amaçlanmıştır. Sendromsuz dudak ve damak yarıklı 80 hasta ve 125 sağlıklı kontrol bireyin dahil edildiği çalışmada, genomik DNA fenol-kloroform yöntemiyle lökositlerden izole edildikten sonra ilgili gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonuyla (PCR) amplifiye edilmiştir. MTR ve MTRR gen bölgelerinde yer alan değişimler restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemiyle, PVRL1 ve TGFβ1 gen bölgelerinde yer alan değişimler ise DNA dizi analizi yöntemiyle incelenmiştir. Çalışma grubumuzda, MTR gen bölgesinde bulunan A2756G (rs1805087), MTRR genine ait A66G (rs1801394), TGFβ1 geninde ise Pro10Leu (rs1800470) ve Arg25Pro (rs1800471) polimorfizmleri literatürle uyumlu olarak sendromsuz damak yarığı ile beraber olan/olmayan dudak yarıklı Türk hastalarda saptanmıştır. Bunlara ilaveten PVRL1 geni ekzon 3 bölgesinde S174T ve T187N değişimleri ve PVRL1 geni ekzon 6 bölgesinde, c.1311_1313insGGA (g.63736–g.63738) mutasyonu saptanmıştır. GGA insersiyonu 125 sağlıklı bireyin hiçbirinde görülmemiştir. PVRL1 geninde bulunan bu değişimler daha önce rapor edilmemiş ve Human Gene Mutation Database (İnsan Gen Mutasyon Veritabanı, HGMD) veritabanında da henüz tanımlanmamıştır. Bu tez çalışması Türk popülasyonunda sendromsuz damak yarığı ile beraber olan/olmayan dudak yarıkları ile MTR, MTRR, PVRL1 ve TGFβ1 genleri arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma olması ve tanımlanmamış mutasyonların literatüre kazandırılmış olmasından dolayı önemlidir.

Bilim Kodu : 20326
Anahtar Kelimeler : Sendromsuz dudak yarığı ve/veya damak yarığı, MTR, MTRR, PVRL1, TGFβ1, polimorfizm, PCR, RFLP, DNA dizi analizi
Sayfa Adedi : 122
Danışman : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

INVESTIGATION OF SOME GENE VARIATIONS IN PATIENTS WITH NONSYNDROMIC CLEFT LIP AND PALATE IN TURKISH SOCIETY AND THEIR ASSOCIATION WITH DISEASE

(Ph. D. Thesis)

Deniz AŞLAR ÖNER

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2018

ABSTRACT

Nonsyndromic cleft lip and palate is one of the most common and significant congenital malformations with a global occurrence, although its prevalence rate varies based on geographical origin, sex, racial background, ethnicity, and socioeconomic status. Nonsyndromic cleft lip and palate is caused due to the interaction between environmental and genetic factors; in addition, genetic studies on this disorder have investigated numerous candidate genes. In this study, MTR, MTRR, PVRL1, and TGFβ1 gene regions located among these candidate genes were analyzed with the following aims: to determine whether these gene regions affect the formation of nonsyndromic cleft lip and palate, to determine the association between nonsyndromic cleft lip and palate and these gene regions, and to contribute toward future research.This study included a total of 80 Turkish patients with nonsyndromic cleft lip and palate and 125 healthy individuals. After the isolation of genomic DNA from peripheral blood leukocytes using the phenol–chloroform method, the related gene regions were amplified using polymerase chain reaction. Variants located in the MTR and MTRR gene regions were investigated using the restriction fragment length polymorphism method, and variants located in the PVRL1 and TGFβ1 gene regions were investigated using the DNA sequencing method. Results showed the presence of MTR A2756G (rs1805087), MTR A66G (rs1801394), TGFβ1 Pro10Leu (rs1800470), and Arg25Pro (rs1800471) polymorphisms in patients with nonsyndromic cleft lip and palate, which is in accordance with the literature. In addition, we detected S174T and T187N variants in the exon 3 region and c.1311_1313insGGA (g.63736-g.63738) mutation in the exon 6 region of the PVRL1 gene. GGA insertion was not detected in the 125 healthy individuals. The variants that were detected in the PVRL1 gene have not been reported earlier and also not described in the Human Gene Mutation Database. This thesis is an important work as it describes the first study showing the association between nonsyndromic cleft lip and palate in the Turkish population and MTR, MTRR, PVRL1, and TGFβ1 genes and undefined mutations are added to the literature.

Science Code : 20326

Key Words : Nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate, MTR, MTRR, PVRL1, TGFβ1, polymorphism, PCR, RFLP, DNA sequence analysis

Page Number : 122

Supervisor : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteğini ve bilgisi esirgemeyen hocam Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN'a,

Her adımımda yanımda olan sonsuz sevgi ve anlayışlarıyla bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim, biricik annem Ayşe AŞLAR ve babam Erdal AŞLAR'a,

Desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman olumlu düşünmem için elinden geleni yapan canım kardeşim Engin AŞLAR'a,

Deneyimlerini, bilgisini ve yardımlarını her zaman hissettiğim, emsalsiz sevgi ve anlayışıyla her daim yanımla olan sevgili eşim Özer ÖNER'e,

Varlığıyla yuvamızı aydınlatan, mutluluk, huzur ve neşe kaynağımız biricik kızım Defne Duru Öner'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deniz AŞLAR ÖNER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xiv

SİMGELER VE KISALTMALAR xv

1. GİRİŞ 1

2. KURAMSAL TEMELLER 3

2.1. Embriyolojik Gelişim 3

2.2. Dudak ve Damak Yarıklarının Sınıflandırılması 10

2.2.1. Davis ve Ritchie'nin dudak ve damak yarıkları sınıflandırması 11

2.2.2. Veau'nun dudak ve damak yarıkları sınıflandırması 12

2.2.3. Kernahan ve Stark'ın dudak ve damak yarıkları sınıflandırması 12

2.3. Dudak ve Damak Yarıklarının Epidemiyolojisi 17

2.4. Dudak ve Damak Yarıklarının Etiyolojisi 20

2.4.1. Vitamin eksikliği 21

2.4.2. Annenin sigara kullanması 21

2.4.3. Annenin alkol kullanması 22

2.4.4. Annenin ilaç kullanması 23

2.4.5. Annenin kimyasallara maruz kalması 23

2.5. Genetik 24

Sayfa

2.5.1. MTR geni 24

2.5.2. MTRR geni 26

2.5.3. PVRL1 geni 28

2.5.4. TGFβ1 geni 32

2.6. Dudak Damak Yarıkları ile Beraber Görülen Diğer Sendromlar 38

2.7. Dudak ve Damak Yarıklarının Tanısı ve Tedavisi 40

3. MOLEKÜLER TEKNİKLER 43

3.1. Gereçler 43

3.1.1. Cihazlar 43

3.1.2. Kimyasal malzemeler 43

3.2. DNA Ekstraksiyonu 45

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 45

3.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) 49

3.5. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) 51

3.6. DNA Dizi Analizi 53

4. MATERYAL VE YÖNTEMLER 57

4.1. Materyal 57

4.1.1. Çalışma grubunun oluşturulması 57

4.2. Yöntemler 57

4.2.1. DNA izolasyonu 57

4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 58

4.2.3. Agaroz jel elektroforezi 64

4.2.4. PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleriyle muamelesi 65

4.2.5. SSCP yöntemi 66

Sayfa

4.2.6. PCR ürünlerinin temizlenmesi 68

4.2.7. DNA dizi analizi 69

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 71

5.1. MTR Geni Mutasyon Analizi 71

5.2. MTRR Geni Mutasyon Analizi 72

5.3. PVRL1 Geni Mutasyon Analizi 74

5.4. TGFβ1 Geni Mutasyon Analizi 80

6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 83

6.1. MTR Gen Taramasına İlişkin Analiz 83

6.2. MTRR Gen Taramasına İlişkin Analiz 84

6.3. TGFβ1 Gen Taramasına İlişkin Analiz 85

7. TARTIŞMA 87

KAYNAKLAR 103

EKLER 117

EK-1. Etik kurul kararı 118

ÖZGEÇMİŞ 119

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. DSÖ KHY verilerine göre nsCL/P ve nsCP prevalansı 18

Çizelge 2.2. Dudak ve damak yarıkları ile beraber görülen sendromlar 38

Çizelge 2.3. Hastalarda saptanan sendromların dağılımı 39

Çizelge 3.1. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin adlandırılması 49

Çizelge 3.2. Restriksiyon enzimlerin kesme yerleri 50

Çizelge 6.1. MTR geninin nsCL/P'li hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri 83

Çizelge 6.2. MTRR geninin nsCL/P'li hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri 84

Çizelge 6.3. TGFβ1 geninin nsCL/P'li hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri 85

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. (a) İki haftalık embriyoda primitif çizgi oluşumu, (b) notokord oluşumu 3

Şekil 2.2. Primitif çizgi boyunca epiblast hücrelerin hareketi 4

Şekil 2.3. Embriyonik trilaminar germ katmanlarının oluşum süreci 5

Şekil 2.4. (a) Nöral katlantı, (b) nöral oluk oluşumu 6

Şekil 2.5. (a) Nöral oluk, (b) nöral krest oluşumu 7

Şekil 2.6. Farengeal arkların gelişimi 8

Şekil 2.7. (a) Yüzün önden görünümü nazal çukurların maksiller çıkıntıdan derin oluklarla ayrılması, (b) maksiller çıkıntıların medial nazal çıkıntılarla kaynaşması 9

Şekil 2.8. (a) Primer ve sekonder damak oluşumu, (b) Primer ve sekonder damağın nazal septum ile birleşmeleri, (c) birleşen damağın son hali 10

Şekil 2.9. Davis ve Ritchie'nin dudak ve damak yarıkları sınıflandırması 12

Şekil 2.10. Kernahan'ın "bölmeli Y" sembolik sınıflandırması 16

Şekil 2.11. Coğrafi bölgelere göre CL±P sıklığı 17

Şekil 2.12. Avrupada sendromsuz yarık dudak ve damak ile sendromsuz yarık damak prevalansı 19

Şekil 2.13. Birinci kromozomda MTR geninin lokalizasyonu 25

Şekil 2.14. Metiyonin sentaz enziminin yapısı 25

Şekil 2.15. Folat döngüsü 26

Şekil 2.16. Beşinci kromozomda MTRR geninin lokalizasyonu 27

Şekil 2.17. Metiyonin sentaz redüktaz enziminin yapısı 27

Şekil 2.18. On birinci kromozomda PVRL1 geninin lokalizasyonu 28

Şekil 2.19. Nektinler, necl ve afadinin moleküler yapısı 29

Şekil 2.20. Nektinlerin trans etkileşimleri. 30

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.21. Nektin ve nektin benzeri moleküllerin etkileşimleri 30

Şekil 2.22. Hücre adezyonunda nektin- afadin kompleksi 31

Şekil 2.23. TGFβ süper ailesi üyeleri 32

Şekil 2.24. On dokuzuncu kromozomda TGFβ1 geni lokalizasyonu 32

Şekil 2.25. TGFβ1'in büyük latent kompleksi içinde salgılanması 34

Şekil 2.26. İntegrin etkileşimi ile latent TGFβ1'in aktivasyonu 35

Şekil 2.27. LAP-β1'in konformasyonel değişimi ile aktif TGFβ1 oluşumu 35

Şekil 2.28. Ekstraselüler matriks ve TGFβ'nın sentezlemesi 36

Şekil 2.29. TGFβ sinyalizasyonu 37

Şekil 3.1. PCR tekniğinin şematik sunumu 47

Şekil 3.2. Tek nükleotid değişimi ile tanıma bölgesi değişen restriksiyon enziminin kesim sonrası jelde görüntülenmesi 51

Şekil 3.3. SSCP yönteminin çalışma prensibi 52

Şekil 3.4. Sanger metodu ile DNA dizi analiz yöntemi 55

Şekil 4.1. MTR primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge 59

Şekil 4.2. MTRR primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge 60

Şekil 4.3. PVRL1 3a primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge. 61

Şekil 4.4. PVRL1 3b primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge. 61

Şekil 4.5. PVRL1 geni 6.eksonu tarayan primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge 62

Şekil 4.6. TGFβ1 geni 1. eksonu tarayan primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge 63

Şekil 4.7. Agencourt AMPure XP boncukları ile pürifikasyon yönteminin basamakları 68

Şekil 5.1. MTR (265 bç) genine ait bölgenin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, 100 bp DNA Ladder, 1-6: 265 bç'lik PCR ürünü 71

Şekil **Sayfa**

Şekil 5.2. MTR 2756A→G değişiminin *HaeIII* restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü. M: Marker, 100 bp DNA Ladder, 1: Kesilmemiş PCR ürünü, 2 ve 5: heterozigot, 3: yabanıl tip, 4: mutant 72

Şekil 5.3. MTRR genine ait bölgenin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, 100 bp DNA Ladder, 1-6: 66 bç'lik PCR ürünü 72

Şekil 5.4. MTRR 66A→G değişiminin NdeI restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü. M: Marker, 100 bp DNA Ladder, 1: Kesilmemiş PCR ürünü, 2 ve 4: heterozigot, 3: yabanıl tip, 5: mutant 73

Şekil 5.5. PVRL1 3a genine ait bölgenin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü, M: Marker, φX174 DNA-HaeIII, 1-6: 199 bç'lik PCR ürünü 74

Şekil 5.6. PVRL1 geninde bant farklılığı saptanan 3a ekzonunun SSCP jel görüntüsü, ↑ ile işaretlenmiş örnekler farklı bantları göstermektedir..... 74

Şekil 5.7. PVRL1 geninin 3a ekzonundaki değişimlerin DNA dizi analizi görüntüsü, TCA→ACA (S174T) değişimi (a) Yabanıl tip (b) ACT→AAT (T187N) değişimi (c) Yabanıl tip (d) S174T ve T187N değişimi (e) değişimler sonucu oluşan amino asit dizilimi 75

Şekil 5.8. PVRL1 3b (201 bç) genine ait bölgenin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, φX174 DNA-HaeIII, 1-6: 201 bç'lik PCR ürünü 76

Şekil 5.9. PVRL1 geninde 3b ekzonunun SSCP jel görüntüsü 77

Şekil 5.10. PVRL1 geninin 3b ekzondaki değişimlerin DNA dizi analizi görüntüsü ... 77

Şekil 5.11. PVRL1 (750 bç) genine ait 6. ekson bölgesinin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, φX174 DNA-HaeIII, 1-6: 750 bç'lik PCR ürünü..... 78

Şekil 5.12. PVRL1 geninde PstI enzimi ile kesim sonrası bant farklılığı saptanan 6. ekzonun SSCP jel görüntüsü, ↑ ile işaretlenmiş örnekler farklı bantları göstermektedir..... 78

Şekil 5.13. (a) PVRL1 geninin 6. ekzonundaki değişimlerin DNA dizi analizi görüntüsü (b) değişim sonucu oluşan amino asit dizilimi 79

Şekil 5.14. TGFβ1 (523 bç) genine ait 1. ekson bölgesinin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, φX174 DNA-HaeIII, 1-6: 523 bç'lik PCR ürünü 80

Şekil 5.15. TGFβ1 geninde HphI enzimi ile kesim sonrası bant farklılığı saptanan ekzonun SSCP jel görüntüsü, ↑ ile işaretlenmiş örnekler farklı bantları göstermektedir 80

Şekil **Sayfa**

Şekil 5.16. TGFβ1 gen değişimlerin DNA dizi analizi görüntüsü, (a) 29C/T(P10L) değişimi ve yabanıl tip (b) 74G/C (R25P) değişimi ve yabanıl tip P10L ve R25P (c) değişimler sonucu oluşan amino asit dizilimi..... 81

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. Kernahan'ın sadece primer damak yarığı, (a)unilateral tam yarık (b) unilateral tam olmayan yarık 13

Resim 2.2. Kernahan'ın sadece primer damak yarığı, median tam yarık 13

Resim 2.3. Kernahan'ın sadece primer damak yarığı, (a) bilateral tam yarık, (b) bilateral tam olmayan yarık 14

Resim 2.4. Kernahan'ın sadece sekonder damak yarığı, (a) tam yarık, (b) tam olmayan yarık, (c) submukoz yarık 14

Resim 2.5. Kernahan'ın primer ve sekonder damağın birlikte yarıkları, (a) unilateral tam yarık, (b) unilateral tam olmayan yarık 15

Resim 2.6. Kernahan'ın primer ve sekonder damağın birlikte yarıkları, (a) median tam yarık, (b) tam olmayan yarık 15

Resim 2.7. Kernahan'ın Primer ve sekonder damağın birlikte yarıkları, (a) bilateral tam yarık, (b) bilateral tam olmayan yarık 16

Resim 2.8. Yarık dudaklı bir hastanın ameliyattan (a) önceki ve (b) sonraki görünümü 40

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
bç	Baz çifti
dk	Dakika
ml	Mililitre
mg	Miligram
kD	Kilodalton
pmol	Pikomol

Kısaltmalar	Açıklamalar
A	Adenin bazı
AJ	Adherens kompleksi
AgNO3	Gümüş nitrat
Asp	Aspartik asit
C	Sitozin bazı
CI	Güven aralığı
CL/P	Dudak damak yarıkları
CLPED1	Yarık dudak damak ektodermal displazi sendromu
CP	İzole damak yarıkları
DS	Desmozom
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dNTP	Deoksinükleotit trifosfatlar
ddNTP	Dideoksinükleotid trifosfatlar

Kısaltmalar	Açıklamalar
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
G	Guanin bazı
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin amino asiti
HaeIII	Haemophilus aegyptius
HGMD	İnsan Gen Mutasyon Veritabanı
İns	İnsersiyon
I	İzolösin amino asiti
KCl	Potasyum klorür
L	Lösin amino asiti
M	Metiyonin amino asiti
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
MS	Metiyonin sentaz
MSR	Metiyonin sentaz redüktaz
MTR	5-Metiltetrahidrofolat metiltransferaz
MTRR	5-Metiltetrahidrofolat metiltransferaz redüktaz
MTHFR	Metilentetrahidrofolat redüktaz
N	Asparajin amino asiti
NaCl	Sodyum klorür
NADPH	Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NdeI	Neisseria denitrificans
NSCL/P	Sendromsuz dudak damak yarıkları
NTD	Nöral tüp kusurları
OFC	Orafasiyel yarık
OR	Risk oranları
P	Prolin amino asiti
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

Kısaltmalar	Açıklamalar
pH	Asitlik-Bazlık Derecesi
PVRL1	Poliovirus ilişkili reseptör 1
RBC	Kırmızı kan hücresi
RE	Restriksiyon endonükleaz
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
S	Serin amino asiti
SAH	S-Adenozil homosistein
SAM	S-adenosilmetiyonin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SSCP	Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi
T	Timin bazı
T	Treonin amino asiti
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris borik asit EDTA
tHcy	Total plazma homosisteinin
TGFβ1	Transforme edici büyüme faktörü beta 1
TJ	Sıkı bağlantı kompleksi

1. GİRİŞ

Dudak damak yarıkları, dünya genelinde görülen en yaygın doğum anomalilerinden birisidir. 500 canlı doğumda 1 ile 2500 canlı doğumda 1 görülen dudak damak yarıklarının görülme sıklığı, etnik geçmiş, coğrafi köken ve sosyo-ekonomik duruma göre değişkenlik göstermektedir (van den Boogaard, Dorland, Beemer ve van Amstel, 2000).

Dudak damak yarıkları, çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi sonucu oluşan multifaktoriyel bir hastalıktır. Hamilelik sırasında annenin sigara içmesi, alkol tüketmesi, antiepileptik ilaç kullanması, B6 ve B12 vitaminlerince yetersiz beslenmesi gibi çevresel faktörler ile beraber genetik faktörlerin etkileşimi, yarık dudak damak oluşumuna sebep olabilmektedir (Pezzetti ve diğerleri, 2004).

Genel olarak dudak damak yarıkları, damak yarığı ile beraber olan/olmayan dudak yarıkları (CL/P) ve izole damak yarıkları (CP) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Aynı zamanda belirli anomalilerin veya izole anomalilerin varlığına veya yokluğuna dayandırılarak, sendromik ve sendromsuz (nonsendromik, nsCLP) yarıklar olarak sınıflandırılmaktadır.

CL/P hastaların yaklaşık %70'i ve CP hastaların %50'si sendromsuz yarıklar sınıfında yer almaktadır. Kalan hastalarda ise, kromozom anomalileri ve teratojenlerin yanı sıra 500'den fazla tanımlanmış mendeliyen sendromları içeren geniş aralıkta bir malformasyon sendromu görülmektedir (Carinci, Scapoli, Palmieri, Zollino ve Pezzetti, 2007; Dixon, Marazita, Beaty ve Murray, 2011; Stuppia ve diğerleri, 2011).

Sendromsuz dudak damak yarıklarının görülme sıklığı, Afrika kökenli popülasyonlarda, 1000 doğumda 0,3, Avrupa kökenli popülasyonlarda 1000 doğumda 0,7–1,3, Asya kökenli popülasyonlarda 1000 doğumda 1,4-2,1 ve Amerikan kökenli popülasyonlarda 1000 doğumda 3,6 olarak bulunmuştur (Brito ve diğerleri, 2011).

Sendromsuz dudak damak yarıklarının genetik açıdan incelenmesi için *SUMO1, RAR, IRF6, MSX1* vb. genlerinin içinde bulunduğu birçok aday gen araştırılmıştır (Blanton ve diğerleri, Tseng, Hsiao, Hsiao, Tsai ve Chiu, 2006; Tang, Wang, Han, Guo, Wang, 2014).

Çalışmamızda bulunan *MTR, MTRR, TGFβ* ve *PVRL1* genleri sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşumunda önemli bir yer tutmaktadır. *MTR* ve *MTRR* genleri folat döngüsünde yer alan enzimleri kodlamaktadır. MTR enzimi, metiyonin ile total plazma homosisteinin (tHcy) remetilasyonu için 5-metiltetrahidrofolattan gelen metil grubunu kullanır, DNA sentezi için önemlidir. MTRR, metiyonin sentez enzimi ile birlikte homosisteinin metiyonine geri dönüşümünde ortak hareket eder. MTRR, metiyonin sentezinde kullanmak için yeniden metil B12 oluşturarak, DNA metilasyonunda önemli rol oynar (Yamaji ve diğerleri, 2009; Bhaskara, Murthy ve Venkatesh Babu, 2011).

PVRL1 geni, hücre adhezyon molekülü olan nektini kodlamaktadır (Takahashi ve diğerleri, 1999). Epitel hücrelerde hücre-hücre bağlantılarının ve sıkı bağlantı bölgelerinin regülasyonunda rol oynayarak palatogenez sırasında damak rafların füzyonunu gerçekleştirmektedir. Gende meydana gelen tüm değişimler, genin aktivasyonunu veya transkripsiyonel regülasyonunu değiştirerek gen fonksiyonunu bozmaktadır (Turhani ve diğerleri, 2005; Scapoli ve diğerleri, 2006; Tseng, Hsiao,Hsiao, Tsai ve Chiu, 2006).

TGFβ1 geni, dudak ve damak gelişiminde hücre çoğalması, hücre göçü ve farklılaşması, ekstraselüler matriksin düzenlenmesi ve epitelyal-mezenşimal dönüşümü içeren biyolojik aktivitelerde rol oynamaktadır (Carinci ve diğerleri, 2003).

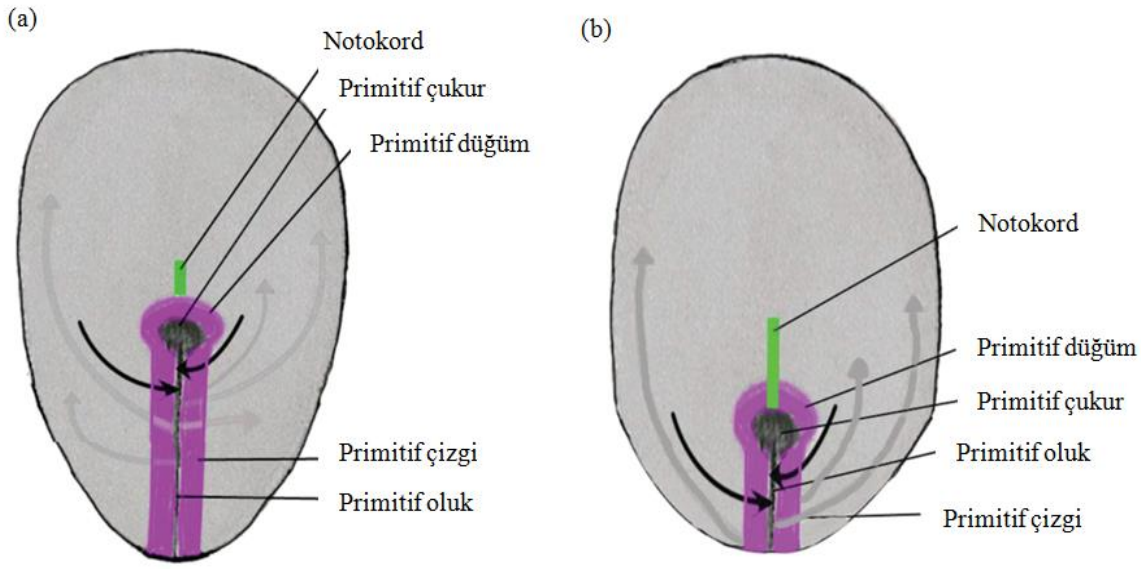
Çalışmamızda bu genlerdeki değişimler moleküler yöntemlerle araştırılacak, elde edilecek veriler istatistiksel olarak değerlendirilecek ve dudak damak yarığı oluşumu üzerine etkili olup olmadığı ortaya konulacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Embriyolojik Gelişim

Baş ve yüz yapılarının gelişimi, embriyonik ve fetal oluşum boyunca düzenli bir şekilde ilerleyen karmaşık bir süreçtir. Dudak ve damağın embriyolojik gelişimi ilk 8 haftada olmaktadır. Hücrelerin göçü ve farklılaşması için gerekli olan sinyal ağı mezoderm ve kranial nöral krest hücrelerinin hızlı ve düzenli bileşimi sayesinde oluşmaktadır (Minoux ve Rijli, 2010).

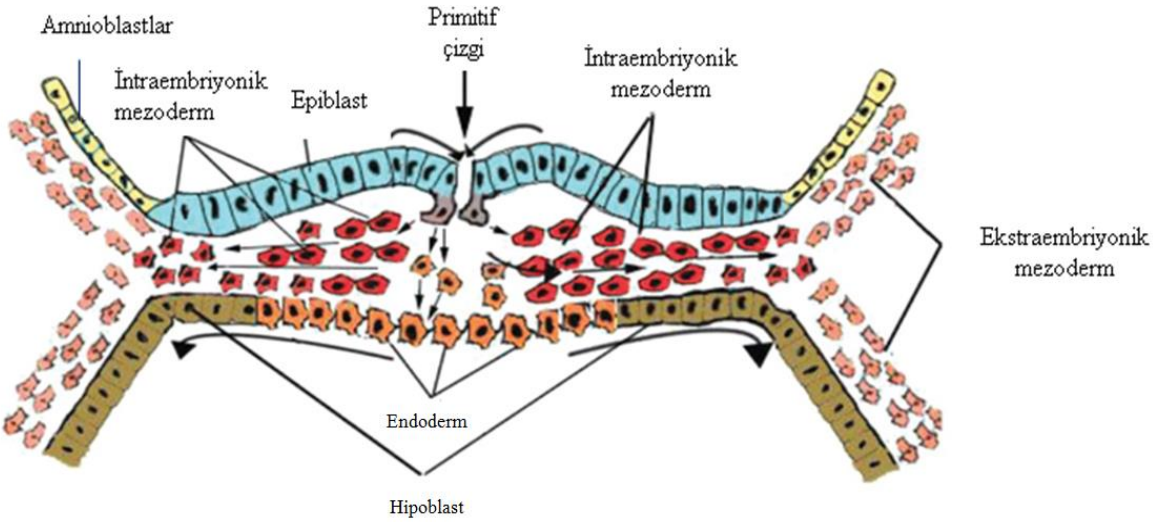
Embriyoda tüm dokuların ve organların gelişiminden embriyonik trilaminar germ diskini oluşturan ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakaları sorumludur. Bu süreç gelişmenin 3. haftasına denk gelmektedir; epiblast hücrelerden oluşan primitif çizginin oluşmasıyla başlamaktadır. Primitif çizgi aynı zamanda embriyonun polaritesini tanımlamaktadır: kranial-kaudal ekseni, dorsal-ventral ekseni, medial ve lateral taraflılığı, sağ ve sol ekseni olmak üzere (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. (a) İki haftalık embriyoda primitif çizgi oluşumu, (b) notokord oluşumu

Primitif çizgi kuyruktan merkeze doğru orta hatta uzanıp bir araya gelerek primitif oluğu oluşturur. Daha fazla epiblast hücresi primitif çizginin sefalik ucuna ilerleyerek primitif düğüm denilen yapıyı meydana getirir. Ortasındaki çukura da primitif çukur adı verilir.

Primitif çizgi ve primitif düğüm notokord ve germ tabakalarının oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Hand ve Frank, 2015:14). Notokord ve germ tabakaları gelişirken primitif çizginin uzunluğu azalır: endoderm ve mezoderm oluştrmak için primitif oluk boyunca epiblastın altına doğru kayar. Göç sırasında epiblastik hücreler, hareketli hücreleri veya mezenşim hücrelerini oluşturmak için şekil değiştirirler. Bu mezenşim hücrelerinin bazıları hipoblast hücrelerinin yerini alarak ekstraembriyonik bölgede endodermi oluştururken bazıları da yeni oluşan endoderm arasına yayılarak intraembriyonik mezodermi oluştururlar. Epiblasttan kalan hücreler de embriyonik ektodermin oluşumunu sağlarlar (Şekil 2.2) (Cordero ve diğerleri, 2011).



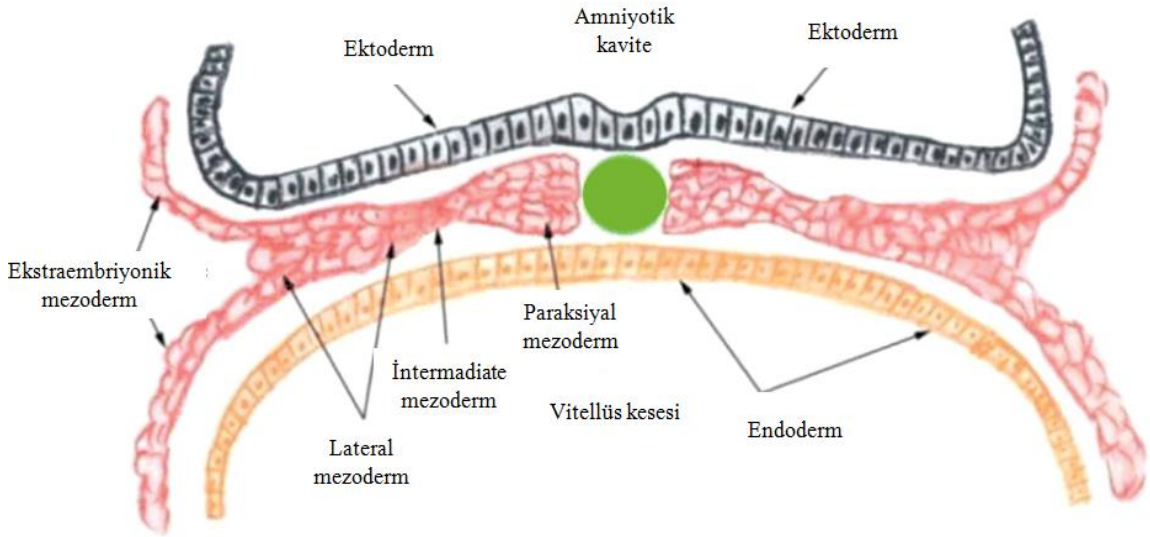
Şekil 2.2. Primitif çizgi boyunca epiblast hücrelerin hareketi

Baş gelişiminde hipoblast hücreleri merkezi öneme sahip olan prekordal plak oluşumunu sağlar. Geçici bir yapı olmasına rağmen, prekordal plaka oral kavite ve farinks gelişimini içeren baş gelişiminde çok önemli bir dönüm noktası olur.

Germ katmanları geliştikçe, mezenkimal hücreler primitif düğümün kranial ucundan ayrılıp notokordu oluşturmak için embriyonun ön ucuna doğru orta hatta göç ederler. Notokord embriyo için aksiyal destek sağlar ve merkezi sinir sistemini oluşturan nöral tüpün farklılaşmasını sağlamak için ektodermle etkileşime girerek omurganın gelişimine öncülük eder (Şekil 2.3). Yetişkin bir insanda, notokord omurlar arası disklerin nükleus pulposuslarını yapar.

Ektoderm ve endoderm tabakaları arasında bulunan mezoderm bölgesel farklılaşma gösterir;

1. paraksiyal (dorsal) mezoderm (notokordun hemen yanında)
2. intermediyer(ara) mezoderm (paraksimal mezodermin yanında)
3. lateral plak mezoderm (ekstraembriyonik mezodermle devam eder)



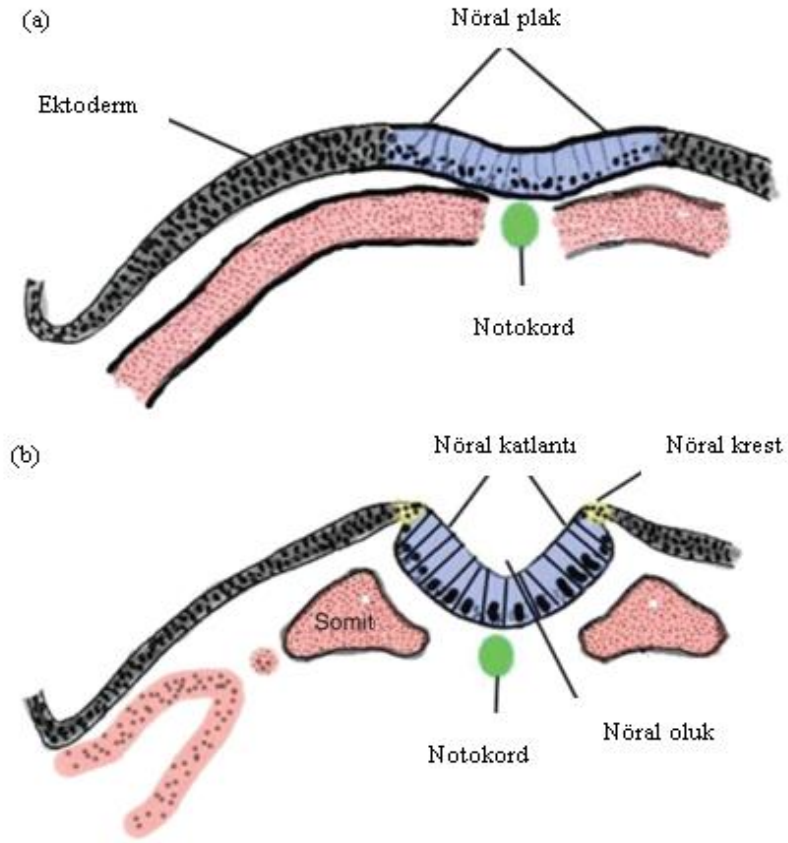
Şekil 2.3. Embriyonik trilaminar germ katmanlarının oluşum süreci

Üçüncü haftada paraksiyal mezoderm, somitleri oluşturmak için bölünür ve 40-44 çift somit oluşur (Hand ve Frank, 2015:15);

1. 4-5 oksipital,
2. 8 servikal,
3. 12 torasik,
4. 5 lumbar,
5. 5 sakral,
6. 7-10 koksigeal.

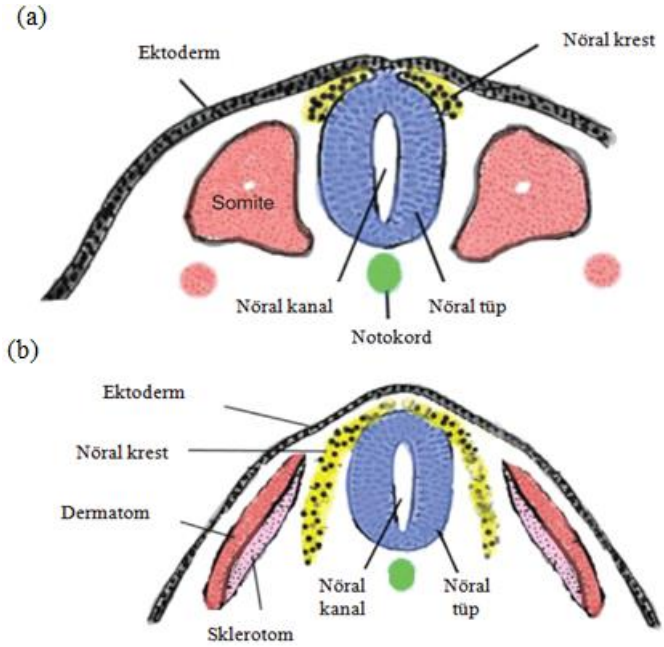
Her somit omuriliğin gelişim aşamalarında belirli bir sinir ile bağlantılı hale gelir. Baş ile ilgili yapıların oluşmasında oksipital somitler görev alır. Birinci oksipital somiti oluşturan paraksiyal mezoderm bölünmeksizin baş mezoderminin önemli bir kısmını oluşturur. Bu hücrelerin önemli bir kısmı çene, yüz ve boyun iskelet kaslarını oluşturan farengeal (brankiyal) mezoderm oluşturmak için embriyonik farinks içine göç eder.

Gastrulasyon bitmeden önce (17-18. Gün), notokordun ektodermle kimyasal ve moleküler etkileşimleri sonucu nöral tüpün oluşumu başlatılır. Notokord üzerindeki ektoderm kalınlaşarak nöral plağı oluşturur. Nöral plak hücrelerinin daha fazla büyümesi nöral katlantıları oluşturur ve katlantılar arasındaki bölge nöral oluk adını alır (Şekil 2.4) (Hand ve Frank, 2015:17).



Şekil 2.4. (a) Nöral katlantı, (b) nöral oluk oluşumu

Hücre sayısının artmasıyla beraber nöral katlantıların uzunluğu, kalınlığı, derinliği artar ve orta hatta birleşerek nöral tüp oluşturulur (Şekil 2.5).

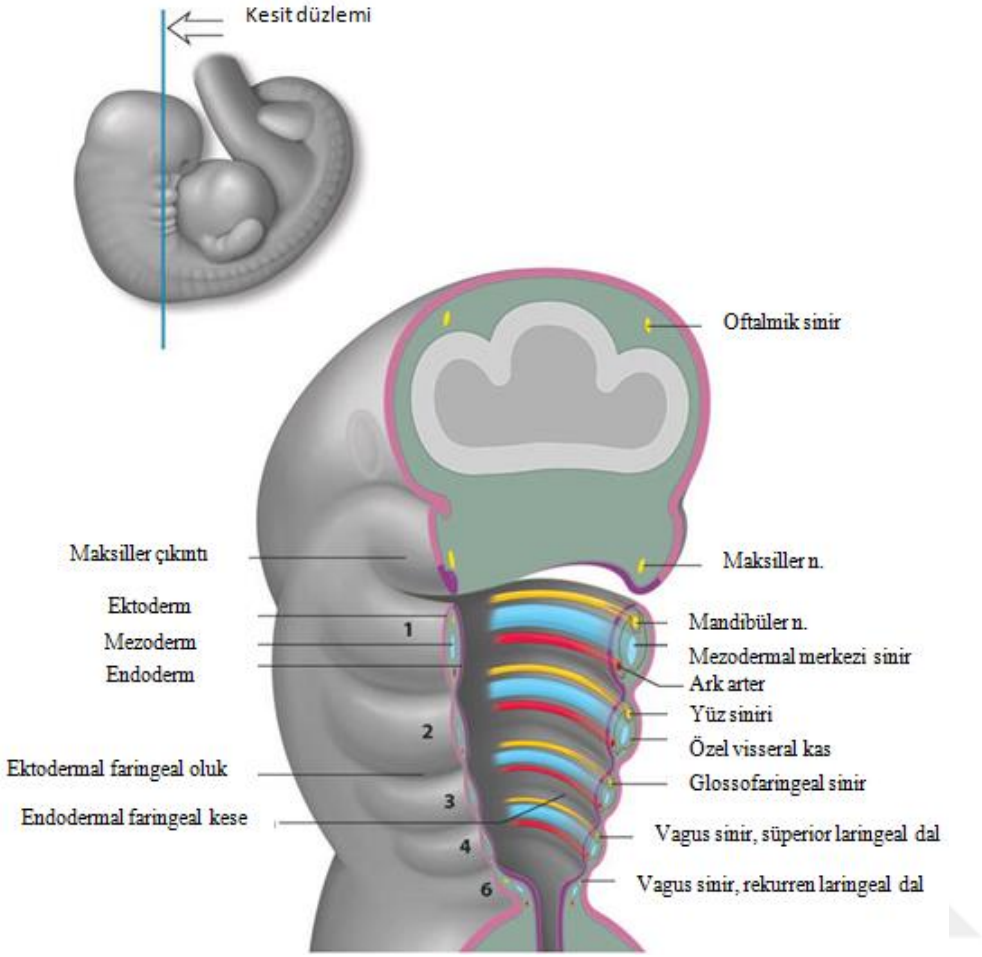


Şekil 2.5. (a) Nöral oluk, (b) nöral krest oluşumu

Nöral oluk oluşurken her iki tarafında yer alan nöral katlantıların uç bölgesinden ayrılan bir kısım hücre topluluğu göç ederek, oluşmaya başlayan nöral tüpün dorsolateral bölgesine yerleşirler ve nöral krest hücrelerini oluştururlar (Baker ve Bronner-Fraser, 1997).

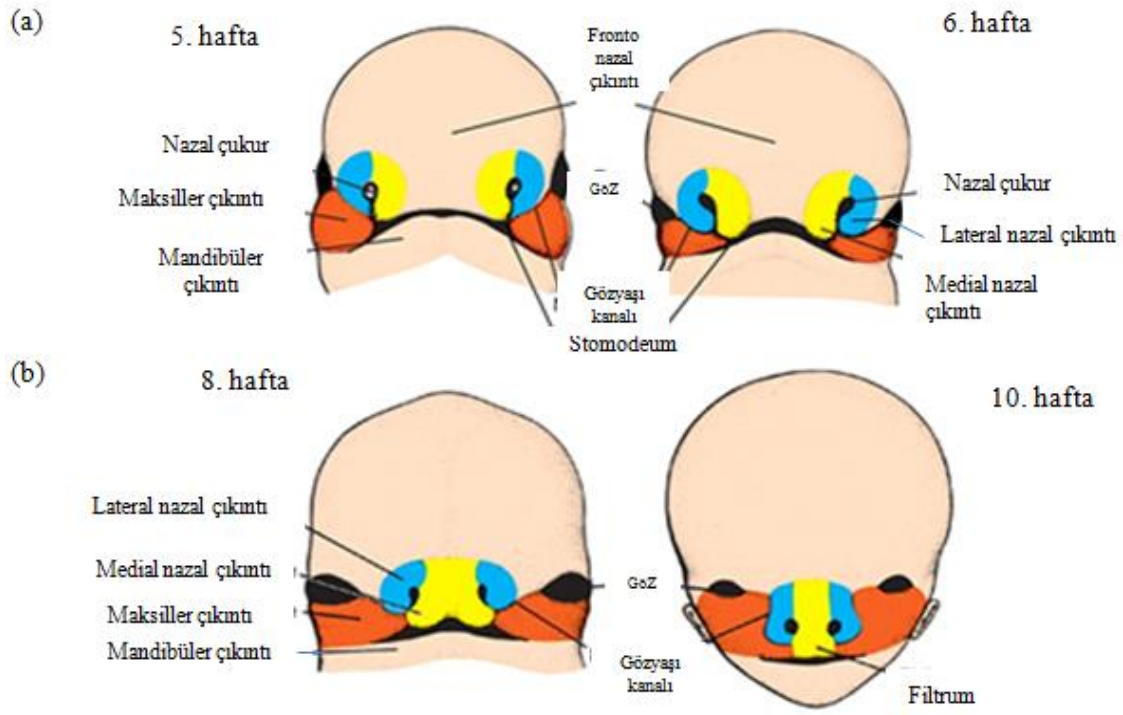
Nöral krest hücreleri farklı doku tiplerinin kaynağı olan pluripotent mezenşimi (Nöral, glial, iskelet, bağ, pigment ve salgı) oluşturur. Nöral krest kökenli yapılar şunlardır: Duyu ve otonomik ganglionlar, enterik sinir sistemi, adrenal medulla, tiroid bezinin kalsitonin salgılayan hücreleri, Schwann hücreleri, dermal melanosit, yağ hücreleri. Baş bölgesinde ise maksilla, mandibula, işitme kemikleri, hyoid kemik ve gırtlaktır (Adameyko ve Fried, 2016).

Farengeal endoderm, diğer germ tabakalarının ve nöral krest hücrelerinin etkileşimleri ile farengeal (brankial) arkların oluşumunu uyarır. Nöral krest hücrelerinin çoğalmasıyla brankial arklar meydana gelir (Cordero ve diğerleri, 2011). Toplam 6 adet farengeal ark bulunmakla birlikte bunlardan 5. ark gelişmemiştir ve tanımlanması zordur. Her bir arkın sınırları, dıştan (ektoderm) farengeal yarıklar ile içten (endoderm) farengeal poşular ile belirlenir. Her ark kendi kıkırdak, sinir, kas ve arterinden oluşur (aortik ark arteri) (Şekil 2.6) (Frisdal ve Trainor, 2014).



Şekil 2.6. Farengeal arkların gelişimi

Farengeal arkların proksimalindeki yüz taslağında, ektodermin her iki yanında kabartılar belirir. Bu kabartılara nazal plakot denir. Bu yapılardan medial ve lateral nazal çıkıntılar gelişir. İki taraflı medial nazal çıkıntıların ortasında frontonazal çıkıntı oluşur. Frontonazal çıkıntı, alın ve burun köprüsünü oluşturur. Nazal plakotların orta kısmının rezorbsiyonu ile nazal pitler ve burun boşlukları oluşur. Medial nazal çıkıntının mediale hareketi ile filtrum, burun ucu, premaksilla ve nazal septum oluşur (Şekil 2.7) (Özgentaş, 1999:17-20).



Şekil 2.7. (a) Yüzün önden görünümü nazal çukurların maksiller çıkıntıdan derin oluklarla ayrılması, (b) maksiller çıkıntıların medial nazal çıkıntılarla kaynaşması (İnternet 1)

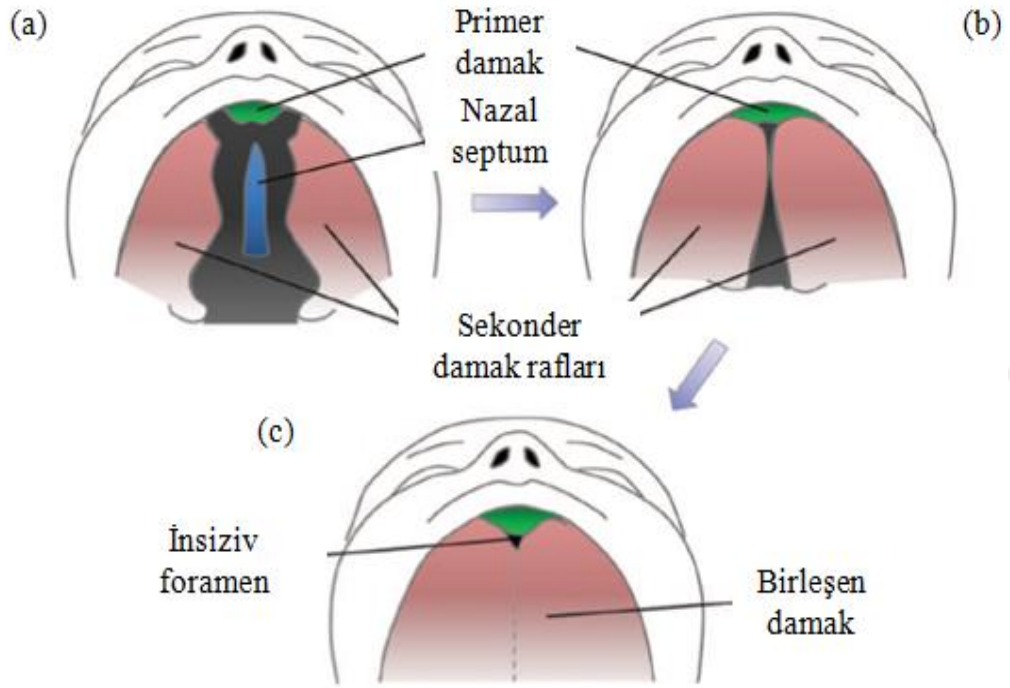
Damak, primer ve sekonder damak olarak adlandırılan iki primordiyal yapıdan oluşmaktadır. Gelişimin 5. haftasında başlayıp 8. haftanın sonuna kadar devam etmektedir. Yüzle ilgili tüm oluşumlar 4-12. haftalar arasında gerçekleşmektedir. (Moore ve Persaud, 1993:121-125).

5. ve 6. haftada iki maksiller ve iki medial nazal süreçlerle oluşturulan primer damak, gelişmekte olan ağız ve burun boşluklarını ayırmaktadır. İlk olarak medial nazal ve lateral süreçler bir araya gelir, daha sonra medial nazal ve maksiller süreçlerle beraber aralarında kalan epitel tabakanın bir kısmı bir araya gelir. Bu epitel tabaka gelecekte burun ve ağız epitelini oluşturur. Üst dudak ve arkada insisiv foramene kadar olan yapılar primer damağı oluşturur (Bush ve Jiang, 2012).

Primer damağın arka sınırı kafatasının gelecekteki insisiv foramen bölgesine göre sadece arkada yer almaktadır. Yüz, ön-arka (postero-kaudal) boyutta büyüdüğünden, primer damak burun boşlukları (solunum fonksiyonu) ve ağız boşlukları (sindirim fonksiyonu) arasında yeterli mesafeyi sağlamak için çok kısadır. Sekonder damak bu boşlukları daha iyi ayırmak için gelişmektedir. Sekonder damak, 6. ve 8. haftalar arasında, foramen

insisivumun posteriorundaki tüm sert ve yumuşak damaktan oluşur. Lateral damak çıkıntıları birbirlerine doğru uzarlar ve dilin üzerinde yatay bir konuma gelerek orta hatta birleşirler (Lan, Xu ve Jiang, 2015).

Daha sonra, primer ve sekonder damak beraber damağın son halini oluştururlar, aynı zamanda nazal septumla da birleşirler. Nazal septum, birleşen medial nazal çıkıntılardan aşağı doğru büyür. Nazal septum ve damak çıkıntıları arasındaki birleşme, 9. haftada anterior olarak başlar, 12. haftada uvulada posterior olarak tamamlanır (Şekil 2.8) (Levi ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.8. (a) Primer ve sekonder damak oluşumu, (b) Primer ve sekonder damağın nazal septum ile birleşmeleri, (c) birleşen damağın son hali

2.2. Dudak ve Damak Yarıklarının Sınıflandırılması

Dudak ve damak yarıklarının sağlıklı bir şekilde sınıflandırması için farklı yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bu sınıflandırmalardan en yaygın olanları Veanu, Davis ve Ritchie, Kernahan ve Stark'ın yaptığı sınıflamalardır.

2.2.1. Davis ve Ritchie'nin dudak ve damak yarıkları sınıflandırması

Davies and Ritchie yarıkların alveolar proses pozisyonuna göre 1922 yılında bir sınıflandırma yapmışlardır ve 3 grup altında toplamışlardır (Şekil 2.9) (Santiago, 1969).

Grup 1: Prealveolar yarıklar

Dudak yarıkları

1. Unilateral
2. Median
3. Bilateral

Grup 2: Postalveolar yarıklar

1. Yumuşak damak yarıkları
2. Sert damak yarıkları
3. Submuköz yarıklar

Grup 3: Alveolar yarıklar

Damak yarıkları

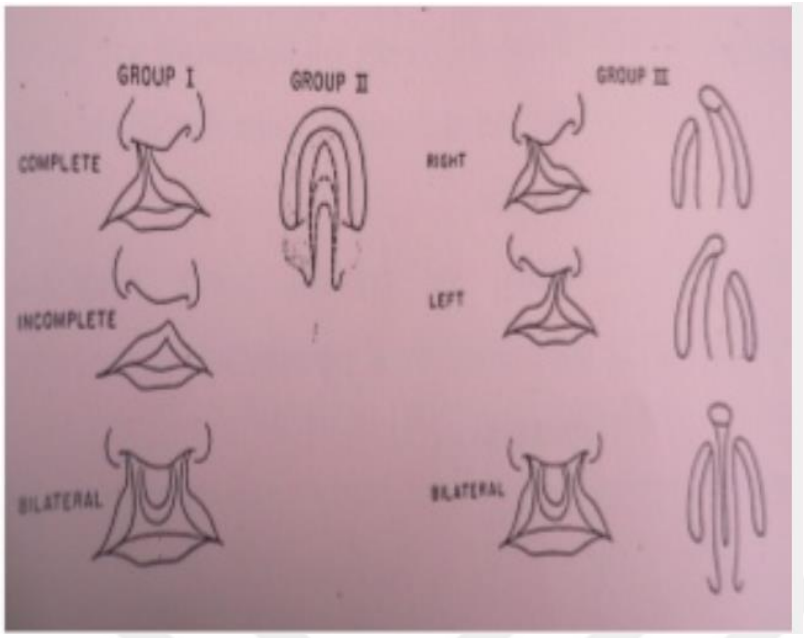
1. Unilateral
2. Median
3. Bilateral

Dudak yarıkları

1. Unilateral
2. Median
3. Bilateral

Alveolar uzantı yarıkları

1. Unilateral
2. Median
3. Bilateral



Şekil 2.9. Davis ve Ritchie'nin dudak ve damak yarıkları sınıflandırması (Davis ve Ristchie, 1922)

2.2.2. Veau'nun dudak ve damak yarıkları sınıflandırması

Veau 1931 yılında dudak ve damak yarıklarını bulundukları yerlere göre 4 grup altında incelemiştir (Santiago, 1969).

Grup 1: Yumuşak damak yarıkları
Grup 2: Sert ve yumuşak damak yarıkları
Grup 3: Tek taraflı dudak ve damak yarıkları
Grup 4: Bilateral dudak ve damak yarıkları

2.2.3. Kernahan ve Stark'ın dudak ve damak yarıkları sınıflandırması

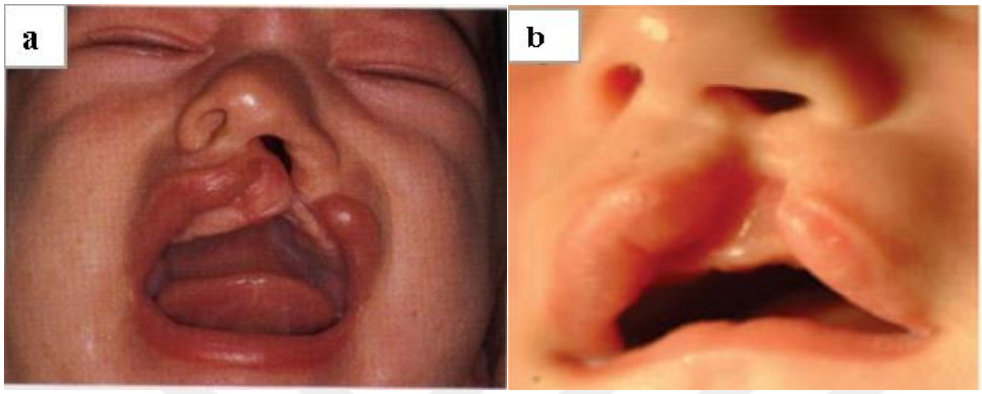
Günümüzde kullanılan ve embriyonal oluşum teorisine dayanan sınıflandırma "bölmeli Y" klasifikasyonu olarak adlandırılan Kernahan ve Stark'a (1971) aittir (Güven., Aksu ve Kocadereli, 2010).

Bu sınıflandırmada, deformiteleri ayırmada kullanılan sınır, foramen incisivumdur. Foramenin önündeki yapılar (prolabium, premaksilla ve burun septumu) "primer damak'', arkasında kalan yapılar (sert ve yumuşak damak) sekonder damak olarak adlandırılır.

Sadece primer damak yarıkları

Unilateral

- Tam yarık
- Tam olmayan yarık



Resim 2.1. Kernahan'ın sadece primer damak yarığı, (a)unilateral tam yarık (b) unilateral tam olmayan yarık (Malek, 2001:19)

Median

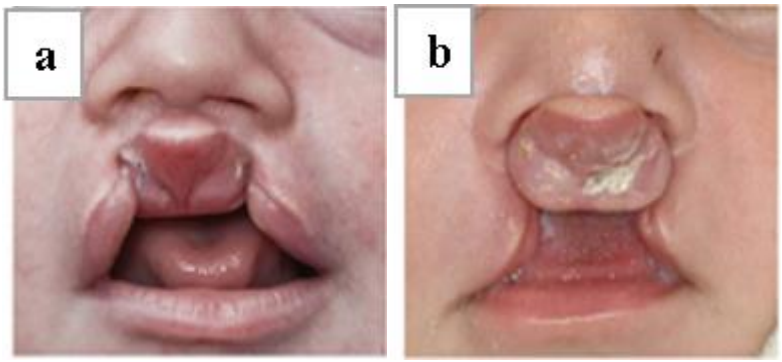
- Tam yarık
- Tam olmayan yarık



Resim 2.2. Kernahan'ın sadece primer damak yarığı, median tam yarık (Sharma, Krishnan, Pal ve Verma, 2013)

Bilateral

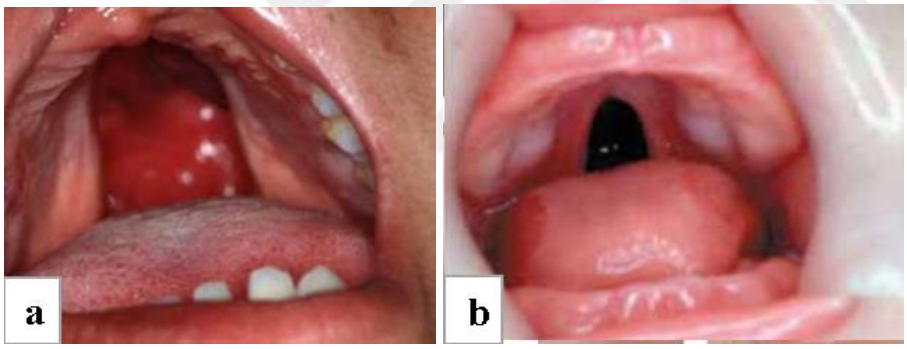
- Tam yarık
- Tam olmayan yarık



Resim 2.3. Kernahan'ın sadece primer damak yarığı, (a) bilateral tam yarık, (b) bilateral tam olmayan yarık (Wang ve diğerleri, 2014)

Sadece sekonder damak yarıkları

- Tam yarık
- Tam olmayan yarık
- Submuköz





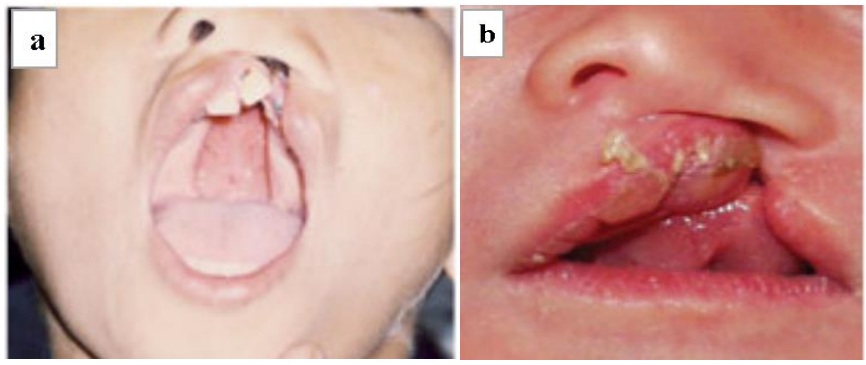
Resim 2.4. Kernahan'ın sadece sekonder damak yarığı, (a) tam yarık, (b) tam olmayan yarık, (c) submukoz yarık (Malek, 2001:21; Freitas ve diğerleri, 2012)

Primer ve sekonder damağın birlikte yarıkları

Unilateral

- Tam yarık

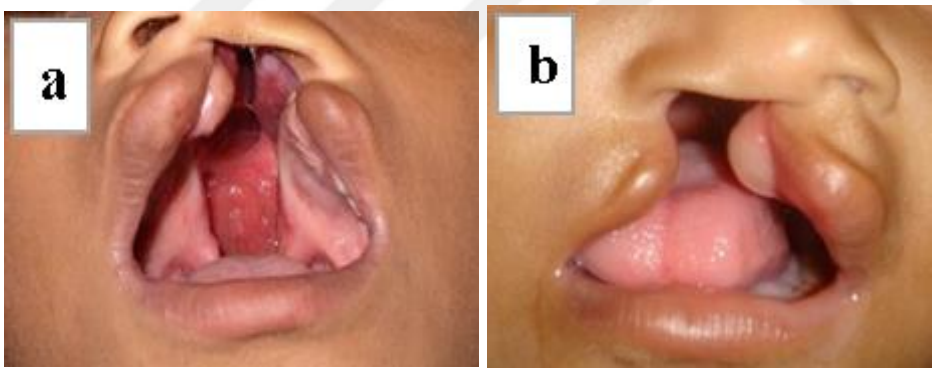
- Tam olmayan yarık



Resim 2.5. Kernahan'ın primer ve sekonder damağın birlikte yarıkları, (a) unilateral tam yarık , (b) unilateral tam olmayan yarık (Dixon, Marazita, Beaty ve Murray, 2011)

Median

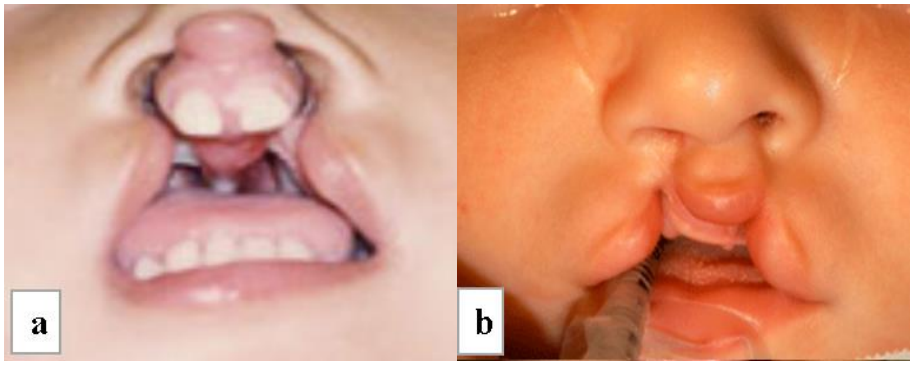
- Tam yarık
- Tam olmayan yarık



Resim 2.6. Kernahan'ın primer ve sekonder damağın birlikte yarıkları, (a) median tam yarık, (b) tam olmayan yarık (İnternet 2)

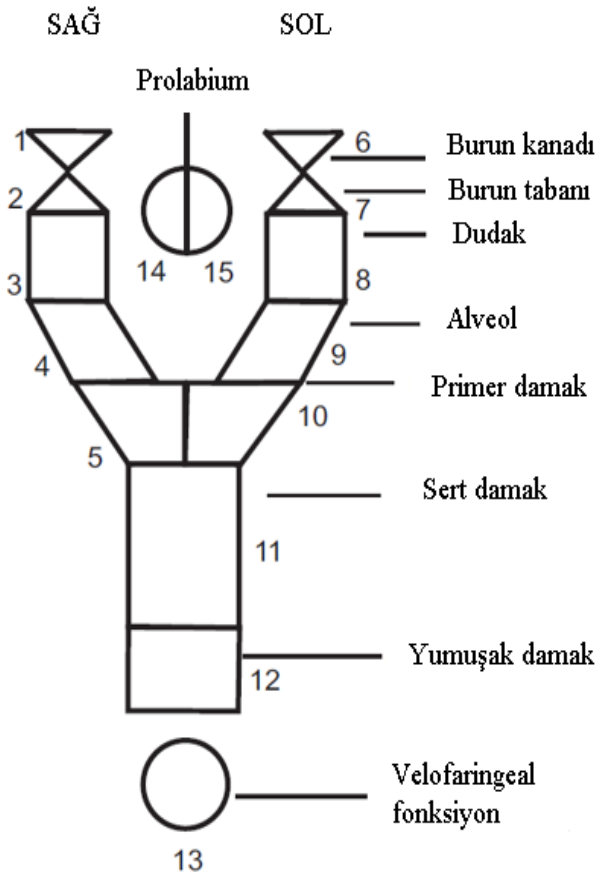
Bilateral

- Tam yarık
- Tam olmayan yarık



Resim 2.7. Kernahan'ın Primer ve sekonder damağın birlikte yarıkları, (a) bilateral tam yarık, (b) bilateral tam olmayan yarık (Dixon, Marazita, Beaty ve Murray, 2011)

Kernahan'ın "bölmeli Y" sembolik sınıflaması dudak damak yarıklarının teşhisinde bilginin daha kolay aktarılmasını sağlamıştır. Yarık defektleri "Y" sembolinin hangi bölgesine denk geliyorsa ona göre değerlendirme yapılmaktadır (Şekil 2.10).



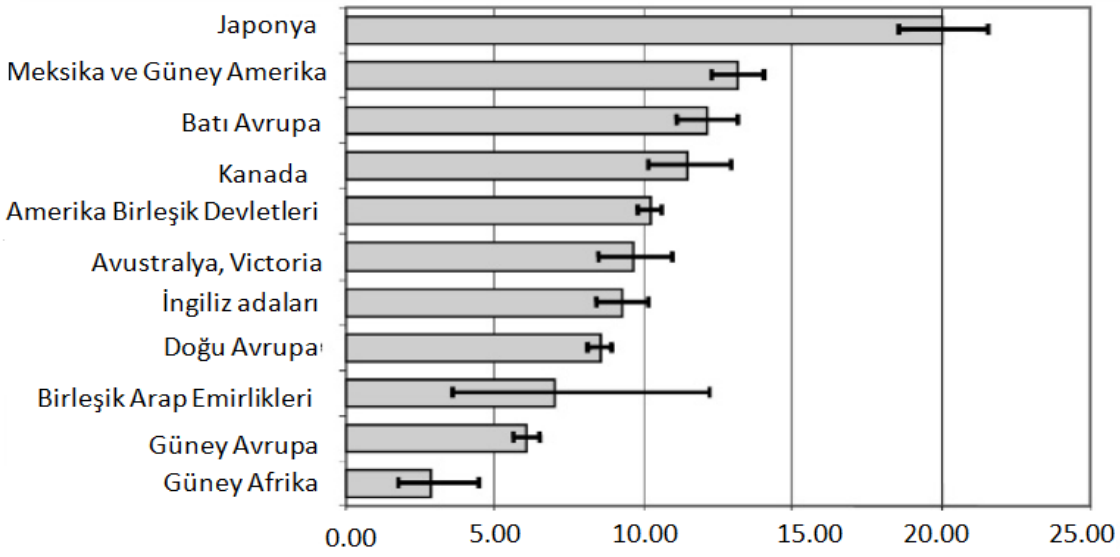
Şekil 2.10. Kernahan'ın "bölmeli Y" sembolik sınıflandırması (Shah, Khalid ve Khan, 2012)

2.3. Dudak ve Damak Yarıklarının Epidemiyolojisi

Dudak damak yarıkları, çevresel faktörler ve sosyo-ekonomik koşulların yanı sıra coğrafik köken, ırk ve etnik gruplar içindeki değişkenliğe bağlı olarak görülen en yaygın doğum anomalilerinden birisidir (Dixon, Marazita, Beaty ve Murray, 2011).

Asya ve Amerikan kökenli populasyonlarda CL/P görülme sıklığı en yüksek prevelansa sahipken, Afrika kökenli populasyonlarda en düşük prevelansa sahiptir. Genel olarak populasyonlarda dudak damak yarıklı bireylerin cinsiyet oranının eşit olmadığı görülmüştür. Erkek bireylerin bayanlara göre etkilenme olasılığı 2 kat daha fazladır. İzole damak yarığının (CP) insidansı bayanlarda daha yüksektir. (Dixon, Marazita, Beaty ve Murray, 2011).

Dünya Sağlık Örgütünün İnsan Genetiği Programı aracılığıyla 2003 yılında kurulan Tipik Orofasiyal Yarıkların Uluslararası Perinatal Veritabanı (IPDTOC) tarafından yapılan bir çalışmaya göre CL±P sıklıkları verilmiştir. Coğrafik alanlara göre değerlendirilen kayıtlarda, Japonya, Meksika, Batı Avrupa, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya, Britanya Adaları, Doğu Avrupa, Birleşik Arap Emirlikleri, Güney-Akdeniz Avrupa ve Güney Afrika'da CL±P sıklıkları belirlenmiştir. CL±P görülme sıklığı en yüksek Japonya olurken, en düşük Güney Afrika olarak saptanmıştır (Şekil 2.11) (IPDTOC çalışma grubu, 2011).



Şekil 2.11. Coğrafi bölgelere göre CL±P sıklığı (10.000 başına)

Sendromsuz CL/P'nin genel olarak dünyada görülme sıklığı 1000 doğumda 1 olarak kabul edilmektedir. Ancak, etnik geçmiş, coğrafik köken ve sosyoekonomik düzeye bağlı olarak görülme sıklığı değişiklik göstermektedir. Afrika kökenli populasyonlarda nsCL/P görülme sıklığı 1000 doğumda 0,3, Avrupa kökenli populasyonlarda 1000 doğumda 0,7-1,3, Asya kökenli populasyonlarda 1000 doğumda 1,4-2,1 ve Amerikan kökenli (Amerindian) populasyonlarında 1000 doğumda 3,6'dır (Brito ve diğerleri, 2011).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Küresel Hastalık Yükü (KHY) çalışması verilerine göre nsCL/P ve nsCP prevalansı Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (Mossey ve Modell, 2012).

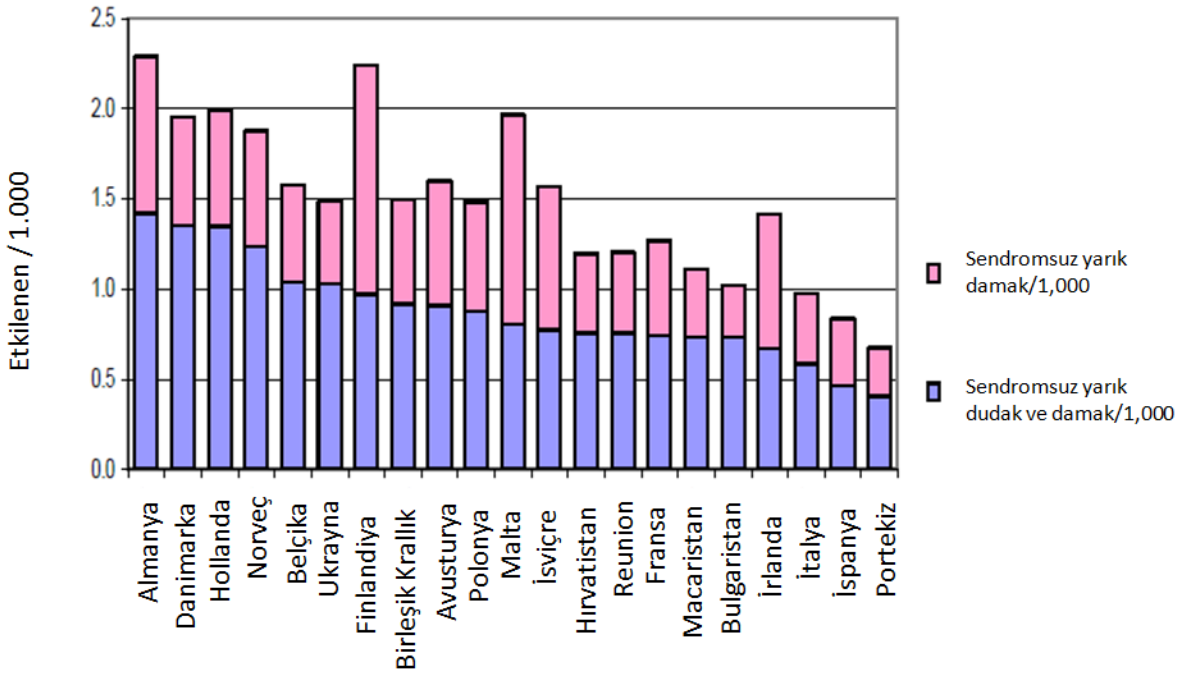
Çizelge 2.1. DSÖ KHY verilerine göre nsCL/P ve nsCP prevalansı

	Toplam sendromsuz yarık/ 1000	nsCP/ 1000	nsCL(P)/ 1000	Toplam % nsCP
Latin Amerika, Güney	2,39	0,72	1,67	30
Latin Amerika, Tropikal	2,39	0,72	1,67	30
Avustralasya	2,01	1,02	0,98	51
Kuzey Amerika	2,00	0,83	1,17	41
Okyanusya	1,85	1,13	0,72	61
Avrupa, Batı	1,66	0,59	1,07	35
Asya Pasifik	1,65	0,64	1,00	39
Asya, Güney	1,60	0,30	1,30	19
Latin Amerika, Merkezi	1,54	0,39	1,15	25
Avrupa, Merkeziey	1,45	0,67	0,77	47
Güneydoğu Asya	1,36	0,28	1,08	20
Latin Amerika	1,29	0,17	1,12	13
Asya, Doğu	1.28	0,27	1,01	21
Avrupa, Doğu	1,22	0,59	0,63	49
Asya, Merkezi	1,19	0,62	0,57	52
Orta Doğu	1,02	0,30	0,72	29

Çizelge 2.1. (devam) DSÖ KHY verilerine göre nsCL/P ve nsCP prevalansı

Karayip Denizi	0,93	0,31	0,62	34
Sahra Altı Afrika, Merkezi	0,54	0,04	0,51	7
Sahra Altı Afrika, Batı	0,54	0,08	0,46	15
Sahra Altı Afrika, Güney	0,45	0,15	0,30	33
Kuzey Afrika	0,44	0,15	0,29	35
Sahra Altı Afrika, Doğu	0,38	0,12	0,27	31
Dünya	1,25	0,31	0,94	25

Konjenital malformasyonların sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılan EUROCAT kayıt verilerine göre Avrupada nsCL/P ve nsCP prevalansı Şekil 2.12'de verilmiştir (Mossey ve Modell, 2012).



Şekil 2.12. Avrupada sendromsuz yarık dudak ve damak ile sendromsuz yarık damak prevalansı

Genetik faktörler ve çevresel faktörlerin etkileşimini içeren multifaktöriyel kalıtım modeli nsCL/P'nin epidemiyolojik bulguları için iyi bir örnek oluşturmaktadır. Ailede yarık dudak damak görülme riski birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Dudak damak yarıklı aile üyelerinin sayısına (pozitif aile öyküsü), yakınlık derecesine, etkilenen bireyin cinsiyetine ve yarık tipine bakılarak risk faktörleri ve derecesini artıran faktörler belirlenmektedir. Bir ailede dudak damak yarıklı çocuk varsa, bir sonraki çocuğun etkileneceği risk %2-5 iken, ailede birden fazla dudak damak yarıklı çocuk varsa risk %10-12'ye yükselmektedir. Eğer ailede tekrar eden bir sendrom da mevcut ise oran %50'ye çıkmaktadır. Çift yumurta ikizlerine (%3-5) oranla tek yumurta ikizlerinde (%40-60) yapılan çalışmalarda ise nsCL/P önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Brito ve diğerleri, 2011; Beaty, Marazita ve Leslie, 2016).

2.4. Dudak ve Damak Yarıklarının Etiyolojisi

Dudak damak yarıkları etkilenen bireylerde ve ailelerinde tıbbi, psikolojik ve sosyal sorunlar ortaya çıkaran en yaygın doğum kusurlarından biri olarak kabul edilmektedir. Hem genetik hem çevresel etkenlerin rol oynadığı karmaşık bir etiyolojiye sahiptir. Vitamin eksikliği özellikle folik asit eksikliği, annenin sigara kullanması, alkol tüketmesi, ilaç kullanması ve kimyasallara maruz kalması gibi risk faktörleri dudak damak yarıklarının gelişimiyle bağlantılı bulunmuştur (Honein ve diğerleri, 2007; Chevrier ve diğerleri, 2007; Murray, 2002).

2.4.1. Vitamin eksikliği

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ve gözlemsel raporlar annenin hamilelik öncesinde aldığı folik asit takviyelerinin yarık dudak damak sıklığının azalmasında koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Folik asit takviyeleri ile CL/P riskinde azalma, hayvan deneylerinde %69-76 olarak hesaplanırken, insanlarda %18-50 oranında hesaplanmıştır (Mossey ve Modell, 2012; Allam ve Stone, 2014).

Amerika Birleşik Devletlerinde folik asit takviyesi, nöral tüp kusurlarının (NTD) oluşumunu azaltmak için 1 Ocak 1998'den itibaren zorunlu hale gelmiştir. Yazdy ve diğerleri, orofasiyal yarıklarda folik asit takviyesinin etkisini 45 eyalette ve Kolombiya bölgesinde doğum belgesi verilerini kullanarak, yarık dudak damak prevalansını doğum

öncesi ve doğum sonrasında karşılaştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, Amerika Birleşik Devletlerindeki folik asit takviyesi, yarık dudak damak prevalansında küçük bir azalma ile ilişkili bulunmuştur (Yazdy, Honein ve Xing, 2007).

Orofasiyal yarıkların patogenezinde beslenme rolüne ilişkin bilgilerimizin geliştirilmesinin gelecekte orofasiyal yarıkların önlenmesi için önemli olduğu düşünülmektedir. 1990'dan beri folik asitle zenginleştirilmiş tahıl kullanımının zorunlu hale getirildiği Kuzey Amerika da CL/P'li doğan çocukların sayısında %5, sadece damak yarıklarında %12 düşüş görülmüştür (Canfield ve diğerleri, 2005).

Badovinac ve diğerleri, hamilelik sırasında folik asit içeren takviyeleri kullanan anneler ve takviye kullanmayan annelerde nsCL/P prevalansının farklı olduğunu göstermek için bir meta analiz çalışması yapmışlardır. Sonuç olarak gebelik sırasında folik asit içeren takviye kullanımının dudak damak yarıklı doğma üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu göstermişlerdir (Badovinac, Werler, Williams, Kelsey ve Hayes, 2007).

Chevrier ve diğerlerinin yaptıkları bir çalışmada, hamilelik sırasında alınan folik asit değerleri için besinlerin içeriklerine göre 15 grup oluşturulmuş ve buna göre alınan günlük değerler çıkartılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, kontrol annelerinin hasta annelerine göre daha yüksek besinsel folik asit alınımına sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla besinsel folik asit alımının CL/P riskini azalttığı sonucuna varılmıştır (Chevrier ve diğerleri, 2007).

Yarık dudak ve damaklı hastalarda düşük serum folat seviyesinin yanında hamilelik sonrasında ölçülen düşük B6 ve B12 düzeylerinin de CLP riskini arttırdığı bildirilmiştir. Munger ve diğerleri, Filipinler de nsCL/P ile maternal B6 vitamini arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda sendromsuz dudak ve damak yarıklı çocuk sahibi olan annelerde B6 vitamini kontrol annelerine göre düşük çıkmış, yarık dudak damaklı doğum yapma riski yüksek bulunmuştur (Munger ve diğerleri, 2004).

2.4.2. Annenin sigara kullanması

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre birçok ülkede üreme çağındaki kadınlarda tütün kullanımı aşırı artmış bulunmaktadır (Windsor, 2002: 147–162). Özellikle hamilelik süresinde annenin sigara kullanması sendromsuz dudak damak yarıklarının patogenezinde

rol oynamaktadır. Metabolik aktivasyon ve DNA hasarına yol açan aromatik ve heterosiklik aminler dahil yaklaşık 4000 kimyasal bileşimden oluşan sigara, yarık dudak ve damakların gelişimine sebep olan metabolik yolaklardaki genleri etkilemektedir (Hein, 2002).

Honein ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, sigara kullanan annelerin çocuklarının sigara kullanmayan annelerin çocuklarına göre sendromsuz yarık dudak damak doğma riski 1,3 kat artmış (95% CI = 1,0-1,6) olarak bulunmuştur (Honein ve diğerleri, 2007).

Martelli ve diğerlerinin hamileliğin birinci trimesterinde sigara kullanan 843 nsCL/P'li çocuk sahibi olan anne ve 676 kontrol annesinde yaptıkları çalışmada, bebeklerde CL/P oluşumu ve annenin sigara kullanımı arasında önemli bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Sigara kullanan annelerin çocuklarında CL/P oluşumu, sigara kullanmayan annelerin çocuklarına göre 2 kat daha fazla risk getirmiştir (Martelli ve diğerleri, 2015).

2.4.3. Annenin alkol kullanması

İnsanlarda alkolün teratojen olduğu tespit edilmiştir, özellikle fetal alkol sendromunda (hamilelikte alkol tüketen annelerin bebeklerinde görülen sendrom) açık bir şekilde gösterilmiştir (Mossey, Little, Munger, Dixon ve Shaw, 2009).

Alkol tüketiminin folat metabolizmasını inhibe ederken serum folat düzeylerini azalttığı bilinmektedir (Hillman ve Steinberg, 1982; Giovannucci, 2004). Yapılan çalışmaların bazılarında dudak damak yarıkları ile annenin alkol tüketimi arasında pozitif bir ilişiki görülürken, hamilelik sırasında annenin az miktarda alkol tüketimesi ile dudak damak yarıkları arasında bir ilişki saptanmamıştır (Meyer, Werler, Hayes ve Mitchell, 2003).

Molina-Solana ve diğerleri yaptıkları bir çalışmada maternal alkol kullanımı ve dudak damak yarıkları arasında bir ilişki bulunduğunu göstermişlerdir ve bebeklerin yarık dudak damak olma riskini 1,28 olarak tespit etmişlerdir (%95 CI=0,98-1,66) (Molina-Solana, Yáñez-Vico, Iglesias- Linares, Mendoza-Mendoza ve Solano- Reina, 2013).

Bille ve diğerlerinin dudak damak yarıklı çocuk sahibi olan 192 anne ile yaptıkları bir çalışmada, birinci trimesterinde alkol tüketmenin istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen 1,11 kat risk getirdiğini bildirmişlerdir (Bille ve diğerleri, 2007).

Alkole bağlı embriyonik malformasyonlar için olası bir mekanizma da embriyogenez sırasında retinoik asit sentezinin etanol inhibisyonudur. Yüksek oranlarda tüketilen alkol kranial nöral krest gelişimi için gerekli olan retinoik asidin üretimini inhibe etmektedir (Kot-Leibovich ve Fainsod, 2009).

2.4.4. Annenin ilaç kullanması

Epidemiyolojik çalışmalar hamilelik sırasında annenin yüksek miktarda ilaç kullanmasının dudak damak yarıklı çocuk dünyaya getirme riskini arttırdığını göstermiştir.

Annenin aspirin, ibuprofen gibi vazoaktif ilaçlar kullanması, antiepileptik ilaçlar kullanması, akne tedavisinde kullanılan ilaçları alması, sedef ve artirit için kullanılan ilaçları alması ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçları alması, bebeklerin yarık dudak damaklı doğma riskini artırmaktadır (Palmieri ve diğerleri, 2008; Kallen, 2003).

Pradat ve diğerlerinin hamileliğin birinci trimesterinde kortikostreoid kullanan annelerden oluşturdukları MADRE veritabanı sonuçlarına göre, düzenli bir şekilde kortikosteroid kullanımı ile yarık dudak damak oluşumu arasında önemli bir ilişki olduğu görülmüştür ve doğan bebeklerin dudak damak yarıklı olma riski 2,59 olarak saptanmıştır (Pradat ve diğerleri, 2003).

Yapılan araştırmalara dayanılarak, bebek sahibi olmak isteyen bayanların ilaç kullanırken dikkatli olmaları ve bilinçlenmeleri önem taşımaktadır.

2.4.5. Annenin kimyasallara maruz kalması

Ne yazık ki gebeliğin ilk trimesterinde annelerin %25,13'ü kimyasal maddelere maruz kalmaktadır. Bu annelerin %11,30'unun temizlik ürünleriyle, %7,83'ünün pestisitlerle, %6'sının da kozmetik ürünleri ile temas ettiği bulunmuştur (Campos Neves, Volpato, Espinosa, Aranha ve Borges, 2016).

Garlantézec ve diğerleri, kimyasal maddelere maruz kalmaların dudak damak yarıklarının oluşumu ile ilişkili olduğunu ve zararlı çözücülerin temizlik maddeleri, kozmetik ürünler ile diğer ürünlerde bulunduğunu göstermişlerdir (Garlantézec, Monfort, Rouget ve Cordier, 2009).

Kuaförlük, tarım, kurşun ve alifatik asitlere maruz kalınan deri veya ayakkabı imalatı gibi mesleklerde çalışan annelerin bebeklerinde de yarık dudak damak görülme sıklığı yüksek bulunmuştur (Kawalec, Nelke, Pawlas ve Gerber, 2015).

Chevrier ve diğerleri gebeliğin birinci trimesterinde organik çözücülere mesleksel olarak maruz kalan annelerin sendromsuz yarık dudak damaklı doğum yapma riskini araştırmışlardır. Sonuçlar, gebelik sırasında organik çözücülere maruz kalmanın yarık dudak ve damak etiyolojisinde rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (Chevrier ve diğerleri, 2006).

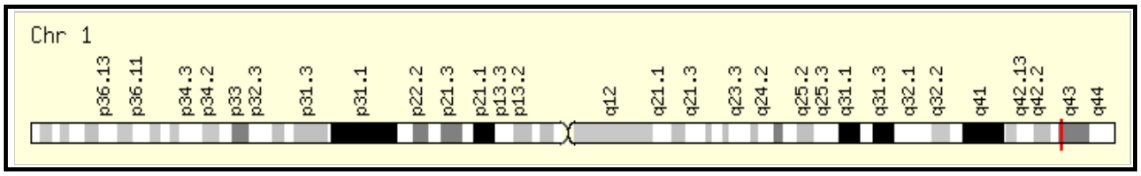
2.5. Genetik

2.5.1. MTR geni

Folat, hücre metabolizması için gerekli olan en önemli substratlardan birisidir. DNA metilasyonu dâhil temel metilasyon reaksiyonlarında SAM ve metiyonin sentezi için gereklidir. DNA'nın timin, adenin ve guanin bazlarının sentezi için gerekli tek karbon ünitesini sağlamaktadır, aynı zamanda düzenleyici molekül olarak işlev görmektedir (Bhaskar, Murthy ve Venkatesh Babu, 2011).

Folat döngüsünde yer alan enzimler önemli rol oynamaktadır. Bu enzimler arasında metiyonin sentaz (MS) ve metiyonin sentaz redüktaz (MSR) enzimleri de yer almaktadır. Metiyonin sentaz enzimi (EC 2.1.1.13), kromozomun 1q42,3-q43 (kromozom 1: 236,795,281-236,903,981) bölgesinde lokalize olan *MTR* (5-metiltetrahidrofolat homosistein metiltransferaz) geni tarafından kodlanmaktadır (Chen ve diğerleri, 1997).

MTR geni, 60-428 baz çifti uzunluğundaki 33 ekzondan ve 310 baz çifti ile 7,7 kilo baz uzunluğundaki intronlardan oluşur (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Birinci kromozomda MTR geninin lokalizasyonu (İnternet 3)

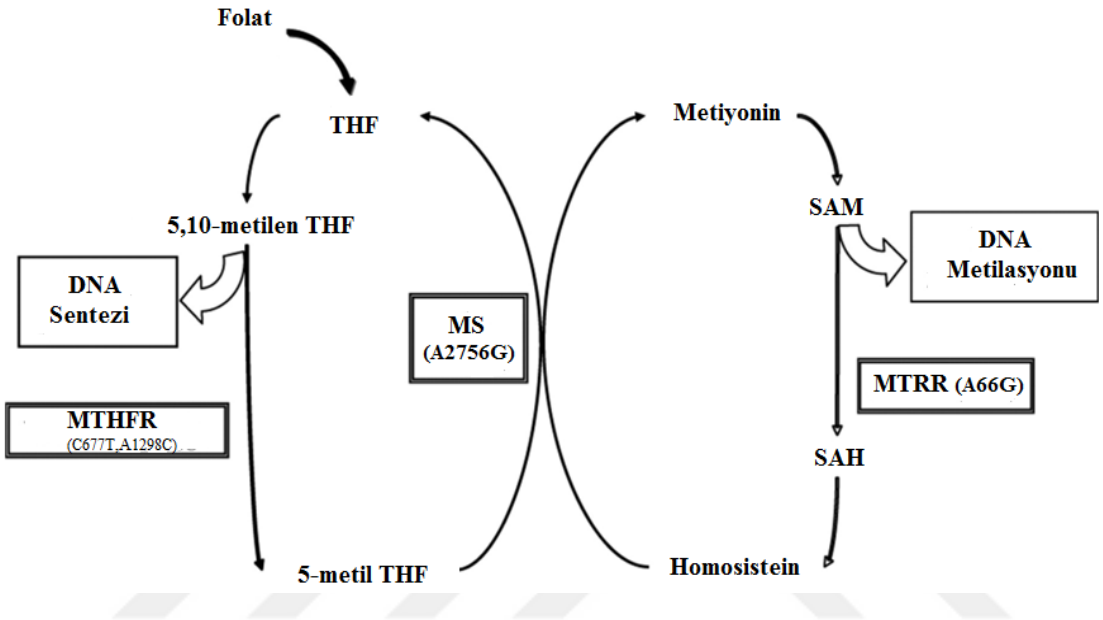
Metionin sentaz enzimi, 140,5 kDa ağırlığında 1265 amino asitten oluşan büyük bir proteindir (Şekil 2.14). Domainler arası bağlayıcı proteinlerle doğrusal şekilde düzenlenmiş dört işlevsel kısımdan oluşur. Üç metil transfer reaksiyonlarının her biri, farklı bir substrat bağlama bölgesi tarafından katalizlenir. N terminal kısmı (Hcy domaini), $(Cys)_3Zn^{2+}$ kümesini kullanarak homosisteinini aktifleştirir. İkinci kısım (folat domaini) metil transferi için metilentetrahidrofolatı aktive eder, üçüncü kısım kobalamine (B12) bağlanır. Dördüncü kısım olan C terminal, S-Adenozil metiyonine bağlanır (Evans ve diğerleri, 2004).



Şekil 2.14. Metiyonin sentaz enziminin yapısı (İnternet 3)

Metionin sentaz enzimi homosisteinin metiyonine dönüştürülmesinde metiltetrahidrofolattan metil gruplarının homosisteine transferini yürütmektedir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için kofaktör olarak kobalaminden (B12 vitamini) meydana gelen metil kobalamini kullanmaktadır. Homosisteinin metiyonine remetilasyonuyla (metil grubu alarak) 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF), DNA sentezi için gerekli olan 5,10-metilen-tetrahidrofolat (5, 10-MTHF) a dönüşür. 5, 10-MTHF, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi ile 5-metiltetrahidrofolata dönüştürülerek aktif folat formunun oluşturulması sağlanır. Metiyoninin kükürt atomuna adenozin trifosfat (ATP)'tan bir adenozin grubunun bağlanmasıyla S-Adenozil metiyonin (SAM) molekülü oluşur.

Metiyonin sentaz redüktaz enzimi, moleküllerin metilasyon reaksiyonlarından sorumlu olan SAM'in metil grubunu vererek S-Adenozil homosistein (SAH)'e dönüşmesini sağlar. Dolayısıyla metilkobalaminin yeniden oluşmasını katalizleyerek aktif halde MTR enziminin devamlılığının sağlanması açısından önemlidir (Şekil 2.15) (Vaughn ve diğerleri, 2004; Barbosa ve diğerleri, 2008; Blanton ve diğerleri, 2011).



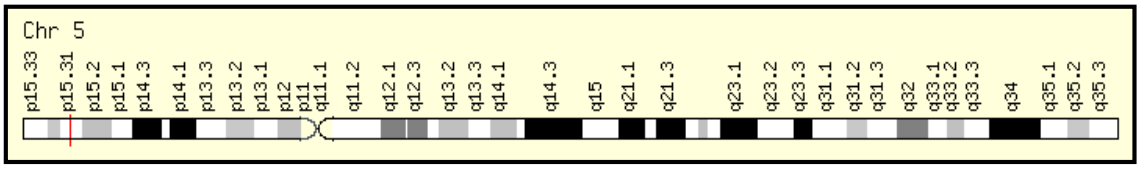
Şekil 2.15. Folat döngüsü (Lee ve diğerleri, 2006'dan değiştirilerek alınmıştır)

Memeli hücrelerinde MS düzeyi folat ile ilişkili olduğundan, metiyonin yokluğunda hücrelerin büyümesi enzim aktivitesinin durumuna göre sınırlanmaktadır. Homosistein remetilasyonunda rol alan bu enzimlerin gen ve protein çalışmaları bu sebepten dolayı önem taşımaktadır.

2.5.2. MTRR geni

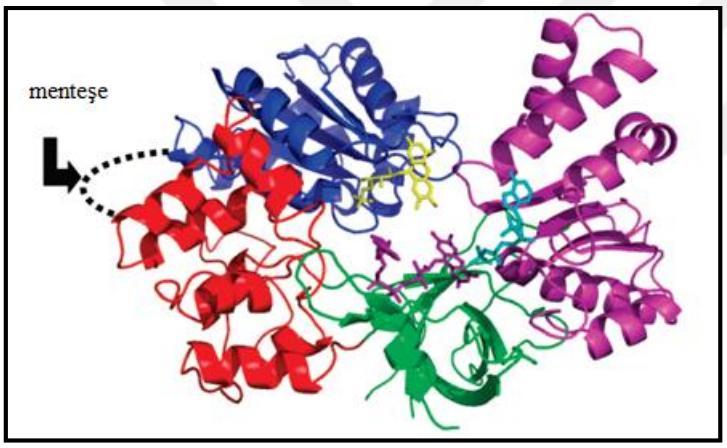
Folat metabolizmasında yer alan metiyonin sentaz redüktaz (MSR) enzimi kromozomun 5p15,2-15,3 (kromozom 5:7,851,186-7,906,025) bölgesinde lokalize olan MTRR (5-metiltetrahidrofolat homosistein metiltransferaz redüktaz) geni tarafından kodlanmaktadır (Leclerc ve diğerleri, 1998).

MTRR geni, 43-380 baz çifti uzunluğundaki 15 ekzondan ve 108 baz çifti ile 4,8 kilo baz uzunluğundaki intronlardan oluşmaktadır (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Beşinci kromozomda MTRR geninin lokalizasyonu (İnternet 4)

725 amino asitten oluşan MTRR enzimi (EC 1.16.1.8), elektron transferazlarının ferredoksin-nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP+) redüktaz (FNR) ailesinin bir üyesidir. Metiyonin sentaz redüktaz enzimi, bir N-terminal NADPH / FAD bağlayıcı (FNR ile ilişkili) domain, bir bağlantı domaini ve bir C-terminal flavodoksin benzeri FMN-bağlama domaini içeren 80 kDa luk bir proteindir (Şekil 2.17) (Wolthers ve Scrutton, 2007).



Şekil 2.17. Metiyonin sentaz redüktaz enzim yapısı

Metabolizmada MTR ve MTRR enzimlerinin rolü çok yönlüdür. Homosisteinin yeniden oluşmasını, tetrahidrofolatın salınmasını ve metiyoninin oluşumunu sağlamaktadırlar. Bu enzimlerin aktivitesinin azalması homosistein seviyesinin yüksekliğine neden olabilir. Bu durum hücre döngüsünde, DNA sentezinde ve proteinlerin yapımında bozukluklara yol açarak tetrahidrofolat seviyesinde azalmalara neden olmaktadır.

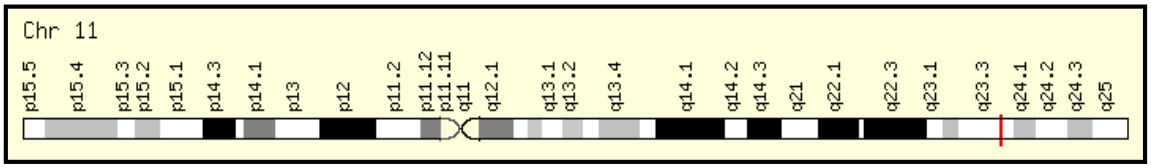
2.5.3. PVRL1 geni

Organizmayı oluşturan hücrelerin birbirlerini tanımaları, büyümeleri, farklılaşmaları, çoğalmaları ve göç etmeleri gibi olayların düzenlenmesinde adezyon (yapışma) molekülleri görev yapmaktadır (Darka, 2003). Adezyon molekülleri, birbirleriyle veya ekstraselüler sıvıdaki moleküllerle etkileşim gösteren, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks bağlantısını sağlayan proteinlerdir (Akkuş ve Sönmez, 2012).

Hücre-hücre adezyon oluşumuna sıkı bağlantı kompleksi (TJ), adherens kompleksi (AJ) ve desmozomlar (DS) olarak bilinen bağlantı kompleksleri aracılık etmektedir (Yap, 2015: 198). Adezyon molekülleri fonksiyon ve yapılarına göre iki şekilde sınıflandırılmaktadır: Ca^2+ bağımlı olanlar ve Ca^2+ bağımlı olmayanlar. Nektinler Ca^2+ bağımlı olmayan hücre adezyon molekülleri arasında yer almaktadırlar. Nektin-1, nektin-2, nektin-3, nektin-4 olmak üzere dört üyeden oluşmaktadırlar.

Nektin-1, kromozomun 11q23,3 (kromozom 11: 119,623,408-119,729,084) bölgesinde lokalize olan poliovirus ilişkili reseptör 1 (Poliovirus Receptor-Related 1, PVRL1, Nektin-1) geni tarafından kodlanmaktadır (Cheng, Huang, Xu, Shu ve Tang, 2012).

PVRL1 geni, 152-610 baz çifti uzunluğundaki 6 ekzondan ve 557 baz çifti ile 49 kilo baz uzunluğundaki intronlardan oluşmaktadır (Şekil 2.18).

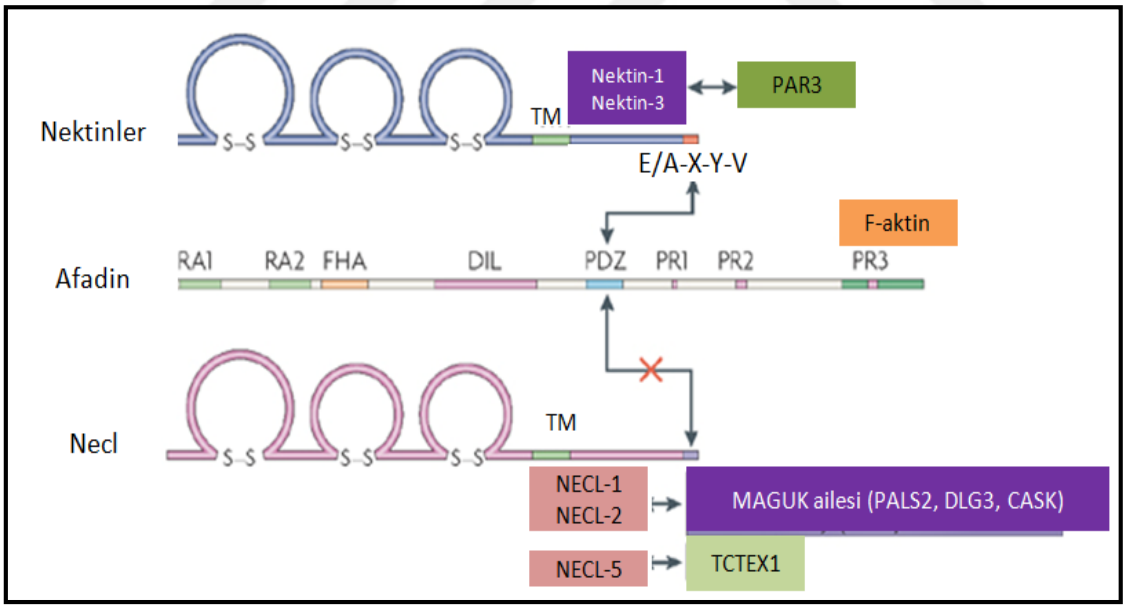


Şekil 2.18. On birinci kromozomda PVRL1 geninin lokalizasyonu (İnternet 5)

Nektin-1, 57 kDa ağırlığında 517 amino asitten oluşan bir proteindir. Her nektin üyesi önce homofilik cis-dimer, daha sonra immunoglobulin domainleri aracılığıyla homofilik veya heterofilik trans-dimerleri (trans-etkileşimler) oluşturmaktadırlar. Heterofilik trans-etkileşimler homofilik trans-etkileşimlere göre daha güçlüdürler.

Nektinler sadece nektinlerle değil nektin benzeri (Necl) diğer moleküllerlede etkileşime girmektedirler. Nektin benzeri moleküller Necl-1, Necl-2, Necl-3, Necl -4 ve Necl-5 olmak üzere beş üyeden oluşmaktadır. Nektin benzeri (Necl) moleküller nektinlere benzerler ancak doğrudan afadine bağlanamazlar (Sakisaka, Ikeda, Ogita, Fujita ve Takai, 2007). Nektin-4 hariç, nektin-1 nektin-1α, nektin-1β, nektin-1γ olmak üzere 3 alt tipe, nektin-2, nektin-2α, nektin-2δ olmak üzere 2 alt tipe, nektin-3 ise nektin3α, nektin- 3β, nektin-3γ olmak üzere 3 alt tipe sahiptirler (Akkuş ve Sönmez, 2012).

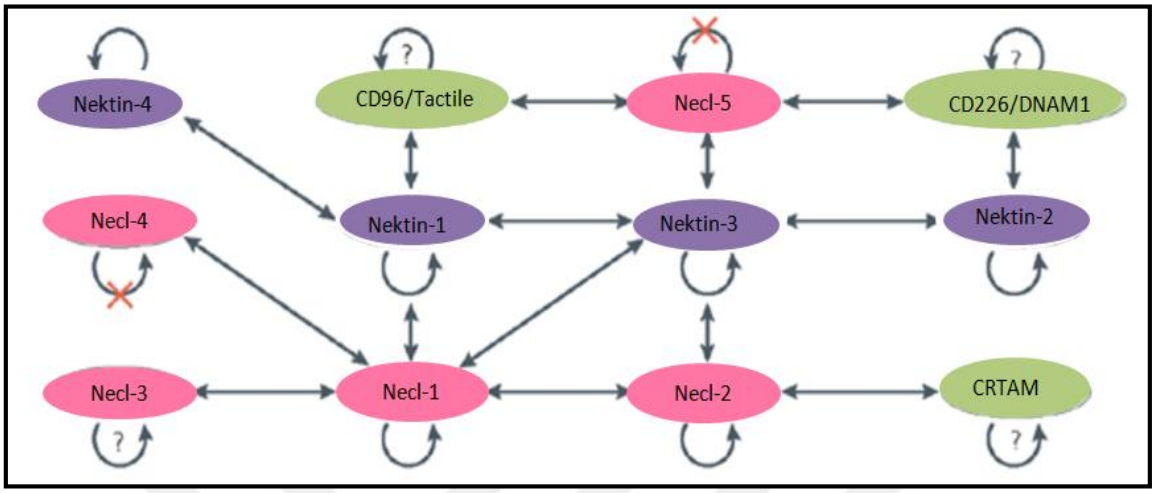
Nektinler ve nektin benzeri moleküller üç Ig-benzeri alan içeren bir ekstrasellüler bölge, tek bir transmembran segment ve sitoplazmik bir kuyruğa sahiptirler. Nektin ailesi adaptör protein afadini etkileyen C terminal bölgede, 4 amino asitin bulunduğu korunmuş bir motife sahiptir (Glu/Ala-X-Tyr-Val, E/A-X-Y-V; X herhangi bir amino asiti temsil etmektedir). Nektin ve afadinin doğrudan bağlanması nektinlerin C terminal bölgesi ile, Afadinin PDZ (postsynaptic density protein-95, Discs-large, zona occludens-1) domaini ile ve aktin hücre iskeletinin nektin bağlantıları aracılığıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Nektinler, necl ve afadinin moleküler yapısı (Takai, Miyoshi, Ikeda ve Ogita, 2008'den değiştirilerek alınmıştır)

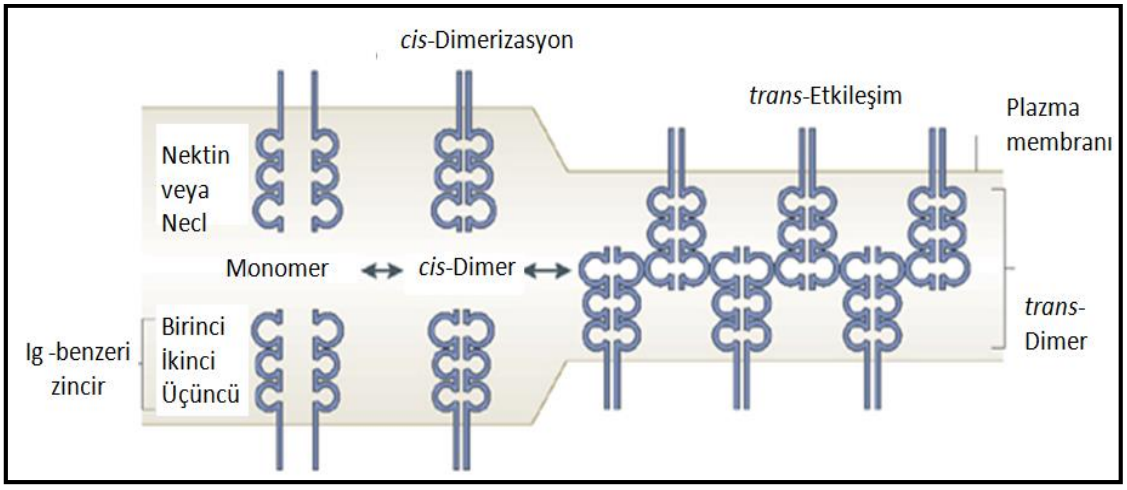
Nektinler, birbirleri arasında trans-homo etkileşimlerle ektraselüler bölgeler aracılığıyla trans-homo dimerler oluştururlar. Aynı zamanda nektinler trans-hetero dimerler oluştururlar ki bu oluşumlar, nektinlerin özgün fonksiyonu için moleküler temeldir (Şekil

2.20). Heterofilik trans etkileşimler nektin-1 ve nektin-3 arasında diğer nektinlere göre daha güçlüdür



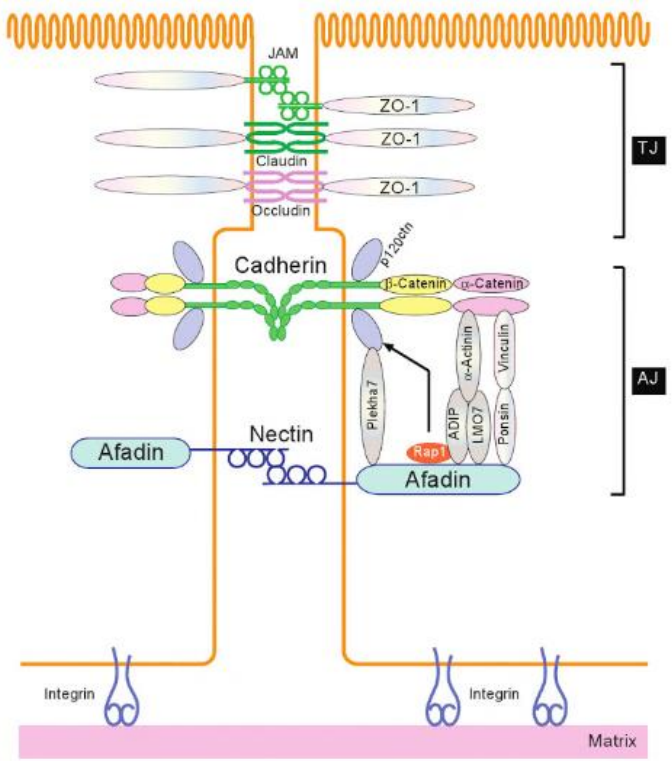
Şekil 2.20. Nektinlerin trans etkileşimleri

Nektin veya nektin benzeri moleküller aynı hücre yüzeyinde ilk olarak cis-dimer formu oluşturmaktadır, bu cis-dimer oluşumu nektinlerin trans etkileşimleri için gereklidir. Trans etkileşimler nektinlerin korunmuş yüzeylerinde trans- dimerlerle gerçekleşmektedir (Şekil 2.21) (Takai, Miyoshi, Ikeda ve Ogita, 2008). Nektinlerin birinci Ig-benzeri ilmiği trans-dimer oluşumu için, ikinci Ig-benzeri ilmiği cis-dimer oluşumu için gerekmektedir. Ancak henüz üçüncü Ig-benzeri ilmiğin fonksiyonu bilinmemektedir (Akkuş ve Sönmez, 2012).



Şekil 2.21. Nektin ve nektin benzeri moleküllerin etkileşimleri (Takai, Miyoshi, Ikeda ve Ogita, 2008'den değiştirilerek alınmıştır)

Nektinler hücre kutup protein olan Par-3, aPKC ve Par-6 ile etkileşim kurarak hücre kutuplaşmasını düzenlemektedirler. Bu proteinlerle etkileşim epitel hücrelerde sıkı bağlantı komplekslerinin ve adherens komplekslerinin oluşumu için gereklidir (Şekil 2.22) (Yap, 2015: 199).



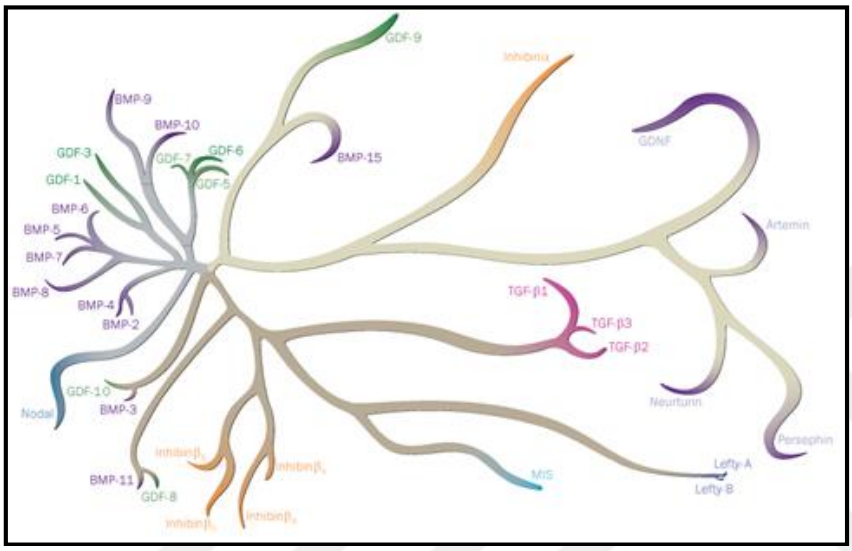
Şekil 2.22. Hücre adezyonunda nektin- afadin kompleksi (Yap, 2015: 207)

Hücre çoğalması, farklılaşması, hareketi ve adezyonu çok hücreli organizmalarda temel hücresel süreçlerdir. Nektinler bu süreçte önemli rol oynayan moleküllerdir. Nektin-1 epidermisin farklılaşması için gereklidir aynı zamanda sıkı bağlantı komplekslerinin ve adherens komplekslerinin oluşumu için dezmozomların oluşumunu düzenlemektedirler.

Nektinler ve nektin benzeri moleküller dudak damak yarıkları, ektodermal displazi, Alzheimer ve kanser gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Yap, 2015: 209). Nektin-1 de meydana gelen mutasyonların yarık dudak damak oluşumdan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Mutasyonlar, nektin-1 in ikinci Ig-benzeri domaininde Trp185 de, üçüncü Ig-benzeri domaininde Gly323 de bulunmaktadır ve çerçeve kayması veya anlamsız (nonsense) mutasyonlara neden olmaktadır.

2.5.4. TGFβ1 geni

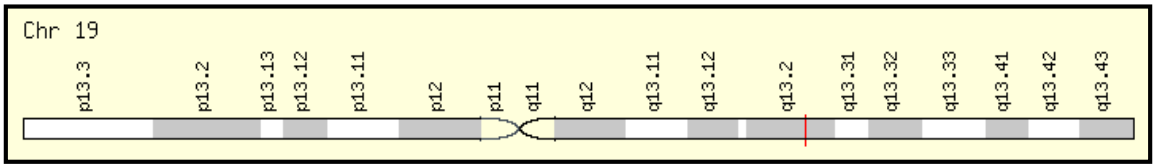
TGFβ süper ailesi üyeleri BMP **(**kemik morfojenik protein), aktivin, inhibin, büyüme farklılaşması faktörü, glia kökenli nörotrofik faktör, lefty, nodal ve TGFβ (TGFβ1, TGFβ2 ve TGFβ3) sitokinlerini kapsayan büyük bir ailedir (Şekil 2.23) (Barutcuoglu ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.23. TGFβ süper ailesi üyeleri (İnternet 6)

TGFβ ailesi palatogenesiz sırasında hücre bölünmesi, farklılaşması, hücre göçü, ekstraselüler matriks oluşumu ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Nawshad, LaGamba ve Hay, 2004).

TGFβ'nın üç izoformu vardır: TGFβ1, TGFβ2 ve TGFβ3. Her izoform farklı bir gen tarafından kodlanmaktadır ve hem dokuya özgü hem de gelişimsel düzenlenme şeklinde eksprese edilmektedirler. TGFβ1, kromozomun 19q13,1 (kromozom 19: 41,301,587-41,353,911) bölgesinde lokalize olan transforme edici büyüme faktörü beta 1 (transforming growth factor beta 1) geni tarafindan kodlanmaktadır (Şekil 2.22).



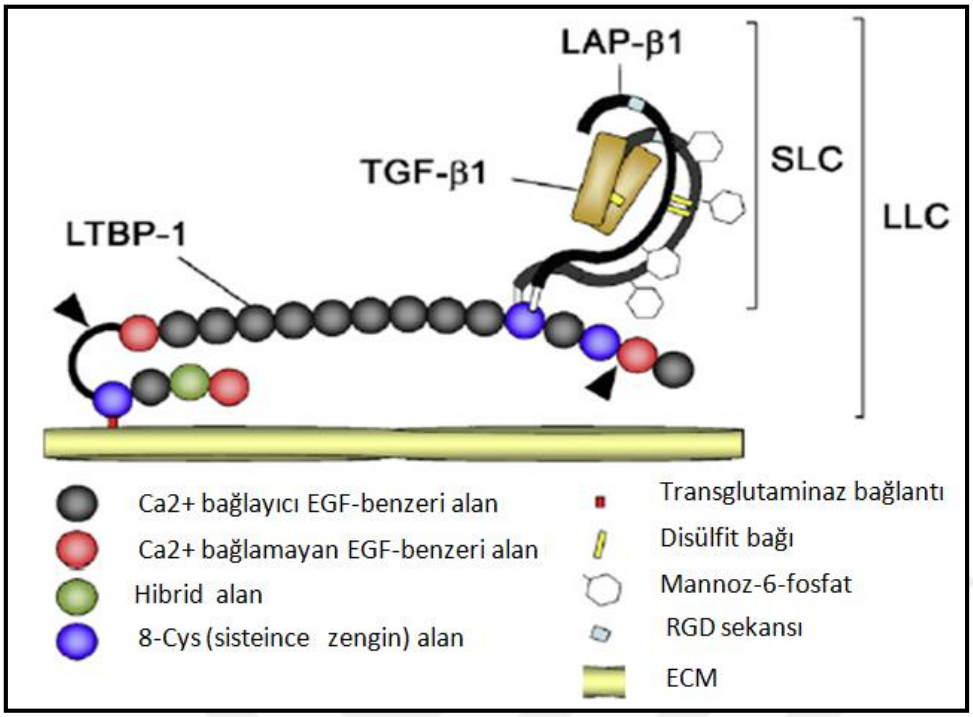
Şekil 2.24. On dokuzuncu kromozomda TGFβ1 geni lokalizasyonu (İnternet 7)

TGFβ1 mesajcı RNA (mRNA), endoteliyal hematopoetik ve bağ dokusu hücrelerinde ifade edilmektedir. *TGFβ2* epiteliyal ve nöronal hücrelerde, *TGFβ3* ise öncelikli olarak mezenşimal hücrelerde ifade edilmektedir. *TGFβ1* ve *TGFβ3* morfogenezi oluşturacak yapılarda ilk olarak ifade edilirken, *TGFβ2* olgun ve farklılaşan epitelyumda daha sonra ifade edilmektedir (Blobe, Schiemann ve Lodish, 2000). Üç izoformu olmasına rağmen sekans benzerliği %71-76'dır ve türler arasında yüksek oranda korunmuş bir bölgedir (Rotzer ve diğerleri, 2001).

TGFβ izoformları büyük prekürsör proteinler olarak kodlanmaktadırlar. TGFβ1 390 amino asitlik, TGFβ2 ve TGFβ3 ise 412 amino asitlik polipeptid zincire sahiptir. Her biri hücreden salgılanması için gerekli olan 20-30 amino asitlik bir N-terminal sinyal peptide, latency associated peptide veya LAP olarak adlandırılan pro (öncü)-bölgeye ve olgun TGFβ molekülünün oluşması için gerekli olan 112-114 amino asitlik bir C-terminal bölgeye sahiptir. Salgılanma sırasında LAP, TGFβ1'in olgun bölgesi ile kovalent olmayan bağlarla ilişkili olarak kalır. LAP-1 uzaklaştırılmadıkça biyolojik olarak aktif olmayan latent TGFβ1 olarak adlandırılır (Khalil ve diğerleri, 2001).

Pro-TGFβ1 molekülü, olgun TGFβ1'i oluşturmak için bir endoproteaz olan furin tarafından kesilir. TGFβ1'e kovalent olmayan bağlarla bağlı olan olgun TGFβ1 ve LAP ilişkisi küçük latent TGFβ1 kompleksi (SLC) olarak adlandırılır. Bu ilişki yüksek affiniteli reseptörler ve diğer reseptörler tarafından TGFβ1'in tanınmasını engeller. SLC= TGFβ1+LAP-β1 SLC'nin LAP kısımları, farklı TGFβ isoformları arasında sekans değişimleri gösterdiğinden dolayı, LAP-β1, LAP-β2 ve LAP-β3 olarak adlandırılırlar. Kemik hücre hattı gibi birkaç hücre tipi SLC formunda latent TGFβ üretir ve salgılar ancak hücre tiplerinin çoğu büyük latent kompleksin (LLC) bir parçası olarak, TGFβ salgılar (Şekil 2.25).

Latent (inaktif) TGFβ1'e bağlanan LTBP proteini ile SLC arasında kovalent disülfit bağları aracılığıyla LLC oluşturulur. LLC= TGFB1+LAP-B1 + LTBP.

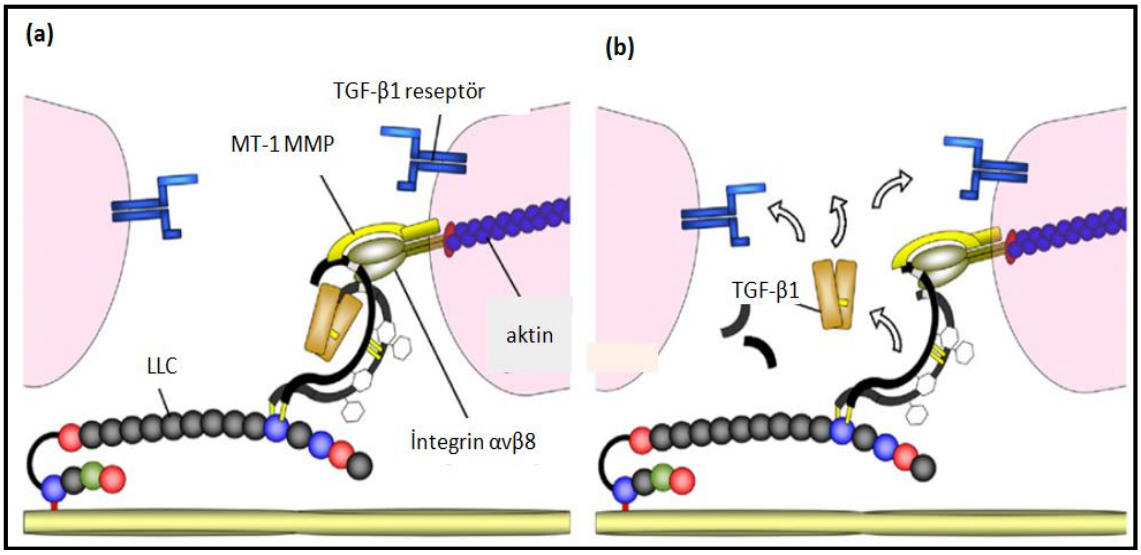


Şekil 2.25. TGFβ1'in büyük latent kompleksi içinde salgılanması

Latent TGFβ1'e bağlanan protein ailesinin 4 izoformu vardır: LTBP-1, LTBP-2, LTBP-3 ve LTBP-4. LTBP'leri fibrilin benzeri extraselüler matriks (ECM) proteinlerinin süper ailesine aittir ve transglutaminasyon aşamasında fibrilin-1 ve vitronektin dâhil olmak üzere diğer ECM proteinlerine bağlanmaktadır. Bu özelliğinden dolayı LLC, ekstraselüler matrikste TGFβ deposu olarak görev yapmaktadır (Wipff PJ ve Hinz, 2008).

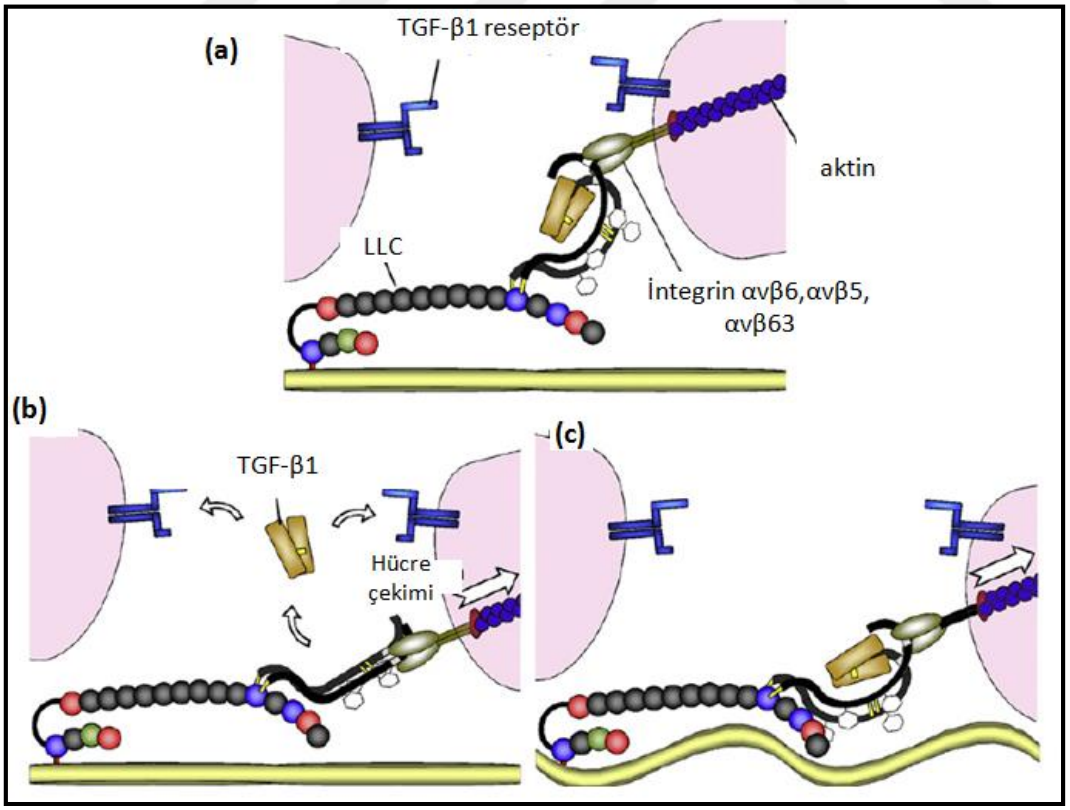
Latent TGFβ1 hücre tipine ve fizyolojik ortama göre çeşitli mekanizmalar tarafından biyolojik olarak aktif forma dönüştürülmektedir. Tüm mekanizmalarda SLC de ve/veya LLC de LAP-β1'den TGFβ1'in ayrımı söz konusudur. LAP-β1, integrinler için tanıma bölgesi olan RGD amino asit sekanslarını içermektedir. LAP-β1 proteinin N terminal bölgesinde bulunurlar ve yüksek affinite ile bağlanmaları için gereklidirler.

Büyük latent TGFβ1 kompleksi ulaştığı hücre yüzeyinde önce integrin ile etkileşime girer. LAP-β1'in proteolitik kesiminden sonra aktif hale gelen TGFβ1 yapıdan ayrılır. Aktive olan TGFβ1, hücre yüzeyinin aktivasyon sınırlarına göre otokrin veya parakrin seviyede hareket eder (Şekil 2.26) (Wipff PJ ve Hinz, 2008).



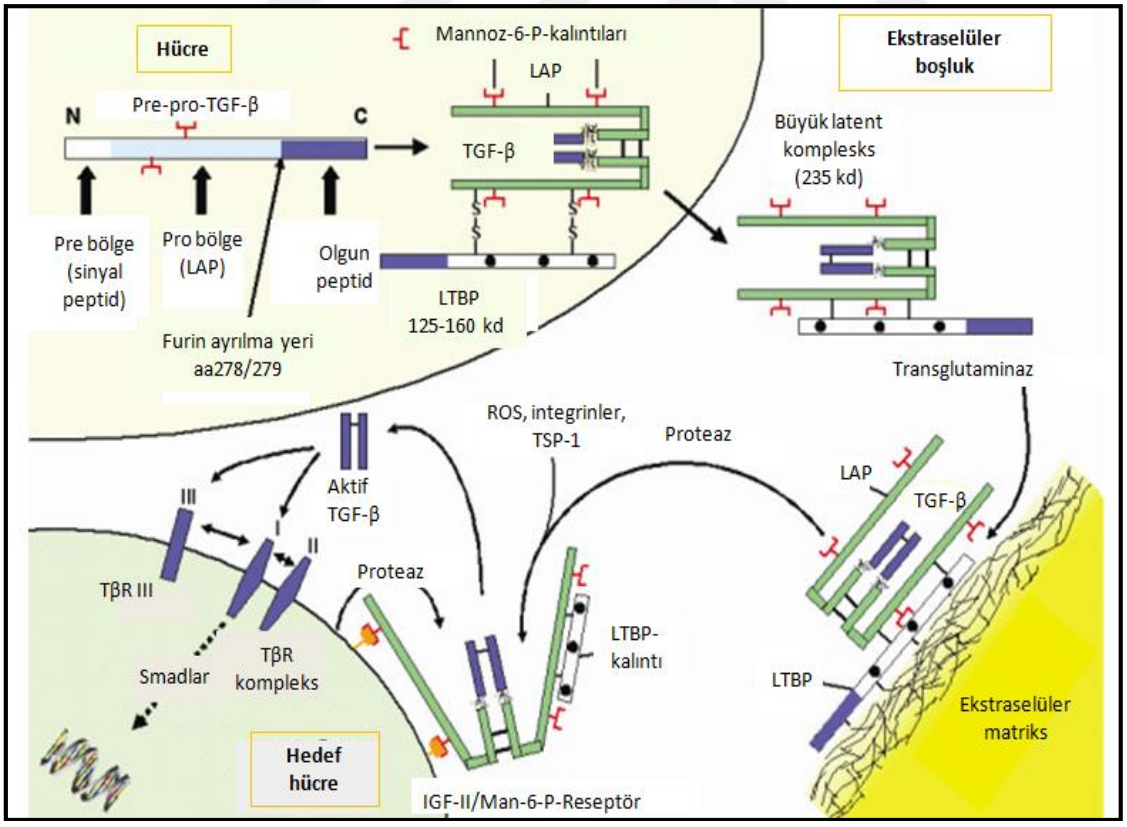
Şekil 2.26. İntegrin etkileşimi ile latent TGFβ1'in aktivasyonu

Ancak LLC ektraselüler matrikse dayanıklı olmayan bir şekilde bağlanmış ise LAP-β1 için kullanılan hücre çekim kuvveti yetersiz olacak ve LAP-β1'de konformasyonel değişim olmayacağı için TGFβ1 serbest kalıp aktive olamayacaktır (Şekil 2.27).



Şekil 2.27. LAP-β1'in konformasyonel değişimi ile aktif TGFβ1 oluşumu

TGFβ sinyal yolağının aktive olması TGFβ ligandının reseptörlere bağlanması ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.28). Reseptörleri aktive etmek için otokrin TGFβ molekülleri salgılanır. TGFβ homodimer sinyalleri transmembran serin/treonin kinaz reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Damak gelişimi sırasında önemli rol oynayan bu reseptörlerin üç tipi bulunur: TGFβ tip I (TβRI), TGFβ tip II (TβRII) ve TGFβ tip III (TβRIII). TβRI ve TβRII ligand varlığında homodimer olarak bulunan sinyal reseptörleridir. Sitoplazmik bir domaini bulunmayan TβRIII ün fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber TβRII ye ligandın bağlanmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. TβRI ve TβRII yapısal olarak birbirine çok benzemektedir. Ancak, TβRII ye göre TβRI daha kısa ekstraselüler domaine sahiptir ve C-terminal bölgesinde yüksek oranda korunmuş GC (glisin, serin) zengin bölge bulunmaktadır. TGFβ ligantının TβRII ye bağlanması, kinaz aktivitesinin ortaya çıkmasını ve TβRI GC domaininde serin ve treoninin fosforile olmasını sağlamaktadır. Tip I sinyal reseptörü aktif hale geldikten sonra sinyali hücre içi aracılar olan ve memelilerde 8 farklı üyesi olan Smad ailesine iletmektedir (Nawshad, LaGamba ve Hay, 2004).

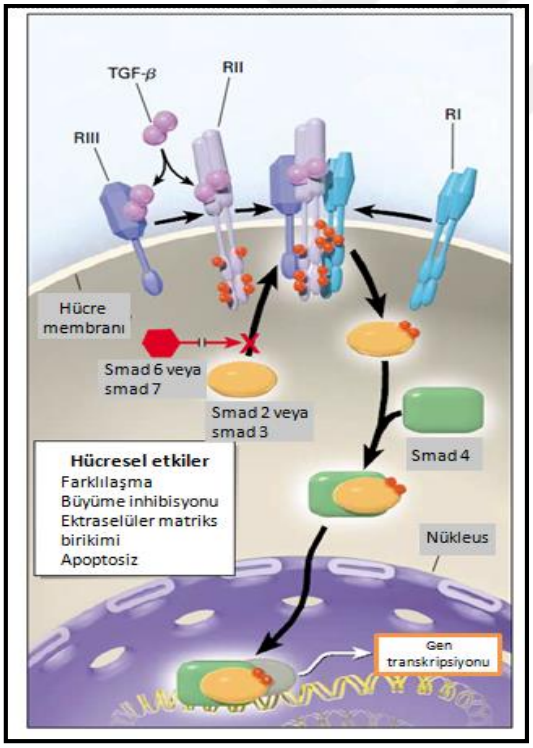


Şekil 2.28. Ekstraselüler matriks ve TGFβ'nın sentezlemesi (Gressner, Weiskirchen ve Gressner, 2007'den değiştirilerek alınmıştır)

Yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre SMAD'lar 3 ayrı alt gruba ayrılırlar;

1. Reseptör ile regüle edilen SMAD'lar (R-SMAD'lar); TGFβ ailesi reseptör kinazlarının direkt substratlarıdır (SMAD 1,2,3,5 ve 8).
2. Ortak-mediatör SMAD'lar (Co-SMAD'lar); R-Smad'larla birleşerek sinyal iletimine katılan SMAD'lardır (SMAD 4).
3. İnhibitör SMAD'lar (ISMAD'lar); R-SMAD ve Co-SMAD gruplarının sinyal fonksiyonunu inhibe eden antagonist SMAD'lardır (SMAD 6 ve SMAD 7).

TGFβ sinyalizasyonunun gerçekleşmesi için nükleusta Smad2/Smad3-Smad4 kompleksinin oluşması gereklidir. Nükleoporinler aracılığıyla bu kompleksin geçişi gerçekleştikten sonra Smad2/Smad3-Smad4 kompleksi yaklaşık 300'e yakın genin promotor bölgesine bağlanmakta ve transkripsiyonun regülasyonu gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.29) (Barutcuoglu ve diğerleri, 2013; Vural, 2010).



Şekil 2.29. TGFβ sinyalizasyonu (Blobe, Schiemann ve Lodish, 2000'den değiştirilerek alınmıştır)

Embriyonik gelişimde TGFβ ve Smadların rolü ve etkisi üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak dudak damak yarıklı hastalar üzerine yapılan TGFβ gen çalışmaları yetersiz bulunmaktadır.

2.6. Dudak Damak Yarıkları ile Beraber Görülen Diğer Sendromlar

Dudak ve damak yarıklarının yaklaşık %70'i sendromsuz yarıklardır. Yaklaşık %30'luk kısmı içeren sendromik yarıklar ise 300'den fazla tanımlanmış mendeliyen sendromlar, teratojenler ve kategorize edilmemiş sendromlardır (Carinci, Scapoli, Palmieri, Zollino ve Pezzetti, 2007). Çizelge 2.2'de dudak ve damak yarıkları ile beraber görülen sendromlar belirtilmiştir (Setó-Salvia ve Stanier, 2014).

Çizelge 2.2. Dudak ve damak yarıkları ile beraber görülen sendromlar

Lokus	*Sendrom*
1p21,1	Tip II Stickler sendromu
1p34	Van der Woude sendromu
2p21	Holoprozensefali-2
2q31,1	Serebral felç
2p25,3	3 MC sendromu
3q28	ankyloblepharon-ektodermal displazi
3q28	Karpal tünel sendromu
3q28	Rapp-Hodgkin sendromu
4p16,2	Diş agenezi
4p16,2	Witkop sendromu
5q15-q21	CL/P ve gastrik kanser
5q32	Treacher-collins sendromu
7q21,11	CHARGE sendromu
8p11,23	Kallmann sendromu
8q24,21	Burkitt lenfoma
9q22,32	Holoprozensefali-7
10q26,13	Cruzon/Apert / Pfeiffer sendromları
11q23,3	EEC (ektrodaktili, ektodermal displazi, clefting) sendromu
12q12-q14	Kabuki sendromu
15q12	Çocukluk çağı epilepsisi
16q22,2	Miller sendromu
17q24,3	Pierre-Robin sendromu
22q11,2	DiGeorge sendromu
22q11,21	Velo-kardio-fasiyal sendromu
Xq21,1	Abruzzo-Erickson sendromu
Xq28	Otopalatodigital sendromu

Ülkemizde, Hacettepe Üniversitesi'ne yarık dudak ve damak tedavisi için başvuran hastaları çalışmaya dâhil ederek istatistik raporu çıkaran Tunçbilek ve diğerlerinin yapmış oldukları bir çalışma mevcuttur.

Çalışmaya alınan 1229 hastanın 151'inde izlem veya tedavi gerektiren toplam 206 ek malformasyon saptanmıştır. Malformasyonlar etkilenen organ sistemine göre incelendiğinde, ekstrakranial iskelet sistemi malformasyonlarının en sık görülen grubunu oluşturmuştur. 1229 hastadan 55'inin sendromik olduğu saptanmıştır (Çizelge 2.3). Bu hastalar incelendiğinde ise Pierre-Robin sekansı en sık görülen grubu oluşturmuştur. Arkasından Van der Woude sendromu ve EEC (ektrodaktili, ektodermal displazi clefting) sendromunun takip ettiği görülmüştür (Tunçbilek, Özgür ve Balcı, 2004).

Çizelge 2.3. Hastalarda saptanan sendromların dağılımı

Sendromlar	*Sayı*
Pierre-Robin sendromu	15
Van der Woude sendromu	7
EEC (ektrodaktili, ektodermal displazi, clefting) sendromu	4
Down sendromu	2
Oro-kranio-dijital sendromu	2
DiGeorge sendromu	2
Wildervank sendromu	2
CHARGE sendromu	2
Oro-fasio-dijital sendrom tip 1	2
Fascio-kardio-renal sendrom	1
Trisomi 18	1
Cornelia de Lange sendromu	1
Cat- eye sendromu	1
Hay-Wells sendromu	1
Treacher-collins sendromu	1
Adams-Oliver sendromu	1
Velo-kardio-fasiyal sendromu	1
Turner sendromu	1
Larsen sendromu	1
Apert sendromu	1
Fraser sendromu	1
Gordon sendromu	1
Klippel-Feil sendromu	1
Goldenhaar sendromu	1
Dandy-Walker sendromu	1
Popliteal web sendromu	1
TOPLAM	55

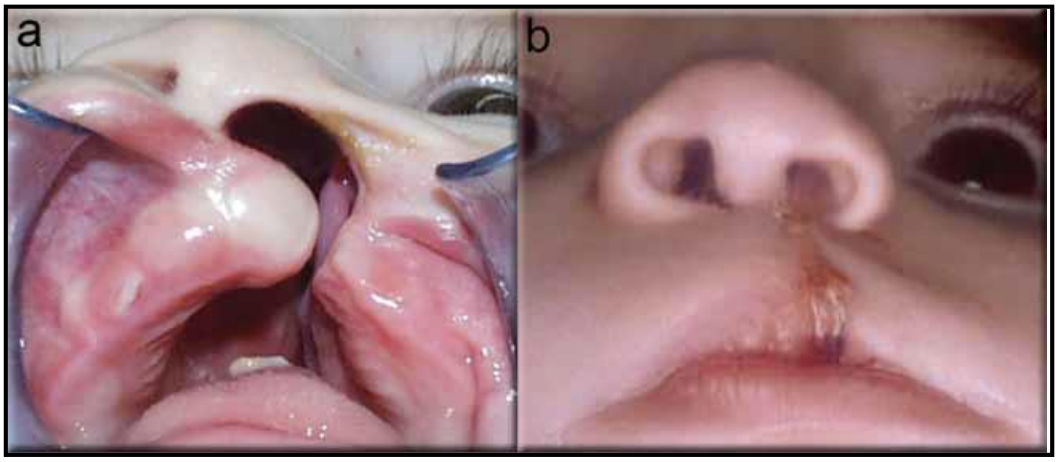
Dudak veya damak yarıklı bir birey estetik şekil bozukluğunun yanı sıra sınırlı maksillofasiyal büyüme, konuşma anomalileri, yutma ve beslenme zorlukları, duyma kaybı gibi ciddi fonksiyonel bozukluklara da maruz kalmaktadır. Bu durum yaşamı tehdit etmese de önemli bir sağlık yükü getirmektedir (Allam ve Stone, 2014).

2.7. Dudak ve Damak Yarıklarının Tanısı ve Tedavisi

Yarık dudak ve damak tanısı, doğumdan sonra anamnez formunun doldurulmasıyla başlanır. Sonrasında fiziki muayene, radyolojik inceleme, genetik inceleme, laboratuar incelemeleri, başın uzunluğu, çevresi ve boyunun ölçüldüğü sefalometri ve fotoğraflama gibi yöntemler kullanılır.

Dudak ve damak yarıklarının tedavisi kesinlikle ekip çalışmasını gerektirmektedir. Bu ekip içerisinde yeni doğan uzmanı, pediatrist, ortodontist, genetik uzmanı, plastik cerrah, kulak burun boğaz uzmanı, konuşma terapisti ve hemşirenin bulunması tedavi için önemlidir (Grayson ve diğerleri, 1999).

Dudak ve damak yarıkları, embriyonik evrenin 4 ile 12. haftalarında nazofrontal ve lateral yüz uzantılarının mezenkim tarafından penetrasyonu ve füzyonlarının eksikliği ile ortaya çıkmaktadır. Genelde dudak yarığı, “10” lar kuralı diye bilinen (10 haftalık yaş “2.5 ay”, 10 poundluk ağırlık “4500 gram”, 10 gr/dl üzeri hemoglobin) yaklaşıma göre ameliyat edilir.



Resim 2.8. Yarık dudaklı bir hastanın ameliyattan (a) önceki ve (b) sonraki görünümü (Keçik, Enacar ve Özgür, 2009)

Dudak onarım teknikleri 4 tanedir; Düz hat onarımı (Veau III ameliyatı), Zig-zag kapama yöntemi (Skoog, Wynn tekniği), Barsky tekniği (Veau II ameliyatı), Primer abbe flebi. Ameliyattan sonra kapatılan yarıkta kas fonksiyon kazanır ve normal dudak şekli oluşturulur. Ameliyat izi, ilk birkaç haftalık dönemde kırmızı ve geniş bir halde olur. Bu görünüm zamanla azalır ancak iz hiçbir zaman tamamen yok olmaz. Birçok çocukta burun ve dudak bölgesindeki gölgelenmeler nedeniyle bu iz zorlukla görülebilir şekle dönüşür.

Damak yarığı ameliyatı, düzgün konuşmayı sağlamak, düzgün orta yüz gelişimini yönlendirmek, dişlerin uyumunu sağlamak, işitme bozukluğunu düzeltmek amacıyla yapılır. Anlaşılabilir konuşma yaklaşık 18. ayda başladığından damak yarığı ameliyatı, bu tarihten önce, bebek 10-12 aylıkken yapılır (Aksu ve Özgür, 2007).

Damak onarımında kullanılan teknikler, Basit palatoplasti, Geri itme (pushback) palatoplasti ve yardımcı girişimler olarak sıralanabilir. Ameliyattan sonra ağızdan bir şeyler yemesi veya içmesi mümkün olamayacağından damar yolundan destek sıvı tedavisi uygulanır.

3. MOLEKÜLER TEKNİKLER

Tezin gerçekleştirilmesi esnasında kullanılan gereç ve yöntemler şu şekilde verilebilir.

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Otomatik pipet (Gilson 10, 100, 200, 1000 μL)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Su banyosu (Kottermann, Almanya)
- Derin dondurucu (-20°C, Arçelik)
- Mikro santrifüj (Thermo, ABD)
- Elektroforez jel tabağı (Qwl Scientific, ABD)
- Minigel elektroforez tankı (Biometra, Almanya)
- Düşük voltaj güç kaynağı (BioRAD, ABD)
- Thermal Cycler (Biometra, Almanya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- UV lamba (Spectroline, ABD)
- Jel görüntüleme sistemi (Image Analyser)
- Agencourt magnetic plate
- Liyofilizatör cihazı (Thermo, ABD)
- DNA dizi analizi cihazı (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD)

3.1.2. Kimyasal malzemeler

- EDTA (AppliChem, Almanya)
- RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu
- Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya)
- Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya)
- Tris (Amresco, ABD)
- Sodyum Klorid (Merck, Almanya)
- Soydum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya)

- Proteinaz K enzimi (Fermentas, Litvanya)
- Fenol (Merck, Almanya)
- Kloroform (Merck, Almanya)
- İzoamil alkol (Merck, Almanya)
- Sodyum Asetat (Sigma, ABD)
- Etanol (Merck, Almanya)
- Taq tampon çözeltisi (Fermentas, Litvanya)
- $MgCl_2$ (Fermentas, Litvanya)
- dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya)
- Agaroz (Sigma, ABD)
- Etidyum bromid (Sigma, ABD)
- Brom-Fenol Mavisi (BBF, Merck, Almanya)
- ΦX174 DNA-HaeIII (BioLabs, ABD)
- 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Litvanya)
- Restriksiyon endonükleaz enzimi (Fermantas, Litvanya)
- Restriksiyon endonükleaz enzimi (New England Biolabs Inc, USA)
- Akrilamid (Merck, Almanya)
- Bis-akrilamid (Sigma, Almanya)
- Borik asit (AppliChem, Almanya)
- Amonyum Persülfat (AppliChem, Almanya)
- TEMED (Sigma, Almanya)
- Xyelene Cyanol (Sigma Aldrich, ABD)
- Gümüş nitrat (AgNO3) (AppliChem, Almanya)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Scharlau, İspanya)
- Agencourt AMPure XP PCR pürifikasyon kiti (Beckman Coulter A63880, ABD)
- GenomeLab Quick Start Master Mix
- Glikojen
- Formamid
- Sample Loading Solution
- Mineral Oil

3.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA'lar, hastalardan toplanan kan örneklerinden fenol/kloroform yöntemi kullanılarak ekstrakte edildikten sonra etanol (Merck, Almanya) ile muamele edilerek çöktürülmüş ve hazır hale getirilmiştir.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyon yöntemi (PCR), bir kimyacı olan Kary Mullis tarafından 1983 yılında geliştirilmiştir. Bu buluşu Kary Mullis'e 1993 yılında kimyada Nobel Ödülü'nü kazandırmıştır.

PCR, organizmaya ait genomik DNA'daki dizisi bilinen özgün bölgenin enzimatik olarak çoğaltması için uygulanan bir in vitro klonlamadır. Polimeraz enzimi varlığında bir dizi reaksiyon içerdiğinden, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olarak adlandırılmaktadır (Akar, 1999:154).

PCR hızlı, özgün, hassas ve az miktarda DNA örneği ile çalışma avantajı sağladığından kalıtsal hastalıkların teşhisinde, parmak izlerinin tanımlanmasında, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde, insan evrimi araştırmalarında ve daha birçok çalışma alanında tercih edilme sebebi olmuştur.

PCR tekniği çok az miktarda DNA ile çalışma imkânı sağlamaktadır. Hedef bölgeyi 10^6-10^{12} arasında çoğaltmak mümkündür. Bu yöntemde, çoğaltılması istenen bölge için sağdan ve soldan bölgeyi çevreleyen bir çift primer sentezlenir. Arada kalan bölge bu primer çifti ile enzimatik olarak sentezlenerek in vitro klonlama gerçekleştirilir.

PCR tekniği için;

1. Genomik DNA örneği
2. Çoğaltılması istenilen bölge için sentezlenmiş bir çift primer
3. Deoksinükleotidtrifosfatlar (A,T,G,C)
4. DNA polimeraz enzimi
5. Polimeraz enziminin çalışması için uygun pH ve iyon koşullarını ihtiva eden tampon karışımı gereklidir (Akar, 1999:154,155).

PCR tekniği, temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 3.1).

1. DNA zincirinin birbirinden ayrılması (Denatürasyonu)

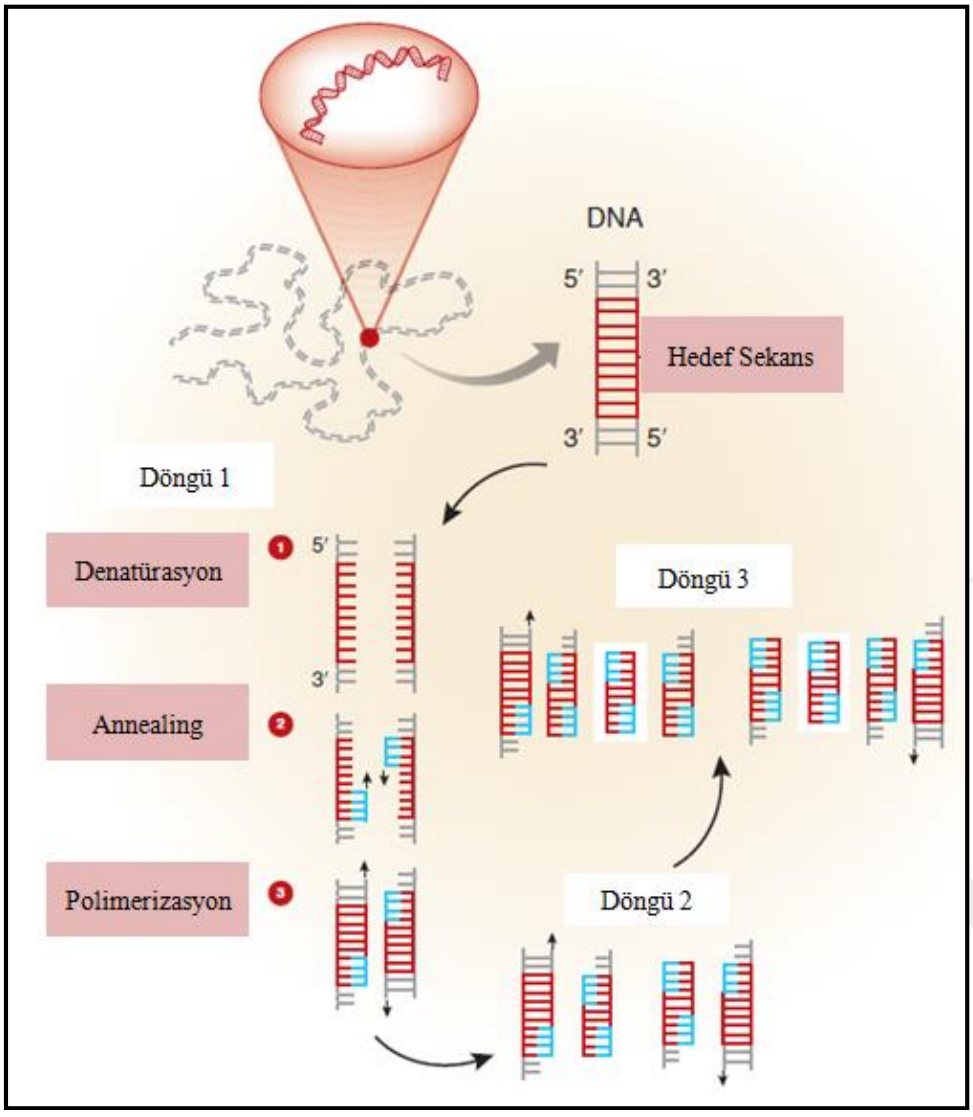
Çoğaltılması istenen DNA, 92-95 °C'de 2-5 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA'nın tek zincirli hale gelmesi sağlanır.

2. Primerlerin DNA zincirine bağlanması (Annealing)

Sıcaklığın 50 ila 65°C arasında düşürülerek oligonükleotid primerlerin, tek zincirli hale getirilmiş DNA'nın 3' uçlarındaki nükleotidlere bağlanması sağlanır. Bu işlem, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak işlev görür ve bölgenin uzunluğuna göre 1-2 dakika sürmektedir.

3. Zincir uzaması (polimerizasyon)

DNA zincirlerine bağlanan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) ile uzatılmasıdır. Taq DNA polimerazın optimum çalışma sıcaklığı 72-75 °C arasında olduğu için çoğaltma işlemleri genelde bu sıcaklıkta yapılmaktadır. DNA polimeraz enzimi nükleotitleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, kalıp DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur. İşlem sonunda DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve 25- 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA fragmenti oluşturulur (Cooper ve Hausman, 2006:115).



Şekil 3.1. PCR tekniğinin şematik sunumu (Garibyan ve Avashia, 2013)

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi birçok faktöre bağlıdır. Bunlar;

1. Enzim konsantrasyonu

Genelde PCR reaksiyonu için *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Enzim, yüksek ısılarda iyi çalışması ve hızlı bir şekilde DNA sentezi yapması sebebiyle tercih edilmektedir. Reaksiyon karışımında kullanılan Enzim konsantrasyonu düşük olursa oluşacak ürün daha az olurken, konsantrasyonun yüksek olması spesifik olmayan bantların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

2. Magnezyum konsantrasyonu

Magnezyum konsantrasyonu Taq DNA polimerazın optimum kosullarda calısması için gereklidir. Aynı zamanda primer bağlanması, denaturasyon, urun spesifikliği, primer dimer olusumunu da etkilemektedir. Reaksiyon karısımında gereğinden fazla magnezyumun bulunması non spesifik urunlerin olusumuna yol acarken, gerektiğinden az miktarda bulunması istenen urunun yeterince sentezlenememesine neden olmaktadır. Polimeraz enziminin iyi çalışabilmesi için tampon pH ının da doğru ayarlanması gerekmektedir. Tamponun 50 mM KCl, 10 mM Tris.Cl pH: 8,4 ve 1.5 mM $MgCl_2$ bulundurması önmelidir. Aynı zamanda DNA elde edilme aşamasında yüksek oranlarda şelasyon yapıcı ajanların (EDTA) bulunmaması gerekmektedir (Yıldırım, Kandemir, Ates Sönmezoğlu ve Gülec, 2011).

3. dNTP konsantrasyonu

dNTP konsantrasyonunun optimize edilememesi oluşacak ürünün yeterince sentezlenememesine neden olmaktadır. Yüksek miktarda kullanılması olması istenilenden farklı dizilerin (misincorporation) çoğaltılmasına sebep olmaktadır. Bu yüzden olabildiğince düşük miktarlarda kullanmak spesifikliği artırmaktadır.

4. Primer konsantrasyonu

Primerlerin nükleotid dizilişleri, primer uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları istenen ürün için büyük önem taşımaktadır. Primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca Tm: 4(GC)+2(AT) formülüyle bulunabilir. Aynı zamanda primerlerin Guanin, Citosin (GC) miktarları %50'yi geçmemelidir. Oluşacak ürünün spesifikliği arttıran bir diğer etken primerlerin uzunluğudur. Uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid arasında olmalıdır. Primer çiftinin uç bölgelerinde ve dizi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır. Aksi takdirde primerin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak PCR'ın olumsuz etkilenmesine neden olabilir (Akar, 1999:165-167).

3.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon endonükleazlar çift sarmal DNA'yı belirli nükleotid dizilerinden tanıyarak kesen bakteriyel kökenli enzimlerdir. Bakterilerde bulunan bu enzimler, dışarıdan hücre içerisine giren bazı özel gen veya markerları taşıyan genetik materyalleri keserek genetik yapılarının değişimi engellemekte ve stabilitelerini korumaktadırlar (Akar, 1999:225).

Restriksiyon endonükleazların tanıdıkları bölgeye polindromik diziler adı verilir. Tanıma dizilerinin uzunluğu 4-8 nükleotidtir ve oluşan yeni parçalar birbirine simetriktir.

Restriksiyon endonükleaz enzimleri adlandırılırken izole edilen prokaryotun cins isminin ilk harfi ve tür isminin ilk iki harfi kullanılır. Bazen soya ait bir harfle birlikte ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamıyla enzimin izolasyon sırası belirtilir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin adlandırılması (Cooper ve Hausman, 2006:104)

EcoRI adının türetilmesi		
Kısaltma	Anlam	Açıklama
E	Escherichia	Cins
Co	coli	Tür
R	RY13	Suş
I	İlk tespit edilmiş	O bakteride tespit edilmiş sırası

Restriksiyon endonükleazların 4 tipi vardır (Tip I, II ve III, IV). Bunlar diziyi tanıma bölgeleri, DNA kesim yerleri ve kofaktör gereksinimleri bakımından farklılık gösterirler.

Tip I restriksiyon endonükleazlar: İlk keşfedilen restriksiyon enzimleridir. Tanıma bölgelerinden yaklaşık 1 kilo baz çifti uzaklıktaki bölgeleri keserler, asimetriktirler ve tanıma bölgeleri 6-8 nükleotidlik bir boşlukla ayrılan iki kısımdan oluşurlar. S-Adenozil

metiyonin, adenozin trifosfat ve magnezyum iyonları ($Mg^{2+)}$ gibi birkaç enzim kofaktör olarak görev alır (Birben, 2007).

Tip II restriksiyon endonükleazlar: Moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılan enzimler bu sınıfta yer almaktadır. Genellikle 4-8 nükleotidlik baz dizisini tanıyarak çift sarmal DNA'yı keserler. Kofaktör olarak genelde sadece Mg^{2+} gereksinimleri vardır.

Tip III restriksiyon endonükleazlar: Palindromik olmayan dizileri tanırlar. DNA'yı tanıma yerinden 20-30 baz uzakta keserler. S-Adenozil metiyonin ve magnezyum iyonları (Mg^{2+})'nı kofaktör olarak kullanırlar (Meisel, Bickle, Kruger ve Schroeder, 1992).

Tip IV restriksiyon endonükleazlar: Sadece metillenmiş DNA'yı keserler. Kofaktör olarak Mg^{2+} ve GTP'yi kullanırlar (Rao ve Sistla, 2004).

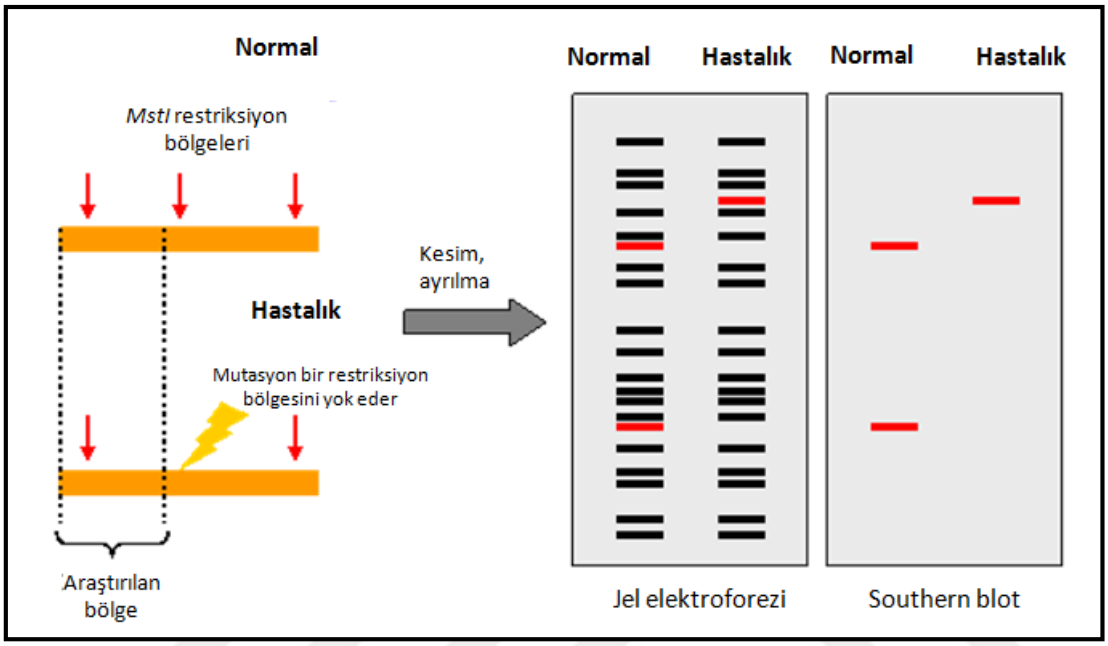
Bazı restriksiyon enzimleri 'yapışkan uçlu' DNA ürünleri oluştururken bazıları 'küt uçlu' ürünler oluşturmaktadır (Çizelge 3.2) (Akar, 1999:71).

Çizelge 3.2. Restriksiyon enzimlerin kesme yerleri

Enzim	Kaynak	Tanıma yeri	Kesme
EcoRI	*Escherichia coli*	5' GAATTC 3' CTTAAG	5' ---G AATTC----3' 3'----CTTAA G----5'
EcoRII	*Escherichia coli*	5' CCWGG 3' GGWCC	5'----- CCWGG----3' 3'-----GGWCC -----5'
HgaI	*Haemophilus gallinarum*	5' GACGC 3' CTGCG	5'------NN NN-----3' 3'------NN NN-----5'
AluI	*Arthrobacter luteus*	5' AGCT 3' TCGA	5' ------AG CT----3' 3'-------TC GA----5'

RFLP, belirli bir restriksiyon endonükleaz ile DNA dizisinin kesilmesinden sonra, jelde DNA nın farklı uzunluklarda fragmanlara ayrılmasıdır (Şekil 3.2). DNA'nın özgül kırılma

bölgesindeki oluşacak tek bir baz değişikliği bile, enzimin tanıma ve kesme özelliğini bozmaktadır ve farklı uzunluklarda DNA fragmanlarının oluşumuna neden olmaktadır. Bu özelliğinden dolayı genotiplendirme, adli tıp, babalık testleri ve kalıtsal hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır.



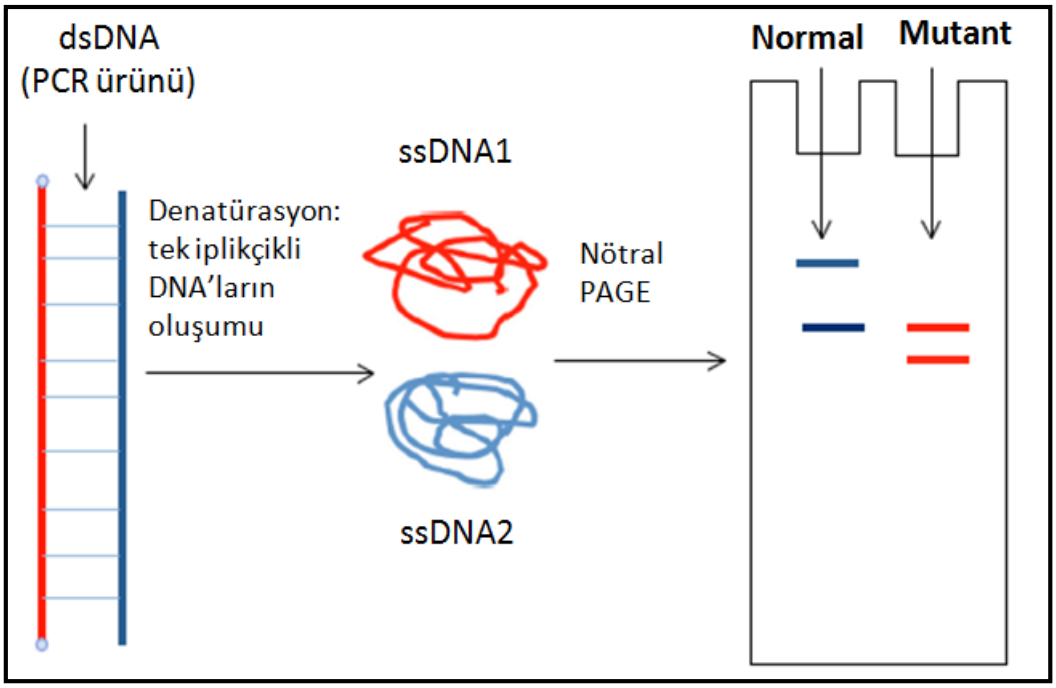
Şekil 3.2. Tek nükleotid değişimi ile tanıma bölgesi değişen restriksiyon enziminin kesim sonrası jelde görüntülenmesi (İnternet 8)

3.5. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP)

Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Stranded Conformation Polymorphism, SSCP) DNA'daki değişimleri belirleyebilen PCR temelli bir yöntemdir. Öncelikle taranacak gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılır. Çoğaltılan PCR ürünleri formamid içeren yükleme boyasıyla karıştırılarak yüksek ısıda denatüre edilir. Dikey jel elektroforezine yüklenerek yüksek voltajda uzun süre yürütülür. İşlem sonunda elektroforezdeki göç hızlarına bakılarak jelin değerlendirilmesi yapılır. Bu yöntem ile nükleotit dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşmuş tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür (Klug ve Cummings, 2002:517).

Poliakrilamid jelde tek zincirli DNA, molekül içi etkileşim sonucu farklı formda katlanıp kıvrılarak belirli bir konformasyon (ikincil yapının oluşması) almaktadır (Nataraj, Olivos-Glander, Kusukawa ve Highsmith, 1999).

DNA da oluşan tek bir nükleotid faklılığı bu konformasyonu değiştirerek DNA nın jeldeki elektroforetik hareketini etkilemektedir. Aynı zamanda DNA zincirinin uzunluğu, baz eşleşmelerinin sayısı ve yeri fragmentlerin hareketlerini belirleyerek farklı bant profilleri olarak gözlenmektedir (Şekil 3.3) (Orita, Iwahana, Kanazawa, Hayashi ve Sekiya, 1989).



Şekil 3.3. SSCP yönteminin çalışma prensibi

PCR ürününün denatürasyonundan sonra poliakrilamid jelde tek iplikçikli DNA lar farklı hareket eder. dsDNA, çift iplikçikli DNA; ssDNA, tek iplikçikli DNA; PAGE, poliakrilamid jel elektroforezi (Bagyinszky, Youn, An ve Kim, 2014'den değiştirilerek alınmıştır)

SSCP yöntemiyle 200 bç'lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %90; 400 bç'lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %80'dir. Araştırılan dizinin uzunluğu arttıkça mutasyon belirleme oranı azalmaktadır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, araştırılan gen bölgesinin 200 bç civarında olması gerekmektedir.

Poliakrilamid non-denature (akrilamide-bisakrilamid) jele yüklenen örnekler elektroforez sonrası karşılaştırıldığında, değişim içeren DNA tek bir baz bile farklı olsa değişik bir bant profili oluşturduğu için normal (wild type) DNA'ya göre farklı yerlerde bantlar göstermektedir.

SSCP tekniği ile birçok örnek aynı anda tarandığı için moleküler genetik çalışmalarında avantajlı bir yöntemdir. Aynı zamanda hızlı ve basit bir yöntemdir ancak duyarlılığı sınırlıdır (Akar, 1999:177,178).

3.6. DNA Dizi Analizi

Genlerin yapısını, ifadelenmesini (ekspresyonu), düzenlenmesini, protein etkileşimlerini ve hastalıkların moleküler mekanizmalarını anlamak için, DNA'daki baz dizilerinin bilinmesi çok önemlidir. DNA baz dizilimlerini görüntülemek için 1970'lerin sonlarında iki farklı diziliş teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar:

1. *Maxam-Gilbert Metodu:* Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen kimyasal kırılma metodudur. Bu yöntem başlangıçta çok önemli bir yere sahipti, ancak günümüzde kullanılmamaktadır.

Nükleotid dizisi belirlenecek olan DNA parçacığının önce 5' ucundan polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif P32 ile işaretlenmesi sağlanır. Bu işaretleme, DNA'nın iki ipliğinin birbirinden ayrılmasından sonra elektroforezde DNA parçacığının tanınmasını sağlamak içindir. Sonraki adımda, dört farklı tüpe konulan DNA örneğini, zinciri belirli nükleotidlerden kırması amacıyla kimyasal reaksiyonlar uygulanır. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpde farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış DNA molekülleri elde edilir. Böylece, kırılmanın olduğu noktaya göre hepsi 5' ucundan işaretlemiş ancak uzunlukları birbirinden farklı olan DNA parçacıkları elde edilmiş olur. Dört reaksiyonda meydana gelen DNA parçacıkları, poliakrilamid jelde yan yana olmak üzere elektroforezle ayrıştırılır. Elektroforez işleminin sonunda DNA parçacıklarının uçları P32 ile işaretli olduğu için otoradyografi ile bantların görüntülenmesi yapılır (Akar, 1999:215,216).

2. *Sanger Metodu:* Sanger dizileme metodu olarak bilinen Frederick Sanger ve Andrew Coulson'un geliştirdikleri enzim aracılığıyla zincir sonlandırma metodudur. Frederick Sanger'e 1980 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırmıştır.

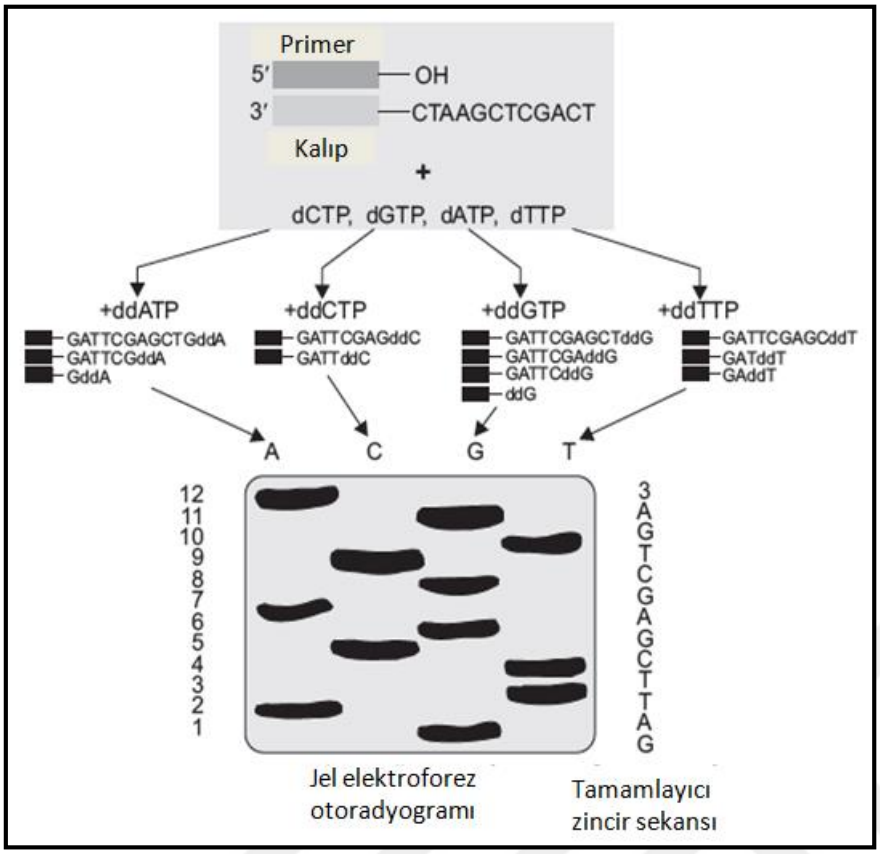
Bu yöntemde, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir.

Sanger metodu için;

1. Tek iplikli kalıp DNA
2. 4 deoksinükleotid (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
3. 4 dideoksinükleotid (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP)
4. DNA polimeraz enzimi (genellikle Taq polimeraz)
5. Serbest OH grubu içeren primer
6. Polimeraz enziminin çalışması için uygun pH ve iyon koşullarını ihtiva eden tampon karışımı gereklidir (Nair, 2010:604-606).

Polimeraz zincir reaksiyon yönteminde olduğu gibi, DNA zincirinin birbirinden ayrılması, primerlerin DNA zincirine bağlanması ve zincir uzama aşamalarının belirli sayıda tekrarlanması ile gerçekleştirilir. Yöntemde kullanılan dideoksinükleotidlerin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. Fosfodiester bağının oluşumu engellendiği için yeni nükleotitler yapıya katılamamakta ve DNA zincir uzaması sonlanmaktadır (Şekil 3.4).

Yöntemde, dört tüp reaksiyon karışımı hazırlanır. Her reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, primer, radyoaktif nükleotid trifosfatların dördü ve ddNTP'den sadece birini içerir. Dört ayrı reaksiyon tüpünde zincir sonlanması için gerekli olan farklı bir ddNTP bulunur. dNTP ve ddNTP aynı tüp içerisinde yer aldığında aralarında bir yarışma başlar. Eğer substrat olarak dNTP kullanılırsa zincir uzamaya devam eder, ddNTP kullanılırsa sentez sonlandırılır. Reaksiyon sonucunda çeşitli uzunluklarda DNA parçacıkları meydana gelir. Bu DNA parçacıkları elektroforezde yürütülerek uzunluklarına göre bir profil sergilerler ve otoradyografi ile görüntülenirler (Geoffrey ve Robert, 2006:111,112).



Şekil 3.4. Sanger metodu ile DNA dizi analiz yöntemi (Nair, 2010:604-606'den değiştirilerek alınmıştır)

Günümüzde dizi analizleri için, otomatik DNA dizi analiz cihazları kullanılmaktadır. Yöntem Sanger'in enzimatik DNA zincir sonlandırma yöntemine dayanmaktadır. İki önemli aşama farklılık göstermektedir. Birincisi işaretleme sırasında radyoaktif madde yerine floresan boyalar kullanılmaktadır. İkincisi otoradyografi ile görüntülenme yerine lazer ve optik okuma sistemlerinin bir arada bulunduğu, verilerin bilgisayar ortamına direkt taşındığı otomasyon sistemi kullanılmaktadır. Sistemde her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak nükleotid dizisinin belirlenmesi sağlanmaktadır (Geoffrey ve Robert, 2006:113).

4. MATERYAL VE YÖNTEMLER

4.1. Materyal

4.1.1. Çalışma grubunun oluşturulması

Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Ana Bilim Dalı'na başvuran ve klinik olarak sendromsuz dudak damak yarık tanısı almış 0-10 yaş arası 80 olgu tez çalışmasına dâhil edilmiştir. DNA'ları çalışılacak bireylerin çalışmaya dâhil edilmelerine dair izin kâğıtları ebeveynlerinden alınmıştır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından onaylanan formlar kullanılmıştır (Tarih:18.12.2007, Karar sayısı:124). Çalışmaya dâhil edilen 0-10 yaş arası 125 kontrol örneği, ülkemizin değişik bölgelerinden toplanmış sağlıklı birey örnekleridir.

4.2. Yöntemler

4.2.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu fenol-kloroform yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle DNA izolasyonu 3 gün sürmektedir. Çalışmaya dâhil edilen bireylerden 1 ml 0,5 M EDTA'lı (Etilendiamintetraasetikasit) tüplere 9 ml kan alınmıştır. Kan örnekleri önce 50 ml'lik falkon tüplere aktarılır, sonra üzerine 25 ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu (155 mM Amonyum Klorid; 10 mM Sodyum Bikarbonat; 0,5 mM EDTA) ilave edilir, çalkalandıktan sonra 20 dk buzda bekletilir. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip falkon tüpünün altında kalan pellete dokunulmadan üstteki süpernatant dökülür. Tüpe tekrar 20 ml RBC lizis solüsyonu ilave edilip yıkama işlemi eritrositler giderilene kadar devam ettirilir. Son yıkama aşamasından sonra kalan beyaz pellet, lökositlerdir. Lökositlerin üzerine 1000 µl RBC lizis solüsyonu eklenip karıştırılır ve 200 µl'si bir ependorf tüpe alınır. Üzerine lökosit hacminin 2,5 katı kadar nükleaz solüsyonu (10 mM pH: 8 Tris- Trisklorid; 100 mM Sodyum Klorid, 1 mM pH:8 EDTA, son konsantrasyonu %0,5 olan Sodyum Dodesil Sülfat (%10'luk SDS) 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi eklenerek 56°C'lik su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılır.

İkinci gün, proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılmasını sağlamak için su banyosundan çıkartılan tüplere 1:1 oranında Fenol, Kloroform ve İzoamil alkol (sırasıyla 25:24:1) oranlarında eklenir. 10 dakika çalkalandıktan sonra 20 dk buzda bekletilir, iki ayrı faz oluşması beklenir. Süpernatant kısmı temiz bir eppendorf tüpe alındıktan sonra üzerine toplam hacmin 1/10'u 2 M Sodyum Asetat toplam hacmin 2 katı %95'lik etanol ilave edilir. DNA'nın görünür hale getirilmesi için tüp hafifçe ters düz edilir ve -20 ºC'de bir gece bekletilir.

Üçüncü gün, -20 ºC'den alınan eppendorf tüpler +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlanır. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 500 µl %70'lik etanol eklenip v +4ºC'de, 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Süpernatant dökülüp etanolün uçması beklenir. Alkol uçtuktan sonra içerisine DNA nın yoğunluğuna göre üzerine TE solüsyonu (10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA) ilave edilerek 37°C su banyosunda DNA'nın çözülmesi sağlanır. DNA nın kullanım süresine göre +4°C'de veya -20ºC'de saklanır.

4.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR yöntemi kullanılarak hedeflenen bölgenin çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada *MTR, MTRR, PVRL1* ve *TGFB* genlerinin aday ekzonları PCR ile çoğaltılmıştır.

MTR geni PCR

MTR geni 2756A→G polimorfizminin taranması için her biri 10pmol/µl konsantrasyonunda bir çift primer seti kullanılmıştır.

MTR F: 5'-GTGTTCCCAGCTGTTAGATG -3'

MTR R: 5'- GACACTGAAGACCTCTGATTTGAAC -3'

TCTATGGCTATCTTGCATTTTCA*GTGTTCCCAGCTGTTAGATG*AAAATCTA
AAGGATGAATACTTTGAGGAAATCATGGAAGAATATGAAGATATTAGAC
AGGACCATTATGAGTCTCTCAAGGTAAGTGGTAGAAACAGATTTTTGCTT
GTTTTTAATGTGACTGTTTTTTATGATCCTAGTTTTTAATGTGACTTTTTAA
AATGGTTTTGAGGAGTGTAAAAGGCTTTGGATCATTTTAGAGAATTTCTG
TCTTCTA*GTTCAAATCAGAGGTCTTCAGTGTC*TTAAGTTCCCAAATAATTTT

Şekil 4.1. MTR primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge

PCR için 10X Taq tampon çözeltisi (Fermentas, Litvanya), 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon 10pmol/µl forward ve reverse primerler, Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya) belirlenen oranlarda kullanılmıştır. Son hacim ddH_2O ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksionu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 37 siklusta; 95°C'de 30 saniye, 52°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye, 72°C'de 10 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Thermal Cycle, Biometra, Almanya). Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 265 bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir. Şekil 4.1'de primerler italik ve altı çizili olarak gösterilmiştir. Ardından %2'lik agaroz jele 10 µl PCR ürünü yüklenerek görüntülenmiştir.

MTRR geni PCR

MTRR geni 66A→G polimorfizminin taranması için her biri 10pmol/µl konsantrasyonunda bir çift primer seti kullanılmıştır.

MTRR F: 5'- GCAAAGGCCCATCGCAGAAGACAT -3'
MTRR R: 5'- GTGAAGATCTGCAGAAAATCCATGTA -3'

TTTCACTGTTACATGCCTTGAAGTGATGAGGAGGTTTCTGTTACTATATGCTACA
CAGCAGGGACAG***GCAAAGGCCATCGCAGAAGAAATA***TGTGAGCAAGCTGTG
G***TACATGGATTTTCTGCAGATCTTCAC***TGTATTAGTGAATCCGATAAGTTTCACT
GTTACATGCCTTGAA
GTGA

Şekil 4.2. MTRR primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge

PCR için 10X Taq tampon çözeltisi, 25 mM $MgCl_2$, son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı, son konsantrasyon 10pmol/µl forward ve reverse primerler, Taq DNA Polimeraz belirlenen oranlarda kullanılmıştır. Son hacim ddH_2O ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksionu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 37 siklusta; 95°C'de 30 saniye, 51°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye, 72°C'de 10 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 265 bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Şekil 4.2). Ardından %2'lik agaroz jele 10 µl PCR ürünü yüklenerek görüntülenmiştir.

PVRL1 geni PCR

PVRL1 genini kodlayan 3. ekzonu taramak için bölge iki parçaya ayrılarak PCR ile çoğaltılmıştır.

1. bölge için (*PVRL1* 3a) her biri 10pmol/µl konsantrasyonunda bir çift primer seti kullanılmıştır.

PVRL1 3a F: 5'-AACAGGGCTAGTCCCATCAC -3'
PVRL1 3a R: 5'-TCCTGGTACTCTGCCTCACC -3'

TTTCACTGTTACATGCCTTGAAGTGATGAGGAGGTTTCTGTTACTATATGCTACA
CAGCAGGGACAG***GCAAAGGCCATCGCAGAAGAAATA***TGTGAGCAAGCTGTG
G***TACATGGATTTTCTGCAGATCTTCAC***TGTATTAGTGAATCCGATAAGTTTCACT
GTTACATGCCTTGAA
GTGA

Şekil 4.3. PVRL1 3a primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge

PCR için 10X Taq tampon çözeltisi, 25 mM $MgCl_2$, son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı, son konsantrasyon 10pmol/µl forward ve reverse primerler, Taq DNA Polimeraz belirlenen oranlarda kullanılmıştır. Son hacim ddH_2O ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksionu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 37 siklusta; 95°C'de 30 saniye, 57°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye, 72°C'de 10 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 199 bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Şekil 4.3). Ardından %2'lik agaroz jele 10 µl PCR ürünü yüklenerek görüntülenmiştir.

2. bölge (PVRL1 3b) için her biri 10pmol/µl konsantrasyonunda bir çift primer seti kullanılmıştır.

PVRL1 3b F: 5'-TCCTGGGAAACTCGGTTAAA-3'
PVRL1 3b R: 5'-CAGCCAGCCCTGCTCAC-3'

CTGGGAAGCCTCCCAGTGTGGTA***TCCTGGGAAACTCGGTTAAA***AGTGAGG
CAGAGTACCAGGAGATCCGGAACCCCAATGGCACAGTGACGGTCATCAGC
CGCTACCGCCTGGTGCCCAGCAGGGAAGCCCACCAGCAGTCCTTGGCCTG
CATCGTCAACTACCACATGGACCGCTTCAAGGAAAGCCTCACTCTCAACG
TGCAGT***GTGAGCAGGGCTGGCTG***CCAGGGGCCTCCTGGGGTGGGCGCCAC
TGTCCCTCCTCCCTCCTCCTCTCCTTTCTCCTCCCTTTCTCT

Şekil 4.4. PVRL1 3b primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge

PCR için 10X Taq tampon çözeltisi, 25 mM $MgCl_2$, son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı, son konsantrasyon 10pmol/µl forward ve

reverse primerler, Taq DNA Polimeraz belirlenen oranlarda kullanılmıştır. Son hacim ddH_2O ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksionu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 37 siklusta; 95°C'de 30 saniye, 56°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye, 72°C'de 10 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 201 bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Şekil 4.4). Ardından %2'lik agaroz jele 10 µl PCR ürünü yüklenerek görüntülenmiştir.

PVRL1 genini kodlayan 6. ekzonu taramak için her biri 10pmol/µl konsantrasyonunda bir çift primer seti kullanılmıştır.

PVRL1 6 F: 5'-ATGGGTGGAGTGCTGCG-3'
PVRL1 6 R: 5'-TGGGGAGGAGCGGTCAC-3'

TCACTCCAGCTACCAACGCTGCGGCATGTTAGGGCTCCAGG*ATGGGTGGAG*
*TGCTGCG*GGGCCTCGAACTGGAGCTGCTCAAACCTGGGGTGCAGACAGCCT
GTCCTTCCTGGCCTCTCCTTTCCCTGCCTCCCTCCCACCCCCTCTACACCCCA
GGAGCACACGCTGATGCTGTCCCCTCCATCTCTTTTCCTCACCCAGAATTCC
CCTACACCCCGTCTCCTCCCGAACATGGGCGGCGCGCCGGGCCGGTGCCCA
CGGCCATCATTGGGGGCGTGGCGGGGAGCATCCTGCTGGTGTTGATTGTGG
TCGGCGGGATCGTGGTCGCCCTGCGTCGGCGCCGGCACACCTTCAAGGGTG
ACTACAGCACCAAGAAGCACGTGTATGGCAACGGCTACAGCAAGGCAGGC
ATCCCCCAGCACCACCCACCAATGGCACAGAACCTGCAGTACCCCGACGAC
TCAGACGACGAGAAGAAGGCCGGCCCACTGGGTGGAAGCAGCTATGAGGA
GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGGCGGTGGAGGGGGCGAGCGCAAGGTGGGC
GGCCCCCACCCCAAATATGACGAGGACGCCAAGCGGCCCTACTTCACCGTG
GATGAGGCCGAGGCCCGTCAGGACGGCTACGGGGACCGGACTCTGGGCTAC
CAGTACGACCCTGAGCAGCTGGACTTGGCTGAGAACATGGTTTCTCAGAAC
GACGGGTCTTTCATTTCCAAGAAGGAGTGGTACGTGTAGCCCCCCTTCCAGA
GCCTCTGTCT*GTGACCGCTCCTCCCCA*GCCCCTCCCCGCACGCCCCCTGCCC

Şekil 4.5. *PVRL1* geni 6.eksonu tarayan primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge

PCR için 10X Taq tampon çözeltisi, 25 mM $MgCl_2$, son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı, son konsantrasyon 10pmol/µl forward ve reverse primerler, Taq DNA Polimeraz belirlenen oranlarda kullanılmıştır. Son hacim ddH_2O ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksionu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 37 siklusta; 95°C'de 30 saniye, 57°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye, 72°C'de 10 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 750 bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Şekil 4.5). Ardından PCR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 µl PCR ürünü yüklenerek görüntülenmiştir.

TGFβ1 geni PCR

TGFβ1 genini kodlayan 1. ekzonu taramak için her biri 10pmol/µl konsantrasyonunda bir çift primer seti kullanılmıştır.

TGFβ1 F: 5'-CTAGGTTATTTCCGTGGG -3'
TGFβ1 R: 5'- CCTTGGCGTAGTAGTCG -3'

CTCCGACCTGCCACAGATCCCCTATTCAAGACCACCCACCTTCTGGTACCAG
ATCGCGCCCAT*CTAGGTTATTTCCGTGGG*ATACTGAGACACCCCCGGTCCAA
GCCTCCCCTCCACCACTGCGCCCTTCTCCCTGAGGACCTCAGCTTTCCCTCG
AGGCCCTCCTACCTTTTGCCGGGAGACCCCCAGCCCCTGCAGGGGCGGGGC
CTCCCCACCACACCAGCCCTGTTCGCGCTCTCGGCAGTGCCGGGGGGCGCC
GCCTCCCCCATGCCGCCCTCCGGGCTGCGGCTGCTGCCGCTGCTGCTACCGC
TGCTGTGGCTACTGGTGCTGACGCCTGGCCGGCCGGCCGCGGGACTATCCA
CCTGCAAGACTATCGACATGGAGCTGGTGAAGCGGAAGCGCATCGAGGCCA
TCCGCGGCCAGATCCTGTCCAAGCTGCGGCTCGCCAGCCCCCCGAGCCAGG
GGGAGGTGCCGCCCGGCCCGCTGCCCGAGGCCGTGCTCGCCCTGTACAACA
GCACCCGCGACCGGGTGGCCGGGGAGAGTGCAGAACCGGAGCCCGAGCCT
GAGGC*CGACTACTACGCCAAGG*AGGTCACCCGCGTGCTAATGGTGGAAACC
CACAACG

Şekil 4.6. *TGFβ1* geni 1. eksonu tarayan primer çiftinin PCR sonucu amplifiye ettiği bölge

PCR için 10X Taq tampon çözeltisi, 25 mM $MgCl_2$, son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı, son konsantrasyon 10pmol/µl forward ve reverse primerler, Taq DNA Polimeraz belirlenen oranlarda kullanılmıştır. Son hacim ddH_2O ile 50 µl'ye tamamlandıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 37 siklusta; 95°C'de 30 saniye, 63°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye, 72°C'de 10 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda 523 bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Şekil 4.6). Ardından PCR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 µl PCR ürünü yüklenerek görüntülenmiştir.

4.2.3. Agaroz jel elektroforezi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin kontrol edilmesi için ve restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşan bantların görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Çalışmamızda PCR ürünlerini değerlendirmek için %2'lik agaroz jel, restriksiyon enzimleriyle kesimleri değerlendirmek için %3'lük agaroz jel kullanılmıştır. İlk olarak, 54 g Tris 27,5 g Borik asit, 20 ml 0,5 M pH:8 EDTA ve deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlanarak TBE 5X solüsyonu hazırlanır. TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında deiyonize su ile seyreltilmesiyle TBE 1X solüsyonu hazırlanır.

%2'lik agaroz jel hazırlamak için, 2g agaroz tartılıp 100 ml TBE 1X solüsyonuna tamamlanmıştır. %3'lik agaroz jel için, 3g agaroz 100 ml TBE 1X solüsyonuna tamamlanmıştır.

İstenilen miktarda agaroz tartılıp TBE 1X solüsyonu ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra mikrodalga fırında karıştırılarak homojen bir şekilde kaynatılır. Üzerine 4 µl etidyum bromid ilave edilip iyice karıştırılırılarak daha önceden hazır hale getirilen jel tabağına dökülür. Jel tabağına uygun taraklar takılarak yükleme kuyucuklarının istenilen hacimde olması sağlanır. Agarozun donması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk bekletilir. Donduktan sonra tarakları çıkartılıp jel tabağı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilir. Jelin üzerini örtecek ve akım geçmesi sağlanacak şekilde tankın, TBE 1X solüsyonu ile doldurulması gerekir. PCR ürünlerinden 6 µl alınarak 3 µl Brom-Fenol Mavisi karıştırılarak jele yüklenir. Çalışılan PCR ürünlerinin doğru bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığını görebilmek için Fermentas ve ΦX174 DNA-*Hae*III (BioLabs, ABD) markerları kullanılmıştır. 90 V akımda 20-30 dk kadar yürütülüp ultraviyole ışık altında değerlendirildikten sonra Image Analyser'da görüntüleri alınmıştır.

4.2.4. PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleriyle muamelesi

MTR 2756A→G gen değişiminin HaeIII ile incelenmesi

MTR geni 26. ekzonun PCR'ı ile elde edilen 265 bç'lik ürünleri, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi için *Hae*III (*Haemophilus aegyptius,* 5′-GG↓CC-3′) restriksiyon endonükleaz enzimiyle (Fermantas, Litvanya) kesime tabi tutulmuştur. 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM $MgCl_2$, 10 mM Dithiothreitol (DTT) ve 500 mM NaCl'den oluşan restriksiyon endonükleaz 10X Buffer M tamponundan örnek başına 2µL, *HaeIII* enziminden 1 µl (10 U/µl), 17 µl distile su ve PCR örneğinden 10 µl tüplere eklenip 2-3 saniye solüsyonun karışması sağlandıktan sonra 2000 rpm hızda 30 saniye santrifuj edilmiştir. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Enzimle kesilen örnekler %3'lük agaroz jelde oluşan bant profillerine göre yorumlanmıştır.

MTRR 66A→G gen değişiminin NdeI ile incelenmesi

MTRR geni 2. ekzonun PCR'ı ile elde edilen 66 bç'lik ürünleri, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi için *NdeI* (*Neisseria denitrificans*, 5′-CA↓TATG-3) restriksiyon endonükleaz enzimiyle (Fermantas, Litvanya) kesime tabi tutulmuştur. 500 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM $MgCl_2$, 10 mM Dithiothreitol (DTT) ve 1000 mM NaCl 'den oluşan restriksiyon endonükleaz 10X Buffer M tamponundan örnek başına 2µl, *NdeI* enziminden 1 µl (10 U/µl), 17 µl distile su ve PCR örneğinden 10 µl tüplere eklenip 2-3 saniye solüsyonun karışması sağlandıktan sonra 2000 rpm hızda 30 saniye santrifuj edilmiştir. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Enzimle kesilen örnekler %3'lük agaroz jelde oluşan bant profillerine göre yorumlanmıştır.

4.2.5. SSCP yöntemi

SSCP yöntemi için poliakrilamid jel hazırlanışı

PCR ile çoğaltılan *PVRL1* ve *TGFβ1* gen bölgelerinin mutasyon taraması SSCP tekniği kullanılarak yapılmıştır. Çalışma için %7'lik poliakrilamid jel hazırlanmıştır. %7 konsantrasyonunda poliakrilamid jel hazırlamak için gerekli solüsyonlar; Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu, TBE 5X solüsyonu, %10'luk Amonyum Persülfat ve TEMED'dir.

Akrilamid - bisakrilamid solüsyonu

196 g Akrilamid ve 4 g bis-akrilamid deiyonize su ile 250 ml'ye tamamlanır. 37ºC'de ısıtılarak çözdürüldükten sonra, son hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

TBE 5X solüsyonu

54 g Tris, 27,5 g Borik asit ve 20 ml 0,5 M pH:8 EDTA deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlanarak TBE 5X solüsyonu hazırlanır.

%10'luk Amonyum Persülfat

1 g Amonyum Persülfat tartılıp distile su ile 10 ml'lik hacime tamamlanır. Poliakrilamid jeli hazırlamak için 12,5 ml %40'lık akrilamid-bisakrilamid solüsyonu, 12 ml TBE 5X solüsyonu ve 35 ml distile su homojen olarak karıştırıldıktan sonra jelin polimerleşmesi için 600 µl %10'luk Amonyum Persülfat ve 60 µl TEMED (N,N,N‟,N‟‟-tetrametilenetilendiamid) ilave edilmiştir.

Jel hazırlama işleminden önce kullanılacak camlar güzel bir şekilde distile su ile yıkanır ve %70'lik alkolle silinir. İki cam arasına spacerlar yerleştirilirek arada 1,5 mm boşluk bırakılması sağlanır, ardından camlar her iki tarafından klemplerle sabitlenerek jelin akması engellenir. Hazırlanan jel iki cam arasına döküldükten sonra tarak yerleştirilir ve kabarcık oluşup oluşmadığı kontrol edilir. Jelin polimerleşmesinden ve tarakların çıkartılmasından sonra, örneklerin yükleneceği kuyucuklar bir şırınga yardımıyla distile su ile temizlenir. Camlar dikey jel elektroforezine yerleştirilerek üzeri TBE 1X solüsyonuyla doldurulur.

2-4 µl PCR ürününün üzerine 3 µl yükleme boyası eklenerek 95°C'de 8 dk denatüre edilip jele yüklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası %95 formamid, 20mM EDTA, %0,05 Xyelene Cyanol ve %0,05 Brom-fenol mavisi içermektedir. Yüklenen örnekler 130 volt akımda +4°C'de 13-16 saat yürütülmüştür. Elektroforez sonrası bantları görünür hale getirmek için gümüş nitrat ile boyama yapılmıştır.

SSCP jeli için gümüş nitrat boyama

Elektroforezde örneklerin yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra, oluşan bantları değerlendirebilmek için iki farklı solüsyon hazırlanmıştır: %1'lik gümüş nitrat solüsyonu ve %15'lik sodyum hidroksit çözeltisi.

%1'lik gümüş nitrat solüsyonunun hazırlanışı

5 g gümüş nitrat (AgNO3) deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.
Bu % 1'lik gümüş nitrat 1/10 oranında deiyonize su ile seyreltilmesiyle % 0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu elde edilir.

% 15'lik sodyum hidroksit hazırlanışı

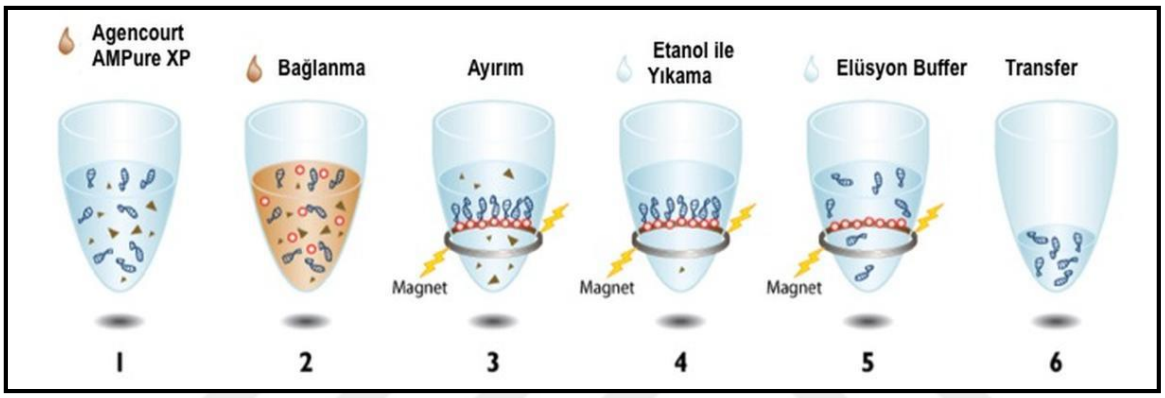
150 g katı sodyum hidroksit (NaOH) deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

Camların arasından dikkatli bir şekilde çıkartılan jel, önce %0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu içerisinde 1-3 dk çalkalanır. Ardından jel iki kez distile su ile yıkanır. Yıkanan jel %15'lik sodyum hidroksit solüsyonuna 285 ml deiyonize su ve 1200 µl formaldehit ilave edilip hazırlanan solüsyona koyulur ve bantlar görünür hale gelene kadar yavaşça çalkalama işlemi gerçekleştirilir. İstenilen görüntü oluştuğunda jel, iki asetat kâğıdı arasına alınarak jelin değerlendirilmesi yapılır.

4.2.6. PCR ürünlerinin temizlenmesi

DNA dizi analizi öncesinde PCR ürünlerinin dNTP ve primer artıklarından temizlenmesi için Agencourt AMPure XP PCR pürifikasyon kiti (Beckman Coulter A63880, ABD) kullanılmıştır. Temizleme işlemi plate üzerinde gerçekleştirilmiştir. İşleme başlamadan önce solüsyon iyice karıştırılarak boncukların homojen bir hale gelmesi sağlanır. 50 µl PCR ürünü, 90 µl manyetik boncuklar içeren solüsyonla homojenize olana kadar karıştırılır (10 kez). Bu adımda 100 bç'den uzun olan PCR ürünleri manyetik boncuklara bağlanır. 4 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra magnetin üzerine yerleştirilerek 5 dk bekletilir. DNA'yı bağlayan boncuklar kuyucukların etrafında halka oluşturarak bulanık olmayan temiz bir görüntü oluşur. Manyetik boncuklara dokunmadan süpernatant ortamdan

uzaklaştırılır. Plate magnetin üzerindeyken 200 µl %70'lik etanol ilave edilir, 30 s bekletildikten sonra etanol uzaklaştırılır ve bu işlem bir kez daha tekrarlanır. Etanol uzaklaştırılırken manyetik boncuklara dokunulmadan, yavaş bir şekilde çekilmesine dikkat edilmelidir. Süpernatant pipetle çekilip uzaklaştırılarak örnekler 5 dk kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra 30 µl ddH_2O ile sulandırılarak homojenize bir görüntü oluşana kadar karıştırılır (10 kez), 1-2 dakika inkübasyona bırakılır. Magnetin üzerine tekrar konulan plate 2 dk bekletildikten sonra temizlenen PCR ürünleri temiz bir eppendorf tüpe aktarılır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Agencourt AMPure XP boncukları ile pürifikasyon yönteminin basamakları (Agencourt AMPure XP pürifikasyon kitinin kullanma klavuzundan alınmıştır, Türkçe'ye çevirisi yapılmıştır)

4.2.7. DNA dizi analizi

Çalışmamızda *PVRL1* (3a, 3b ve 6. ekzon bölgeleri) ve *TGFβ1* genlerinin nükleotid dizilerini belirlemek amacıyla Sanger DNA dizi analizi yöntemi esasına dayalı bir otomatik kapiler elektroforez sistemi ile çalışan DNA dizi analiz cihazı kullanılmıştır (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD).

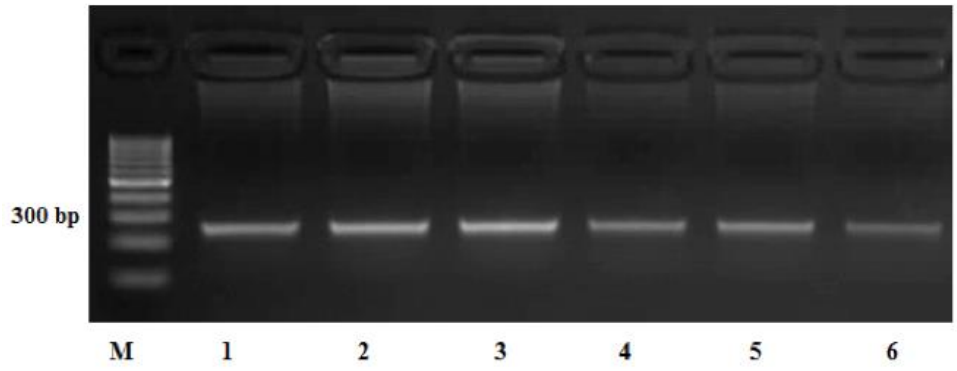
Çalışma plate üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her örnek için 6-10 µl Quick Start Master Mix, 2-12 µl pürifiye edilmiş PCR ürünü, 1-4 µl 10 pmol primer (forward veya reverse) konularak son hacim ddH_2O ile 20 µl'ye tamamlanarak 'cycle sequencing' gerçekleştirilmiştir. 94°C'de 5 dakika, bunu takiben 30 siklusta; 96°C'de 20 saniye, 50°C'de 20 saniye ve 60°C'de 4 dk olacak şekilde PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda, reaksiyonun durdurulmasını sağlamak için her bir örneğe önce 5 µl durdurma solüsyonu (2 µl 1,5 M Sodyum Asetat, 2µl 50 mM EDTA, 1 µl

20 mg/ml'lik Glikojen) ardından, 60 µl %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 200 µl %70'lik etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir, tekrar süpernatant uzaklaştırılmış ve aynı işlem bir kez daha yapılmıştır. Daha sonra plate, liyofilizatör cihazına (Thermo, ABD) yerleştirilmiş ve örneklerin kuruması için yüksek vakum uygulanmıştır. Cihazdan çıkan örneklerin her birine 25 µl formamid ilave edilip DNA zincirlerinin tekrar bir araya gelmemesi sağlanmıştır. Örneklerin hepsine birer damla mineral yağ damlatıldıktan sonra, plate cihaza (CEQ2000XL, Beckman Coulter, ABD) yerleştirilmiştir. İşlem sonrasında verilerin yorumlanması için CEQ Sequencing Software programı kullanılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

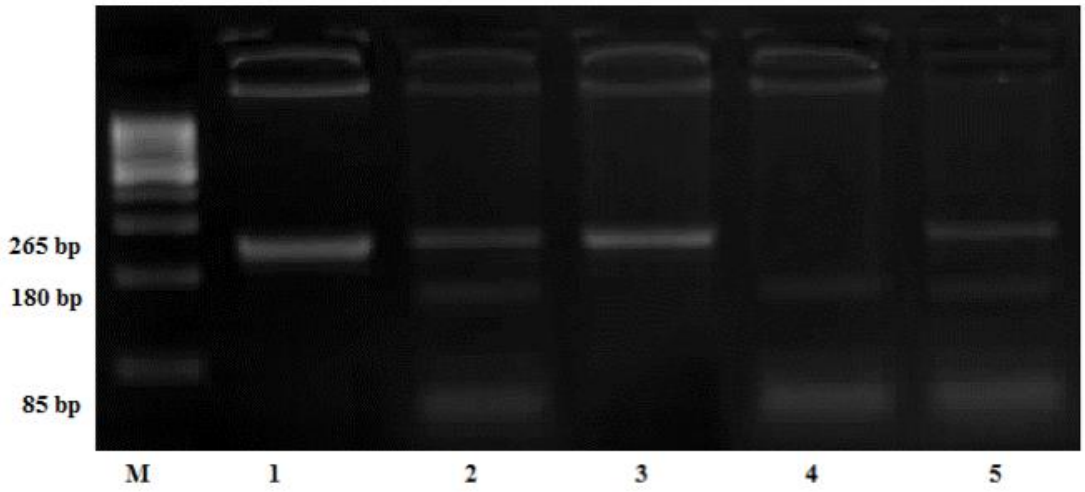
5.1. *MTR* Geni Mutasyon Analizi

80 sendromsuz dudak damak yarık tanısı almış hasta ve 125 sağlıklı kontrolde *MTR* geninin 26. ekzonu PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örnekler %2'lik agaroz jelde 90V'de 20 dk yürütülmüştür. PCR sonunda elde edilen ürün boyutu 265 bç uzunluğundadır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *MTR* (265 bç) genine ait bölgenin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, 100 bp DNA Ladder, 1-6: 265 bç'lik PCR ürünü

MTR genindeki 2756A→G (rs1805087; GAC→GGC; D→G; Asp, aspartik asit→glisin) polimorfizmin saptanması amacıyla kullanılan *HaeIII* enzimi için kesim bölgesi içeren GG mutant (homozigot) bireylerde 180 ve 85 baz çiftlik 2 bant gözlenmiştir. AG heterozigot bireylerde ise 265, 180 ve 85 baz çiftlik 3 bant gözlenmiştir. *HaeIII* enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde (yabanıl tip) ise sadece 265 baz çifti uzunluğunda tek bant gözlenmiştir.

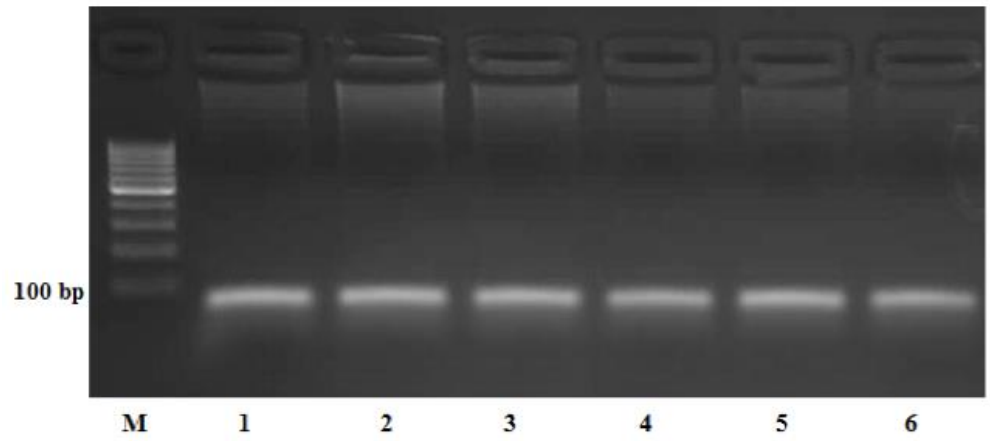


Şekil 5.2. *MTR* 2756A→G değişiminin *HaeIII* restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü. M: Marker, 100 bp DNA Ladder, 1: Kesilmemiş PCR ürünü, 2 ve 5: heterozigot, 3: yabanıl tip, 4: mutant

MTR geninin 2756. nükleotidindeki değişim için, PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu agaroz jelde yürütülerek elde edilen görüntüler yorumlandıktan sonra istatistiksel analiz programı ile risk değerlerine bakılmıştır.

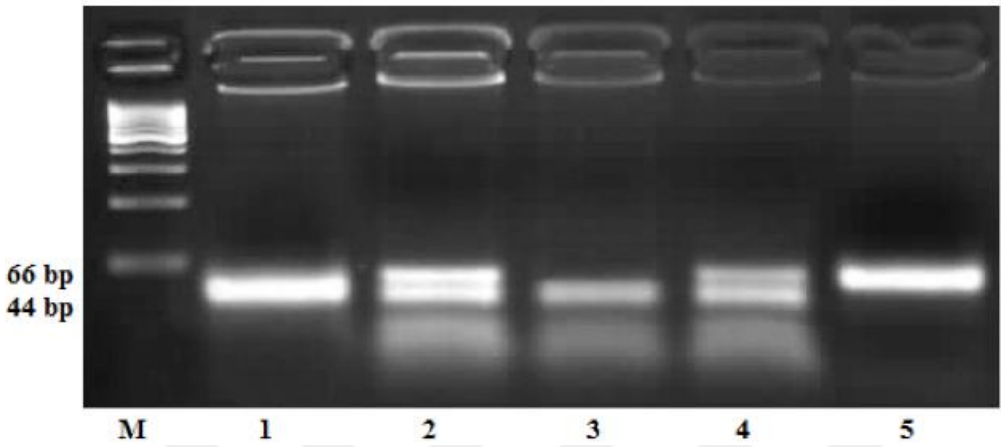
5.2. *MTRR* Geni Mutasyon Analizi

Sendromsuz dudak damak yarık tanısı almış 80 hasta ve 125 sağlıklı kontrolde *MTRR* geninin 2. ekzonu polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örnekler %2'lik agaroz jelde 90V'de 30 dk yürütülmüştür. PCR sonunda elde edilen ürün boyutu 66 bç uzunluğundadır (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. *MTRR* (66 bç) genine ait bölgenin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, 100 bp DNA Ladder, 1-6: 66 bç'lik PCR ürünü

MTRR genindeki 66A→G polimorfizmin saptanması için kullanılan *NdeI* enzimi için kesim bölgesi içeren GG mutant (homozigot) bireylerde 66 baz çiftlik bant gözlenmiştir. AA yabanıl tip bireylerde ise 44 ve 22 baz çiftlik 2 bant gözlenmiştir.

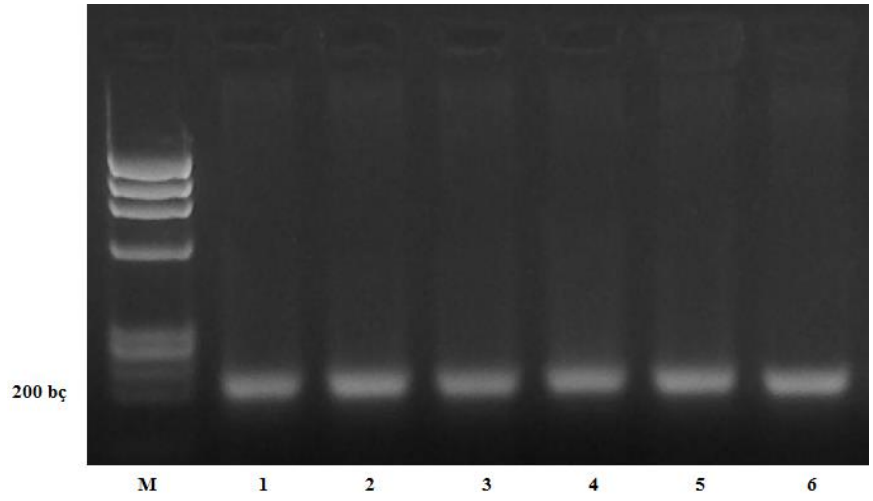


Şekil 5.4. *MTRR* 66A→G değişiminin *NdeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile tayinini gösteren agaroz jel görüntüsü. M: Marker, 100 bp DNA Ladder, 1: Kesilmemiş PCR ürünü, 2 ve 4: heterozigot, 3: yabanıl tip, 5: mutant

MTRR geninin 66. nükleotidindeki değişim için, PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi sonucu agaroz jel görüntülerine bakılarak yorumlanmış ve istatistiksel analiz programı ile risk değerlerine bakılmıştır.

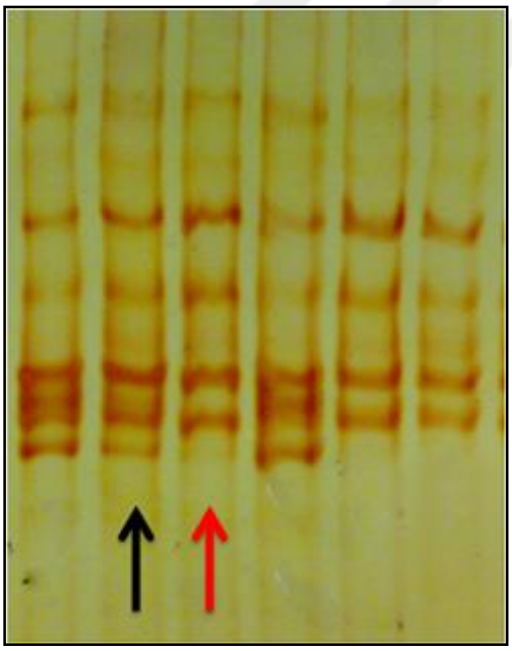
5.3. *PVRL1* Geni Mutasyon Analizi

Sendromsuz dudak damak yarıklı 80 hasta ve 125 kontrolde *PVRL1* geninin 3. ekzonu ve 6. Ekzonu PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örnekler %2'lik agaroz jelde 90V'de 30 dk yürütülmüştür. PCR sonunda elde edilen ürün boyutu *PVRL1* geni 3a ekzon bölgesi için 199 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. *PVRL1 3a* (199 bç) genine ait bölgenin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü, M: Marker, φX174 DNA-HaeIII, 1-6: 199 bç'lik PCR ürünü

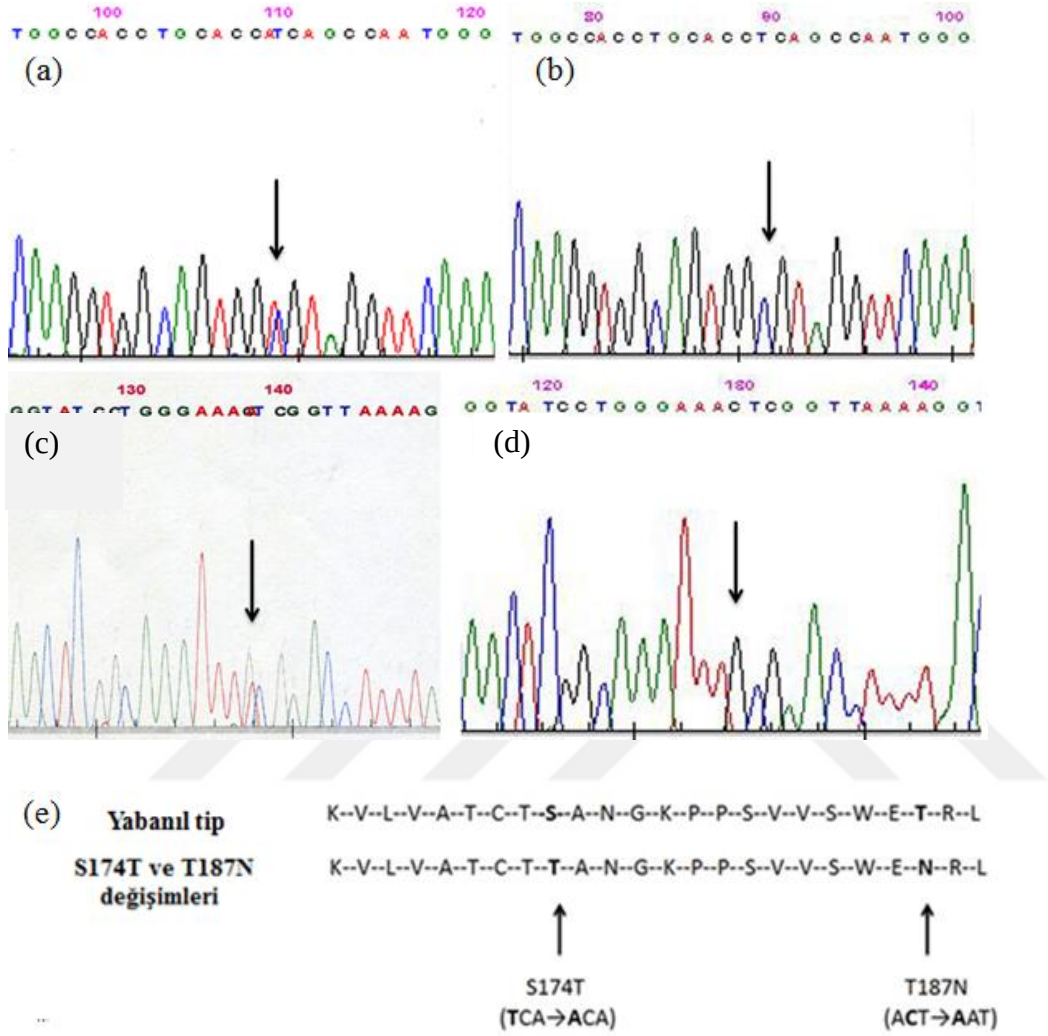
PCR ile çoğaltılan örneklerde farklı bant profili olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla örnekler SSCP tekniği ile %7'lik poliakrilamid jelde yürütülmüştür.



Şekil 5.6. *PVRL1* geninde bant farklılığı saptanan 3a ekzonunun SSCP jel görüntüsü, ↑ ile işaretlenmiş örnekler farklı bantları göstermektedir

SSCP taramasında genin 3. ekzonunda bant farklılığı tespit edilen bireylere DNA dizi analizi yapılmıştır. *PVRL1* geni 3a ekzon bölgesinin DNA dizi analizleri sonucunda, S174T ve T187N değişimleri saptanmıştır. Kodon 174'de meydana gelen T>A değişimi diziyi TCA→ACA şeklinde değiştirmiş ve Serin→Treonin aminoasit değişimi meydana

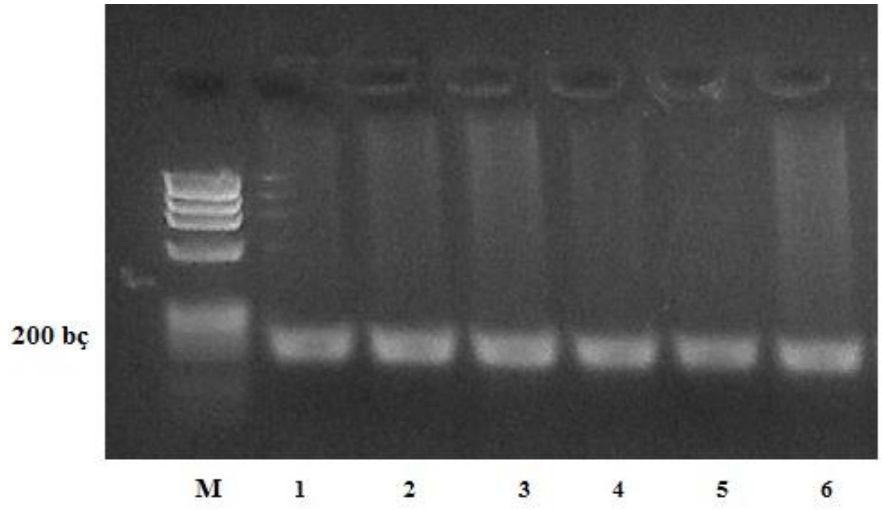
gelmiştir. Kodon 187'de meydana gelen C>A değişimi diziyi ACT→AAT şeklinde değiştirmiş ve Treonin→Asparajin aminoasit değişimi meydana gelmiştir (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. *PVRL1* geninin 3a ekzonundaki değişimlerin DNA dizi analizi görüntüsü TCA→ACA(S174T) değişimi (a) Yabanıl tip (b) ACT→AAT (T187N) değişimi (c) Yabanıl tip (d) S174T ve T187N değişimi (e) değişimler sonucu oluşan amino asit dizilimi

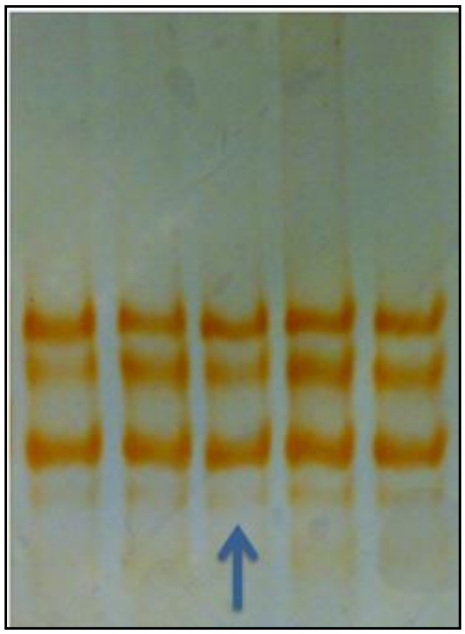
S174T ve T187N değişimlerinin her ikiside 80 hastada heterozigot olarak bulunmuştur. Bunun yanında, her iki değişim 3 sağlıklı bireyde de saptanmıştır. Bu değişimler, Human Gene Mutation Database (İnsan Gen Mutasyon Veritabanı, HGMD) ve National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, NCBI) SNP (Single Nucleotide Polymorphisms, Tek Nükleotid Polimorfizm) veritabanında henüz tanımlanmamıştır.

PCR sonunda elde edilen ürün boyutu *PVRL1* geni 3b ekzon bölgesi için 201 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 5.8).



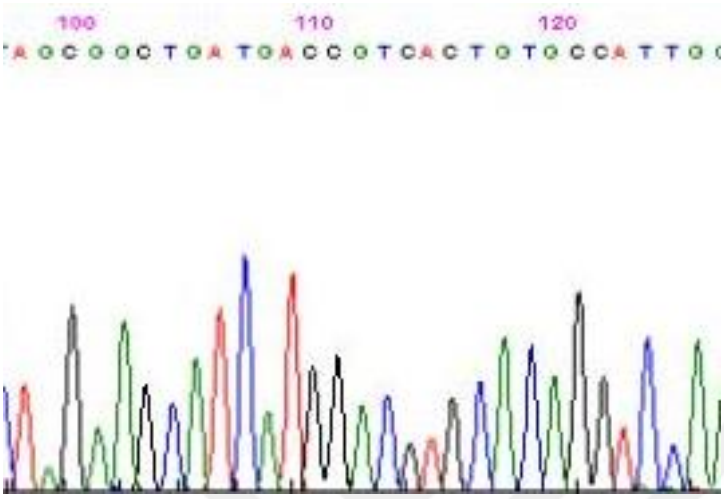
Şekil 5.8. *PVRL1 3b* (201 bç) genine ait bölgenin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü . M: Marker, φX174 DNA-HaeIII, 1-6: 201 bç'lik PCR ürünü

PCR ile çoğaltılan örneklerde farklı bant profili olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla örnekler SSCP tekniği ile %7'lik poliakrilamid jelde yürütülmüştür.



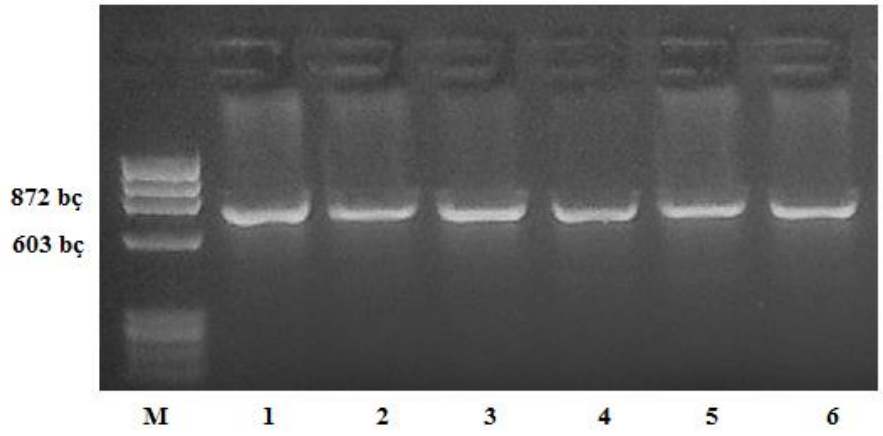
Şekil 5.9. *PVRL1* geninde 3b ekzonunun SSCP jel görüntüsü

PVRL1 3b bölgesi için yapılan SSCP'de farklı bant profili veren hasta DNA'sına rastlanılmamıştır, ancak herhangi bir değişimin olup olmadığının saptanması amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır.



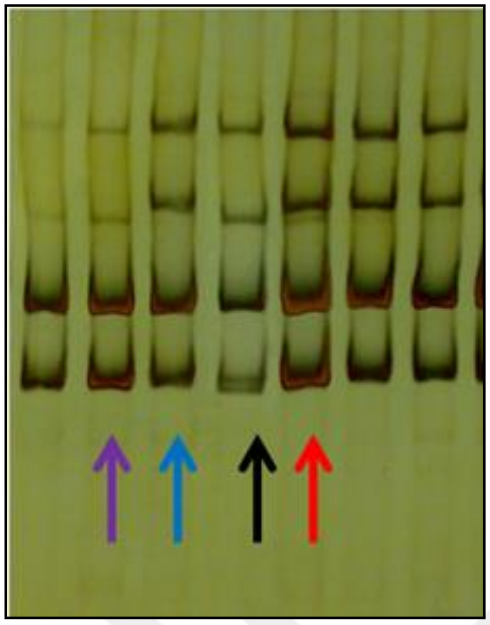
Şekil 5.10. *PVRL1* geninin 3b ekzonundaki değişimlerin DNA dizi analizi görüntüsü

PCR sonunda elde edilen ürün boyutu *PVRL1* geni 6. ekzon bölgesi için 750 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 5.11).



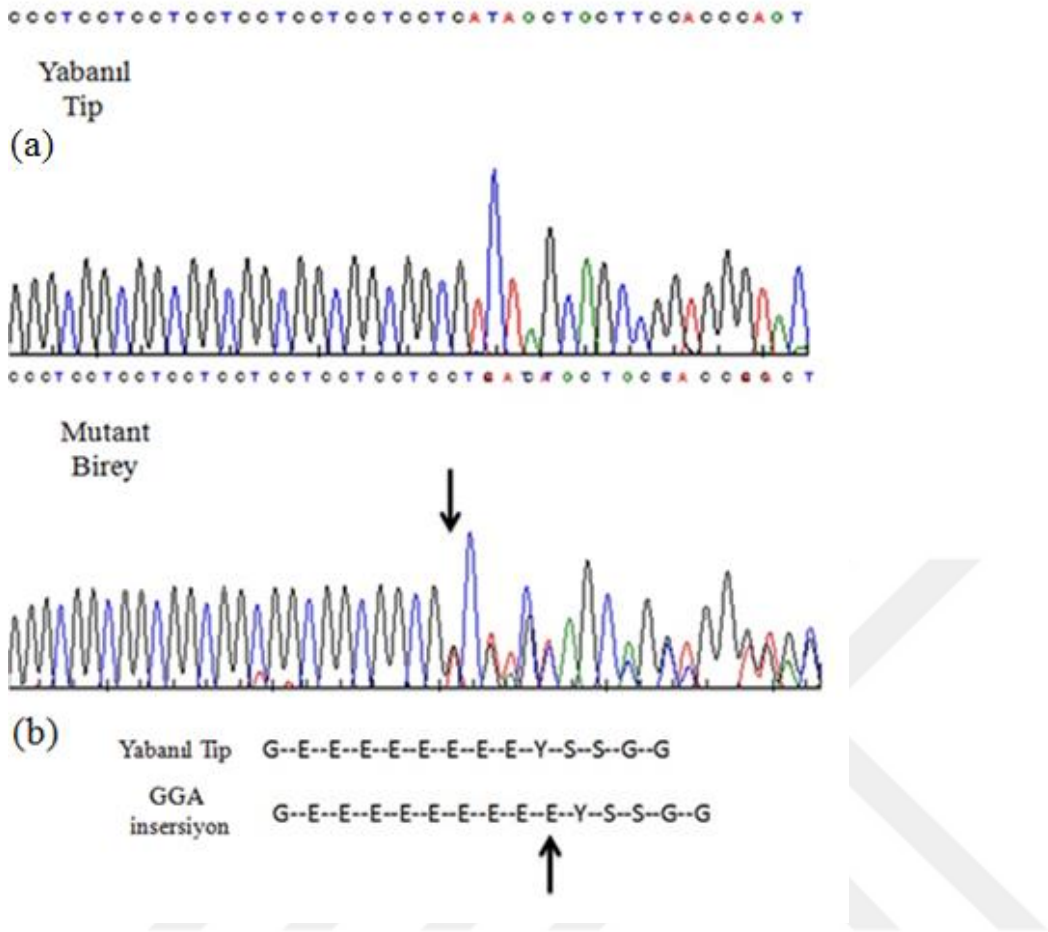
Şekil 5.11. *PVRL1* (750 bç) genine ait 6. ekson bölgesinin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, φX174 DNA-HaeIII, 1-6: 750 bç'lik PCR ürünü

PCR ile çoğaltılan örneklerde farklı bant profili olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla örnekler SSCP tekniği ile %7'lik poliakrilamid jelde yürütülmüştür.



Şekil 5.12. *PVRL1* geninde *PstI* enzimi ile kesim sonrası bant farklılığı saptanan 6. ekzonun SSCP jel görüntüsü, ↑ ile işaretlenmiş örnekler farklı bantları göstermektedir

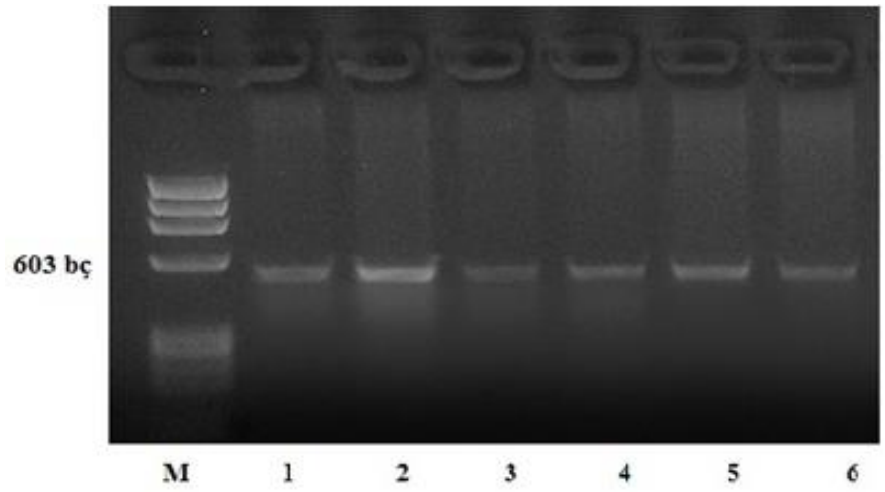
PVRL1 geni 6. ekzon bölgesi için yapılan DNA dizi analizi sonucunda c.1311_1313insGGA (g.63736–g.63738) nükleotidleri arasında yeni GGA insersiyonu bulunmuştur (Şekil 5.13). 80 sendromsuz dudak ve damak yarıklı hastanın 15'inde GGA insersiyonu saptanmıştır, bununla birlikte 125 sağlıklı bireyin hiçbirinde bu mutasyon görülmemiştir. GGA insersiyonu daha önce rapor edilmemiştir. HGMD ve NCBI SNP veritabanında henüz tanımlanmamıştır.



Şekil 5.13. (a) *PVRL1* geninin 6. ekzonundaki değişimlerin DNA dizi analizi görüntüsü
(b) değişim sonucu oluşan amino asit dizilimi

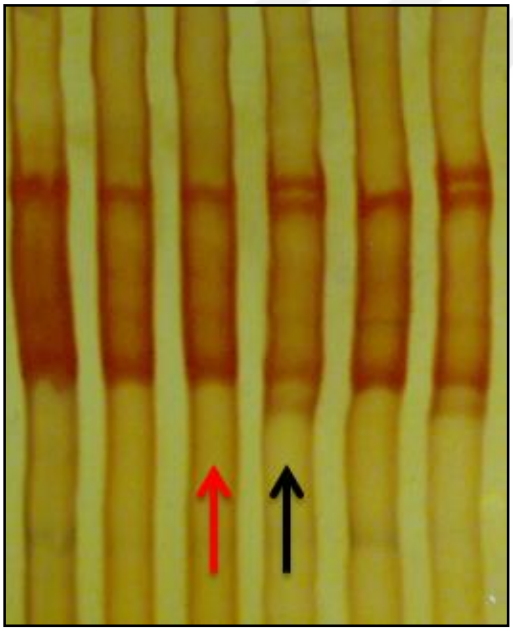
5.4. TGFβ1 Geni Mutasyon Analizi

Sendromsuz dudak damak yarıklı 80 hasta ve 125 kontrolde *TGFβ1* geninin 1. ekzonu PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örnekler %2'lik agaroz jelde 90V'de 30 dk yürütülmüştür. PCR sonunda elde edilen ürün boyutu 523 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 5.14).



Şekil 5.14. *TGFβ1* (523 bç) genine ait 1. ekson bölgesinin PCR ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Marker, φX174 DNA-HaeIII, 1-6: 523 bç'lik PCR ürünü

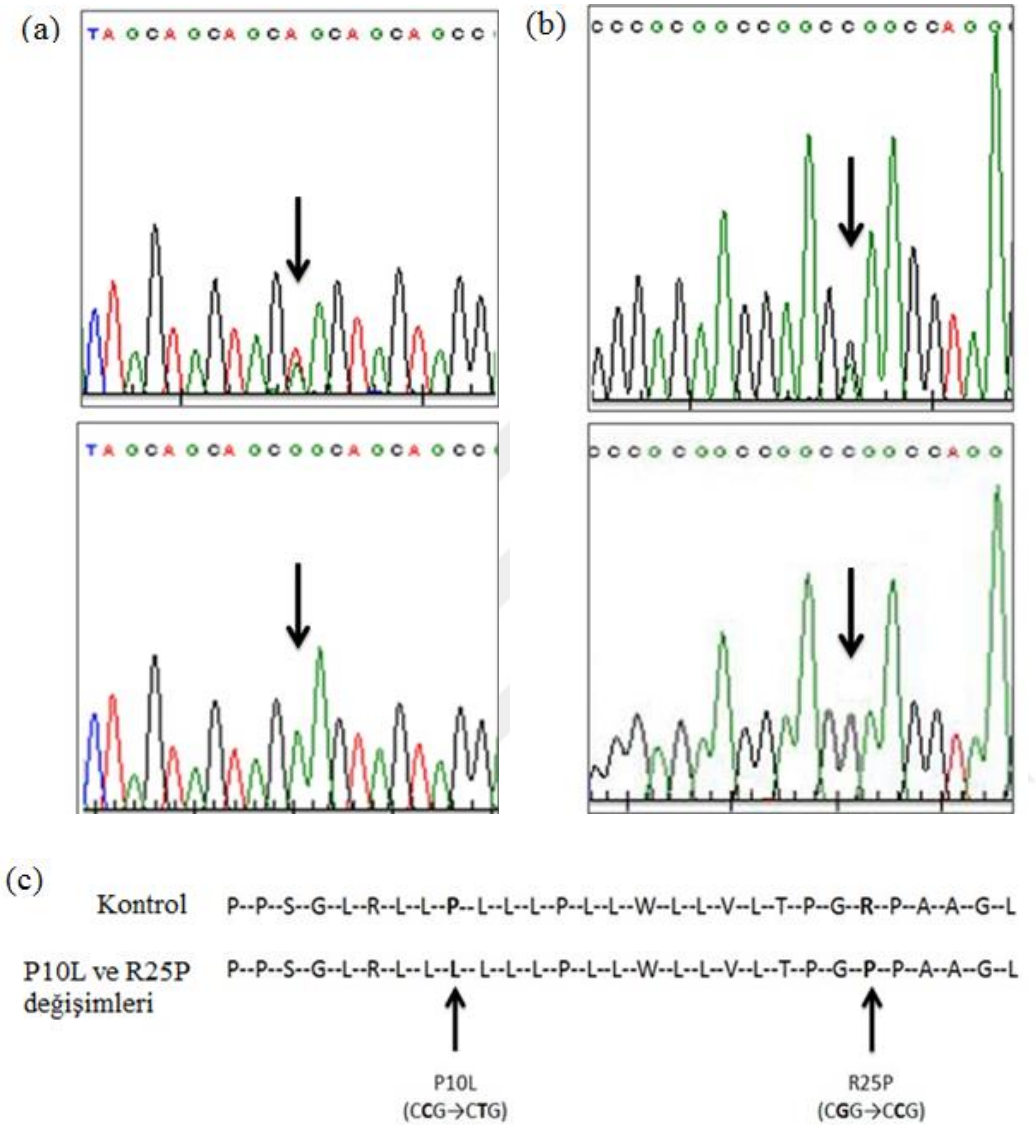
PCR ile çoğaltılan örneklerde farklı bant profili olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla örnekler SSCP tekniği ile %7'lik poliakrilamid jelde yürütülmüştür.



Şekil 5.15. *TGFβ1* geninde *HphI* enzimi ile kesim sonrası bant farklılığı saptanan ekzonun SSCP jel görüntüsü, ↑ ile işaretlenmiş örnekler farklı bantları göstermektedir

SSCP yöntemi sonucu oluşan bant farklılıkları yorumlandıktan sonra farklı bantlara sahip hasta örneklerine, PCR ürünlerinin temizlenme aşamasından sonra DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon taraması yapılmıştır.

TGFβ1 gen bölgesinin DNA dizi analizleri sonucunda, Pro10Leu ve Arg25Pro değişimleri saptanmıştır (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. *TGFβ1* gen değişimlerin DNA dizi analizi görüntüsü, (a) 29C/T(P10L) değişimi ve yabanıl tip (b) 74G/C (R25P) değişimi ve yabanıl tip P10L ve R25P (c) değişimler sonucu oluşan amino asit dizilimi

6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gen taramaları sonucunda ortaya konulan gen değişimlerinin risk getirisini saptamak amacıyla Ki Kare (p değeri) ve Odds değeri (OR) hesaplanmıştır. P<0,05 düzeyi anlamlı kabul edilmiştir. Risk oranları (OR) %95 güven aralığı ile hesaplandı.

6.1. MTR Gen Taramasına İlişkin Analiz

MTR gen taramasında sendromsuz dudak damak yarıklı 80 hasta ve 125 kontrol grubunda AA, AG ve GG genotiplerine ait Çizelge 6.1'deki sonuçlara ulaşılmıştır.

Çizelge 6.1. MTR geninin nsCL/P'li hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

Genotip	Kontrol grup (n=125) (%)	Hasta grup (n=80) (%)	OR (%) CI	p değeri
MTR 2756A→ G				
AA	71 (57)	63 (79)	1	Ref.
AG	47 (38)	12 (15)	0,29 (0,14-0,59)	0,0008
GG	7 (5)	5 (6)	0,80 (0,24-2,66)	0,95
Allel A	189 (76)	138 (86)	1	Ref.
Allel G	61 (24)	22 (14)	0,49 (0,29-0,84)	0,0088

Polimorfizmdeki değişimlerin hastalardaki ve kontrol gruplarındaki dağılımına bakıldığında; hasta grubunda *MTR* 2756 AA genotipine sahip 63 (%79) birey, AG genotipine sahip 12 (%15) birey, GG genotipine sahip 5 (%6) birey bulunmuştur. Kontrol grubunda ise *MTR* 2756 AA genotipine sahip 71 (%57) birey, AG genotipine sahip 47 (%38) birey, GG genotipine sahip 7 (%5) birey olduğu görülmüştür.

MTR gen taramasına ait uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0,0008). *MTR* genindeki AG heterozigot değişim sendromsuz yarık dudak damak hastalığı için 0,29 kat risk getirmektedir.

6.2. MTRR Gen Taramasına İlişkin Analiz

80 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve 125 kontrol grubunda AA, AG ve GG genotiplerine ait Çizelge 6.2'deki sonuçlara ulaşılmıştır.

Çizelge 6.2. *MTRR* geninin nsCL/P'li hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

Genotip	Kontrol grup (n=125) (%)	Hasta grup (n=80) (%)	OR (%) CI	p değeri
MTRR 66 A → G				
AA	13 (10)	11 (14)	1	Ref.
AG	107 (86)	58 (72)	0,64 (0,26-1,52)	0,31
GG	5 (4)	11 (14)	2.6 (0.69-9.8)	0,27
Allel A	133 (53)	80 (50)	1	Ref.
Allel G	117 (47)	80 (50)	1,14 (0,76-1,70)	0,53

Hasta grubunda *MTRR* 66 AA genotipine sahip 11 (%14) birey, AG genotipine sahip 58 (%72) birey, GG genotipine sahip 11 (%14) birey saptanmıştır. Kontrol grubunda *MTRR* 66 AA genotipine sahip 13 (%10) birey, AG genotipine sahip 107 (%86) birey, GG genotipine sahip 5 (%4) birey bulunmuştur.

Uygulanan Ki-Kare analizi sonucunda *MTRR* geni için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0,05). Bununla birlikte *MTRR* 66A→G değişimi sendromsuz yarık dudak damak hastalığı için 2,6 kat risk getirmektedir.

6.3. TGFβ1 Gen Taramasına İlişkin Analiz

80 hasta ve 125 kontrol grubunda Pro10Leu ve Arg25Pro değişimlerinin genotip ve allel dağılımları Çizelge 6.3'de verilmiştir.

Çizelge 6.3. *TGFβ1* geninin nsCL/P'li hasta ve sağlıklı kontrol grubunda p ve OR değeri

TGFβ1 geni	Hasta grup (n=80) (%)	Kontrol grup (n=125) (%)	OR (%) CI	P değeri
Pro10Leu				
CC	17 (21)	17 (14)	1	Ref.
CT	22 (28)	48 (38)	2,18 (0,94-5,06)	0,06
TT	41 (51)	60 (48)	1,46 (0,67-3,19)	0,66
Allel C	56 (35)	82 (33)	1	Ref.
Allel T	104 (65)	168 (67)	1,10 (0,73-1,68)	0,65
Arg25Pro				
GG	74 (93)	113 (90)	1	Ref.
GC	6 (7)	12 (10)	1,31 (0,48-3,64)	0,79
CC	0	0	0,65 (0,01-33,3)	0,58
Allel G	154 (96)	238 (95)	1	Ref.
Allel C	6 (3)	12 (5)	1,29 (0,48-3,52)	0,80

Kodon 10 da meydana gelen C>T değişimi diziyi CCG→CTG şeklinde değiştirmiş ve Prolin→Lösin aminoasit değişimi meydana gelmiştir. Pro10Leu polimorfizmdeki değişimin hastalardaki ve kontrol gruplarındaki dağılımına bakıldığında; hasta grubunda CC genotipine sahip 17 (%21) birey, CT genotipine sahip 22 (%28) birey, TT genotipine sahip 41 (%51) birey bulunmuştur. Kontrol grubunda ise CC genotipine sahip 17 (%14), CT genotipine sahip 48 (%38) birey, TT genotipine sahip 60 (%48) birey olduğu görülmüştür. T allelinin frekansı sırasıyla, hasta ve kontrollerde %65 ve %67 olarak

bulunmuştur (p=0,65). CT genotipinin frekansı kontrollerle karşılaştırıldığında, dudak damak yarıklığının 2,18 kat risk getirdiği görülmüştür (p=0,06).

Kodon 25'de meydana gelen G>C değişimi diziyi CGG→CCG şeklinde değiştirmiş ve Arjinin→Prolin aminoasit değişimi meydana gelmiştir. Arg25Pro polimorfizmdeki değişimin hastalardaki ve kontrol gruplarındaki dağılımına bakıldığında; hasta grubunda GG genotipine sahip 74 (%93) birey, GC genotipine sahip 6 (%7) birey saptanmıştır. Kontrol grubunda ise GG genotipine sahip 113 (%90), GC genotipine sahip 12 (%10) birey olduğu görülmüştür. C allelinin frekansı sırasıyla, hasta ve kontrollerde %3 ve %5 olarak bulunmuştur (p=0,80). GC genotipinin frekansı kontrollerle karşılaştırıldığında, dudak damak yarıklığının 1,31 kat risk getirdiği görülmüştür (p=0,79).

7. TARTIŞMA

Dünyada görülme sıklığı 1/500-1/2500 olarak kabul edilen sendromsuz dudak ve damak yarıkları, çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi sonucu oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır. Sendromsuz dudak damak yarıklarının genetik açıdan incelenmesi için birçok aday gen araştırılmıştır ve çalışmanın yapıldığı populasyonlara bağlı olarak farklı parametreler yayınlanmıştır (Schutte ve Murray, 1999; Pezzetti ve diğerleri, 2004).

Dudak damak yarıklarıyla ilgili literatür araştırması yapıldığında Türkiye'de çok az sayıda istatistiksel çalışma yapıldığı görülmektedir. Yapılan çalışmalarda da dudak damak yarıklı hastaların genetik temellerine dayalı bilgilerin çok az nitelikte olması dikkat çekmektedir.

1988-2005 yılları arasında Gazi Üniversitesi'nde Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen 17,259 doğumla ilişkili olarak, toplam malformasyon sıklığı, bu malformasyonların tipleri, izole ve kombine olarak görülme oranları, anne yaşına göre ve cinsiyete göre dağılımlarını belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada toplam 205 anomali tespit edilmiştir. Bu anomalilere göre, konjenital malformasyonlu fetüs doğma oranı %1,18 olarak bulunmuştur. Erkek çocuklarda herhangi bir konjenital malformasyon bulunma oranı %1,21 ve kızlarda %1,15 olarak saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda, yarık dudak %2,43, yarık damak ise %1,95 olarak olarak rapor edilmiştir (Biri, Onan, Kocrucuoğlu, Tıraş ve Himmetoğlu, 2005).

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2004 yılında yarık dudak ve damak hastalarında görülen ek malformasyonların ve sendromların saptanması amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya yarık dudak ve damak nedeniyle izlenen ve tedavi edilen 1229 hasta katılmıştır. Bu hastaların 793'ünde (%64,4) hem dudak hem damak yarığı, 436'sında ise (%35,6) izole damak yarığı olduğu görülmüştür. Hem dudak hem damak yarığı olan 793 hastanın 91'inde (%11,4), izole damak yarığı olan 436 hastanın ise 60'ında (%13,7) ek malformasyon olduğu saptanmıştır. En sık görülen malformasyonların başında da ekstrakranial iskelet sistemi malformasyonlarının olduğu sonucuna varılmıştır (Tunçbilek, Özgür ve Balcı, 2004).

Türkiye'de yapılan başka bir çalışma, 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'nde yürütülmüştür. Konya bölgesinde doğan bebeklerin yarık damaklı ve yarık dudak ile beraber yarık damaklı olmasına eşlik eden konjenital malformasyonların insidansını ve tipini bulmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya yarık damaklı ve yarık dudak ile beraber yarık damaklı olarak tanısı konulan toplam 121 bebek dâhil edilmiştir ve konjenital anomlailer için ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, dudak damak yarıklı bebeklerin 80'inde en az bir malformasyon olduğu görülmüştür. En sık görülen konjenital malformasyon konjenital kalp hastalığı olurken bunu, baş-boyun anomalileri takip etmiştir (Altunhan ve diğerleri, 2012).

Semiç-Jusufagiç ve diğerleri, Türk populasyonunda dudak ve damak yarıkları ile MTHFR (C677T ve A1298C) polimorfizmlerini araştırmak için, 56 vaka-aile üçlüsü üzerinde çalışmışlardır. 677 TT genotipi taşıyan annelerin dudak damak yarıklı çocuğa sahip olma riski sağlıklı kontrollere göre 3 kat artış göstermiştir (OR=3,14, P=0,03). 677CT/1298AC kombin genotipi ise 2 kat risk getirmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (OR=2,27, P=0,07) (Semiç-Jusufagiç ve diğerleri, 2012).

Yürütülmüş olan bu çalışmada sendromsuz dudak ve damak yarıklı seksen hasta ve yüz yirmi beş sağlıklı birey dâhil edilmiştir. Çalışma sonucunda toplam yedi değişim tespit edilmiştir. Bu değişimlerden PVRL1 geninde tespit edilen değişimler ilk defa bu tez çalışmasında gösterilmiştir. HGMD ve NCBI SNP veritabanında henüz tanımlanmamıştır.

Sendromsuz dudak ve damak yarıklı hasta grupları ile bugüne kadar yapılan çalışmalar, embriyonik gelişimde folat ve metiyonin döngülerinin proteinlerini kodlayan genlerin polimorfik varyantları tarafından bozulabileceğini göstermektedir.

Folat metabolizmasında yer alan ve önemli görevleri olan metiyonin sentaz enzimi *MTR* geni tarafınfan kodlanmaktadır. Çalışmalarda en yaygın görülen *MTR* A2756G polimorfizmi (rs1805087), 2756. nükleotidde A>G transisyonu ile oluşmaktadır. Değişim sonucunda genin ürünü olan proteinin 919. pozisyonunda Aspartik asit amino asitinin yerine Glisin amino asiti geçmektedir (Nazki, Sameer ve Ganaie, 2014).

Bugüne kadar birçok popülasyonda *MTR* A2756G polimorfizmi ile sendromsuz dudak ve damak yarıklığı arasındaki ilişkiler araştırılmıştır ve istatistiksel hesaplamaları yapılarak çalışma grupları için risk değerleri rapor edilmiştir.

Mostowska ve diğerleri, *MTR* A2756G polimorfizminin sendromsuz dudak damak yarıklı çocukların doğumunda bir risk faktörü oluşturup oluşturmadığını anlamak için, sendromsuz dudak damak yarıklı çocukların anneleri (122) ile sağlıklı çocukların annelerinden (82) elde edilen DNA örnekleri üzerinde çalışmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda *MTR* 2756AG ve *MTR* 2756GG genotipli annelerin dudak damak yarıklı çocuğa sahip olma riski sırasıyla 2,15 ve 2,60 kat olarak saptanmıştır. Dudak damak yarıklı çocuk sahibi olan annelerde, *MTR* geninin polimorfik geçiş mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (Mostowska, Hozyasz ve Jagodzinski, 2006).

Polonya'da başka bir çalışma gerçekleştiren Mostowska ve diğerleri, 174 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve 176 kontrol grup ile çalışma yapmıştır. *MTR* A2756G polimorfizmi ile sendromsuz dudak damak yarıklılığı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır ve çalışma sonucunda istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($p=0,65$) (Mostowska, Hozyasz, Wojcicki, Dziegelewska ve Jagodzinski, 2010).

Brandalize ve diğerleri tarafından Güney Brezilya'da yapılan çalışmada, 114 sendromsuz dudak damak yarıklı çocuk ve 110 anne ile 100 sağlıklı çocuk ve anneleri, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G ve *MTRR* A66G gen polimorfizm tespiti için PCR-RFLP yöntemiyle taranmıştır. MTR 2756G allelinin frekansı hastalarda, 0,21, kontrollerinde 0,19, hasta annelerinde 0,19, kontrollerde 0,17 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak MTR geni 2756G allelinin, sendromsuz dudak damak yarıkları ile istatistiksel bir ilişkisi bulunamamıştır. Genotip dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine uyumlu çıkmıştır (Brandalize ve diğerleri, 2007).

İtalyan hastalarda Martinelli ve diğerlerinin, folat yolağıyla ilişkili 4 gende (*MTR, MTRR, TCN1, TCN2)* sık olarak srastlanılan polimorfizmler ile yaptıkları çalışmaya, 218 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve ebeveynleri ile 289 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Çalışmada, *MTR* 2756A→G polimorfizmi ile dudak damak yarıkları arasında önemli bir fark bulunamamıştır. 2756G allel aktarımında, $p=0,69$ olarak saptanmıştır (Martinelli ve diğerleri, 2006).

Bezerra ve diğerleri dudak damak yarıklarının *MTHFR, MTR, MTRR* ve *RFC1* genleri ve çevresel faktörlerle olan karşılıklı etkileşimlerini araştırmak için sendromsuz dudak damak yarıklı hasta çocuklar ve anneleri ile kontrol çocuklar ve annelerinin dahil edildiği bir çalışma yürütmüşlerdir. Folik asit konsantrasyonu, vitamin B12 konsantrasyonu, total plazma homosistein seviyesi ve hamilelik sırasında annenin alkol tüketim miktarına bakılarak yapılan çalışma, 140 hasta çocuk ve annelerini, 175 kontrol çocuk ve annelerini içermektedir. Çalışmada, folik asit konsantrasyonu hem dudak damak yarıklı çocuklarda hem de annelerinde kontrol gruba göre daha düşük seviyede saptanmıştır (P<0.001 ve P=0,003, sırasıyla). Hasta çocuk ve annelerinde düşük folik asit düzeyi dudak damak yarıkları riskinde artış ile değerlendirilmiştir. Vitamin B12 konsantrasyonu ve total plazma homosistein seviyeleri hasta ve kontrol gruplarıyla benzer bulunmuştur. Dudak damak yarıklı çocukların annelerinde hamilelik sırasında alkol tüketimi kontrollere göre yüksek bulunmuştur ve dudak damak yarıklı çocuk doğurma riski ile ilişkilendirilmiştir (OR: 3,64, 95% CI: 1,6–8,3, P<0,001). *MTHFR* gen polimorfzimleri ile folik asit, vitamin B12 ve homosistein konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanırken, *MTR, MTRR* gen polimorfizmleri ile folik asit, vitamin B12 ve homosistein konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptanamamıştır (Bezerra ve diğerleri, 2015).

Çin populasyonunda Jiang ve diğerleri, folat döngüsünde yer alan MTHFR, MTR, MTRR ve TCN2 genlerindeki değişimlerin sendromsuz dudak damak yarıkları ile ilişkili olup olmadığını araştırmak için 204 hasta ve 226 kontrol grup üzerinde çalışma yapmışlardır. HapMap veritabanından MTR geni için 18 SNP, MTRR geni için 15 SNP araştırmışlardır. Sonuç olarak yaptıkları çalışmada, folat yolağı ile ilişkili olan bu polimorfizmlerin sendromsuz yarık dudak ve damak hastalığı ile ilişkisinin olmadığını rapor etmişlerdir (Jiang ve diğerleri, 2015).

Guo ve diğerlerinin, Çin'de PCR-RFLP yöntemini kullanarak 97 hasta-ebeveyn triad ve 140 sağlıklı triad üzerinde yaptıkları araştırmada, A2756G polimorfizminin yarık dudak damak oluşum mekanizması üzerine etkisini araştırmışlardır. Hasta ve kontrol grupları arasında aile üyeleri için *MTR* A2756G genotip ve allel frekanslarında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir. GG genotipi hasta çocuklar ve annelerinde tespit edilmemiştir. Çalışmada *MTR* 2756AG heterozigot genotip taşıyıcısı çocukların yarık dudak olma riski 1,8 olarak bildirilirken, *MTR* 2756AG genotipli annelerin dudak damak yarıklı çocuk sahip olma riski 1,3 olarak bildirilmiştir (Guo ve diğerleri, 2009).

Chorna ve diğerleri Ukrayna'nın batı bölgesinde sendromsuz dudak damak yarıklı çocuklar, anneleri ve sağlıklı bireylerden oluşan çalışma grubunda yaptıkları araştırmada, *MTR* 2756AG heterozigot genotipi taşımanın 2756AA genotipi taşıyanlara göre 1,5 kat risk getirdiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda *MTR* 2756GG genotipi taşıyan annelerin dudak damak yarıklı çocuk doğurma riski 1,3 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte çalışmanın *MTR* 2756AG allel ve genotip dağılımına bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmediği de rapor edilmiştir (P>0,05) (Chorna, Akopyan, Makukh ve Fedoryk, 2011).

Murthy ve diğerlerinin Hindistan'da 142 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve 141 kontrol bireyle gerçekleştirdikleri çalışmada, *MTR* A2756G Genotip dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine uyumlu çıkmıştır. *MTR* 2756AG genotipi taşımanın 2756AA genotipi taşıyanlara göre 1,4 kat risk getirdiği gösterilmiştir. Ancak *MTR* A2756G polimorfizmi ile yarık dudak damak oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir (Murthya, Gurramkondab ve Lakkakula, 2015).

Sendromsuz dudak damak yarıklı hastalarla yapmış olduğumuz çalışmada, *MTR* 2756AG heterozigot genotipi taşımanın 2756AA genotipi taşıyanlara göre Türk populasyonunda genetik açıdan bir risk faktörü olduğu, p değerinin anlamlı çıkması (P=0,0008) ile gösterilmiştir. Homozigot *MTR* 2756GG genotipli hastalarda ise istatistiksel olarak dudak damak yarıklığıyla ilişkili olacak şekilde anlamlı bir veri saptamamış olmamız diğer çalışmalarla da desteklenmiştir. Bu polimorfizmin fonksiyonel rolü henüz tam olarak araştırılmamıştır. Ancak çoğu araştırma, plazma homosistein seviyesinin mutant A2756G alleli ile ters orantılı bir ilişki içinde olduğunu göstermiştir ve değişimin "aktive edici bir polimorfizm" olduğuna dair kanıtlar sunmuştur. *MTR* A2756G polimorfizmi, MTR proteininin enzimatik aktivitesini arttırarak ya da kofaktörü bağlama kabiliyetini geliştirerek enzim aktivitesini arttırmaktadır. MTR enzim aktivitesindeki artış, SAM sentezinin ve DNA metilasyonunun artması ile sonuçlanmaktadır. Ancak *MTR* A2756G genotipi ile DNA hipermetilasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Bunun yanı sıra *MTR* A2756G taşıyıcılarında homosistein artışı S-adenozilhomosisteinin (SAH)'de artmasına neden olabilmektedır. SAH, hemen hemen tüm metiltransferazları inhibe ederek kendi sentezini sınırlayabilir ve SAH'deki artışlar hidroliz yönünde kayabilir.

Artış gösteren SAH konsantrasyonu ile DNA hipometilasyonu arasındaki ilişki yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Weiner, Boyarskikh, Voronina, Mishukova ve Filipenko, 2014; James, Melnyk, Pogribna, Pogribny ve Caudill, 2002; Yi ve diğerleri, 2000).

Sonuç olarak ortaya konulan bulgulara göre, *MTR* gen polimorfizmi tespit edilen hastalarda DNA hipometilasyonu görülmüş olabilir, çünkü kraniyofasiyal yapıların oluşumundan sorumlu olan genlerin ekspresyon düzeylerinin değişmesi söz konusudur. Üstelik artan DNA hipometilasyonunun gelişme üzerindeki olumsuz etkisi, kromozom kararsızlığın oluşması, transpoze edilebilir elementlerin yeniden aktifleştirilmesi ve damgalamanın kaybolmasının bir sonucu olabilir. Bundan dolayı *MTR* 2756A>G değişiminin DNA metilasyon durumuna etkisi hakkında daha ayrıntılı çalışmalar yapılması, dudak damak yarıklarının oluşum mekanizmasına dair daha detaylı bilgiler sağlayabilir.

MTR enziminin aktif formunun yenilenmesi için gerekli olan metiyonin sentaz redüktaz, folat yolağında rol oynayan bir diğer önemli enzimdir. Folat metabolizmasında yer alan ve önemli görevleri olan metiyonin sentaz redüktaz enzimi *MTRR* geni tarafından kodlanmaktadır. Çalışmalarda en yaygın görülen *MTRR* A66G polimorfizmi (rs1801394), 66. nükleotidde A>G transisyonu ile oluşmaktadır. Değişim sonucunda genin ürünü olan proteinin 22. pozisyonunda İzolösin amino asitinin yerine Metiyonin amino asiti geçmektedir (Bhaskara, Murthy ve Venkatesh Babu, 2011).

Bugüne kadar *MTRR* geni ve dudak damak yarıkları ile ilgili farklı populasyonlarda birçok çalışma yapılmış ve genin hastalık üzerindeki etkisi ortaya koyulmuştur.

Chorna ve diğerleri tarafından yapılan araştırmaya göre, *MTRR* 66AG heterozigot genotipi taşımanın yarık dudak damaklı olma riski 5 kat artış gösterirken, 66AG genotipi taşıyan annelerin dudak damak yarıklı çocuk sahibi olma riski 2,6 kat artış göstermiştir (Chorna, Akopyan, Makukh ve Fedoryk, 2011).

Hindistan'da 142 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve 141 kontrol ile *MTRR* A66G polimorfizminin dudak damak yarıklarının gelişimi için risk faktörü olup olmadığını araştıran Murthya ve diğerleri, çalışma sonucunda homozigot GG genotipinin hem hasta grubunda ve kontrol gurupta gözlemlenmediğini hem de *MTRR* 66AG genotipinin yarık

dudak damak oluşumu için 1,65 kat risk getirdiğini rapor etmişlerdir (Murthya, Gurramkondab ve Lakkakula, 2015).

Sendromsuz dudak damak yarığı ve *MTRR* A66G polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların çoğunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Küchler ve diğerlerinin Brezilyalı 401 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve 466 kontrol bireyi dâhil ettikleri çalışmada, *MTRR* A66G genotip dağılımı Hardy-Weinberg eşitliğine uyumlu çıkmıştır. *MTRR* A66G polimorfizmi ile yarık dudak damak oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir (Waltrick-Zambuzzi ve diğerleri, 2015).

Polonya'da 174 sendromsuz dudak damaklı hasta ve 176 kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada, *MTRR* A66G polimorfizmi ile dudak damak yarıkları arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (P=0,78) (Mostowska, Hozyasz, Wojcicki, Dziegelewska ve Jagodzinski, 2010).

Güney Brezilya'da Brandalize ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, *MTRR* A66G gen polimorfizmi ve sendromsuz dudak damak yarıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. *MTRR* 66G allel frekansı daha önce yapılan araştırmalara (Brezilya populasyonunda 0,51, Avrupa populasyonunda 0,55) göre düşük çıkmıştır (0,35) (Brandalize ve diğerleri, 2007).

Martinelli ve diğerlerinin İtalyalı sendromsuz dudak damak yarıklı 218 triad ve 289 sağlıklı birey ile gerçekleştirdikleri araştırmada, *MTRR* 66A→G polimorfizmi ile dudak damak yarıkları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır. 66G allel aktarımında, P=0,84 olarak saptanmıştır (Martinelli ve diğerleri, 2006).

Şimdiye kadar yapılan çalışmaların bazılarında ve bizim çalışmamızda, *MTRR* 66AG polimorfizmi ile sendromsuz dudak damak yarıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamasına rağmen, yürüttüğümüz çalışmada *MTRR* 66AG heterozigot genotip varlığının Türk populasyonunda 2,6 kat risk getirdiği elde edilen veriler ve istatistiksel sonuçlar ile belirlenmiştir. Aynı zamanda, elde edilen sonuçlar farklı populasyonlarla yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir.

Çalışmamızda 66G allel frekansı 0,50 olarak bulunmuştur. Bu veriler İtalyan populasyonunda 0,52, Avrupada 0,55, Fransız populasyonunda 0,57, Polonya populasyonunda 0,59 olarak saptanan değerler ile korelasyon göstermiştir. 66G allel frekansı Ukraynada 0,62-0,78, Rus populasyonunda 0,64, İsrail populasyonu 0,42 olarak rapor edilirken, Güney Afrika populasyonunda 0,12, Brezilya populasyonunda 0,07, Meksika populasyonunda 0,21 olarak daha düşük allel frekansları görülmüştür (Chorna, Akopyan, Makukh ve Fedoryk, 2011; Brandalize ve diğerleri, 2007). Allel frekanslarındaki bu farklılık, populasyonun bu alelik frekansların değiştirilmesine olanak sağlayan bazı faktörlere duyarlı olmasından kaynaklanabilir. Yabanıl tip allelerin belirlenmesiyle ilgili tartışmalar ve araştırmalar devam etmektedir. Bazı araştırmacılar 66G allelinin yabanıl tip allel olabileceğini ileri sürmektedirler. Bunun yanında, özellikle B12 vitamin eksikliği ve aktif folat eksikliği, kan plazmasında homosistein birikmesini (hiperhomosisteinemi) ve embriyogenezin kritik aşamasında yarık dudak damak oluşumunu kolaylaştırabiir. 1997 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde uygulamaya giren, zenginleştirilmiş tahıl ürünleri ile beslenme sayesinde folat eksikliği %92, hiperhomosisteinemi %48 oranında azalmıştır. Dolayısıyla popülasyonların beslenme şekilleri düzeldiğinde, düşük folat ve B12 vitamini hiperhomosisteinemi için en önemli faktör olmayı bırakabilir (Gaughan ve diğerleri, 2001).

MTRR A66G (I22M) polimorfizmi FMN-bağlama alanı içerisinde yer almaktadır ve variant enzimde G alleli substrat için daha düşük affiniteye sahip enzim üretmektedir (Waltrick-Zambuzzi ve diğerleri, 2015).

MTRR 66A>G (rs1801394) polimorfizminin, yabanıl tip genotip tip ile karşılaştırıldığında kodlanan proteinin aktivitesinde dört kat azalmaya yol açtığı çalışmalarla gösterilmiştir (Bezerra ve diğerleri, 2015).

MTRR enzim aktivitesinin azalması, aktif MTR enzim miktarının azalmasına neden olmaktadır. Metiyonin sentaz aktivitesi, yeterli miktarda metiyonin muhafaza etmek ve yarık dudak damak oluşumu ile ilişkili olduğu bilinen homosistein birikimini önlemek açısından önemlidir (Zhu ve diğerleri, 2003).

Metiyonin yolağında reaksiyonu, 5-metiltetrahidrofolattan tetrahidrofolata katalize eden metiyonin sentazın azalan aktivitesi, pürin ve pirimidin biyosentezinin gerçekleştirilememesine dolayısıyla hücresel folatın 5-metil-tetrahidrofolat olarak

tutulmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda metiyonin sentaz, DNA metilasyonu gibi birçok hücresel işlemde önemli bir metil grubu donörü olan S-adenosilmetiyoninin (SAM) hücresel seviyesini muhafaza eden metilasyon siklusunda da kritik bir öneme sahiptir. MTRR azalan enzim aktivitesi homosistein birikiminin artmasına bağlı olarak SAM seviyesinde azalmaya neden olacaktır. Bunu takiben embriyogenez sırasında genomik programlamayı düzenleyen bir epigenetik mekanizma olan DNA metilasyonunda azalma görülecektir.

Sonuç olarak *MTRR* geninde meydana gelen A66G polimorfizmi, dudak ve damak gelişiminde önemli olan çok sayıda hücresel prosesi bozması açısından yarık dudak damak oluşumuyla ilişkilendirilebilir.

Sendromsuz dudak ve damak yarıklarının oluşumundan sorumlu aday genler arasında yer alan *PVRL1* geni nektin 1 proteinini kodlamaktadır. Nektin 1 yüz ve damak gelişimi sırasında hücre-hücre adezyon molekülü olarak hücresel süreçte önemli rol oynamaktadır.

Farklı populasyonlarda yapılan birçok çalışmada, *PVRL1* gen değişimleri ile sendromsuz dudak ve damak yarıklığı arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. *PVRL1* geni ile dudak damak yarıkları arasındaki ilişki ilk olarak Suzuki ve diğerleri (2000) tarafından ortaya koyulmuştur.

Suzuki ve diğerleri yaptıkları çalışmada Margarita Adası ve İsrailli yarık dudak/damak ektodermal displazi sendromu (CLPED1) ailelerinde *PVRL1* geninin 3. ekzon bölgesinde ve Brezilyalı CLPED1 ailelerinde *PVRL1* 5. ekson bölgesinde değişimler tespit etmişlerdir. Margarita Adası CLPED1 hastalarında, kodon Trp185'de TGG→TAG değişimine sebep olan nonsense bir mutasyon tanımlamışlardır. İsrailli hastalarda çerçeve kayması ile sonuçlanan tek bazlık bir TGG→T-G delesyonu ve Brezilyalı hastalarda yine çerçeve kaymasına neden olan kodon Gly323'de tek bazlık bir GGT→GGTT duplikasyonu tanımlamışlardır (Suzuki ve diğerleri, 2000).

Yoshida ve diğerleri yarık dudak/damak ektodermal displazi sendromlu (CLPED1) Japon bir hastada *PVRL1* geni 2. ekzonda homozigot c.400C>T (p.Arg134*) mutasyonunu tanımlamışlardır. Hastanın ailesi mutant allel bakımından heterozigot bulunmuştur (Yoshida ve diğerleri, 2015).

Tongkobpetch ve diğerleri (2008), *PVRL1* geni ekzon 6 da 1183. nükleotidde G>A transisyonu ile oluşan bir mutasyon tanımlamışlardır. Kodon 395'de meydana gelen mutasyon sonucunda valin amino asitinin yerine metiyonin amino asiti (V395M) geçmektedir. 100 Taylandlı sendromsuz yarık dudak ve damaklı hastadan birinde bu mutasyon görülürken, 200 sağlıklı kontrol bireyin hiçbirinde bu değişim görülmemiştir (Tongkobpetch ve diğerleri, 2008).

Sözen ve diğerleri (2001) Kuzey Venezuela'da yaptıkları araştırmada *PVRL1* W185X mutasyonunun sendromsuz yarık dudak ve damak oluşumu için genetik bir risk oluşturduğunu ve bu mutasyonun heterozigotluğu ile aralarında son derece önemli bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Sözen ve diğerleri, 2001).

PVRL1 geninin üç splice izoformundaki mutasyonları taramak için birden fazla populasyonda çalışma yapan Avila ve diğerleri, G361V mutasyonun yarık dudak damak fenotipleri arasında çok yüksek oranda bulunduğunu göstermişlerdir (P=0,005). Çalışmada aynı zamanda hücre-hücre ve hücre-virüs adezyonuna aracılık ettiği gösterilen V1 ve C1 domainlerinde S112T ve T131A varyantları bulunmuştur. T131A varyantı 1300'den fazla sağlıklı kontrol grupta saptanmazken, S112T varyantı bilinen tüm *PVRL1* sekanslarında korunmuştur. Ortaya koyulan bu veriler ile mutasyonların, hücre-hücre adezyonunun başlatılması ve düzenlenmesini bozduğu ve embriyonik yüz morfogenezini etkilediğini düşündürmektedir (Avila ve diğerleri, 2006).

Scapoli ve diğerleri sendromsuz yarık dudak ve damaklı 143 İtalyan hasta ile yaptıkları araştırmada, *PVRL1* geninin ekson 3 bölgesinde R199Q, R210H ve R212H mutasyonlarını tanımlamışlardır. Bu mutasyonların epitel hücrelerin adezyonu sırasında nektin moleküllerinin dimerleşmesini inhibe ederek PVRL1 proteinin fonksiyonunu olumsuz bir şekilde etkilediği düşünülmektedir (Scapoli ve diğerleri, 2006). Başka bir çalışmada W185X mutasyonu ile ilişkisini araştırmak için tarama yapan Scapoli ve diğerleri sendromsuz dudak ve damak yarıkları için bu mutasyonun bir risk oluşturmadığını göstermişlerdir (Scapoli ve diğerleri, 2004). Benzer şekilde Tseng ve arkadşları, *PVRL1* geni kodon 185 ve 323'teki mutasyonlar ile Tayvanlı nsCL/P hastaları arasında hiçbir ilişki bulamamıştır (Tseng, Hsiao, Hsiao, Tsai ve Chiu, 2006).

Çinde Shu ve diğerleri 171 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve 100 kontrol grup ile *PVRL1* geni ekzon 2 ve 5'de daha önce tanımlanan kodon 112, 131, 361 ve 395 mutasyonları için tarama yapmışlardır. Çalışma sonucunda *PVRL1* gen mutasyonları ile sendromsuz dudak damak yarıklılığı arasında ilişki olmadığını rapor etmişlerdir (Shu ve diğerleri, 2015).

Cheng ve diğerlerinin 470 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve 693 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada, PVRL1 geninde yaygın ya da nadir olarak görülen varyantların Güney Han Çin populasyonunda yarık dudak ve damak gelişiminde bir rol oynamadığını bildirmişlerdir (Cheng, Huang, Xu ve Shu, 2012).

Tayvan populasyonunda Peng ve diğerleri tarafından yeni nesil sekanslama yöntemi kullanılarak 103 sendromsuz orofasiyel yarıklı hasta ve 100 sağlıklı kontrol birey ile gerçekleştirilen çalışmada, PVRL1 geninin de bulunduğu 18 lokus taranmıştır. Tayvanlı dudak damak yarıklı hastalarda PVRL1 geninde S112T ve L18F mutasyonları saptanırken kontrollerde bu değişimler bulunmamıştır (Peng ve diğerleri, 2016).

Brezilya'da bir çalışma gerçekleştiren Paranaíba ve diğerleri, 317 sendromsuz dudak damak yarıklı hasta ve 413 kontrol grup üzerinde çalışmıştır. *PVRL1* G361V polimorfizmi ile sendromsuz dudak damak yarıklılığı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır ve çalışma sonucunda istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır (Paranaíba ve diğerleri, 2013).

Turhani ve ark. Avrupa kökenli dudak damak yarıklı hastalarda PVRL1 geninde tanımladıkları Glu441-Gly442insGlu mutasyonunda, glutamik asit eklenmesinin karboksil terminalde nektin 1'in sarmal yapısını dengesiz hale getireceğini düşünmektedir. Bu dengesizlik nektin 1'in bir etkileşimini ve bunun sonucunda NAP (Nectin-Afadin-Ponsin) hücre adezyon sistemine bağlı hücre hücre sistem aktivasyonunu inhibe edebilir (Turhani ve diğerleri, 2005).

Sendromsuz dudak ve damak yarıklı hastalarla yapmış olduğumuz çalışmada, *PVRL1* geni ekzon 3 bölgesinde S174T ve T187N değişimleri saptanmıştır. Kodon 174'de meydana gelen T>A değişimi diziyi ***T***CA→***A***CA şeklinde değiştirerek Serin amino asitinin yerine Treonin aminoasitinin geçmesine neden olmaktadır. Kodon 187'de meydana gelen C>A

değişimi ise diziyi A***C***T→A***A***T şeklinde değiştirerek Treonin amino asitinin yerine Asparajin aminoasitinin geçmeine neden olmaktadır. S174T ve T187N değişimlerinin her ikiside 80 hastada heterozigot olarak bulunmuştur. Bunun yanında, her iki değişim 3 sağlıklı bireyde de saptanmıştır. Bu değişimler, HGMD ve NCBI SNP veritabanında henüz tanımlanmamıştır.

Üçüncü eksonda bulunan varyantlar PVRL1'in V1 ve C1 ekstraselüler domainde bulunmaktadır. Bu varyantların, epiteliyal adezyon olayları sırasında PVRL1/nektin moleküllerinin dimerleşmesine müdahale ederek PVRL1 protein fonksiyonunu olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir (Avila ve diğerleri, 2006).

Nektin, sitoplazmik kuyruk bağlama proteinleri olan afadin ve katenin vasıtasıyla E-kaderin kompleksiyle de ilişkilendirilir. Ekson 3 mutasyonlarının proteinin hem alfa hem beta izoformlarını kestiği daha önce rapor edilmiştir (Suzuki ve diğerleri, 2000). Bu bağlamda hücre içi domain/etki kaybı, hücre-hücre adezyon sürecini harekete geçirmek için gerekli olan protein-protein etkileşimlerini bozabilir. Hücre içi varyantlar, bu alana gelen sinyalleri bozarak yüzün morfogenezini etkileyebilir (Avila ve diğerleri, 2006).

PVRL1 geni ekzon 6 bölgesinde c.1311_1313insGGA (g.63736–g.63738) nükleotidleri arasında yeni GGA insersiyonu bulunmuştur. 80 sendromsuz dudak ve damak yarıklı hastanın 15'inde GGA insersiyonu saptanmıştır, bununla birlikte 125 sağlıklı bireyin hiçbirinde bu mutasyon görülmemiştir. GGA insersiyonu daha önce rapor edilmemiştir. HGMD ve NCBI SNP veritabanında henüz tanımlanmamıştır.

Elde edilen verilere göre, *PVRL1* gen değişimleri Türk populasyonunda sendromsuz dudak ve damak yarıkları için genetik bir risk faktörü oluşturuyor gibi görünmektedir. Bugüne kadar PVRL1 proteinini araştırmak için herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Mutasyon sonucu değişen proteinin aktivitesi hakkında herhangi bir fonksiyonel veri olmadan yalnızca sekans bilgileri temelinde, bu mutasyonların yarık dudak damak oluşumunda yer aldığı iddiası yanlış olabilir. Ancak, c.1311_1313insGGA nin 125 sağlıklı kontrolde bulunmadığına dair kanıtlar, bu mutasyonun sendromsuz yarık dudak damak oluşumunda yer aldığı hipotezini desteklemektedir.

PVRL1 aynı zamanda alfa herpes virüsünün bağlanması ve girmesi için bilinen üç primer reseptörden biri olarak görev yapmaktadır ve herpes virüs girişi aracı-mediatörü C (HveC) olarak bilinir. Dolayısıyla gebelik sırasında annedeki virüs enfeksiyonu, çocukların yarık dudak veya damaklı olmasında etkin bir rol oynayabilir (Avila ve diğerleri, 2006).

Özetle, *PVRL1* gen değişimleri sendromsuz dudak damak yarıklarının oluşum nedenleri olabilir. Daha büyük bir örneklem boyutuyla PVRL1'in diğer genler ve proteinleri ile olan etkileşimlerinin araştırılması dudak damak yarklarının anlaşılmasına daha fazla yardımcı olabilir. Aynı zamanda maternal birinci trimester viral enfeksiyonunun doğru olarak karakterize edilmesi, çevre etkileşimleri yoluyla gen araştırmasına çok fazla katkı sağlayabilir.

TGFβ1, kromozomun 19q13,1 bölgesinde lokalize olan transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF-beta 1) geni tarafından kodlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda en yaygın görülen TGFβ1 polimorfizleri Pro10Leu ve Arg25Pro değişimleridir. Pro10Leu (rs1800470) polimorfizmi kodon 29'da C>T değişimi ile oluşurken, Arg25Pro (rs1800471) polimorfizmi kodon 74'de G>C değişimi ile oluşmaktadır (Murray, 2002).

Embriyonik gelişim sırasında dudak damak gelişiminde *TGFβ1* sinyal mekanizmasının işleyişi ile ilgili yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak dudak damak yarıklı hastalar üzerine yapılan *TGFβ1* gen çalışmaları yetersiz bulunmaktadır.

Jin ve Ding (2014) tarafından in vivo olarak farelerde gerçekleştirilen araştırmada, sekonder damak oluşumu için TGFβ1 ve TGFβ2'nin fonksiyonel olarak gerekliliği gösterilerek ilk genetik kanıtlar ortaya konulmuştur (Jin ve Ding, 2014).

TGFβ1 ve TGFβ3'ün yarık dudak damak oluşumu ile ilişkisini ilk kez Bodo ve ark. 1999 yılında yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Aynı zamanda nsCL/P fibroblastların *TGFβ1* transkripsiyonunda paralel bir azalma ile daha az aktif TGFβ1 ürettiklerini rapor etmişlerdir (Bodo ve diğerleri, 1999). TGFβ1 izoformlarının sinyalleşmesi palatal rafların füzyonunu hızlandırmada önemli bir role sahiptir (Bush ve Jiang, 2012).

Alman hastalarda Stoll ve diğerlerinin, real time PCR yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada *TGFβ1* gen polimorfizmlerinin yarık dudak damak oluşum mekanizması üzerine

etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda Leu10Pro polimorfizminde nsCL/P hastaları ile kontrol bireyleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilirken, kodon 74 de meydana gelen Arg25Pro polimorfizmi ile yarık dudak damak oluşumu arasında anlamlı bir ilişki olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir (P<0,025) (Stoll ve diğerleri, 2015).

Yürüttüğümüz çalışmada *TGFβ1* Pro10Leu (29C>T) polimorfizmi ile sendromsuz dudak damak yarıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamasına rağmen, 29C>T heterozigot genotip varlığının Türk populasyonunda 2,18 kat risk getirdiği elde edilen veriler ve istatistiksel sonuçlar ile belirlenmiştir (P=0,06). Elde edilen bulgular yapılan çalışmaları destekler nitelikte sonuçlar vermiştir.

TGFβ1 Arg25Pro (74G>C) polimorfizmi için heterozigot genotip varlığı, yarık dudak damak oluşumu için 1,3 kat risk getirmiştir. Stoll ve diğerlerinin yaptıkları çalışmanın aksine dudak damak yarıkları ile Arg25Pro polimorfizmi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

Bulgularımızdaki farklılık muhtemelen CL/P malformasyonunun karmaşık etiyolojisini yansıtmaktadır. Nitekim genetik ve çevresel faktörler muhtemelen farklı popülasyonlarda malformasyon gelişimine farklı katkıda bulunmaktadır.

TGFβ1 geninin ekzon 1'deki Pro10Leu ve Arg25Pro polimorfizmlerinin, kodon 29'da TGFβ1 prekürsöründen kesilen sinyal peptit sekansında bulunduğu gösterilmiştir. Sinyal sekansı, yeni sentezlenen proteinin endoplazmik retikulum membranlarından dışa aktarılmasına izin verir. Sinyal peptidleri çok çeşitli sekanslara sahip olmalarına rağmen bir bütün olarak işlev sergilerler ve üç bölgeden oluşurlar: pozitif yüklü N-terminal bölgesi, merkezi hidrofobik çekirdek ve polar C-terminal bölgesi (Cambien ve diğerleri, 1996).

Pozisyon 10'da meydana gelen C>T değişiminin diziyi C***C***G→C***T***G şeklinde değiştirmesiyle Prolin aminoasitinin yerine Lösin aminoasiti geçmektedir. Pro10Leu polimorfizmi hidrofobik çekirdekte bulunmaktadır ve hem prolin hem lösin amino asitleri apolar amino asitlerdir. Sinyal peptit sekansında Pro10Leu polimorfizmi, sinyal peptidinin işlevini ve sentezlenen TGFβ1 proteinin sekresyonunu etkilemektedir (Dunning ve diğerleri, 2003).

Pozisyon 25'de meydana gelen G>C değişiminin diziyi C***G***G→C***C***G şeklinde değiştirmesiyle Arjinin aminoasitinin yerine Prolin aminoasiti geçmektedir. Arg25Pro polimorfizmi hidrofobik çekirdeğin 3' ucuna yakın bir yerde bulunmaktadır ve büyük polar amino asitin yerine küçük apolar amino asitin geçmesi söz konusu olmaktadır. Dolayısıyla farklı sınıflardaki sinyal dizisi mutasyonları, sentezlenen protein verimliliğinde ve salgılanmasında farklılıklara yol açmaktadır (Crilly ve diğerleri, 2002).

Sonuç olarak ortaya konulan bulgulara göre, *TGFβ1* geninde meydana gelen Pro10Leu ve Arg25Pro polimorfizmleri, yukarıda da değinildiği üzere yarık dudak ve damak oluşumu için risk faktörü olarak ilişkilendirilebilir ve dudak ve damak yarıklı hastalarda *TGFβ* sinyalizasyonunda analiz edilen gen varyasyonları hakkında diğer araştırmacılara yol gösterici olabilir.

Yarık dudak ve damak oluşumuna yol açan moleküler olayların kesin olarak tespit edilememesi, embriyogenezde damak gelişimi sırasında gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve gen ağları hakkındaki bilgi eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Bizimki gibi tek gen çalışmaları, dudak damak gelişimi ile ilgili gen ağlarının mevcut bilimsel verilerine katkıda bulunarak yarık dudak ve damak patogenezinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Çünkü sendromsuz yarık dudak ve damak etiyolojisine katkıda bulunan faktörlerin belirlenmesi, yarık dudak damak oluşumunun önlenmesi ve gerekli tedbirlerin alınması açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Adameyko, I., and Fried, K. (2016). The Nervous System Orchestrates and Integrates Craniofacial Development: A Review. *Frontiers in Physiology,* 19(7), 49.

Akar, N. (1999). *Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş* (İkinci Baskı). Türkiye: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ANTIP A.Ş. Yayınları, 71-508.

Akkuş, D. ve Sönmez, M.F. (2012). Investigation of Nectin-2 Expression in the Rat Thymus During Organogenesis in the Embryo. *Erciyes Medical Journal,* 34(2), 59-64.

Aksu, A.E. ve Özgür F. (2007). Erken Ve Geç Damak Yarığı Onarımlarının Maksilla Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Sefalometrik Analiz Yöntemi İle Karşılaştırılması. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi*, 15(3), 155-164.

Allam, E., and Stone, C. (2014). Cleft Lip and Palate: Etiology, Epidemiology, Preventive and Intervention Strategies. *Journal of Anatomy and Physiology,* 4(3), 1-6.

Altunhan, H., Annagür, A., Konak, M., Ertuğrul, S., Örs, R., ve Koc, H. (2012). The incidence of congenital anomalies associated with cleft palate/cleft lip and palate in neonates in the Konya region, Turkey. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,* 50(6), 541-544.

Avila, J.R., Jezewski, P.A., Vieira, A.R., Orioli, I.M., Castilla, E.E., Christensen, K., Daack-Hirsch, S., Romitti, P.A., and Murray, J.C. (2006). PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *American Journal of Medical Genetics Part A,* 140(23), 2562-2570.

Badovinac, R.L., Werler, M.M., Williams, P.L., Kelsey, K.T., and Hayes, C. (2007). Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2007; 79(1), 8-15.

Bagyinszky, E., Youn, Y.C., An, S.S., and Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging,* 9, 535-551.

Baker, C.V., and Bronner-Fraser, M. (1997). The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction. *Mechanisms of Development,* 69(1-2), 3-11.

Barbosa, P.R., Stabler, S.P., Machado, A.L., Braga, R.C., Hirata, R.D., Hirata, M.H., Sampaio-Neto, L.F., Allen, R.H., and Guerra-Shinohara, E.M. (2008). Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *European Journal of Clinical Nutrition,* 62(8), 1010-1021.

Barutcuoglu, M., Umur, A.S., Vatansever, H.S., Umur, N., Ozbilgin, K., Sayhan, S., ve Selcuki, M. (2013). TGF-βs and Smads activities at the site of failed neural tube in the human embryos. *Turkish Neurosurgery,* 23(6), 693-699.

Beaty, T.H., Marazita, M.L., and Leslie, E.J. (2016). Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: today's challenges and tomorrow's opportunities. *F1000Research,* 5, 2800.

Bezerra, J.F., Oliveira, G.H., Soares, C.D., Cardoso, M.L., Ururahy, M.A., Neto, F.P., Lima-Neto, L.G., Luchessi, A.D., Silbiger, V.N., Fajardo, C.M., Oliveira, S.R., Almeida, M.D., Hirata, R.D., Rezende, A.A., and Hirata, M.H. (2015). Genetic and non-genetic factors that increase the risk of non-syndromic cleft lip and/or palate development. *Oral Diseases,* 21(3), 393-399.

Bille, C., Olsen, J., Vach, W., Knudsen, V.K., Olsen, S.F., Rasmussen, K., and Murray, J.C. (2007). Andersen AM, Christensen K. Oral clefts and life style factors a case-cohort study based on prospective Danish data. *European Journal of Epidemiology,* 22(3), 173-181.

Bhaskara, L.V., Murthy, J., and Venkatesh Babu, G. (2011). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Archives of Oral Biology,* 56(8), 723-737.

Birben, E. (2007). Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlar ile Kesimi. *Astım Allerji İmmünoloji* 5(1), 53-55.

Biri, A., Onan, A., Kocrucuoğlu, Ü., Tıraş, B., ve Himmetoğlu, Ö. (2005). Bir Üniversite Hastanesinde Konjenital Malformasyonların Görülme Sıklığı ve Dağılımı. *Perinatoloji Dergisi*, 13(2), 86-90.

Blanton S. H., Cortez, A., Stal, S., Mulliken, J. B., Finnell, R. H., and Hecht, J. T. (2005). Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 137A(3), 259-262.

Blanton, S. H., Henry, R. R., Yuan, Q., Mulliken, J. B., Stal, S., Finnell, R. H., and Hecht, J. T. (2011). Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 91(1), 50-60.

Blobe, G. C., Schiemann, W. P., and Lodish, H. F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England Journal of Medicine,* 342(18), 1350-1358.

Bodo, M., Baroni, T., Carinci, F., Becchetti, E., Bellucci, C., Pezzetti, F., Conte, C., Evangelisti, R., and Carinci, P. (1999). TGFbeta isoforms and decorin gene expression are modified in fibroblasts obtained from non-syndromic cleft lip and palate subjects. *Journal of Dental Research,* 78(12), 1783-1790.

Brandalize, A.P., Bandinelli, E., Borba, J.B., Félix, T.M., Roisenberg, I., and Schüler-Faccini, L. (2007). Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 40(6),787-791.

Brito L.A., Cruz L.A., Rocha K.M., Barbara L.K., Silva C.B., Bueno D.F., Aguena M., Bertola D.R., Franco D., Costa A.M., Alonso N., Otto P.A., and Passos-Bueno M.R. (2011). Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155A(7), 1581-1587.

Bush, J.O., and Jiang, R. (2012). Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development*, 139(4), 231-243.

Cambien, F., Ricard, S., Troesch, A., Mallet, C., Générénaz, L., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Ruidavets, J.B., and Poirier, O. (1996). Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension*, 28(5), 881-887.

Campos Neves, A.T., Volpato, L.E., Espinosa, M.M., Aranha, A.M., and Borges, A.H. (2006). Environmental factors related to the occurrence of oral clefts in a Brazilian subpopulation. *Nigerian Medical Journal*, 57(3), 167-172.

Canfield, M.A., Collins, J.S., Botto, L.D., Williams, L.J., Mai, C.T., Kirby, R.S., Pearson, K., Devine, O., and Mulinare, J. (2005). National Birth Defects Preventin Network. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 73(10), 679-689.

Carinci, F., Scapoli, L., Palmieri, A., Zollino, I., and Pezzetti, F. (2007). Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip: An update. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 71(10), 1509-1519.

Carinci, F., Pezzetti, F., Scapoli, L., Martinelli, M., Avantaggiato, A., Carinci, P., Padula, E., Baciliero, U., Gombos, F., Laino, G., Rullo, R., Cenzi, R., Carls, F., and Tognon, M. (2003). Recent developments in orofacial cleft genetics. *Journal of Craniofacial Surgery*, 14(2), 130-143.

Chen, L.H., Liu, M.L., Hwang, H.Y., Chen, L.S., Korenberg, J., and Shane,.B. (1997). Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3628–3634.

Cheng, H.Q., Huang, E.M., Xu, M.Y., and Shu, S.Y., Tangcorresponding, S.J. (2012). PVRL1 as a Candidate Gene for Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate: No Evidence for the Involvement of Common or Rare Variants in Southern Han Chinese Patients. *DNA and Cell Biology*, 31(7), 1321-1327.

Chevrier, C., Dananché, B., Bahuau, M., Nelva, A., Herman, C., Francannet, C., Robert-Gnansia, E., and Cordier, S. (2006). Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. *Occupational and Environmental Medicine*, 63(9), 617-623.

Chevrier, C., Perret, C., Bahuau, M., Zhu, H., Nelva, A., Herman, C., Francannet, C., Robert-Gnansia, E., Finnell, R.H., and Cordier, S. (2007). Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A(3), 248-257.

Chorna, L.B., Akopyan, H.R., Makukh, H.V., and Fedoryk, I.M. (2011). Allelic polymorphisms in the MTHFR, MTR and MTRR genes in patients with cleft lip and/or palate and their mothers. *Cytology and Genetics*, 45(3), 177-181.

Cooper G.M. ve Hausman, R.E. (2006). *Hücre Moleküler Yaklaşım* (Üçüncü Baskı). (Çev. M. Sakızlı ve N.Atabey). İzmir: İzmir Tıp Kitabevi. (Eserin orijinali 2006'da yayımlandı). 104,115.

Cordero, D.R., Brugmann, S., Chu, Y., Bajpai, R., Jame, M., and Helms, J.A. (2011). Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155A(2), 270-279.

Crilly, A., Hamilton, J., Clark, C.J., Jardine, A., and Madhok, R. (2002). Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(8), 678-681.

Darka Ö. (2003). Hücre adezyon molekülleri ve enflamasyondaki rolleri. *Türkiye Klinikleri Mikrobiyoloji Enfeksiyon Dergisi*, 2(1), 36-43.

Davis, J.S., and Ritchie, H.P. (1922). Classification of congenital clefts of the lip and palate with a suggestion for recording these cases. *JAMA*, 79(16),1323-1327.

Dixon, M.J, Marazita, M.L., Beaty, T.H., and Murray, J.C. (2011). Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 167-178.

Dunning, A.M., Ellis, P.D., McBride, S., Kirschenlohr, H.L., Healey, C.S., Kemp, P.R., Luben, R.N., Chang-Claude, J., Mannermaa, A., Kataja, V., Pharoah, P.D., Easton, D.F., Ponder, B.A., and Metcalfe, J.C. (2003). A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Research*, 63(10), 2610-2615.

Evans, J.C., Huddler, D.P., Hilgers, M.T., Romanchuk, G., Matthews, R.G., Ludwig, M.L. (2004). Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 101(11), 3729-3736.

Freitas, J.A., das Neves, L.T., de Almeida, A.L., Garib, D.G., Trindade-Suedam, I.K., Yaedú, R.Y., Lauris Rde, C., Soares, S., Oliveira, T.M., and Pinto, J.H. (2012). Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP)--Part 1: overall aspects. *Journal of Applied Oral Science*, 20(1), 9-15.

Frisdal, A., and Trainor, P.A. (2014). Development and Evolution of the Pharyngeal Apparatus. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(6), 403–418.

Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology,* 133(3), e6.

Garlantézec, R., Monfort, C., Rouget, F., and Cordier, S. (2009). Maternal occupational exposure to solvents and congenital malformations: A prospective study in the general population. *Occupational and Environmental Medicine,* 66(7), 456–463.

Gaughan, D.J., Kluijtmans, L.A., Barbaux, S., McMaster, D., Young, I.S., Yarnell, J.W., Evans, A., and Whitehead, A.S. (2001). The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis*, 157(2), 451-456.

Giovannucci, E. (2004). Alcohol, one-carbon metabolism, and colorectal cancer: recent insights from molecular studies. *Journal of Nutrition,* 134(9), 2475S-2481S.

Grayson BH, Santiago PE, Brecht, L.E., and Cutting, C.B. (1999). Presurgical nasoalveolar molding in infants with cleft lip and palate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 36, 486-498.

Gressner, O.A., Weiskirchen, R., and Gressner, A.M. (2007). Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comparative Hepatology*, 6, 7.

Guo, J.Z., Song, X.M., Wang, Y., Zhu, W.L., Li, S.Q., and Li, Y. (2009). [No association of the A2756G polymorphism of methionine synthase gene with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi,* 26(3), 345-349.

Güvenç, T.N., Aksu, M., ve Kocadereli, I. (2010). The role of orthodontics in the treatment of cleft lip-palate patients. *Dental Journal of Dicle*, 11(1), 57-65.

Hand, A.R. and Frank, M.E. (2015). *Fundamentals of Oral Histology and Physiology. Chapter 2, Development of the Head, Face, and Mouth*. Amerika: Wiley-Blackwell, 14.

Hein, D.W. (2002). Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research,* 506-507, 65-77.

Hillman, R.S., and Steinberg, S.E. (1982). The effects of alcohol on folate metabolism. *Annual Review of Medicine*, 33, 345- 354.

Honein, M,A,, Rasmussen, S.A., Reefhuis, J., Romitti, P.A., Lammer, E.J., Sun, L., and Correa, A. (2007). Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology,* 18(2), 226-233.

IPDTOC Working Group. (2011). Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTOC). *The Cleft Palate-Craniofacial Journal,* 48(1), 66-81.

İnternet 1: Craniofacial Development. Duke Medicine. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fweb.duke.edu%2Fanatomy%2Fembryology%2Fcraniofacial%2Fcraniofacial.html&date=2018-02-04, Son Erişim Tarihi: 04.02.2018.

İnternet 2: Bergermann, M.; Tilkorn, C.. Closure of cleft palates. Surgical Humanitarian Aid Resource Europe. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.esprasshare.org%2Fshare-teaching-and-lectures%2Fclosure-of-cleft-palates%2F&date=2018-01-21, Son Erişim Tarihi: 21.01.2018.

İnternet 3: MTR Gene (Protein Coding). URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.genecards.org%2Fcgi-bin%2Fcarddisp.pl%3Fgene%3DMTR%26keywords%3Dmtr&date=2018-01-21, Son Erişim Tarihi: 21.01.2018.

İnternet 4: MTRR Gene (Protein Coding). URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.genecards.org%2Fcgi-bin%2Fcarddisp.pl%3Fgene%3DMTRR%26keywords%3Dmtrr&date=2018-01-21, Son Erişim Tarihi: 21.01.2018.

İnternet 5: NECTIN1 Gene (Protein Coding). URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.genecards.org%2Fcgi-bin%2Fcarddisp.pl%3Fgene%3DNECTIN1%26keywords%3Dpvrl1&date=2018-01-21, Son Erişim Tarihi: 21.01.2018.

İnternet 6: TGF-beta Superfamily. R&D systems a biotechne brand. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.rndsystems.com%2Fresearch-area%2Ftgf--beta-superfamily&date=2018-02-04, Son Erişim Tarihi: 04.02.2018.

İnternet 7: TGFB1 Gene (Protein Coding). URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.genecards.org%2Fcgi-bin%2Fcarddisp.pl%3Fgene%3DTGFB1%26keywords%3Dtgfb1&date=2018-01-21, Son Erişim Tarihi: 21.01.2018.

İnternet 8: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fprobe%2Fdocs%2Ftechrflp&date=2018-01-21, Son Erişim Tarihi: 21.01.2018.

James, S.J., Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I.P., and Caudill, M.A. (2002). Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *Journal of Nutrition,* 132(8), 2361S-2366S.

Jin, J.Z., and Ding, J. (2014). Strain-dependent effects of transforming growth factor-b1 and 2 during mouse secondary palate development. *Reproductive Toxicology*, 50, 129-133.

Jiang, C., Yin, N., Zhao, Z., Wu, D., Wang, Y., Li, H., and Song, T. (2015). Lack of Association Between MTHFR, MTR, MTRR, and TCN2 Genes and Nonsyndromic CL±P in a Chinese Population: Case-Control Study and Meta-Analysis. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal,* 52(5), 579-587.

Kallen, B. (2003). Maternal drug use and infant cleft lip/palate with special reference to corticoids. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal,* 40(6), 624–628.

Kawalec, A., Nelke, K., Pawlas, K., and Gerber, H. (2015). Risk factors involved in orofacial cleft predisposition - review. *Open Medicine Journal,* 10(1), 163-175.

Keçik, D., Enacar, A., ve Özgür, F. (2009). Nazo Alveolar Şekillendirme Tedavisi Uygulanan Tek Taraflı Dudak-Damak Yarığı Olgusunun Uzun Dönem Sonucu. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi,* 17(2), 108-114.

Khalil, N., Parekh, T.V., O'Connor, R., Antman, N., Kepron, W., Yehaulaeshet, T., Xu, Y.D., and Gold, L.I. (2001). Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMJ Thorax*, 56(12), 907-915.

Klug, W.S., Cummings, M.R., and Spe, Charlotte. *Genetik kavramlar* (Üçüncü Baskı). (Çev. S. Sümer, A. Öğüş, R. Öner, L. Açık, C. Öner. Türkiye. Palme Yayınları. (Eserin orjinali 2011' yayımlandı), 517.

Kot-Leibovich, H., and Fainsod, A. (2009). Ethanol induces embryonic malformations by competing for retinaldehyde dehydrogenase activity during vertebrate gastrulation. *Disease Models & Mechanisms,* 2(5-6), 295–305.

Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H.H., Rommens, J.M., Scherer, S.W., Rosenblatt, D.S., and Gravel, R.A. (1998). Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 95(6), 3059-3064.

Lee, H. C., Jeong, Y. M., Lee, S. H., Cha, K. Y., Song, S. H., Kim, N. K., Lee, K. W., and Lee, S. (2006). Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. *Human Reproduction,* 21(12), 3162-3170.

Levi, B., Brugman, S., Wong, V.W., Grova, M., Longaker, M.T., and Wan, D.C. (2011). Palatogenesis:engineering, pathways and pathologies. *Organogenesis*, 7(4), 242-254.

Lan, Y., Xu, J., and Jiang, R. (2015). Cellular and Molecular Mechanisms of Palatogenesis. *Current Topics in Developmental Biology,*115, 59-84.

Malek, R. (2001). *Pathological Anatomy, Cleft Lip And Palate Lesions, Pathophysıology and Prımary Treatment* (Birinci Baskı). United States of America: CRC Yayıncılık, 19.

Martelli, D.R., Coletta, R.D., Oliveira, E.A., Swerts, M.S., Rodrigues, L.A., Oliveira, M.C., and Martelli Júnior, H. (2015). Association between maternal smoking, gender, and cleft lip and palate. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology,* 81(5), 514-519.

Martinelli, M., Scapoli, L., Palmieri, A., Pezzetti, F., Baciliero, U., Padula, E., Carinci, P., Morselli, P.G., and Carinci, F. (2006). Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human Mutation,* 27(3), 294.

Meisel, A., Bickle, T.A., Kruger, D.H., and Schroeder, C. (1992). Type III restriction enzymes need two inversely oriented recognition sites for DNA cleavage. *Nature*, 355 (6359), 467-469.

Meyer, K.A., Werler, M.M., Hayes, C., and Mitchell, A.A. (2003). Low maternal alcohol consumption during pregnancy and oral clefts in offspring: the Slone Birth Defects Study. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology,* 67(7), 509-514.

Minoux, M., and Rijli, F.M. (2010). Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development*, 137(16), 2605-2621.

Molina-Solana, R., Yáñez-Vico, R.M., Iglesias-Linares, A., Mendoza-Mendoza, A., and Solano- Reina, E. (2013). Current concepts on the effect of environmental factors on cleft lip and palate. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42(2), 177-184.

Moore, K. L and T. V. N. Persaud. (1993). *Before we are born essentials of embryology and birth defects* (Dördüncü Baskı). Philadelphia: Saunders, 121-125.

Mossey, P.A., Little, J., Munger, R.G., Dixon, M.J., and Shaw, W.C. (2009). Cleft lip and palate. *Lancet*, 374(9703), 1773-1785.

Mossey, P.A., and Modell, B. (2012). Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Frontiers of Oral Biology,* 16, 1-18.

Mostowska, A., Hozyasz, K.K., and Jagodzinski, P.P. (2006). Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clinical Genetics*, 69(6), 512-517.

Mostowska, A., Hozyasz, K.K., Wojcicki, P., Dziegelewska, M., and Jagodzinski, P.P. (2010). Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *Journal of Medical Genetics*, 47(12), 809-815.

Munger, R.G., Sauberlich, H.E., Corcoran, C., Nepomuceno, B., Daack-Hirsch, S., and Solon, F.S. (2004). Maternal vitamin B-6 and folate status and risk of oral cleft birth defects in the Philippines. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology,* 70(7), 464-471.

Murray, J.C. (2002). Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clinical Genetics*, 61(4), 248-256.

Murthya, J., Gurramkondab, V.B., and Lakkakula, B. (2015). Genetic variant in MTRR A66G, but not MTR A2756G, is associated with risk of non-syndromic cleft lip and palate in Indian population. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 27(6), 782-785.

Nair, A.J. (2010*). Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering.* Jones and Bartlett Publishers (First Edition), United States of America: Jones and Bartlett Publishers, 604-606.

Nataraj, A.J., Olivos-Glander, I., Kusukawa, N., and Highsmith WE, Jr. (1999). Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis.* 20(6), 1177-1185.

Nawshad, A., LaGamba, D., and Hay, E.D. (2004). Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Archives of Oral Biology*, 49(9), 675-689.

Nazki, F.H., Sameer, A.S., and Ganaie, B.A. (2014). Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, 533(1), 11-20.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), 2766-2770.

Özgentaş, E. (1999). Dudak *ve Damak yarıkları Embriyolojisi, Dudak ve Damak Yarıkları.* Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı Yayınları, 17-20.

Palmieri, A.., Avantaggiato, A., Marzia Arlotti, G.B., Scapoli, L., Martinelli, M., Furio Pezzetti, F., and Carin, F. (2008). Drugs and nonsyndromic orofacial cleft: an update. *Brazilian Journal Oral Sciences*, 7(24), 1470-1475.

Paranaíba, L.M., de Aquino, S.N., Bufalino, A., Martelli-Júnior, H., Graner, E., Brito, L.A., e Passos-Bueno, M.R., Coletta, R.D., and Swerts, M.S. (2013). Contribution of polymorphisms in genes associated with craniofacial development to the risk of nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*,18(3), e414-20.

Peng, H.H., Chang, N.C., Chen, K.T., Lu, J.J., Chang, P.Y., Chang, S.C., Wu-Chou, Y.H., Chou, Y.T., Phang, W., and Cheng, P.J. (2016). Nonsynonymous variants in MYH9 and ABCA4 are the most frequent risk loci associated with nonsyndromic orofacial cleft in Taiwanese population. *BMC Medical Genetics*, 17(1), 59.

Pezzetti, F., Martinelli, M., Scapoli, L., Carinci, F., Palmieri, A., Marchesini, J., Carinci, P., Caramelli, E., Rullo, R., Gombos, F., and Tognon, M. (2004). Maternal MTHFR Variant Forms Increase the Risk in Offspring of Isolated Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Human Mutation*, 24(1), 104-105.

Pradat, P., Rober-Gnansia, E., Di Tanna, G., Rosano, A., Lisi, A., Mastroiacovo, P., and contributors to MADRE database. (2003). First trimester exposure to corticosteroids and oral clefts. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 67(12), 968-970.

Rao, D.N., and Sistla, S. (2004). S-Adenosyl-L-methionine-dependent restriction enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39 (1), 1-19.

Rotzer, D., Roth, M., Lutz, M., Lindemann, D., Sebald, W., and Knaus, P. (2001). Type III TGF-beta receptor-independent signalling of TGF-beta2 via TbetaRII-B, an alternatively spliced TGF-beta type II receptor. *EMBO Journal*, 20(3), 480-490.

Sakisaka, T., Ikeda, W., Ogita, H., Fujita, N., and Takai, Y. (2007). The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(5), 593-602.

Santiago, A. (1969). Classification of cleft lip and palate for machine record coding. *The Cleft Palate Journal*, 6, 434-439.

Scapoli, L., Palmieri, A., Pezzetti, F., Carinci, F., Marchesini, J., Martinelli, M., Delaiti, G., Tognon, M., Carinci, P., and Gombos, F. (2004). Investigation of the W185X nonsense mutation of PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip and palate patients. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 127A(2), 211.

Scapoli L., Palmieri A., Martinelli M., Vaccari C., Marchesini J., Pezzetti F., Baciliero, U., Padula, E., Carinci, P., and Carinci, F. (2006). Study of the PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip patients with or without cleft palate. *Annals of Human Genetics*, 70(Pt3), 410–413.

Schutte, B.C., and Murray, J.C. (1999). The many faces and factors of orafacial clefts. *Human Molekuler Genetics*, 8(10), 1853-1859.

Semiç-Jusufagiç, A., Bircan, R., Çelebiler, Ö., Erdim, M., Akarsu, N., Elçioğlu, N.H. (2012).Association between C677T and A1298C MTHFR gene polymorphism and nonsyndromic orofacial clefts in the Turkish population: a case-parent study. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 54(6), 617-625.

Setó-Salvia, N., and Stanier, P. (2014). Genetics of cleft lip and/or cleft palate: association with other common anomalies. *European Journal of Medical Genetics*, 57(8), 381-393.

Sharma, R., Krishnan, S., Pal, U.S., and Verma, M. (2013). Median facial dysplasia: A rare craniofacial syndrome and the surgical management of associated cleft lip. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 4(1), 84-86.

Shah, S.N., Khalid, M., and Khan, M.S. (2012). A Review of Classification Systems For Cleft lip and Palate Patients II. Embryological Classifications. *Journal of Khyber College of Dentistry*, 2(2), 86-91.

Shu, S.Y., Zhang, M.J., Cheng, H.Q., Tang, S.J., Chen, W.L., Wu, S.R., Lin, Y., and Chen, Q.S. (2015). Mutation analysis of PVRL1 in patients with non-syndromic cleft of the lip and/or palate in Guangdong. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 3400-3408.

Sözen, M.A., Suzuki, K., Tolarova, M.M., Bustos, T., Fernández Iglesias, J.E., and Spritz, R.A. (2001). Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Nature Genetics*, 29(2), 141-142.

Stoll, C., Mengsteab, S., Stoll, D., Riediger, D., Gressner, A.M., and Weiskirchen, R. (2004). Analysis of polymorphic TGFB1 codons 10, 25, and 263 in a German patient group with non-syndromic cleft lip, alveolus, and palate compared with healthy adults. *BMC Medical Genetics*, 22, 5:15.

Stuppia, L., Capogreco, M., Marzo, G., La Rovere, D., Antonucci, I., Gatta, V., Palka, G., Mortellaro, C., and Tetè, S. (2011) Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. *Journal of Craniofacial Surgery*, 22(5), 1722-1726.

Suzuki, K., Hu, D., Bustos, T., Zlotogora, J., Richieri-Costa, A., Helms, J.A., and Spritz, R.A. (2000). Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nature Genetics*, 25(4), 427-430.

Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., and Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8), 603-615.

Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., and Takai, Y. (1999). Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domaincontaining protein. *Journal of Cell Biology*, 145(3), 539–549.

Tongkobpetch, S., Suphapeetiporn, K., Siriwan, P., and Shotelersuk, V. (2008). Study of the poliovirus receptor related-1 gene in Thai patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37(6), 550-553.

Tseng, Y.T., Hsiao, H.H., Hsiao, H.P., Tsai, W.C., and Chiu, H.H. (2006). A study of PVRL1 mutations for non-syndromic cleft lip and/or palate among Taiwanese patients. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 35(5), 453-455.

Tang MR, Wang YX, Han SY, Guo S, Wang D. (2014). SUMO1 genetic polymorphisms maycontribute to the risk of nonsyndromic cleft lip with or without palate: a meta-analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 18(9), 616-624.

Tunçbilek, G., Özgür, F., ve Balcı, S. (2004). 1229 yarık dudak ve damak hastasında görülen ek malformasyonlar ve sendromlar, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi,* 47(1), 172-176.

Turhani, D., Item, C.B., Watzinger, E., Sinko, K., Watzinger, F., Lauer, G., and Ewers, R. (2005). Mutation analysis of CLPTM 1 and PVRL 1 genes in patients with non-syndromic clefts of lip, alveolus and palate. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery,* 33(5), 301306.

Waltrick-Zambuzzi, M., Tannure, P.N., Vieira, T.C., Antunes, L.S., Romano, F.L., Zambuzzi, W.F., Granjeiro, J.M., and Küchler, E.C. (2015). Genetic Variants in Folate and Cobalamin Metabolism-Related Genes in Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate. *Brazilian Dental Journal,* 26(6), 561-565.

Wang, K.H., Heike, C.L., Clarkson, M.D., Mejino, J.L., Brinkley, J.F., Tse, R.W., Birgfeld, C.B., Fitzsimons, D.A., and Cox, T.C. (2014). Evaluation and integration of disparate classification systems for clefts of the lip. *Frontiers in Physiology,* 14(5), 163.

Weiner, A.S., Boyarskikh, U.A., Voronina, E.N., Mishukova, O.V., and Filipenko, M.L. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methionine synthase A2756G polymorphisms influence on leukocyte genomic DNA methylation level. *Gene,* 533(1), 168-172.

Windsor, R. (2002). Smoking, cessation and pregnancy. Geneva: World Health Organization, 147–162.

Wipff, P.J., and Hinz, B. (2008). Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *European Journal of Cell Biology;* 87(8-9), 601-615.

Wolthers, K.R., and Scrutton, N.S. (2007). Protein interactions in the human methionine synthase-methionine synthase reductase complex and implications for the mechanism of enzyme reactivation. *Biochemistry,* 46(23), 6696-6709.

van den Boogaard, M.J., Dorland, M., Beemer, F.A., and van Amstel, H.K. (2000). MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nature Genetics,* 24(4), 342-343.

Vaughn, J. D., Bailey, L. B., Shelnutt, K. P., Dunwoody, K. M., Maneval, D. R., Davis, S. R., Quinlivan, E. P., Gregory, J. F. 3rd, Theriaque, D. W., and Kauwell, G. P. (2004). Methionine synthase reductase 66A->G polymorphism is associated with increased plasma homocysteine concentration when combined with the homozygous methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T variant. *Journal of Nutrition,* 134(11), 2985-2990.

Vural, P. (2010). The Suppressing Role of Transforming Growth Factor- B in Cancer. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 8(1), 35-42.

Yamaji, T., Iwasaki, M., Sasazuki, S., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Tsugane, S. (2009). Methionine synthase A2756G polymorphism interacts with alcohol and folate intake to influence the risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18, 267-274.

Yap, A. (2015). *Cellular Adhesion in Development and Disease* (First edition). United States of America: Academic Press, 198-207.

Yazdy, M.M., Honein, M.A., and Xing, J. (2007). Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the U.S. grain supply. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 79(1), 16-23.

Yıldırım, A., Kandemir, N., Ates Sönmezoğlu, O., ve Gülec, T. (2011). Polymerase Chain Reaction in Wheat and Optimization of the Possible Problems. *Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, 26(1), 36-39.

Yi, P., Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I.P., Hine, R.J., and James, S.J. (2000). Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29318-2923.

Yoshida, K., Hayashi, R., Fujita, H., Kubota, M., Kondo, M., Shimomura, Y., and Niizeki, H. (2015). Novel homozygous mutation, c.400C>T (p.Arg134*), in the PVRL1 gene underlies cleft lip/palate-ectodermal dysplasia syndrome in an Asian patient. *The Journal of Dermatology*, 42(7), 715-719.

Zhu, H., Wicker, N.J., Shaw, G.M., Lammer, E.J., Hendricks, K., Suarez, L., Canfield, M., and Finnell, R.H. (2003). Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Molecular Genetics and Metabolism*, 78(3), 216-221.

EKLER

EK-1. Etik kurul kararı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ ARAŞTIRMA ETİK KURULU KARARLARI

Karar tarihi : **18.12.2007**
Karar sayısı: **124**

1- Prof. Dr. Erhan ÖZDİLER sorumluluğunda yürütülecek olan, **"Dudak Damak Yarıklı Hastalarda Mutasyon Tiplerinin Belirlenmesi ve Ailesel Geçişin İncelenmesi"** konulu araştırmanın, Araştırma Etik Kurulunca değerlendirilip olup, etik açıdan uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

Prof. Dr. Mutahhar ULUSOY
Başkan

Prof. Dr. Şaziye ARAS Prof. Dr. Ayşegül KÖKLÜ Prof. Dr. Tamer YILMAZ

Prof.Dr. Murat AKKAYA Prof. Dr. Sebahat GÖRGÜN Prof. Dr. Ümit AKAL AKTAŞ

Doç. Dr. Meltem DARTAR ÖZTAN Doç. Dr. Engin ERSÖZ

Doç. Dr. Serap ŞAHİNOĞLU

Katılmadı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler



Soyadı, adı : AŞLAR ÖNER, Deniz

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 26.04.1987, Ankara

Medeni hali : Evli

Telefon : 0 (312) 536 277 48 46

e-mail : denizaslar@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı	2009
Lisans	Ankara Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Keçiören Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-Halen	LÖSEV, Kanser Araştırma ve Genetik Laboratuvarı	Uzman Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Akin, D.F., Oner, D.A., Sipahi, K., Mumcuoglu, M., Kurekci, E., Ezer, U., and Akar, N. (2017). Screening of polymorphisms in the folate pathway in Turkish pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia patients. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 18(4), 349-353.

Aslar Oner, D., Akin, D.F., Sipahi, K., Mumcuoglu, M., Ezer, U., Kurekci, E., and Akar, N. (2016). Screening of Variations in CD22 Gene in Children with B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 20(9), 552-555.

Akin, D.F., Mumcuoglu, M., Oner, D.A., Ozturk, M., Ezer, U., Kurekci, E., and Akar N. (2016). Screening of FLT3 Gene Mutations (FLT3-ITD and D835) in Turkish Childhood Acute Leukemia Patients. *Molecular Medicine and Clinical Applications*, 1(1), 1-5.

Aslar Oner, D., and Tastan, H. (2016). Association of MSX1 c.*6C > T Variant with Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Turkish Patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 20(7), 402-405.

Oner, D.A., and Tastan, H. (2016). Association Between the Transforming Growth Factor Beta 1 Gene Polymorphisms and Turkish Patients with Nonsyndromic Cleft Lip With/Without Cleft Palate. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 20(5), 265-268.

Oner, D.A., and Tastan, H. (2016). Identification of Novel Variants in the PVRL1 Gene in Patients With Nonsyndromic Ceft Lip With or Without Cleft Palate. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*,20(5), 269-272.

Akin, D.F., Oner, D.A., Mumcuoglu, M., Ezer, U., Bahce, M., Kurekci, E., and Akar, N. (2016). Detection of TET2, KRAS and CBL variants by Next Generation Sequencing and analysis of their correlation with JAK2 and FLT3 in childhood AML. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 17(2), 209-215.

Aşlar, D., and Taştan, H. (2014). Prevalence of MTHFR, MTR and MTRR Gene Polymorphisms in Turkish Patients with Nonsyndromic Cleft Lip and Palate, *Gene Therapy & Molecular Biology*, 16, 115-129.

Aşlar, D., and Taştan, H. (2014). Novel insertion mutation in the PVRL1 gene in Turkish patients with non-syndromic cleft lip with/without cleft palate, *Archives of Oral Biology*, 59(3), 237-240.

Aşlar, D., Ozdiler, E., Altuğ, A.T., and Taştan, H. (2013). Determination of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene polymorphism in Turkish patients with nonsyndromic cleft lip and palate, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 77(7),1143-1146.

Uluslararası ve Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Oner, D. A., Akin, D. F., Sipahi, K., Mumcuoglu, M., Battaloglu, N. O., Taşdelen, S., Ezer, U., Emir, S., and Kurekci, E. (2017). Screening of Nudt15 Gene Variants in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Haematologica*, 102(2), 656.

Mumcuoglu, M., Oner, D.A., Akin, D., Sirin F., Ezer U., and Kurekci, E. (2016). Programmed Cell Death Protein-1 (PD-1) and its Ligands Expression Levels in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and their Implications for Glucocorticoid Resistance. *Pediatric Blood & Cancer*, 63(3), 114.

Aşlar Öner, D., Akın, D.F., Sipahi, K., Mumcuoğlu, M., Öner Battaloğlu, N., Taşdelen, S., Ezer, U., Emir, S., ve Kürekçi, E. (2016, 19-22 Ekim). *NUDT15 Gen Değişimlerinin Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda Taranması*. 42.Ulusal Hematoloji Kongresinde sunuldu, Antalya.

Akin, D. F., Oner, D. A., Sipahi, K., Mumcuoglu, M., Kurekci, E., Ezer U., and Akar, N. (2016, May 04-07). *Screening of EPCR Variants and Their Correlation with Factor V Leiden and Prothrombin 20210A Mutations in Turkish Pediatric Patients with Acute Leukemia.* Paper presented at the 24th Biennial International Congress on Thrombosis/EMLTD Congress, İstanbul.

Akin, D. F., Oner, D. A., Mumcuoglu, M., Kurekci, E., Ezer U., and Akar N. *The Association of The Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G Polymorphism and Factor V Leiden (FVL) Mutation in Pediatric Acute Leukemia Patients*. Paper presented at the 24th Biennial International Congress on Thrombosis/EMLTD Congress, İstanbul.

Mumcuoğlu, M., Akın Balı, D., Aşlar Öner, D., Ezer, Ü, ve Kürekçi, A.E. (2015, 21-24 Ekim). *SIRT1 İnhibitörü Sirtinol'ün Lösemik Hücrelerde Apoptoz Yapıcı Etkisinin ve Mekanizmasının Araştırılması*. 41. Ulusal Hematoloji Kongresinde sunuldu, Antalya.

Aslar, D., Akin, D.F., Mumcuoglu, M., Ezer U., Kurekci E., and Akar N. (2015). Screening for Variations in Exons 9, 10 and 12 oF CD22 Gene in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, *Haematologica*, 100(1), 633-634.

Akin, D. F., Aslar, D., Mumcuoglu, M., Ezer U., Bahce M., Kurekci E., and Akar N. (2015). Detection of TET2, KRAS, and CBL Variants By Next Generation Sequencing in Childhood Acute Myeloid Leukemia, *Haematologica*, 100(1), 650-650.

Akin, D., Aslar, D., Mumcuoglu, M., Ezer, U., Kurekci, E., and Akar, N. (2014). Comparative Analysis of HDAC 2, 4, 5, 7, 8, and 9 m-RNA Expression Levels in Pediatric Acute Leukemia Patients in Before and After Chemotherapy Compare To Healthy Controls, *Pediatric Blood & Cancer*, 61(2), 254-255.

Aşlar, D., Akın, D., Mumcuoğlu, M., Ezer, Ü., Kürekçi, E., ve Akar, N. (2014, 22-25 Ekim). *CD22 Geni 9, 10 ve 12. Ekson Gen Değişimlerinin Çocukluk Çağı Pre B-ALL Hastalarda Taranması*. 40.Ulusal Hematoloji Kongresinde sunuldu, Antalya.

Akın, D., Aşlar, D., Mumcuoğlu, M., Ezer, Ü., Kürekçi, E., ve Akar, N. (2014, 22-25 Ekim). *Yeni Nesil Sekanslama Tekniği ile TET2, KRAS ve CBL Gen Değişimlerinin Saptanması ve JAK2 V617F/FLT3-ITD Mutasyonları ile Pediatrik AML'li Hastalarda Birlikteliğinin Değerlendirilmesi*. 40.Ulusal Hematoloji Kongresinde sunuldu, Antalya.

Akın, D., Aşlar, D., Mumcuoğlu, M., Öztürk, M., Ezer, Ü., Akar, N., ve Kürekçi, E. (2014, 22-25 Ekim). *Yüksek Doz Metotreksat Alan Akut Lenfoblastik Lösemili Çocuklarda, AANAT Gen Polimorfizmi ve Gen İfadelenme Düzeyine Etkisinin Araştırılması*. 40.Ulusal Hematoloji Kongresinde sunuldu, Antalya.

Aşlar, D., Taştan, H, ve Özdiler, E. (2014, 23-27 Haziran). *Sendromsuz Dudak ve Damak Yarıklı Türk Hastalarda Poliovirüs Reseptör İlişkili Protein 1 Geninde Yeni Polimorfizm Tespiti.* 22. Ulusal Biyoloji Kongresinde sunuldu, Eskişehir.

Aşlar, D., Taştan, H., ve Özdiler, E. (2014, 23-27 Haziran). *Metilentetrahidrofolat Redüktaz Polimorfizmi Sendromsuz Yarık Dudak ve Damak Oluşumunu Etkiler Mi? 22. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 22. Ulusal Biyoloji Kongresinde sunuldu, Eskişehir.

Aşlar, D., Akın, D., Mumcuoğlu, M., Ezer, Ü., Kürekçi, E., ve Akar, N. (2014, 23-27 Haziran). *Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemili Hastalarda RFC G80A Polimorfizminin Sıklığı ve MTHFR Polimorfizmleri ile İlişkilendirilmesi*. 22. Ulusal Biyoloji Kongresinde sunuldu, Eskişehir.

Akın, D., Aşlar, D., Mumcuoğlu, M., Ezer, Ü., Kürekçi, E., ve Akar, N. (2014, 2-4 Nisan). *Çocukluk Çağı AML'li Hastalarda C/EBPA, TET2, KRAS ve CBL Gen Değişimlerinin Yeni Nesil Sekanslama Tekniği ile Belirlenmesi.* Ulusal Kanser Haftası Sempozyumunda sunuldu, Ankara.

Akın, D., Aşlar, D., Mumcuoğlu, M., Ezer, Ü., Bahçe, M., Kürekçi, E., Akar, N. (2014, 2-4 Nisan). *C/EBPA Gen Değişimlerinin Çocukluk Çağı Akut Miyeloid Lösemili Hastalarda Yeni Nesil Sekanslama Yöntemi ile Taranması ve Diğer Prognostik Belirteçler ile Karşılaştırılması,* Ulusal Kanser Haftası Sempozyumunda sunuldu, Ankara.

Aşlar, D., Taştan, H., Özdiler, E., Altuğ, A. (2012, 15-18 Kasım). *Sendromsuz Dudak Damak Yarıklı Türk Hastalarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi*. 2.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresinde sunuldu, Antalya.

Aşlar, D., Taştan, H., Özdiler, E., Altuğ, A. (2012, 3-7 Eylül). *Sendromsuz Dudak Damak Yarıklı Türk Hastalarda Transforming Growth Factor Beta1 Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi*. 21. Ulusal Biyoloji Kongresinde sunuldu, İzmir.

Taştan, H., Aşlar, D., Özdiler, E., Altuğ, A. (2012, 24-26 Eylül). *Determination of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Polymorphism in Turkish Patients with Nonsyndromic Cleft Lip and Palate*. Kırgızistan Birinci Uluslararası Biyoloji Kongresinde sunuldu, Kırgızistan.

Ödüller

1. Genç Araştırmacı Ödülü "40.Ulusal Hematoloji Kongresi", 22-25 Ekim 2014, Antalya.

2. TÜBİTAK yayın teşvik ödülleri, 2014



GAZİ GELECEKTİR...