



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SECKEL SENDROMUNUN GENETİK
ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gülden YORGANCIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2014



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SECKEL SENDROMUNUN GENETİK
ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gülten YORGANCIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ersan KALAY

TRABZON-2014

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Gülden YORGANCIOĞLU’nun hazırladığı “SECKEL SENDROMUNUN GENETİK ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ersan KALAY

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ersan KALAY

Prof. Dr. Yakup ASLAN

Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER

Tarih: .../.../2014

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

../../2014

Gülden YORGANCIOĞLU

İthaf

*Yüksek lisans tezimi, hayat ne getirirse getirsin asla vazgeçmeyen insanlara ve değerli
aileme ithaf ediyorum*

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübesini paylaşmayı esirgemeyen, beni yorulmaksızın dinleyerek yardımcı olan ve takıldığım her noktada farklı bir bakış açısı ile beni en doğruya yönlendirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ersan KALAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın genom boyu homozigotluk analizi aşamalarında katkılarını esirgemeyen ve tanıştığım için kendimi şanslı saydığım değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU'ya, çalışmanın klinik değerlendirmelerini yapan ve örnek sağlayan sayın Doç. Dr. Cavidan Nur SEMERCİ'ye, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini, fikirlerini, yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji anabilim dalımız değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e, Prof.Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e ve Öğr. Gör. Dr. Bayram TORAMAN'a teşekkür ederim.

Araştırma süreci ve tez yazım aşamasındaki katkılarının yanında sosyal hayatıma da renk katan değerli arkadaşlarım, Arş. Gör. Pelin KÜÇÜK, Arş. Gör. Ceren SÜMER, Arş. Gör. Adem YILDIRIM, Arş. Gör. Orhan SEZGİN, Arş. Gör. Burcu YÜCEL, Banu ÖZTÜRK, Figen SEYMEN, Abide CANSIZ, Sibel MOLLAMEHMETOĞLU, Kimyager Fatmagül YENİSEY'e, Biyolog Tülay KÖSEAHMET'e, diğer bölüm arkadaşlarıma ve yardımını esirgemeyen diğer anabilim dallarındaki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Manevi desteğini hep arkamda hissettiğim değerli arkadaşlarım Melda SARIMAN'a, Gülay BÜLBÜL'e, Şeyda DEMİR'e, Leyla ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Bu dünyanın en huzurlu yerini bilim için sürekli terk etmek zorunda kalsam da her döndüğümde beni sonsuz sevgileri ile kucaklayan annem ve babam Yasemin –Ender YORGANCIOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Bu araştırmayı 10121 no'lu proje ile destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri birimine ve YÖK-Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Genetik Hastalıklar	5
4.2. Microcephalic Primordial Dwarfism (MPD)	6
4.2.1. Seckel sendromu	6
4.2.2. Seckel Sendromu İle İlişkilendirilen Genler	7
4.2.2.1. Ataxia-Telangectasia and RAD3 related (ATR)	7
4.2.2.2. C-term Interacting Protein (CtIP)	8
4.2.2.3. Sentromerik Protein J (CENPJ)	9
4.2.2.4. Sentrozomal Protein 152 (CEP152)	10
4.2.2.5. Sentrozomal Protein 63 (CEP63)	11
4.2.2.6. Ninein (NIN)	11
4.3. Polo Benzeri Kinazlar	13
4.3.1. PLK1	15
4.3.2. PLK2	16
4.3.3. PLK3	17
4.3.4. PLK4	17
4.3.4.1 PLK4 ve Sentirol Duplikasyonu	19
4.3.5. PLK5	20

5. GEREÇ VE YÖNTEM	21
5.1. Gereç	21
5.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Aile Bireylerinin Belirlenmesi	21
5.1.2. Kimyasallar	23
5.1.3. Kitler	23
5.1.4. Cihazlar	24
5.1.5. Sarf Malzemeleri	25
5.1.6. Solüsyonlar	25
5.1.6.1. DNA İzolasyon Solüsyonları	25
5.1.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları	28
5.1.6.3. Yükleme Tamponları	28
5.2. Yöntem	29
5.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	29
5.2.2. Genomik DNA Konsantrasyonlarının ve Çalışma Stoklarının Ayarlanması	31
5.2.3. Bağlantı Bölgesinin Belirlenmesi	31
5.2.3.1. Genom Boyu Homozigotluk Taraması	31
5.2.3.2. Homozigot Bölgelerin Bütün Aile Bireylerinde STRP Markırları İle Test Edilmesi ve Haplotip Analizi	31
5.2.4. Bağlantı Bölgesindeki Aday Genlerin Belirlenmesi	36
5.2.5. Mutasyon Analizi	36
5.2.5.1. <i>PLK4</i> Geninin PCR ile Amplifikasyonu	36
5.2.5.2. Döngüsel Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)	39
5.2.6. <i>PLK4</i> Geninde c.31-3A>G değişiminin ARMS Yöntemiyle Taranması	41
5.2.7. RNA İzolasyonu ve Revers Transkriptase PCR (RT-PCR)	43
5.2.8. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile Kırılma Varyantlarının Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	44
6. BULGULAR	46
6.1. Klinik Değerlendirme	46
6.2. Aile Ağacı Analizi	49
6.3. Karyotip Analizi ve Kardeş Kromatid Değişimi'nin (SCE) İncelenmesi	50
6.4. Genom Taraması ve Bağlantı Bölgesinin Belirlenmesi	51
6.4.1. Genom Boyu Homozigotluk Taraması	51
6.4.2. Bağlantı Bölgelerinin STRP Markırları ile Test Edilmesi ve Haplotip Analizi	52

6.5. Bağlantı Bölgesinde Bulunan Aday Genlerin Tespit Edilmesi	56
6.6. <i>PLK4</i> Geninde Mutasyon Taraması	57
6.7. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) ve Quantitative-Real Time PCR (qRT-PCR) ile <i>PLK4</i> Kırılma Varyantlarının Analizi	59
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	62
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
9. KAYNAKLAR	68
10. ETİK KURUL ONAYI	79
11. ÖZGEÇMİŞ	81



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Seckel sendromundan sorumlu genler	13
Tablo 2.	4. ve 17. kromozomlar üzerinde belirlenen kritik bölgeler için haplotip analizinde kullanılan STRP markırları, dizileri ve kromozomlar üzerindeki fiziksel yerleşimleri	33
Tablo 3.	<i>PLK4</i> geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler. Primer dizileri ve PCR ürünü uzunlukları	38
Tablo 4.	Döngüsel dizileme reaksiyonunda kullanılan primerler	39
Tablo 5.	ARMS reaksiyonunda kullanılan primerler	41
Tablo 6.	RT-PCR ve qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler	44
Tablo 7.	Ailede etkilenmiş bireylerin klinik bulguları	48
Tablo 8.	DB-2471 no'lu hasta bireye ait lenfosit hücre kültüründe spontan ve MMC ile uyarılmış SCE sıklığı	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Polo benzeri kinazların farklı taksonlardaki üyeleri	13
Şekil 2.	PLK ailesi üyelerinin yapısal ve fonksiyonel özellikleri	14
Şekil 3.	PLK1'in hücre içinde rol aldığı mekanizmalar	15
Şekil 4.	İnsan PLK1 ve PLK4 proteinlerinin domain yapıları	18
Şekil 5.	Sentrozomun yapısı	19
Şekil 6.	Çalışmaya dahil edilen SS_CNS_25 ailesine ait aile ağacı	22
Şekil 7.	Homozigot bölgelerin STRP markırları ile test edilmesi	32
Şekil 8.	Klinik değerlendirme	47
Şekil 9.	DB-2471 no'lu hastada radyolojik bulgular.	47
Şekil 10.	DB-2471 no'lu hastaya ait anöploidik bir karyotip	50
Şekil 11.	250K SNP array verilerinin VIGENOS ile analizi	52
Şekil 12.	4q28.1-28.3 kromozom bölgesinin STRP markırları ile haplotip analizi	54
Şekil 13.	17q25.3-ter kromozom bölgesinin STRP markırları ile haplotip analizi	55
Şekil 14.	SS_CNS_25 ailesinde kritik bölge içinde bulunan genler.	56
Şekil 15.	PLK4 geninin PCR ile çoğaltılması	57
Şekil 16.	PLK4 geninde meydana gelen c.31-3A>G değişimine ait kromatogram	58
Şekil 17.	c31-3A>G değişiminin SS_CNS_25 ailesinde dağılımının ARMS yöntemi ile gösterilmesi	58
Şekil 18.	PLK4 cDNA'sının RT-PCR ile çoğaltılması sonucunda görülen değişiklikler	59
Şekil 19.	c.31-3A>G değişiminin sonucunda hastada görülen varyantlar	60
Şekil 20.	PLK4_1 qRT-PCR analizi	61

KISALTMALAR SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ARMS	Mutasyona Dayanıklı Amplifikasyon Sistemi
ATR	Ataxia-Telangectasia and RAD3 related
ATRIP	ATR İlişkili Protein
CDK	Sikline Bağımlı Kinaz
CENPJ	Sentromerik Protein J
CEP152	Sentromerik Protein 152
CEP63	Sentromerik Protein 63
CPB	Kriptik Polo Box
CtIP	C-term İlişkili Protein
Del	Delesyon
DNA	Deoksiribo Nükelik Asit
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
İGP	İnsan Genom Projesi
MGS	Meier-Gorlin Sendromu
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
MMC	Mitomisin C
MOPD	Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism
MPD	Microcephalic Primordial Dwarfism
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
mRNA	mesajcı Ribonükleik asit
PBD	Polo box Domain
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3K	Phosphoinositid 3-kinaz
PI3KK	Phosphoinositid 3-kinaz ilişkili kinaz
PLK	Polo benzeri kinaz
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
RBBP-8	Retinoblastoma Bağlayıcı Protein 8
RNAi	RNA İnterferans
RPA	Replikasyon protein A
RT-PCR	Ters transkriptaz PCR
SCE	Kardeş Kromatid Değişimi

SCKL	Seckel lokusu
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
STR	Kısa Ardışık Tekrarlar
STRP	Kısa Ardışık Tekrar Polimorfizmi
TURC	Tubulin Halka Kompleksi
VIGENOS	Visual Genom Stüdyo



1. ÖZET

Seckel Sendromunun Genetik Etiyolojisinin Araştırılması

Seckel sendromu (OMIM 210600); otozomal resesif geçiş gösteren prenatal ve postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, kısa boy ve zekâ geriliği ile karakterize nadir görülen bir hastalıktır. Seckel sendromu, hem genetik hem de klinik olarak heterojenite göstermektedir. Bugüne kadar Seckel sendromunun etiyolojisinde rol oynayan yedi gen tanımlanmış olup, tanımlanmayı bekleyen başka genlerin olduğu öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında, Seckel sendromu tanısı alan iki hasta bireyin bulunduğu ve akraba evliliğinin görüldüğü bir ailede genetik etiyolojinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada ilk olarak, iki etkilenmiş birey ve etkilenmiş bireylerden birinin ebeveynleri olmak üzere toplam 4 bireye genom boyu homozigotluk taraması yapıldı. Elde edilen tek nükleotid polimorfizm (SNP) verilerine göre 4. kromozom üzerinde q28.1 lokusunda 6.5 Mb'lık bir bölgenin ve 17. kromozom üzerinde 17q25.3 lokusunda 0.6 Mb'lık bir bölgenin her iki hastada da homozigot kalıtıldığı gözlemlendi. Homozigotluk gösteren her iki bölge, bütün aile bireyleri dahil edilerek Kısa Ardışık Tekrar Polimorfizmi (STRP) markırları ile test edildi ve 4. kromozom üzerindeki bölgenin hastalıkla birlikte kalıtıldığı doğrulanırken 17. kromozom üzerinde görülen bölgenin hastalıkla kalıtılmadığı gözlemlendi. Ailede hastalılıkla birlikte kalıtılan 4. kromozom üzerindeki kritik bölge içerisinde yer alan genler değerlendirildi ve sentriol duplikasyonunda kritik rol oynayan Polo Benzeri Kinaz 4 proteinini kodlayan *PLK4* geni aday gen olarak seçildi. Yapılan mutasyon taraması sonucunda, *PLK4* geninin ikinci intronunda kırılma alıcı bölgesinde mRNA kırılmasını bozarak protein sentezinin erken sonlanmasına neden olan homozigot hipomorfik bir mutasyon (c.31-3A>G/p.Asp11Profs14Stop) tespit edildi. Genomik kararsızlığa neden olan bu mutasyon, ailede hastalılıkla birlikte kalıtılırken sağlıklı kontrol grubunda görülmedi.

Sonuç olarak, bu çalışma ile sentriol duplikasyonunda ve genomik kararlılığın korunmasında kritik rol oynayan *PLK4* geni üzerindeki hipomorfik bir mutasyonunun Seckel sendromuna neden olduğu ilk kez gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Genetik haritalama, Seckel sendromu, *PLK4*

2. SUMMARY

Investigation of the Genetic Etiology of the Seckel Syndrome

Seckel syndrome (OMIM 210600) is a rare autosomal recessively inherited disease which is characterized by prenatal and postnatal growth retardation, microcephaly, short stature and mental retardation. Seckel syndrome shows both genetic and clinical heterogeneity. To date, seven genes were identified to being involved in the etiology of Seckel syndrome and it is proposed that there could be another genes waiting for identification.

In this study, we aimed to evaluate the genetic etiology of a family of consanguineous marriage including two affected individuals diagnosed as Seckel syndrome. Firstly, Genome-wide homozygosity mapping was performed on four samples (two affected individuals and parents of one individual). Single nucleotide polymorphism (SNP) data revealed the segregation of two homozygous interval on chromosome 4q28.1-28.3 (6.59 Mb) and on chromosome 17q25.3 (0.6 Mb) in two affected individuals. Critical regions were tested on all family members with short tandem repeats polymorphisms (STRP) markers and co-segregation of the 6.59 Mb interval with disease was confirmed, whereas 0.6 Mb interval did not show co-segregation with disease. *PLK4* gene (encoding Polo Like Kinase protein) which is found in the critical region of chromosome 4, and plays critical role in centriol duplication, was selected as a candidate gene. According to the mutation screening results; a homozygous hypomorphic mutation (c.31-3A>G /p.Asp11Profs14Stop), which led to the early truncation of protein synthesis due to the disruption of mRNA splicing acceptor site, was detected. This mutation caused the genomic instability and inherited with disease in the family and was not detected in healthy control group.

In conclusion, we showed for the first time that p.Asp11Profs14Stop mutation in *PLK4* causes Seckel syndrome.

Key words: Genetic mapping, Seckel syndrome, *PLK4*,

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Nükleik asitlerin dizilenmesinin keşfi insan genomunun ve insan genomundan kodlanan RNA molekülerinin dizilenmesini mümkün hale getirmiştir. İnsan genomunu dizileme amacıyla başlatılan İnsan Genom Projesi (İGP) ile insan genomu %99.9 oranında dizilenirken, aynı zamanda genom tarafından kodlanan RNA molekülleri de dizilenmiş ve insan genomunda 25-26.000 gen olduğunu göstermiştir. İnsan genom projesi sonucunda, genom dizisi ve kodlayan genlerle birlikte insan genomunda kişiden kişiye farklılıklar gösteren ve fenotip üzerinde olumlu ya da olumsuz etki göstermediği düşünülen çok sayıda tek nükleotitik değişiklikler (SNP'ler) ve ardışık kısa tekrar dizilerinin (STR'ler) varlığı da gösterilmiştir. İlk aşamada STR bölgeleri ve sonrasında SNP'ler, Mendelian kalıtım gösteren hastalıklardan sorumlu genetik bozuklukların etkilediği genlerin yerleşik olduğu lokusların haritalanması sürecinde çığır açıcı katkılar sağlamışlardır. Genetik haritalama çalışmaları olarak adlandırılan bu çalışmalar kapsamında bugüne kadar yaklaşık 5439 gen hastalıklarla ilişkilendirilerek 3674 hastalığın etiyolojisi aydınlatılmıştır. Genlerin hastalıklarla ilişkilendirilmesi ayrıca birçok moleküler mekanizmanın aydınlatılması sürecine de katkı sağlamıştır (1-3).

Seckel sendromu (OMIM: 210600), düşük doğum ağırlığı, mikrosefali, mental retardasyon, boy kısalığı, atipik yüz görünümü (arkaya eğimli alın, gaga şeklinde belirgin bir burun, küçük çene) ile karakterize otozomal resesif geçişli nadir bir hastalıktır (4-6). Klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalık olan Seckel sendromu sıklıkla doğumu takip eden dönemde ölüme neden olmaktadır. Bu durum, geniş ailelere ulaşma ve buna bağlı olarak genetik etiyolojinin aydınlatılması sürecini zorlaştırmaktadır. Gelişen teknoloji ile birlikte SNP'lerin genetik haritalama çalışmalarında kullanılmaya başlanması akraba evliliğinin sık görüldüğü toplumlarda geniş aileler üzerinden genetik etiyolojinin aydınlatılmasını mümkün hale getirmiştir. Seckel sendromu ile ilgili olarak yürütülen genetik haritalama çalışmaları sonucunda bugüne kadar hastalıkla ilişkili yedi lokus tanımlanmış olup bu lokuslardan altısında ilişkili genler tanımlanarak sorumlu mutasyonlar gösterilmiştir (7-12). Seckel sendromu ile ilişkilendirilen genlerin fonksiyonlarını tanımlamaya yönelik olarak yürütülen çalışmalarda ise bu hastalığın etiyolojisinde rol oynayan genler tarafından kodlanan

proteinlerin genomik kararlılığın sürdürülmesinde, hücrenin hayat döngüsünün kontrolünde ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir (13).

Bu çalışma ile Seckel sendromu tanısı konulan ancak bilinen Seckel sendromu lokuslarına bağlantı göstermeyen bir ailede, Seckel sendromunun etiyolojisinde rol alan yeni bir genin genetik haritalama metodu kullanılarak tanımlanması hedeflenmiştir. Bunun yanında; DNA hasarına cevap, hücrenin hayat döngüsünün kontrolü ve hücre bölünmesinin düzenlenmesi gibi moleküler mekanizmaların aydınlatılması sürecine katkı sağlayacak verilerin ortaya konulması amaçlanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Genetik Hastalıklar

Hastalıkların önemli bir kısmının etiolojisinde genetik bozukluklar veya genetik bozukluklarla bir araya gelen çevresel faktörler rol oynamaktadır. Genetik bozukluklar sonucu ortaya çıkan hastalıklar, genetik materyalin etkilenme şekline bağlı olarak kromozomal hastalıklar, multifaktöriyel hastalıklar ve tek gen hastalıkları olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (14).

Kromozomal hastalıklar, genellikle spontan olarak ortaya çıkmakta ve nadiren kalıtsallık göstermektedir. Kromozomların etkilenme şekline bağlı olarak kromozomal anomaliler, sayısal ve yapısal kromozom anomalileri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu anomalilerin genom üzerinde etkiledikleri bölgenin büyüklüklerine bağlı olarak fenotipe yansımaları da değişkenlik göstermektedir (15)

Multifaktöriyel hastalıklar, genetik bozukluklar ile çevresel faktörlerin etkileşimi, birden fazla genetik bozukluğun birlikteliği veya birden fazla genetik bozukluk ile çevresel etkilerin bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu grup hastalıklarda düzenli bir kalıtım görülmezken, hasta bir bireyin bulunduğu bir ailede ikinci bir bireyin hasta olma riski genel popülasyona göre artış göstermektedir (16).

Tek gen hastalıkları ise sıklıkla mendeliyen kalıtım kalıbı ile uyumluluk gösteren hastalıklar olup, bu tip hastalıklarda görülen fenotipin ortaya çıkması için tek bir genin bozulması yeterlidir. Birçok hastalıkta birden fazla gen, birbirinden bağımsız olarak aynı fenotipe neden olabilmektedir. Bu durum genetik heterojenite olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte bir genin farklı mutasyonları da farklı fenotiplere neden olabilmekte ve bu durum fenotipik heterojenite olarak adlandırılmaktadır (17).

Genetik hastalıkların çok az bir kısmı tedavi edilebilmektedir ve uygulanan tedavi yöntemleri bu hastalıkların bir sonraki kuşakta ortaya çıkmasının önüne geçmemektedir. Günümüz koşullarında genetik hastalıklarla mücadele sürecinde en önemli hedeflerden biri, hastalığın bir sonraki kuşağa aktarılmasının önüne geçmektir. Bunun başarılabilmesi için de öncelikle hastalıkların genlerle ilişkilendirilmesi ve ardından her bir bireyde hastalığa neden olan mutasyonun belirlenerek bu genlerin rol aldığı moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Bireylerdeki mutasyonların

belirlenmesinin ardından *preimplantasyon genetik tanı* veya *prenatal tanı* yöntemleri kullanılarak ailelerin sağlıklı çocuk sahibi olmalarının yolu açılmaya çalışılmaktadır (16, 18).

Bu yöndeki en kapsamlı çalışma insan genomunu aydınlatmaya yönelik olan İnsan Genom Projesidir (İGP) İGP 1990 yılında başlatılmış ve 15 yılda tamamlanması planlanmıştır. Teknolojik gelişmelere bağlı olarak beklenenden daha erken bir sürede tamamlanan projenin sonuçları 2003 yılında dünyaya duyurulmuştur. İGP, insan genomunun 3.2 milyar baz çiftinden oluştuğunu ve yaklaşık 26.000 gen içerdiğini göstermiştir. Genom üzerindeki genlerin biliniyor olması gerek genetik hastalıkların tanısının konulmasında, gerekse hastalıkların bir sonraki kuşağa aktarılmasının önlenmesinde tek başına hiçbir fayda sağlamamaktadır. Bugüne kadar 3674 gen hastalıkla ilişkilendirilmiş olmasına rağmen 3657 hastalık ile ilişkili gen ya da lokus halen keşfedilmeyi beklemektedir. Sağlıklı nesillerin oluşturulması yönünde İGP'den azami faydanın sağlanabilmesi için insan genomunda tanımlanan genlerin hastalıklarla ilişkilendirilmesi ve hastalardaki mutasyonların belirlenmesi gerekmektedir (3, 19).

4.2. Microcephalic Primordial Dwarfism (MPD)

Microcephalic Primordial Dwarfism (MPD), otozomal resesif kalıtım gösteren ve *in utero* dönemde başlayan ve doğum sonrasında da devam eden gelişme geriliğinin ağır bir formudur (13). MPD'de görülen büyüme fenotipi belirgin mikrosefali ve kısa boy ile karakterize olup bu fenotipi paylaşan çeşitli hastalıklar rapor edilmiştir. Otozomal resesif kalıtım gösteren bu hastalıklar, Meier-Gorlin Sendromu (OMIM:224690) (20, 21), Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism (MOPD) II (OMIM:210720) (22, 23), ve Seckel sendromu (OMIM:210600) olarak gruplandırılmaktadır (24).

4.2.1. Seckel sendromu

Seckel sendromu (OMIM:210600) ; orantılı boy kısalığı, şiddetli mikrosefali, mental retardasyon ve arkaya eğimli alın, gaga şeklinde çıkıntılı bir burun, küçük çene ile karakterize otozomal resesif kalıtım gösteren nadir bir hastalıktır (6) . Seckel sendromu hem klinik hem de genetik olarak heterojenite göstermektedir (25). Bugüne kadar Seckel sendromu ile ilişkilendirilen 7 farklı lokus (SCKL1-7) rapor edilmiştir. Bu SCKL3 haricindeki altı lokusta hastalıktan sorumlu mutasyon sırasıyla *ATR*, *RBBP-*

8(*CtIP*), *CENPJ*, *CEP152*, *CEP63* ve *NIN* genleri üzerinde gösterilmiştir. Bu genlerin kodladığı proteinler genomik kararlılığın sürdürülmesi ve sentriol duplikasyonu gibi mekanizmalarda rol oynamaktadır (7, 8, 11, 12, 26-29).

4.2.2. Seckel Sendromu İle İlişkilendirilen Genler

4.2.2.1. Ataxia-Telangectasia and RAD3 related (ATR)

Seckel sendromunun genetik etiyolojisini aydınlatmaya yönelik genetik haritalama çalışmalarından elde edilen ilk sonuçlar başlangıçta akraba oldukları bilinmeyen Pakistanlı iki aile üzerinden elde edilmiştir. Bu çalışmada ailedeki fenotipin 3. kromozom üzerinde q22.1-q24 lokusu (*SCKL1*) ile birlikte kalıtıldığı gösterilmiştir (26). *SCKL1* lokusunun tanımlandığı aileler üzerinde yürütülen ileri çalışmalarda ailedeki fenotipten sorumlu homozigot hipomorfik (minimal düzeyde fonksiyonel transkriptin oluşturulması durumu) bir mutasyon *ATR* (*Ataxia-Telangectasia and RAD3 related*) geni üzerinde gösterilmiştir (12). Takip eden süre içinde Seckel sendromlu farklı bir hastada compound heterozigot *ATR* mutasyonu tanımlanmıştır. Bu hastada allellerden birinde 540 kb'lik bir delesyon gözlenirken, ikinci allelde kırılma mekanizmasını bozarak *ATR* ekspresyonunu şiddetli bir şekilde azaltan ve bir amino asidin bir başka amino aside dönüşmesi şeklinde oluşan bir missense mutasyon gösterildi (30). Son olarak 2013 yılında Seckel sendromlu iki İngiliz ailede *ATR* ekspresyonunu dramatik bir şekilde azaltan bir mutasyon gösterilmiştir (31). Sonuç olarak bugüne kadar *ATR* geni üzerinde Seckel sendromu ile ilişkili toplam 4 farklı mutasyon tanımlanmıştır ve bu mutasyonların tamamında *ATR* ekspresyonu tamamen ortadan kalkmadan şiddetli şekilde azalmış olduğu gösterilmiştir.

ATR geni (OMIM:601215), 2644 aminoasitten oluşan 301 kDa moleküler ağırlığındaki *ATR* proteinini kodlamaktadır. (32). *ATR* proteini, DNA hasarına yanıtta ve DNA tamirinde görev alan Phosphoinositid 3-kinase (PI3K) ilişkili protein kinaz (PI3KK) ailesinin bir üyesidir. *ATR* proteini, DNA'da oluşan çapraz bağlanma, baz eklenmesi, tek zincir kırıkları, replike olan hücrelerin canlılığının sürdürülmesi ve apoptoz gibi mekanizmalarda aktive olmaktadır (33). *ATR*, tek zincir kırıklarının varlığında, Replikasyon Protein A (RPA) ve Seckel sendromu ile ilişkilendirilmiş olan *ATR* Interacting Protein (*ATRIP*) ile etkileşerek kırık bölgesinde lokalize olur (34). *ATR* proteininin *ATRIP*'e bağlı olarak aktive olması ile *ATR* substratlarını fosforiller

ve mevcut DNA hasarı sinyalinin nukleusun tamamına yayılması sağlanır (35-38). Böylece replikasyon çatalında DNA sentezi yavaşlatılarak hücrenin mitotik girişini engellenir (39, 40). Bunların dışında, ATR ekspresyonundaki azalma DNA hasarına cevapta rol alan H2AX, Chk1, NBS1 ve p53 gibi ATR substratı olan proteinlerin fosforilasyonunun bozulduğu gösterilmiştir (12).

Atr knock-out (*Atr*^{-/-}) fareler, embriyonik gelişimin 7.5'inci gününde (E.7.5) ölürken, heterozigot mutant (*Atr*^{+/-}) farelerde sağkalım azalmakta ve tümör insidansı artmaktadır (41). Diğer taraftan minimal düzeyde fonksiyonel transkript oluşturabilen hipomorfik *Atr* mutasyonu taşıyan farelerin ise hayatta kalmayı başardığı gösterilmiştir(42).

Ayrıca, *ATRIP* (OMIM 606605) geninde, heterozigot c.2278 C>T mutasyonu tespit edilmiş ve bu mutasyonun ATR bağlanma etkinliğini bozduğu ve Seckel sendromu'na neden olduğu rapor edilmiştir. Fakat, *ATRIP* mutasyonu görülen hastaların klinik bulgularının MGS ve MOPDII ile benzerlik göstermesinden dolayı, Seckel sendromu ile ilişkilendirilen lokuslara henüz dahil edilmemiştir (31).

4.2.2.2. C-term Interacting Protein (CtIP, Retinoblastoma Binding Protein-8; RBBP-8)

Seckel sendromu ile ilişkili olarak tanımlanan ikinci lokus (SCKL2) Seckel sendromlu bireylerin bulunduğu ve akrabalık görülen Irak asıllı bir ailede 18. kromozom üzerinde p11.31-q11.2 bölgesinde gösterilmiştir (27). Aynı aile üzerinde yürütülen mutasyon tarama çalışmaları ile ailedeki fenotipten sorumlu mutasyon *CtIP* (*RBBP-8*) geni üzerinde gösterilirken bu sonuç ikinci bir Seckel sendromlu ailede gösterilen farklı bir mutasyonla doğrulanmıştır. SCKL2 ailesinde gösterilen ve *CtIP* geninin 15. intronunu etkileyen g.2347+53T>G nokta mutasyonu sonucunda erken sonlanma kodonu oluşarak, normalden daha kısa mutant bir protein ortaya çıkmıştır. Protein sentezinin erken sonlanması sonucunda CtIP proteininin karboksil terminal kısmında yer alan Mre11-Rad50-NBS1 (MRN) kompleks bağlanma domaini sentezlenememiştir. Ayrıca *CtIP* geni üzerinde farklı bölgeleri tutan mutasyonlar Seckel sendromuna bezemekle birlikte, farklı fenotipik bulgular barındıran Jawad sendromuna (OMIM:251255) da neden olduğu gösterilmiştir (9).

SCKL2 lokusunda tanımlanan *CtIP* geni (OMIM:604124), 897 amino asitten oluşan yaklaşık 101 kDa ağırlığında CtIP (RBBP-8) proteinini kodlamaktadır (43). CtIP hücre döngüsünün G1 evresinde Rb proteini ile etkileşerek, hücre proliferasyonunda görev alan genlerin eksprese edilmesini sağlar ve hücrenin DNA Sentezini (S fazı) başlatmasına yardımcı olur. Bunun yanında, hücrede DNA hasarına bağlı olarak oluşan çift zincir kırıklarının onarılması için BRCA1 ve MRN kompleksi ile etkileşir. Böylece ATR proteini aktive olur ve homolog rekombinasyon mekanizması ile kırık tamir edilerek genomik stabilitenin korunması sağlanır (44). CtIP geninde meydana gelen fonksiyon kaybından dolayı hasta hücrelerinde DNA hasarına karşı aşırı duyarılık gelişmekte ve bu durum apoptozu tetiklemektedir (9).

4.2.2.3. Sentromerik Protein J (CENPJ; Centrosomal P4.1-Associated Protein-CPAP)

Seckel sendromu ile ilişkili olarak tanımlanan dördüncü lokus (SCKL4), Seckel sendromlu bireylerin bulunduğu ve akraba evliliğinin görüldüğü Suudi Arabistan asıllı bir ailede 13. kromozomun q12 bölgesinde gösterilmiştir. *CENPJ* geninin 11. intronunda kırılma alıcı bölgesinde meydana gelen g.3303-1G>C mutasyonu'nun Seckel sendromuna yol açtığı rapor edilmiştir (11). İlave 3 ailede daha yapılan mutasyon taramasında, *CENPJ* geni üzerinde farklı mutasyonlar tanımlanmıştır. İlave ailelerden ilki Pakistan kökenli olup, *CENPJ* geninin ikinci ekzonunda meydana gelen tek bazlık bir delesyon (c.17delC) sonucu nonsense bir mutasyon tespit edilmiştir. Brezilya kökenli ikinci ailede de ekzon 16'da tek bazlık bir değişim sonucunda (c.3704A>T) missense bir mutasyon gösterilmiştir (45). Pakistan kökenli üçüncü ailede de ekzon 11 üzerinde dört bazlık bir delesyon (c.3243_3246delTCAG) sonucunda nonsense bir mutasyon gösterilmiştir. Bu üç ailede gösterilen mutasyonlar primer mikrosefali ile ilişkilendirilmiştir (46).

CENPJ geni (OMIM:609279), 1338 amino asitten oluşan yaklaşık 153 kDa ağırlığında CENPJ proteinini kodlamaktadır. CENPJ proteini evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuş olup sentromerde lokalizedir ve sentriol biyogenezinde gama tubulin halka kompleksi (γ -TURC) ile etkileşmektedir (47). *CENPJ* sentriol biyogenezinde iş

ipliği oluşumunda, sentrozomal bütünlüğün korunmasında ve kromozomların yavru hücrelere dengeli dağılımında kritik öneme sahiptir (48).

İnsanda görülen hipomorfik mutasyonu homozigot taşıyan *Cenpj* transgenik farelerde (*Cenpj*^{tm/tm}); doğum öncesi ve sonrası büyüme geriliği, iskelet anomalileri, nöropatolojik değişiklikler gibi Seckel sendromunun klinik bulguları tanımlanmıştır. Yine aynı farelerde; tek ve çok kutuplu iğ iplikleri, tetraploidi gibi genomik düzensizlikler, artmış DNA hasarı ve apoptoz gibi moleküler seviyede değişiklikler bildirilmiştir (49).

4.2.2.4. Sentrozomal Protein 152 (CEP152)

Seckel sendromu ile ilişkilendirilen beşinci lokus (SCKL5), akraba evliliğinin görüldüğü Türk asıllı 5 aile üzerinde yapılan genom boyu homozigotluk taraması sonucunda etkilenmiş bireylerde 15. kromozomun q21.1-21.2 bölgesinde bulunmuştur. *CEP152* geninin 4. intronunda görülen (c.261+1G>C) kırılma verici bölgede meydana gelen tek bazlık bir değişimin alternatif kırılmayı bozarak üç farklı varyantın (*CEP152_T1*, *CEP152_T2* ve *CEP152_T3*) ortaya çıkmasına neden olmuştur. *CEP152_T1* varyantında 6 bazlık bir delesyon (p.Val86_Asn87del) gösterilmiştir. *CEP152_T2* varyantında ise c.261+1G>C değişiminin protein sentezinin erken sonlanmasına yol açan nonsense bir mutasyonun (p.Pro65AlafsX81) oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. *CEP152_T3* varyantında meydana gelen bir diğer nonsense mutasyonun da (p.Ala65X) protein sentezinin erken sonlanmasına yol açtığı gösterilmiştir. İlave olarak, Türk asıllı bir başka Seckel sendromlu bireyde yapılan ekzom dizileme çalışması ile (c.261+1G>C) mutasyonu doğrulanmıştır. İtalyan asıllı bir başka etkilenmiş bireyde ise compound heterozigot kalıtılan iki farklı mutasyon (c.2034T>G ve c.2694+1G) tespit edilmiştir. Güney afrika kökenli bir başka etkilenmiş bireyde ise babadan kalıtılan iki bazlık delesyon (c.4210-4211delGT) ve anneden kalıtılan bir mutasyon (c.2000A>G) compound heterozigot olarak görülmüştür. İntronik dizilerde meydana gelen değişimler, kırılma verici bölgesini tamamen bozmakta ve proteinin fonksiyon kaybına neden olmaktadır. *CEP152*-Seckel hasta fibroblastlarının değişik sayıda ve büyüklükte nukleus ve sentrozom içerdikleri, kromozomların yanlış sıralandığı, tek ve çok kutuplu iğ iplikleri, erken ayrılan kardeş kromatidler ve metafaz

karyotipinde anöploidi görülmüştür (29). Bir başka çalışmada ise, Doğu Kanada popülasyonunda *CEP152* mutasyonları primer mikrosefali ile ilişkilendirilmiştir (10).

CEP152 geni (OMIM:613529), 1654 amino asitten oluşan yaklaşık 152 kDa ağırlığında sentrozomal *CEP152* proteinini kodlamaktadır (50, 51). *CEP152* proteini, sentriol duplikasyonu sırasında *PLK4* ve *CPAP* proteinlerinin sentrozoma lokalize olmaları için iskelet görevi görür (52).

4.2.2.5. Sentrozomal Protein 63 (CEP63)

Seckel sendromu ile ilişkilendirilen altıncı lokus (SCKL6), akraba evliliğinin görüldüğü ve etkilenmiş üç bireyin bulunduğu Pakistan kökenli bir ailede 3. kromozomun q22 bölgesinde gösterilmiştir. *CEP63* geninin 4. ekzonunda meydana gelen tek bazlık bir değişimin (c.129G>A) alternatif kırılmayı bozarak nonsense bir mutasyona yol açtığı gösterilmiştir. *CEP63*^{-/-} hasta fibroblast hücrelerinde, *CEP63* proteininin zayıf miktarda sentezlendiği gösterilmiş ve oluşan mutasyonun hipomorfik bir mutasyon olduğu bildirilmiştir. Farelerde *Cep63* geninin yokluğunda (*CEP63*^{KO}), sentrozom etrafındaki halka yapının oluşumunun bozulduğu ve iğ ipliği oluşumunda defektlerin meydana geldiği bildirilmiştir (8).

CEP63 geni (OMIM:614724), 703 amino asitten oluşan 63.4 kDa ağırlığındaki *CEP63* proteinini kodlamaktadır. *CEP63* proteini, amino ucundan *CEP152* proteini ile etkileşir ve sentrozoma lokalizasyonunu sağlar. *CEP63*, *CEP152* ve *CEP57* proteinleri sentriol çevresinde halka şeklinde bir kompleks oluşturarak, bölünen hücrelerde sentriol sayısının sabit tutulmasını ve böylelikle sentriol duplikasyonunun uygun şekilde gerçekleşmesini kontrol eder (8, 53). Bunun yanında, *CEP63* proteini *CDK1* proteinini bağlayarak sentrozoma lokalize olmasını sağlar ve hücrenin mitoz girişini düzenlemektedir (54).

4.2.2.6. Ninein (NIN)

Seckel sendromu ile ilişkilendirilen yedinci lokus (SCKL7), akraba evliliğinin rapor edilmediği etkilenmiş iki bireyin bulunduğu Hindistan kökenli bir ailede, genom boyu homozigotluk haritalaması ile, 14. kromozomun q22.1 bölgesinde gösterilmiştir. Etkilenmiş bireylerde, *NIN* geni üzerinde ekzon 18'de p.Q1222R ve ekzon 23'de

p.N1709S missense mutasyonları ekzom dizileme yöntemi ile compound heterozigot olarak gösterilmiştir (7).

NIN geni (OMIM:608684), 2041 amino asitten oluşan 238 kD ağırlığındaki NIN proteinini kodlar. Sentrozom duplikasyonu sırasında CEP110 proteini ile etkileşir. NIN proteininin yokluğunda sentrozomun tubular yapılanması değişir ve sentrozomun mikrotubul organizasyon merkezi (MTOC) ile etkileşimi bozulur (55). NIN proteini, sentrozom hedef sinyali içeren coiled coil II domaini aracılığı ile gama tubulin ve centrin (CENT1) proteini ile sentrozomda etkileştiği ve mikrotubul eksi uçlarında kapak görevi gördüğü gösterilmiştir (56).



Tablo 1. Seckel sendromundan sorumlu genler

LOKUS	GEN	GENİN FONKSİYONU	Mutasyon
SCKL1	ATR	DNA hasarı, hücre döngüsünün regülasyonu, DNA replikasyonunun stabilizasyonu	Hipomorfik
SCKL2	RBBP-8	DNA çift zincir kırıklarının onarılması, hücre döngüsünün kontrolü	Hipomorfik
SCKL3	Bilinmiyor	-	-
SCKL4	CENPJ	Sentriol biyogenezi	Hipomorfik
SCKL5	CEP152	Sentriol biyogenezi, genomik stabilite	Hipomorfik
SCKL6	CEP63	Sentrozom dupliasyonu, CEP152'nin sentromere lokalizasyonu	Hipomorfik
SCKL7	NIN	Mitotik iğ ipliği organizasyonu. nöron gelişimi	Compound heterozigot

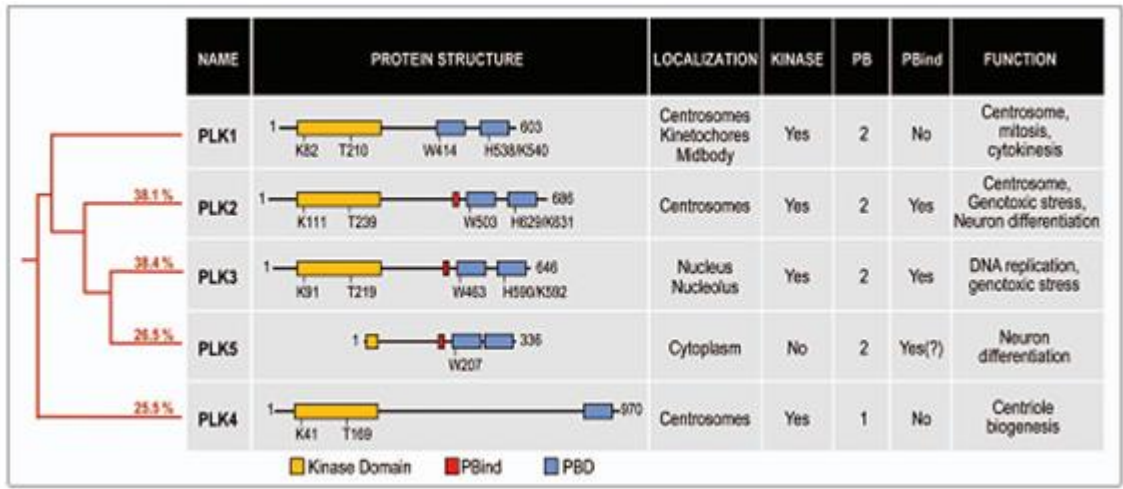
4.3. Polo Benzeri Kinazlar

Polo benzeri kinaz (PLK)'lar, tüm ökaryotlarda (bitkiler ve apicompleksanlar hariç) hücre bölünmesinin regülasyonunda çeşitli görevlere sahip kinaz aktivitesi olan proteinlerdir (57). Bu proteinler evrimsel süreçte iyi korunmuşlar ve farklı taksonlardaki üyeleri alt gruplara ayrılmıştır (Şekil 1).

		YEAST		PLANTS	INVERTEBRATES		VERTEBRATES			
										
		<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	<i>S. purpuratus</i>	<i>D. rerio</i>	<i>Xenopus</i>	<i>H. sapiens</i>
Subfamilies	PLK1	plk1	Cdc5	-	plk-1 plk-2 plk-3	polo	PLK1	plk1	Plx1	PLK1
	PLK2	-	-	-	-	-	PLK2	plk2b plk3	Plx2 Plx3 Plx5	PLK2 PLK3 PLK5
	SAK	-	-	-	zyg-1	sak	SAK	plk4	Plx4	PLK4

Şekil 1. Polo benzeri kinazların farklı taksonlardaki üyeleri. Mayalar (*S.pombe* ve *S.cerevisiae*) yalnızca bir adet polo benzeri kinaz'a sahiptir. Omurgasızlarda (*C.elegans* ve *Drosophila* sp.) PLK2 bulunmamaktadır. PLK5 ise omurgalılarından Amfibilerde ve İnsanda bulunmaktadır.(de Carcer'dan, 59)

Tüm polo benzeri kinazlar, amino uçlarında (N-terminal) serine/threonin kinaz aktivitesine sahip korunmuş bir katalitik domaini ile karboksil uçlarında (C-terminal) tekrarlayan yaklaşık 100 aminoasitlik polo box domainlerine (PBD) sahiptirler. PLK4 haricindeki PLK ailesi üyelerinde iki PBD bulunurken, PLK4 yalnızca bir PBD içermektedir. Kinaz ve PBD bölümleri birbirlerine linker adı verilen bağlayıcı bölge ile bağlanırlar (Şekil 2). PBD bölgesi, fosforilasyona uğrayan peptidlerin bağlanma modülü olarak görev yapmaktadır (58).

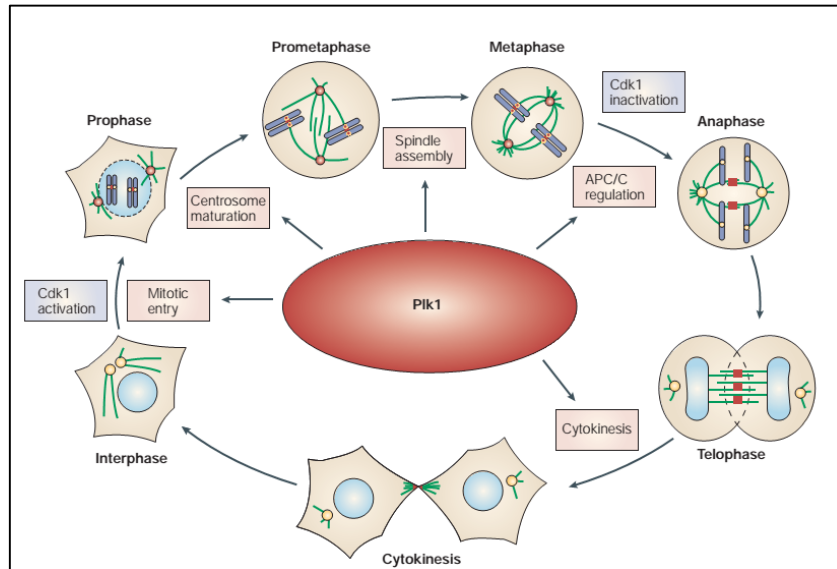


Şekil 2. PLK ailesi üyelerinin yapısal ve fonksiyonel özellikleri. Solda gösterilen kırmızı ağaç, insan PLK proteinlerinin filogenisini göstermektedir. PBD (mavi); Polo box domain, PBind, Fosfopeptid bağlama motifi (kırmızı), Kinaz domaini (sarı) (de Carcer'dan, 59)

4.3.1. PLK1

PLK1 geni 16. kromozomun p12.2 bölgesinde lokalize olup, 603 amino asitlik 70 kDa ağırlığındaki PLK1 proteinini kodlamaktadır. PLK1, PLK ailesinin üzerinde en çok çalışılan üyesi olup hücre döngüsünün ana düzenleyicileri arasında yer almaktadır. Hücre döngüsünün interfaz safhasında PLK1 proteini sitoplazma ve sentrozoma lokalize olurken, hücre bölünmesi esnasında kinetokorda ve sitokinez köprüsünde yoğunlaşmaktadır (Şekil 3). PLK1 proteini hücre bölünmesi sırasında sentrozom maturasyonu, iğ ipliklerinin doğru şekilde dizilimi, kardeş kromatidlerin doğru şekilde ayrılması ve sitokinez gibi evrelerde görev almaktadır (59).

PLK1 ekspresyonunun RNA interferans (RNAi) mekanizması ile baskılanmasının, çift kutuplu iğ ipliklerinin oluşumunda ve kinetokorların mikrotübüllere doğru bir biçimde tutunmasında hatalara yol açtığı gösterilmiştir (60). Ayrıca *Plk1*^{-/-} farelerin, iğ ipliklerinin düzgün oluşamamasına bağlı olarak yoğun bir biçimde mitotik tutulmaya maruz kaldıkları ve embriyonun 8 hücreli morula evresinden ileri gidemeyerek öldükleri bildirilmiştir. *Plk1*^{+/-} farelerin %27.5'inin tümör geliştirdiği ve bu tümörlerin sıklıkla akciğer ve karaciğerde oluştuğu rapor edilmiştir (61).



Şekil 3. PLK1'in hücre içinde rol aldığı mekanizmalar. PLK1, hücrede mitoza giriş, sentrozom olgunlaşması, iğ ipliklerinin oluşumu ve sitokinez gibi temel olaylarda aktif rol oynamaktadır (Barr'dan, 60)

4.3.2. PLK2

Plk2 geni ilk olarak, serumsuz bırakılan NIH 3T3 fare fibroblast hücre hattında mitojenik uyarıya karşı erken yanıt oluşturan gen olarak tanımlanmıştır (62). *Plk2*'nin protein stabilitesi analiz edildiğinde, bu proteinin yarılanma ömrünün hücre döngüsünün G1 evresi süresince kısa olduğu ve katalitik aktivitesinin bu evre boyunca devam ettiği bildirilmiştir. *Plk2*^{-/-} farelerin ilginç olarak hayatta kaldıkları ancak embriyonik fibroblastlarda proliferasyonun yavaşladığı ve hücrenin S fazına geçmede gecikme olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, PLK2'nin embriyonun canlılığı ve doğum sonrası gelişme için esansiyel olmadığı ileri sürülmüştür (63).

Apoptoz ve kemorezistans mekanizmalarının düzenleyici proteinlerini belirlemek için yapılan bir çalışmada, *Plk2*'nin siRNA ile susturulmasının apoptozun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (64). Yapılan mikrodizin analizlerinde transkripsiyonu p53 tarafından kontrol edilen PLK2'nin eksikliğinde DNA hasarı oluşturan ajanlara karşı hücrenin hassasiyeti atmaktadır (65).

İnsan *PLK2* geni, 5. kromozomun q11.2 bölgesinde lokalize olup, 671 amino asitten oluşan 78 kDa'lık PLK2 proteinini kodlamaktadır. PLK2 transkripleri ilk olarak, fetal akciğer, böbrek, dalak ve kalp dokularında en fazla miktarda tespit edilmişlerdir (66). PLK2 proteininin hücre içinde sentrozomda lokalize olduğu gösterilmiştir (67). İnsan servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde, PLK2'nin hücre döngüsünün G1, Sentez (S) ve G2 evrelerinde görüldüğü ve en fazla ekspresyonun S evresinde yapıldığı bildirilmiştir (68). Primer insan tiroid hücrelerinin 24 saat boyunca X-ray ışınlarına maruz bırakılmaları sonucunda PLK2'nin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı ve PLK2'nin, DNA hasarına bağlı oluşan hücre içi strese cevap verici gen olduğu ifade edilmiştir (69). Ayrıca, PLK2'in merkezi sinir sisteminde yüksek seviyede eksprese edildiği; sinaptik homeostazis ve nöron farklılaşmasında rol oynadıkları bildirilmiştir (58).

4.3.3. PLK3

Plk3 geni fare NIH 3T3 fibroblast hücre hattında Fibroblast büyüme faktörü-1 (Egf1) tarafından indüklenen ve diğer Plk ailesi üyeleri ile homoloji gösteren erken yanıt geni olarak tanımlanmıştır (70). PLK3 protein seviyesinin, hücre döngüsünün tüm evrelerinde tespit edildiği ortaya sürülmesine rağmen, bazı çalışmalar PLK3 ekspresyonunun yalnızca mitoz sırasında en üst seviyelere çıktığını bazıları ise yalnızca G1 evresinde PLK3'ün yüksek seviyede eksprese edildiğini göstermiştir (71, 72). PLK3 ile ilgili bu tartışmalı sonuçların, endojen PLK3'ün zayıf çözünürlüğünden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Endojen PLK3'ün ektopik olarak eksprese edilmesi sonucunda proteinin interfazda sentrozomlara, mitoz sırasında iğ ipliklerinin kutuplarına ve sitokinez sırasında orta cisimciğe (midbody) lokalize olduğu gösterilmiştir (73, 74). Ayrıca PLK3'ün, mitoz esnasında golgiden kopan membranların fragmentasyonunda görev aldığı bildirilmiştir (75) .

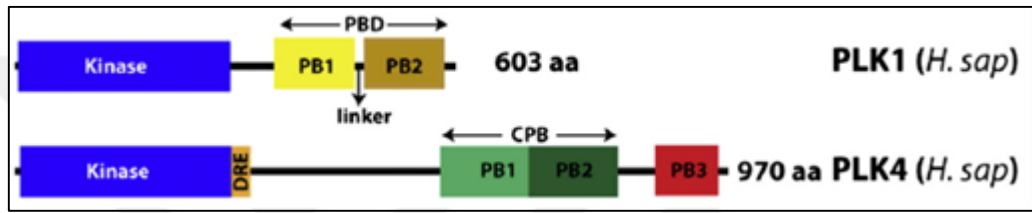
Bir başka çalışmada ise PLK3'ün yalnızca nükleolusta bulunduğu, bunun haricinde hücrenin başka hiçbir yerinde bulunmadığı gösterilmiştir. Yapılan fonksiyon çalışmalarında, *Plk3*'ün hücre döngüsünün S fazına girişinde düzenleyici rol oynadığı rapor edilmiştir (71). *Plk3*^{-/-} farelerin vücut ağırlıklarında artış tespit edilmiş ve bu farelerin ilerleyen yaşlarda tümör geliştirdiği bildirilmiştir (76). Nihayetinde, mevcut literatüre dayanarak PLK3 ile ilgili bilgiler tartışmaya açık olup proteinin tam fonksiyonu bilinmemektedir.

4.3.4. PLK4

Plk4 geni, ilk olarak farelerde cDNA kütüphanesi taramaları sonucunda *Drosophila* Polo kinaz proteini ile homoloji gösteren kinaz olarak tanımlanmıştır (77). Fare *Plk4* geninin insandaki homoloğu olan *PLK4* geni ise kanser gelişiminde rol oynayan kinazların taranması esnasında bulunmuştur (78). *Plk4* geni farede 3. kromozomda insanda ise 4. kromozomda bulunmaktadır. İnsan *PLK4* geninin yer aldığı 4q28 bölgesinin sıklıkla kromozomal yeniden düzenlemelere uğradığı ve bu bölgenin bazı kanserlerde kaybedildiği bildirilmiştir (79).

Diğer Plk ailesi üyelerinde olduğu gibi *Plk4* proteininin, diğer Plk ailesi üyeleri ile benzer şekilde 265 aminoasitlik N-terminal katalitik domaininde ATP bağlama bölgesi

(Gly-X-Gly-X-Phe-Ala) bulunmaktadır. C-terminal bölgesinde ise ailenin diğer üyelerinde birinci polo box domainine karşılık gelen kriptik polo box domaini ve korunmuş 64 adet aminoasitten oluşan bir adet polo box domaini yer almaktadır. Polo box domaini Plk4'ün homodimerizasyonunda görev almaktadır (80). Diğer Plk üyelerinden farklı olarak, PLK4 üzerinde korunmuş uzun bir merkezi bölge (linker) bulunmaktadır (Şekil 4). Bu bölgenin fonksiyonu henüz bilinmemektedir. Bunun yanında, PLK4 üzerinde protein stabilitesini yöneten 3 adet PEST domaini bulunmaktadır. Bu domainler prolin (P), aspartat (D), glutamat (E), serin (S) ve threonin (T) amino asitlerince zengindir (81).



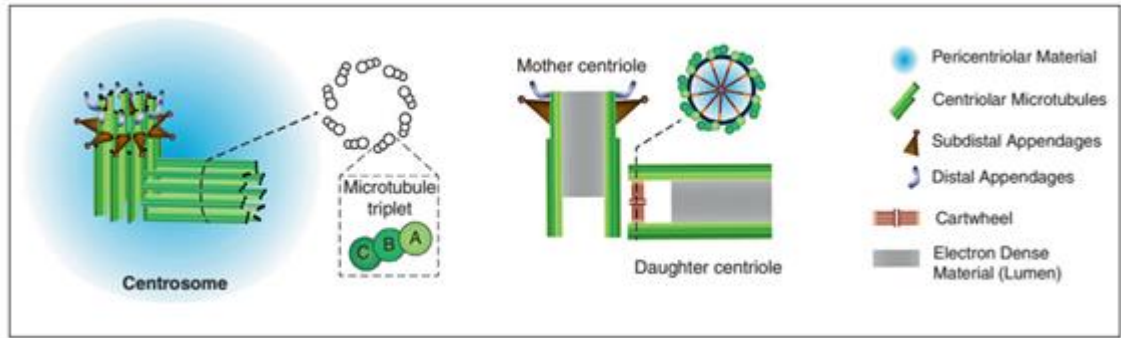
Şekil 4. İnsan PLK1 ve PLK4 proteinlerinin domain yapıları. 603 aminoasitten oluşan PLK1 proteini iki adet, 970 aminoasitten oluşan PLK4 proteini bir adet polo box domaini içermektedir. Her iki proteinde kinaz domaini ortak olarak bulunmaktadır. PBD, Polo box domain; CPB, Kriptik polo box domaini (Jana'dan, 82)

İnsan *PLK4* geni 16 ekzondan oluşmakta ve alternatif mRNA kırılması ile 3 adet transkripsiyonel varyantı meydana gelmektedir. *PLK4_1* varyantının kodlayan 16 ekzonu bulunmakta ve 970 aminoasitlik en uzun proteini kodlamaktadır. Ekzon 3'ü içermeyen *PLK4_2* varyantı 15 ekzon içermekte ve 938 amino asitlik daha kısa bir formu kodlamaktadır. *PLK4_3* varyantı ise 16 ekzondan oluşmakta ancak ilk ekzonu protein kodlamamaktadır. *PLK4_3* varyantı 929 aminoasitlik en kısa varyantı kodlamaktadır (UCSC Human Genome Browser'dan).

Yapılan fonksiyonel çalışmalar, Plk4'ün gastrulasyon sonrasındaki embriyonik gelişimde önemli rol oynadığını ve mitotik ilerleme için gerekli olduğunu bildirmektedir. *Plk4*^{-/-} fare embriyolarının 7.5'inci günde (E.7.5) hücre döngüsünde tutuklandıkları ve apoptotik hücrelerin sayısında artış olduğu gözlenmiştir. *Plk4*^{+/-} fare embriyolarının ise normal gelişimlerini tamamlamış fakat bu farelerde ilerleyen zamanda akciğer ve karaciğer kanseri gelişimi rapor edilmiştir (82).

4.3.4.1 PLK4 ve Sentriol Duplikasyonu

Sentrozom, silindir şeklinde mikrotübül yapılı iki adet sentriolden oluşmaktadır. Sentriollerin etrafı, protein içerikli perisentriolar materyal (PCM) ile çevrilidir. Her bir sentrozom olgun (ana) ve olgunlaşmamış (yavru) sentriolden oluşmaktadır. Sentrioller 9 kat simetrik iskelet şeklinde yapılanırlar. Çember şeklindeki içyapı (cartwheel) ise yalnızca olgunlaşmamış sentriolde bulunmaktadır. Olgun sentriol, distal ve subdistal uzantılara sahiptir. Distal uzantılar plazma membranına tutunmayı sağlar. Sentrioller, sentrozom, sil ve kamçı oluşumunda rol oynayan mikrotübül içeren yapılardır. Sentrozom, mitoz sırasında iğ ipliklerinin organizasyonunu düzenleyen mikrotübül organizasyon merkezi (MTOC) görevi gören organeldir (Şekil.5) (83).



Şekil 5. Sentrozomun yapısı. (Brito'dan, 84)

Sentriol biyogenezi, birçok proteinin rol oynadığı hiyerarşik mekanizmalar sonucunda meydana gelmektedir. Sentrozomlar, her bir hücre döngüsünde bir kez duplikasyon geçirirler. PLK4 ile CEP152 proteinlerinin etkileşerek sentriole lokalizasyonu, duplikasyon mekanizmasının ana basamaklarından biridir. Sentriol duplikasyonunun kusursuz işlemesi için PLK4'ün hücre içindeki yoğunluğu kontrol altında tutulmaktadır (52, 84). Somatik hücrelerde PLK4'ün aşırı eksprese edilmesi, çok sayıda sentriolün oluşumuna neden olmaktadır. PLK4'ün RNAi ile baskılanması sonucunda ise sentriol duplikasyonu engellenmekte ve meydana gelen mitotik bozukluklar sonucunda apoptoz indüklenmektedir (83).

4.3.5. PLK5

PLK5 geninin ilk olarak bir yalancı gen tarafından kodlandığı ve DNA hasarına karşı yanıtta rol aldığı bildirilmiştir. İnsan *PLK5* geninin 6. ekzonunda meydana gelen stop kodonundan dolayı fare *Plk5* genine göre daha kısa bir formu kodladığı gösterilmiştir (85).

Plk5 proteini farelerde spesifik olarak göz, beyin ve ovaryum dokularında eksprese olmaktadır. Sıçan primer hipokampus neuroblast hücrelerinde Plk5 ekspresyonunun RNAi ile baskılanması sonucunda akson büyümesi ve neurit oluşumunda azalma görülmüştür. İnsan PLK5 proteininin de nöron ve glia hücrelerinin sitoplazmasında var olduğu tespit edilmiştir. PLK5'in insan beyin tümörlerinde belirgin şekilde regülasyonunun azaldığı rapor edilmiştir. İnsan Glioblastoma multiforme (GBM) tümör hücrelerinde PLK5'in yeniden eksprese edilmesi, bu hücreleri apoptoza yönlendirdiği gösterilmiştir (86).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

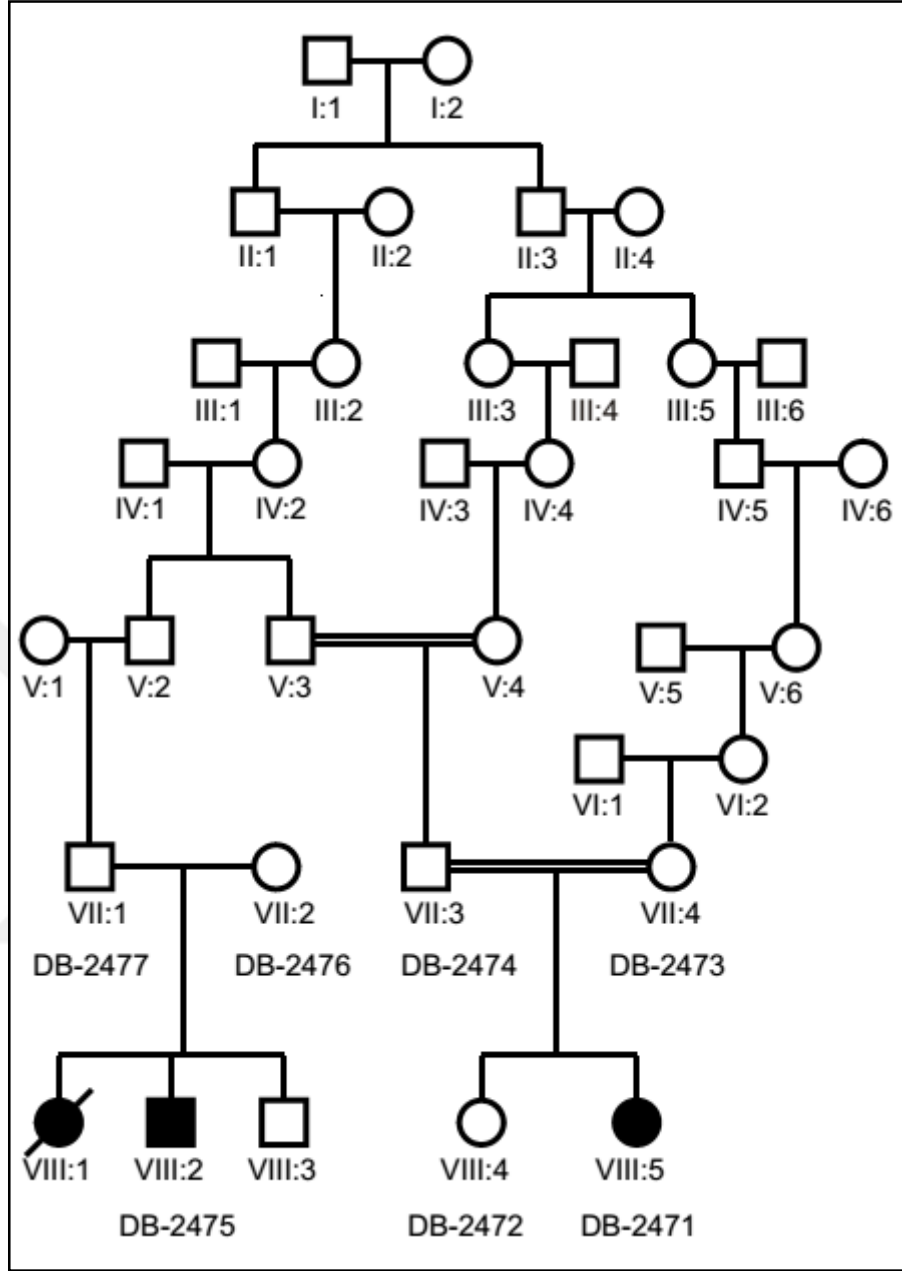
5.1. Gereç

5.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Aile Bireylerinin Belirlenmesi

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı arasında yapılan işbirliği ile gerçekleştirildi.

Çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde gelişme geriliği, atipik yüz görünümü gibi şikayetlerle başvuran iki birey ve bu bireyin ailesi değerlendirildi. Ailede hastalığın kalıtım kalıbını belirlemek üzere aile ağacı oluşturuldu. Ailede genetik etiyolojiyi aydınlatma sürecine katkı sağlama potansiyeline sahip olan bireyler belirlendi ve bu bireylerden 6-8 ml periferik kan örneği alınarak Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda DNA izolasyonu yapıldı.

Çalışmaya dahil edilen bütün bireylere çalışma ve olası sonuçları hakkında bilgi verilerek, her bireyden çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarını belgeleyen Gönüllü Onam Formu alındı. Çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Dosya No: 2013/73).



Şekil 6. Çalışmaya dahil edilen SS_CNS_25 ailesine ait aile ağacı. İçi boş kare: Sağlıklı erkek; İçi boş daire: Sağlıklı kadın; İçi dolu kare: Etkilenmiş erkek; İçi dolu daire, Etkilenmiş kadın. İçi dolu üstü çizili daire: Etkilenmiş ancak hayatta olmayan kadın. Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerin DNA örnek numaraları DB-XXXX şeklinde ilgili bireylerin altında gösterilmiştir.

5.1.2. Kimyasallar

Potasyum hidrojen karbonat (KHCO_3)	AppliChem, A2375.1000
Tris-Baz ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	AppliChem, A2264.1000
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
EDTA disodyum dihidrat ($\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	AppliChem, A2937.0500
Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	Merck, 1.01547.0.100
Kalsiyum klorür (CaCl_2)	Merck, 910TA654681
Proteinaz K	Promega, V3021
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Glasiyel asetik asit ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Merck, 1.00056.2500
SeaKem® LE Agaroz	Lonza, 50004L
Etidyum bromide ($\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$)	Sigma, E-7637
Orange G	Sigma, O-1625
Etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Mey, Türkiye
Deoksinukleotid triphosphates (dNTPs)	Promega, U1420
GoTaq® Flexi DNA polimeraz	Promega, M8305
Oligonucleotid primer	IDT
100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
Sephdex®G-50	Sigma, S5897-25G
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, 4311320

5.1.3. Kitler

NucleoSpin® Extract II	Macharey-Nagel, 740 609 250
ABI PRISM®BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, 4336917
3130 POP-7™ Polymer	Applied Biosystems, 4352759
GeneScan™ DS-33 Installation Standard 6-FAM™, VIC™, NED™ ve PET™	Applied Biosystems, 4330397
GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard	Applied Biosystems, 4322682
EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix	Life Technologies, 11784-01K
SuperScript® III First System for RT-PCR	Life Technologies, 18080-051

5.1.4. Cihazlar

Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Doğru akım güç kaynağı (3000 volt)	CONSORT E833, Belçika
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj (1 adet)	Eppendorf 5804, Almanya
Yüksek devirli santrifüj (2 adet)	Eppendorf 5810, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo IEC, ABD
Vorteks	Nüve NM110, Türkiye
UV translüminatör	Vilbert Lourmat, Fransa
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 2000, KODAK, ABD
Otomatik pipet seti	Rainin, ABD
Hassas terazi	AHAUS, ABD
pH metre	Hanna, Portekiz
Spektrofotometre	Eppendorf, Almanya
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Buz makinesi	Scotmann, İngiltere
Mikrodalga fırın	Arçelik MD 554, Türkiye
Distile su cihazı	GFL 2004, Almanya
Derin dondurucu (-20)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-86)	Thermo, ABD
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Etüv	Memmert, Almanya
Termocycler	GeneAmp 9700, ABI, ABD
Termocycler	Techne Genius, İngiltere
Genetik analiz cihazı	3130 Genetic Analyzer, ABI
Termomikser (ısıtıcı blok)	Eppendorf, Almanya
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Light Cycler® 480 II	Roche, ABD
Nanodrop® 2000 UV-Vis Spektrofotometre	Thermo, ABD

5.1.5. Sarf Malzemeleri

Çeşitli boyutlarda pipet uçları	Axygene, ABD
Mikrosantrifüj tüpler	Axygene, ABD
K3EDTA'lı tüpler (mor kapaklı)	Vacutainer
Falkon Tüpler (50 ml)	Greiner Bio-One, Almanya

5.1.6. Solüsyonlar

5.1.6.1. DNA İzolasyon Solüsyonları

1. Eritrosit Lizis Tamponu (ELB) (10X) (pH 7.4)

155 mM	NH ₄ Cl
10 mM	KHCO ₃
0.5 M	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

82.9 g	NH ₄ Cl
10 g	KHCO ₃

20 ml 0,5M Na₂EDTA 900 ml deiyonize suda çözöldü, pH 7.4'e ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

1X çalışma solüsyonu hazırlanışı:

10X stok solüsyonundan 100 ml alınıp son hacim deiyonize su ile 900 ml'ye tamamlandı. 121°C' de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

2. Nuclei Lizis Tamponu (NLB) (pH 8.2)

10 mM	Tris-Base
400 mM	NaCl
2 mM	Na ₂ EDTA

Hazırlanışı:

1.21 g	Tris-Base
23.4 g	NaCl
0.74 g	Na ₂ EDTA

900 ml deiyonize suda çözüldü, pH 8.2' ye ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

3. Proteinaz K Seyreltme Tamponu (pH 8.0)

0.05 M	Tris-HCl
1 mM	CaCl ₂

Hazırlanışı:

0.788 g	Tris-HCl
0.011 g	CaCl ₂

80 ml deiyonize suda çözüldü, pH 8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

4. Proteinaz K Çözeltisi (10 mg/ml)**Hazırlanışı:**

100 mg'lık liyofilize haldeki Proteinaz K, 10 ml Proteinaz K seyreltme tamponunda son konsantrasyon 10mg/mL olacak şekilde buz üzerinde çözülerek hazırlandı. Proteinaz K çözeltisi 600 µl olacak şekilde 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere bölündü ve -20°C'de saklandı.

5. %10'luk (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Solüsyonu**Hazırlanışı:**

10 g SDS tartıldı ve son hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanarak 68°C'de ısıtılarak çözüldü. 0.22 µm'lik mikrofiltre ile steril edildi.

6. Sodyum Klorür (6 M)

Hazırlanışı:

58.4 g NaCl 30 ml deiyonize su içinde çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

7. 0.1M Na₂EDTA (pH 8.0)

Hazırlanışı:

37,22 g Na₂EDTA

700 ml deiyonize su içinde çözüldü, 10M'lik NaOH ile pH 8.0'a ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

8. 1M Tris-HCl (pH 7.4)

Hazırlanışı:

157.6 g Tris-HCl

900 ml deiyonize suda çözüldü, pH 7.4'e ayarlandı. Son hacimdeiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

9. TE Tamponu (pH 7.5)

10 mM Tris HCl

1mM Na₂EDTA

Hazırlanışı:

0.394 g Tris-HCl

0.093 g Na₂EDTA

100 ml deiyonize suda çözüldü. pH 7.5'ye ayarlandıktan sonra son hacim deiyonize su ile 250 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavlandı.

5.1.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

1. TAE Elektroforez Tamponu (pH 8.5):

50X stok solüsyon hazırlanışı:

242 g Tris base

37.2 g Na₂EDTA.2H₂O

57.1 ml Glasiyel asetik asit deiyonize su kullanılarak 900 ml'de çözüldü. NaOH ile pH 8,5'e ayarlandı, son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 1X çalışma solüsyonu için 50X stok solüsyondan 20mL alınarak deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

1X çalışma solüsyonu hazırlanışı:

50X stok solüsyondan 20mL alınarak deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2. Etidyum Bromid Solüsyonu:

10 mg/ml olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Karanlıkta muhafaza edildi.

5.1.6.3. Yükleme Tamponları

1. 10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

Hazırlanışı:

20 g Sukroz 40 ml dH₂O içinde çözüldü. 100 mg (0.1 g) Orange G yukarıdaki solüsyon içerisinde çözülerek son hacim dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı.

5.2. Yöntem

5.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Gönüllü Onam Formu'nu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden tüm bireylerden 10 ml'lik K₃EDTA'lı tüplere periferik kan örneği alındı. DNA izolasyonu “yüksek tuz konsantrasyonu ile çöktürme” (Salting Out) yöntemi ile aşağıdaki gibi yapıldı (87). Ailenin tüm bireylerinden alınan periferik kan örneklerinden izole edilen genomik DNA örneği DB-XXXX şeklinde kodlanarak, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı DNA bankasına kayıt edildi. Her bir bireye ait DNA örneğinin kayıt numarası ilgili aile ağacı üzerinde gösterildi (Şekil 6).

I. Gün

1. 10 ml'lik K₃EDTA'lı steril tüplerdeki periferik kan, 50 ml'lik steril falkon tüplere aktarıldı.
2. Steril falkon tüplerdeki kan üzerine 40 ml ELB eklenerek tüpler hafifçe çalkalandı.
3. Falkon tüpler buz üzerinde 30 dakika bekletildikten sonra 4°C'de 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi.
4. Tüplerdeki süpernatant %10'luk çamaşır suyu içeren atık kabına dökülerek bir gece bekletildi. Dezenfeksiyon işlemi yapıldıktan sonra atık uzaklaştırıldı.
5. Tüpte kalan pellet üzerine 40 ml ELB eklendi ve kapakları sıkıca kapatılan falkon tüpler kuvvetli bir şekilde çalkalandı. İyice çalkalanan falkon tüpler 4°C'de, 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Tüpte kalan pellet üzerine 25 ml ELB eklendikten sonra tüpler kuvvetli bir şekilde çalkalandı ve 4°C'de, 10 dakika, 2500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Eğer pellet temizlenmemiş ve tüpün dibinde halen fazla miktarda eritrosit var ise 6. basamak tekrarlandı.
8. Pellet üzerine 4 ml NLB ve 120 µl proteinaz K eklendi.
9. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak pellet dağılana kadar tüpler çalkalandı.

10. Son olarak tüplere 425 µl SDS eklendi.
11. Falkon tüplerin kapakları kapatılara birkaç kez köpürtülmeden alt-üst edilerek 37°C de bir gece inkübasyona bırakıldı.

II. Gün

12. Falkon tüpler etüvden çıkartıldıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
13. Genomik DNA'ların -80°C'de stok olarak saklanması için 2 ml'lik contalı kriyotüplerin üzerlerine DNA banka numaraları yazıldı.
14. Her bir falkon tüpe 1.4 ml 6M NaCl eklendi, kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra 15 saniye çok hızlı bir şekilde çalkalandı.
15. Örnekler 20°C'de 15 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi.
16. Süpernatant yavaşça 50 ml'lik temiz falkon tüplere aktarıldı. 20°C'de 15 dakika 6000 rpm'de tekrar santrifüj edildi.
17. Süpernatant tekrar temiz falkon tüpe aktarılarak üzerine hacminin 3 katı kadar %96'lık etil alkol eklendi.
18. Kapakları sıkıca kapatılan falkon tüpler 1-2 dakika bekletildikten ve yavaş bir şekilde alt-üst edildikten sonra görünür hale gelen genomik DNA bir araya getirildi.
19. Yoğunlaşarak toplanan genomik DNA pipet yardımıyla 2 ml'lik contalı kriyotüpe alınarak üzerine 500 µl %70'lik etil alkol eklendi.
20. Kriyotüpler kapağı kapatıldıktan sonra alt-üst edildi ve mikrosantrifüjde 45 saniye 10.000 rpm'de santrifüj edilerek DNA pelleti çöktürüldü.
- 21 Kriyotüplerde kalan %70'lik etil alkol pipetle uzaklaştırıldı.
22. Kriyotüpler, etil alkol kalıntıları uçana kadar açık tutularak kurumaya bırakıldı. Alkol uçtuktan sonra genomik DNA'nın üzerine 500 µl TE buffer ilave edildi.
- 23 TE buffer eklendikten sonra tüpler genomik DNA'nın homojen hale gelmesi için 2 gün +4°C'de bekletildi. Tüpler aralıklarla alt-üst edildi.
24. Elde edilen genomik DNA'lar moleküler analizlerde kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucularda saklandı.

5.2.2. Genomik DNA Konsantrasyonlarının ve Çalışma Stoklarının Ayarlanması

Elde edilen genomik DNA örneklerinden çalışma solüsyonu hazırlamak için stok genomik DNA'dan 20µl alınarak 60µl enjeksiyonluk su ile seyreltildi ve karışım oda sıcaklığında 1 gün bekletildi. Seyreltilen genomik DNA örneklerinden 1µl alınarak Nanodrop® 2000 UV-Vis Spektrofotometre'de DNA konsantrasyonları ölçüldü. Konsantrasyonları belirlenen stok genomik DNA'lardan 12.5 ng/µl, 25 ng/µl ve 50 ng/µl konsantrasyonlarda çalışma solüsyonları hazırlandı.

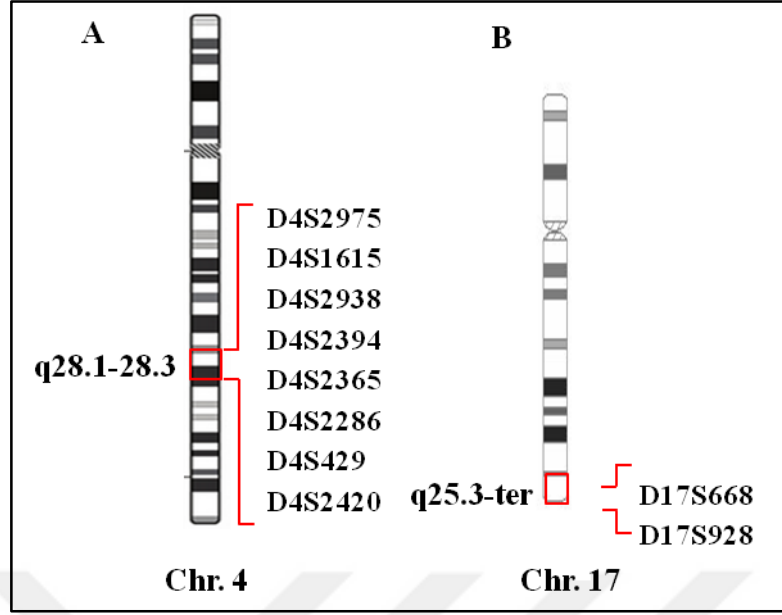
5.2.3. Bağlantı Bölgesinin Belirlenmesi

5.2.3.1. Genom Boyu Homozigotluk Taraması

SS_CNS_25 ailesinden ikisi hasta (DB-2471, DB-2475) ve ikisi sağlıklı (DB-2473, DB-2474) olmak üzere toplam 4 bireyde Affimetrix GeneChip 250K SNP array platformu üzerinde genom taraması yapıldı. 250K SNP array genom taraması hizmet satın alma (AY-KA Ltd. Şti., Ankara) yolu ile gerçekleştirildi. Genom üzerindeki lokalizasyonları bilinen 250.000 SNP için elde edilen genotip verileri VIGENOS Plus yazılım programına aktarılarak, ailede hastalıkla birlikte kalıtılan homozigot bölgeler belirlendi.

5.2.3.2. Homozigot Bölgelerin Bütün Aile Bireylerinde STRP Markırları İle Test Edilmesi ve Haplotip Analizi

Genom boyu homozigotluk taramasına göre belirlenen homozigot bölgeler için UCSC Human Genome Browser veri tabanı (<http://genome.ucsc.edu/>, NCBI 37hg19 Feb.2009) kullanılarak, bölgeleri kapsayan STRP markırları ve markır dizileri belirlendi (Şekil 7) (Tablo 2). Ailede ortak homozigot kalıtılan bölgeler, SNP'lerden daha informatif olan STRP markırları ile bütün aile bireylerinde test edilerek bu bölgelerin haplotipi oluşturuldu ve yalancı pozitif bölgeler dışlandı. Hastalıkla birlikte kalıtılan bölgenin sınırlarının belirlenmesi ile kritik bölge daraltılarak bölge içinde kalan genlerin sayısının azaltılması amaçlandı.



Şekil 7. Homozigot bölgelerin STRP markırları ile test edilmesi. A) 4. kromozom üzerinde görülen kritik bölge ve kullanılan STRP markırları B) 17. kromozom üzerinde görülen kritik bölge ve kullanılan STRP markırları

Tablo 2. 4. ve 17. kromozomlar üzerinde belirlenen kritik bölgeler için haplotip analizinde kullanılan STRP markırları, dizileri ve kromozomlar üzerindeki fiziksel yerleşimleri

Marker	Forward Reverse	Primer Dizileri (5'-3')	Mb
D4S2975	F	tgtaaacgacggccagtCTGGGCTCAAGTGATTTTC	125.44
	R	caggaacagctatgaccCAGCTGGGACAATGGTGT	
D4S1615	F	tgtaaacgacggccagtCCTTGGGTCAGCCACATATC	128.2
	R	caggaacagctatgaccCACTCAGAACAGAACTTGGGT	
D4S2938	F	tgtaaacgacggccagtTGCAAATTCGTGGGAC	129.31
	R	caggaacagctatgaccTGGTGTAGTATTCCATCGTG	
D4S2394	F	tgtaaacgacggccagtACTGGTATGTCCTAACCCCC	130.29
	R	caggaacagctatgaccGATCTGCAGTTGGATTCTGG	
D4S2365	F	tgtaaacgacggccagtAGTAATTCCTCAACTGCATCACC	130.78
	R	caggaacagctatgaccATGCCAAGGATGGTGAGTTA	
D4S2286	F	tgtaaacgacggccagtGCTGCACCTTAGACTAGAT	131.47
	R	caggaacagctatgaccTTAGTAGCTTCTCAGCAGC	
D4S429	F	tgtaaacgacggccagtGGTGATCCACCTGCCT	133.11
	R	caggaacagctatgaccAAGCCACTGACCTTCACT	
D4S2420	F	tgtaaacgacggccagtAGCTCCATCTAAGTTGCTGC	134.24
	R	caggaacagctatgaccAATGCTTATCTACCAATGAGTGG	
D17S668	F	tgtaaacgacggccagtTGACAGAGCGAGACCCTGC	59.45
	R	caggaacagctatgaccGAACGGGATTGGTTATACTAATGC	
D17S928	F	tgtaaacgacggccagtTAAAACGGCTACAACACATACA	80.25
	R	caggaacagctatgaccATTTCCCCACTGGCTG	

5.2.3.2.1. Haplotip Analizi İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Fragman Analizi

Her bir markırın çoğaltılmasında kullanılacak primer çiftlerinden forward primerin 5' ucuna universal M13 (-21) ileri (forward) primer dizisi (5'-TGTA AAC GACGGCC AGT-3') ve geri (revers) primerin 5' ucuna universal M13 (-21) geri primer dizisi (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') eklendi (Tablo 2). Her bir primer çifti için ön PCR ve işaretleme PCR'ı olmak üzere iki aşamada PCR gerçekleştirildi. Ön PCR, genomik DNA kullanılarak istenilen bölgenin çoğaltılması için yapılırken; ikinci PCR, ön PCR ürünlerinin uç kısımlarına floresan boyalarla işaretlenmiş dizilerin eklenmesi amacıyla yapıldı. Ön PCR işleminde her bir örnek için 25 µl karışım hazırlandı.

Ön PCR Karışımı**1X**

5X PCR Tamponu (Promega)	: 5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	: 1.5 µl
dNTP Karışımı (10 mM)	: 0.4 µl
Pr F (10 pmol/µl)	: 0.4 µl
Pr R (10 pmol/µl)	: 0.4 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega)	: 0.1 µl
DNA (12.5 ng/µl)	: 2.5 µl
dH ₂ O	: 14.7 µl
Toplam	: 25 µl

Ön PCR Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

Ön PCR Koşulları

94°C 6'	Başlangıç denatürasyonu	} 30 döngü
94°C 30"	Denatürasyon	
58°C 30"	Bağlanma	
72°C 30"	Sentez	
72°C 6'	Son sentez	
10°C ∞	Bekleme	

Ön PCR ürünlerinin 2 µl'si, 2 µl yükleme tamponu ve 4 µl dH₂O ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde 100 voltta 30 dakika yürütüldü. Elektroforez sonuçları jel görüntüleme sisteminde kontrol edilerek PCR ürünlerinin kalitesi belirlendi. Ön PCR sonucu elde edilen ürünler, işaretleme PCR'ı için kalıp olarak kullanıldı. İşaretleme PCR'ında D4S29752 ve D4S429 PCR ürünleri NED™ (sarı); D4S6115, D4S2365 ve D17S928 PCR ürünleri VIC™ (yeşil); D4S2938, D4S2286 ve D17S668 PCR ürünleri FAM™ (mavi); D4S2394 ve D4S2420 PCR ürünleri ise PET™ (kırmızı) floresan boyaalarının takılı olduğu M13 (-21) primerleri ile işaretlendi. İşaretleme reaksiyonundaki ileri ya da geri primerlerden sadece biri işaretlenmiş olup diğer primer herhangi bir floresan ile işaretli değildir. İşaretleme PCR'ı için yapılan bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı.

İşaretleme PCR Karışımı**1X**

5X PCR Tamponu (Promega)	: 2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	: 0.6 µl
dNTP (10 mM)	: 0.2 µl
M13 (-21)Pr F (10 pmol/µl)	: 0.15 µl
M13 (-21)Pr R (10 pmol/µl)	: 0.15 µl

Taq Polimeraz (5U/ μ l) (Promega)	: 0.04 μ l
PCR Ürünü	: 2 μ l
dH ₂ O	: 4.86 μ l
Toplam	: 10 μ l

İşaretleme PCR'ı Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

İşaretleme PCR Koşulları

94°C 2'	Başlangıç denatürasyonu	
94°C 30"	Denatürasyon	} 25 döngü
58°C 30"	Bağlanma	
72°C 30"	Sentez	
72°C 5'	Son sentez	
10°C ∞	Bekleme	

Yukarıdaki reaksiyondan elde edilen ve farklı floresan boyalarla işaretlemiş PCR ürünlerinden oluşan birinci panel için, işaretleşmiş PCR ürünlerinin pre-run sonucundaki sinyal şiddetleri dikkate alınarak, D4S2975 (sarı), D4S1615 (yeşil), D4S2938 (mavi) ve D4S2394 (kırmızı) PCR ürünlerinden 2.5 μ l alınarak toplam 10 μ l'lik bir karışım hazırlandı. İkinci panel için ise D4S2365 (yeşil)'den 1.5 μ l, D4S2286 (mavi)'den 1.5 μ l ve D4S429 (sarı)'dan 4 μ l ve D4S2420 (kırmızı)'dan 2.5 μ l işaretleşmiş PCR ürünü alınarak toplam 9.5 μ l'lik karışım elde edildi. Üçüncü panel için de D17S668 (mavi) ve D17S928 (yeşil)'den 2.5 μ l alınarak toplam 5 μ l'lik karışım hazırlandı. Hazırlanan bu karışımlardan 2.5 μ l, Hi-Di™ Formamid'ten 7 μ l ve GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard markırından 0.5 μ l alındı ve fragman analizi için kullanılacak platelerdeki kuyucuklara her bir örnek için 10 μ l olacak şekilde dağıtıldı. Hazırlanan fragman analizi plateleri kapiller elektroforez işlemi için 3130 Genetik Analizör cihazına yüklendi. Kapiller elektroforez işlemi yapıldıktan sonra elde edilen sonuçlar, *GeneMapper® v4.1 & Data Collection v3.1* programı kullanılarak analiz edildi. Bu şekilde SS_CNS_25 ailesindeki tüm bireylerin haplotipleri oluşturuldu.

5.2.4. Bağlantı Bölgesindeki Aday Genlerin Belirlenmesi

SS_CNS_25 ailesinin haplotip analizi sonuçları değerlendirilerek belirlenen bağlantı bölgesinde yer alan genler UCSC Human Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>), Ensembl Genom Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) ve NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanları kullanılarak belirlendi. Bu genlerin herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmiş olup olmadıkları, hücredeki fonksiyonları, eksprese oldukları dokular, etkileştiği proteinler değerlendirildi.

5.2.5. Mutasyon Analizi

5.2.5.1. *PLK4* Geninin PCR ile Amplifikasyonu

Mutasyon taraması için kritik bölgede yer alan *PLK4* aday gen olarak seçildi. Mutasyon taranması için DB-2475 no'lu hasta bireye ait genomik DNA örneği kullanıldı. *PLK4* geninde bulunan 17 ekzon ve ekzon-intron bağlantı bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılacak primer dizileri *Primer3* programı kullanılarak hazırlandı (Tablo 3) (88).

PLK4 geninin her bir ekzonun amplifikasyonu için PCR işlemi 25 µl son hacimde gerçekleştirildi ve bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
5X PCR Tamponu (Promega)...	: 5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	: 1.5 µl
dNTP Karışımı (10 mM)	: 1 µl
Pr F (10 pmol/µl)	: 1 µl
Pr R (10 pmol/µl)	: 1 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega).	: 0.1 µl
gDNA (25 ng/µl)	: 2.5 µl
dH ₂ O	: 12.9 µl
Toplam	: 25 µl

PCR işlemi Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

PCR Koşulları

94°C 6'	Başlangıç denatürasyonu	
94°C 30"	Denatürasyon	} 35 döngü
58°C 45"	Bağlanma	
72°C 30"	Sentez	
72°C 6'	Son sentez	
10°C ∞	Bekleme	

Elde edilen PCR ürünlerinin 2 µl'si, 2 µl yükleme tamponu ve 4 µl dH₂O ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde 100 voltta 30 dakika yürütüldü. Jel görüntüleme sisteminde PCR ürünlerinin kaliteleri kontrol edildi.

Kaliteli PCR ürünleri Nucleospin® Extract II kiti ile üretici firmanın önerdiği aşağıdaki protokole göre temizlendi;

1. 25 µl PCR ürünlerinin üzerine 200 µl Buffer NT (DNA bağlayıcı tampon) ilave edildi.
2. PCR ürünü + Buffer NT karışımı 2 ml'lik toplama tüpü üzerindeki Nucleospin® Extract Column tüplerine aktarılarak, 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
3. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldı
4. Nucleospin® Extract Column tüplerindeki membran üzerine 600 µl Buffer NT3 (yıkama tamponu) eklenerek 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra tüpler ikinci kez 11.000 g'de 2 dakika santrifüj edilerek Buffer NT3'ün membrandan tamamen uzaklaşması sağlandı.
6. Nucleospin® Extract Column tüpleri 1.5 ml'lik eppendorf tüplerin üzerine alınarak membran üzerine PCR ürünlerinin konsantrasyonlarına göre 30-50 µl enjeksiyonluk su eklendi ve 1 dakika bekletildikten sonra 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 3. *PLK4* geninin amplifikasyonunda kullanılan primerler. Primer dizileri ve PCR ürünü uzunlukları.

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı	PCR Ürünü (bps)
862	tatttcggaccgtgaagtaacc	<i>PLK4_EX1F</i>	575
863	tcgtgtcctcccacaattactc	<i>PLK4_EX1R</i>	
864	gactgcgtgaaggaagctaatac	<i>PLK4_EX2F</i>	379
865	ccttgaggagaagtgggaggtag	<i>PLK4_EX2R</i>	
866	aacatgccttcaccctagac	<i>PLK4_EX3F</i>	455
867	cttaagcaaggtcaaggctttc	<i>PLK4_EX3R</i>	
868	cttttaccgaagcaccctctctg	<i>PLK4_EX4_5F</i>	641
869	aattagcagcttgggatgtagg	<i>PLK4_EX4_5R</i>	
870	aagctccaagccactgttctac	<i>PLK4_EX6F-1</i>	554
871	aacgatctgctggatttctacg	<i>PLK4_EX6R-1</i>	
872	tcgacactgacacagtcaagaac	<i>PLK4_EX6F-2</i>	496
873	gctctacgaaggtatcgagaatg	<i>PLK4_EX6R-2</i>	
874	tcttcttcaggagatggaaacag	<i>PLK4_EX6F-3</i>	492
875	cagggtcaaaatcatgacagtgg	<i>PLK4_EX6R-3</i>	
876	attttggcatgggagtttagc	<i>PLK4_EX7F</i>	495
877	gatacagggcttgctatgtgc	<i>PLK4_EX7R</i>	
878	cagagtgcgttatttgtgtcg	<i>PLK4_EX8F</i>	598
879	ccataaacaccagctctctttc	<i>PLK4_EX8R</i>	
880	gtgaagcagcttgatttgac	<i>PLK4_EX9F</i>	299
881	gaatgctaaacgtgcttaaaccg	<i>PLK4_EX9R-1</i>	
882	ggaaaacctctaccaccatttg	<i>PLK4_EX9R-2</i>	
883	tttgccagtatgatagtgtctctg	<i>PLK4_EX10F</i>	541
884	aaaggcatacaactctcaccag	<i>PLK4_EX10R</i>	
885	atttgactcccagtttggtttc	<i>PLK4_EX11F</i>	489
886	actccgctgtgcaatttatatg	<i>PLK4_EX11R</i>	
887	acgcaaagcattcatatcacac	<i>PLK4_EX12F</i>	518
888	gtgcttctgtcattgtttcacc	<i>PLK4_EX12R</i>	
889	tgtatatggaccatgctaagagg	<i>PLK4_EX13_14F</i>	555
890	attttacaagaaggcatcagg	<i>PLK4_EX13_14R</i>	
891	tgtctgcttttgctgaatgtg	<i>PLK4_EX15F</i>	451
892	aagtaggtcacccaagcctagc	<i>PLK4_EX15R</i>	
893	cagaaccacaaacctctactg	<i>PLK4_EX16F</i>	455
894	gtaaggctacaaggaaccaac	<i>PLK4_EX16R</i>	
895	aatttttctgaggtgcctcttg	<i>PLK4_EX17F-1</i>	562
896	gacgcagggaaaacaataaaag	<i>PLK4_EX17R-1</i>	
897	agaccataacccccgaacttac	<i>PLK4_EX17F-2</i>	524
898	ttctgcacatgtaaccagaac	<i>PLK4_EX17R-2</i>	

5.2.5.2. Döngüsel Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing)

Temizlenen PCR ürünleri, her bir bandındaki DNA miktarı bilinen markır (NEB 100 bp DNA ladder) ile birlikte %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Böylece her bir dizileme reaksiyonuna konulacak kalıp PCR ürününün miktarının 50-100 ng arasında olması sağlandı. Döngüsel dizileme reaksiyonunda her bir ekzon için, ekzonun amplifikasyonunda kullanılan primerlerinden sadece biri kullanıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Döngüsel dizileme reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Dizilenen Ekzon
863	tcgtgtcctcccacaattactc	<i>PLK4_EX1R</i>
865	ccttgagaagtgggaggtag	<i>PLK4_EX2R</i>
866	aacatgcctccaccctagac	<i>PLK4_EX3F</i>
868	ctttaccaagcacctctctg	<i>PLK4_EX4_5F</i>
870	aagctccaagccactgttctac	<i>PLK4_EX6F-1</i>
872	tcgacactgacacagtcaagaac	<i>PLK4_EX6F-2</i>
874	tcttctcaggagatggaaacag	<i>PLK4_EX6F-3</i>
876	atgttgcatgggagtttagc	<i>PLK4_EX7F</i>
878	cagagtgcgttattttgtgtcg	<i>PLK4_EX8F</i>
881	gaatgctaaacgtgctaaacg	<i>PLK4_EX9R-1</i>
883	tttgccagtatgatatgtctctg	<i>PLK4_EX10F</i>
886	actccgctgtgcaatttatatg	<i>PLK4_EX11R</i>
888	gtgcttctgtcattgtttcacc	<i>PLK4_EX12R</i>
889	tgtatatggaccatgctaatgagg	<i>PLK4_EX13_14F</i>
891	tgtctgctttgctgaatgtg	<i>PLK4_EX15F</i>
894	gtaaggctacaaggaaccaac	<i>PLK4_EX16R</i>
895	aattttctgaggtgcctcttg	<i>PLK4_EX17F-1</i>
897	agaccataacccccgaacttac	<i>PLK4_EX17F-2</i>

Döngüsel dizileme reaksiyonu BigDye® Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kiti kullanılarak yapıldı. Bir reaksiyonluk karışım aşağıdaki gibi hazırlandı;

PCR Karışımı

1X

BigDye	: 1,5 µl
5X Buffer	: 1 µl
İleri ya da Geri Primer (10 pmol/µl)	: 0.5 µl
Temizlenmiş PCR ürünü	: 0.5 µl
dH ₂ O	: 6.5 µl
Toplam	: 10 µl

Döngüsel dizileme reaksiyonu Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

PCR Koşulları

96°C 2'	Başlangıç denatürasyonu	
96°C 15"	Denatürasyon	} 25 döngü
50°C 20"	Bağlanma	
60°C 2'	Sentez	
10°C ∞	Bekleme	

Döngüsel dizileme reaksiyonu sonucunda elde edilen PCR ürünleri Sephadex®G-50 ile aşağıdaki temizleme protokolü kullanılarak saflaştırıldı;

1. 1 g Sephadex®G-50 tartılarak 12-13 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve çalışmaya başlamadan önce en az 30 dakika +4°C'de bekletildi.
2. Kolon tüpler 2 ml'lik toplama tüpleri üzerine alındı.
3. Kolon tüplere 600 µl Sephadex®G-50 eklendi ve 750 g'de 2.5 dakika santrifüj edildi.
4. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldı ve kolon tüpler 1.5 ml'lik eppendorf tüplerin üzerine alındı.
5. Döngüsel dizileme reaksiyonu ile çoğaltılan PCR ürünleri kolon tüpteki Sephadex®G-50 üzerine dikkatlice eklenerek 750 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
6. Saflaştırılan PCR ürünleri 96 kuyulu platelere transfer edilerek ABI 3130 genetik analiz cihazına yüklendi ve dizileme işlemi gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları Chromas 2.32 ve SeqScape® software v2.5 programları ile analiz edildi. Elde edilen veriler gen bankasından (89) alınan referans *PLK4* dizisi (Ref Seq: NM_014264) ile karşılaştırıldı.

5.2.6. *PLK4* Geninde c.31-3A>G değişiminin ARMS Yöntemiyle Taranması

SS_CNS_25 ailesindeki DB-2475 numaralı hastanın *PLK4* geni Intron 1’de görülen c.31-3A>G değişiminin bilinen bir SNP’ye karşılık gelmemesi üzerine hem ailenin bütün bireylerinde hem de Seckel sendromu öyküsü bulunmayan 335 sağlıklı bireyde bu değişim için tarama yapıldı. Bu tarama işlemi, değişimin olduğu bölge için enzim tanıma bölgesi bulunmadığından dolayı mutasyona dayanıklı amplifikasyon sistemi (ARMS) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

ARMS reaksiyonu için normal allele spesifik *PLK4_NS* (Pr. 906), mutant allele spesifik *PLK4_MS* (907) ters yön primerleri ve bu primerlerle kullanılmak üzere *PLK4_CF* (Pr. 908) ileri yön primerleri tasarlandı (Tablo 5).

Tablo 5. ARMS reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer No	Primer Dizisi (5’-3’)	Primer Adı
906	cctttaccaagcagatttccaactttaaattcc <u>GT</u>	<i>PLK4_NS</i>
907	cctttaccaagcagatttccaactttaaattcc <u>GC</u>	<i>PLK4_MS</i>
908	gaggtgtaatacccgcttgaatttgcataattcc	<i>PLK4_CF</i>

Ailede ve kontrol grubunda mutant allelin varlığını test etmek için *PLK4_CF* ve mutant allele spesifik *PLK4_MS* primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu son hacim 25 µl olacak şekilde aşağıdaki şekilde hazırlandı;

PCR Karışımı**1X**

5X PCR Tamponu (Promega)	: 5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	: 1.5 µl
dNTP Karışımı (10 mM)	: 0.5 µl
Pr F <i>PLK4</i> _CF (10 pmol/µl)	: 0.5 µl
Pr R <i>PLK4</i> _MS (10 pmol/µl)	: 0.5 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega)	: 0.1 µl
gDNA (25 ng/µl)	: 2.5 µl
dH ₂ O	: 14.9 µl
Toplam	: 25 µl

Ailede ve kontrol grubunda normal allelin varlığını test etmek için *PLK4*_CF ve normal allele spesifik *PLK4*_NS primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu son hacim 25 µl olacak şekilde aşağıdaki şekilde hazırlandı;

PCR Karışımı**1X**

5X PCR Tamponu (Promega)	: 5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	: 1.5 µl
dNTP Karışımı (10 mM)	: 0.5 µl
Pr F <i>PLK4</i> _CF (10 pmol/µl)	: 0.5 µl
Pr R <i>PLK4</i> _NS (10 pmol/µl)	: 0.5 µl
Taq Polimeraz (5U/µl) (Promega)	: 0.1 µl
gDNA (25 ng/µl)	: 2.5 µl
dH ₂ O	: 14.9 µl
Toplam	: 25 µl

PCR işlemi Applied Biosystems 9700 Thermocycler cihazı kullanılarak aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

PCR Koşulları

94°C 6'	Başlangıç denatürasyonu	
94°C 30"	Denatürasyon	} 35 döngü
58°C 45"	Bağlanma	
72°C 30"	Sentez	
72°C 1'	Son sentez	
10°C ∞	Bekleme	

5.2.7. RNA İzolasyonu ve Revers Transkriptase PCR (RT-PCR)

PLK4 geninde görülen c.31-3A>G değişimini homozigot olarak bulunduran DB-2471 no'lu hasta bireyden, heterozigot olarak bulunduran iki bireyden (DB-2471'in anne ve babası), ve sağlıklı bir bireyden alınan Na3EDTA'lı periferik kandan RNeasy Mini Kit (QIAGEN) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen total RNA Invitrogen SuperScript® III First System for RT-PCR kiti kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü

Genomik dizi üzerinde görülen c.31-3A>G değişiminin *PLK4* mRNA'sının üç varyantı üzerine etkisini belirlemek için gene/transkripte özgü primerler kullanılarak cDNA üzerinden PCR yapıldı. 970 amino asitlik protein kodlayan uzun variant için ekzon 1'e özgü 902 nolu ileri primer ile ekzon 3'e özgü 903 no'lu ters primer kullanıldı. 938 amino asitlik transkripti analiz etmek için ekzon 1'e özgü 902 nolu ileri primer ile ekzon2-ekzon 4 kavşağına özgü 955 nolu ters yönlü primer kullanıldı. En kısa varyant olan ve 929 amino asitlik protein kodlayan transkrip için, bu transkripte özgü 905 nolu ileri yönlü primer ile üçüncü ekzona özgü 903 nolu primerler kullanıldı (Tablo 6). Amplifiye edilen normal ve mutant varyantlar %2'lik agaroz jelde görüntülendi.

5.2.8. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile Kırılma Varyantlarının Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

PLK4 geninde görülen c.31-3A>G değişimini homozigot olarak bulunduran DB-2471 no'lu hasta bireyden ve sağlıklı bir bireye ait cDNA örneklerinden kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) gerçekleştirildi. Bu işlem, c.31 -3A>G değişiminin 970 amino asitlik protein kodlayan transkriptinin kırılmasını hangi oranda bozduğunu belirlemek amacıyla yapıldı. Normal traskript ekzon 1- ekzon 2 kavşağına özgü olacak şekilde tasarlanan ileri yönlü primer (Pr.922) ve 4. ekzona özgü geri yönlü primer (Pr.914) ile amplifiye edildi. Mutant transkript ise intron 1'den ekzon 2'ye aktarılan 63 nükleotitik diziye özgü ileri primer (Pr.911) ve ekzon 3'e özgü geri yönlü primer (Pr.912) ile amplifiye edildi. Standart olarak da housekeeping gen olan *Gliseralehit 3-Fosfat Dehidrogenaz* (*GAPDH*) primerleri kullanıldı.

Tablo 6. RT-PCR ve qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.

Primer No	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Adı
902	gactgcgtgaaggaagctaac	PLK4_Ex1F
903	tctctgtaccattcctgcttg	PLK4_Ex3R
905	gcccctcaagagacaagagtag	PLK4_Ex2F
911	ccctcccatcttctttctac	PLK4_QPCR_F
912	tcacctcatttggactctctg	PLK4_QPCR_R
914	cattttctgagaagggttcactc	PLK4_QPCR_R
922	tgcacggggagaagatcgaggatt	PLK4_NVS_Ex1-2F
943	aacatcatccctgccttactg	GAPDH_F
944	tggtgaagtcagaggagaccac	GAPDH_R
955	tgctatcttcaaaatagttataaagcatttg	PLK4_Wt_938_Pr_R_Ex4-Ex2

qRT-PCR için reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı;

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
SYBR®GreenER™qPCR SuperMix	10 µl
İleri Primer (10mM)	1 µl
Geri Primer (10mM)	1 µl
cDNA	2,5 µl
Steril su	1 µl
Toplam	20 µl

PCR işlemi için hazırlanan karışım Light Cycler® 480 II cihazı ile uyumlu 96 kuyulu platelere aktarıldı. Reaksiyon kit protokolünde belirtilen şekilde aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi;

PCR Koşulları

95°C 5'	Ön inkübasyon	
94°C 30"	Denatürasyon	} 40 döngü Amplifikasyon
58°C 1'	Bağlanma	
72°C 45"	Sentez	
95°C 15"		
60°C 1		} 1 döngü Melting Curve
97°C ∞		
40°C 30"	Soğutma	

Normal ve mutant varyantların ekspresyon miktarlarını kıyaslamak amacı ile *LightCycler® 480 Software, Version 1.5* yazılım programı kullanıldı. Varyantların ekspresyon düzeyleri *GAPDH* geninin hücredeki ekspresyonu referans alınarak normalize edildi.

6. BULGULAR

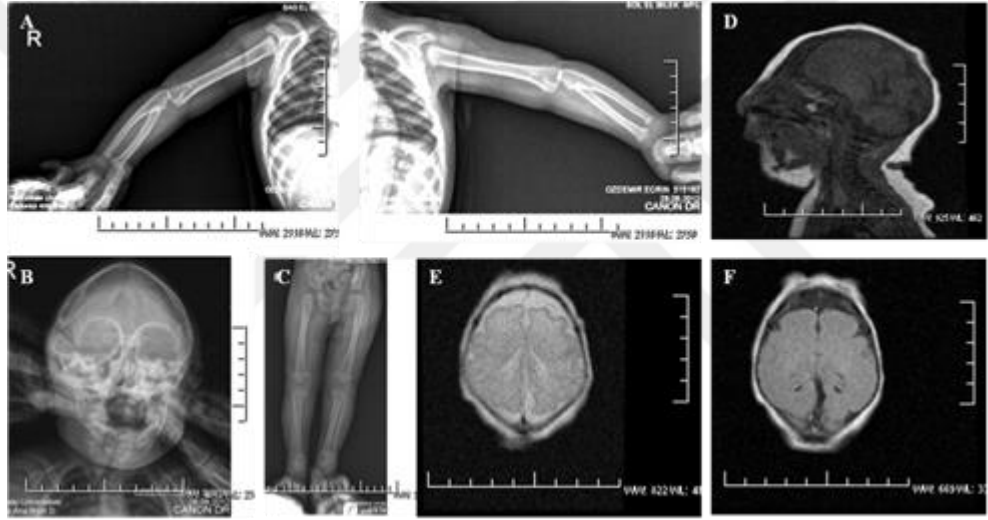
Seckel sendromu, doğum öncesi ve doğum sonrası gelişme geriliği ile karakterize otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalık olup hem klinik hem de genetik olarak heterojeniteye sahiptir (OMIM:210600). Bugüne kadar Seckel sendromunun genetik etiyolojisi ile ilişkilendirilmiş 6 gen bulunmaktadır. Ancak tanımlanmış genler ile açıklanamayan ailelerin varlığı halen tanımlanmayı bekleyen genlerin varlığını göstermektedir. Seckel sendromunun genetik etiyolojinde rol alan ve henüz tanımlanmamış genleri belirlemeye yönelik olarak yapılan bu çalışma kapsamında, Seckel sendromu tanısı konulmuş bireylerin bulunduğu SS_CNS_25 adlı aile (Şekil 6) değerlendirildi.

6.1. Klinik Değerlendirme

Çalışma kapsamında değerlendirilen SS_CNS_25 kodlu aile bireylerinin klinik değerlendirmesi Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapıldı. Ailenin DB-2471 nolu etkilenmiş bireyinde gerçekleştirilen fenotipik (Şekil 8) ve radyolojik değerlendirmede (Şekil 9); hastanın Seckel sendromu ile uyumlu doğum öncesi ve doğum sonrası gelişme geriliği, dismorfik yüz görünümü, mikrosefali, orantılı boy kısalığı, iskelet ve beyin anomalileri gözlemlendi (Tablo 7). Ailedeki etkilenmiş ikinci bireyde (DB-2475) yapılan fenotipik değerlendirmede de indeks vakada olduğu gibi Seckel sendromu ile uyumlu dismorfik yüz görünümü, mikrosefali ve orantılı boy kısalığı gözlemlendi (Tablo 7).



Şekil 8. Klinik değerlendirme. DB-2471 (A-C) ve DB-2475 (D) no'lu bireylerin görünümü.



Şekil 9. DB-2471 no'lu hastada radyolojik bulgular. Bilateral üst ekstremitte görüntüsünde radius'un proksimal kısmında hipoplazi, humerus epifizinin gecikmesi ile birlikte hamatum ve capitatum kemiklerinin yokluğu gecikmiş kemik yaşını göstermektedir (A). Mikrosefali, sagittal ve lambdoid suturelerin açıklığı (B). Alt ekstremitte görüntüsünde Femoral epifizin gecikmesi (C). Sagittal T1 kesiti görüntüsünde corpus callosum'un proksimal bölgesinin eksikliği (D). Aksiyal T1 ve T2 görüntülerinde corpus callosum'un proksimal bölgesinin eksikliği, pakigiri ve mikrosefali (E-F).

Tablo 7. Ailede etkilenmiş bireylerin klinik bulguları. (+:Var, -:Yok, BY: Bilgi yok)

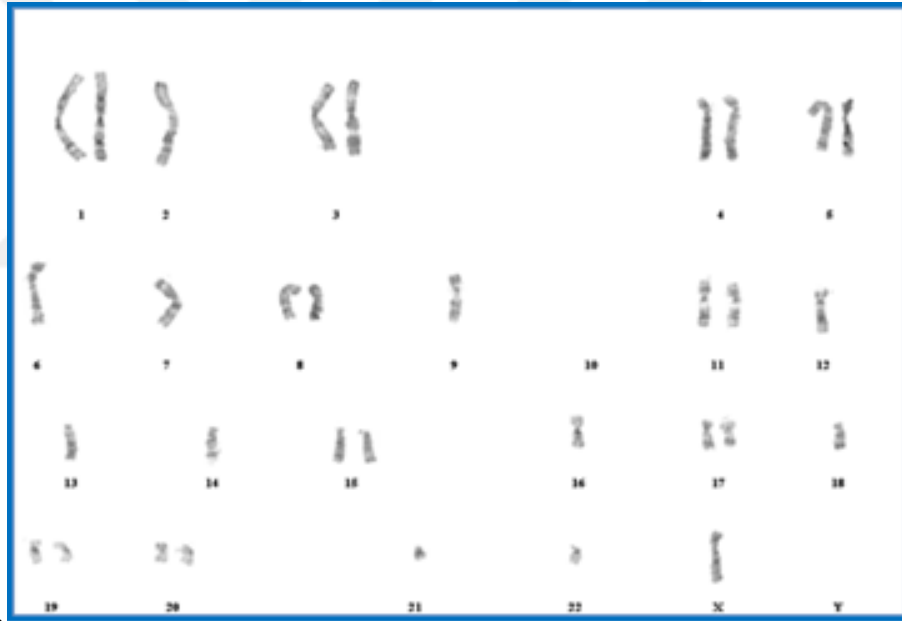
Klinik Bulgular	DB-2471	DB-2475
Cinsiyet	Kadın	Erkek
Büyüme Parametreleri		
Boy ve kilo	Doğumda ?cm ve 1570 g	BY
Baş çevresi	9. ay 30.8 cm ve ?g	BY
Fasiyal Dismorfizm		
Arkaya eğilimli alın	+	+
Mikrognati	+	+
Fasiyal asimetri	-	-
Düşük/malforme kulaklar	Büyük kulaklar	-
Gözkapağı aralığı	Yukarı eğimli	Yukarı eğimli
Şaşılık	-	+
Blepharophimosis	+, epikantus	+, epikantus
Gaga şeklinde burun	Balblı	Çıkıntılı
Yarık damak	-	-
Yüksek Damak	+, ince üst dudak	BY
Selektif diş agenezi	BY	BY
Diş minesini hipoplazisi	BY	BY
İskelet bulguları		
11 kaburga çifti	-	BY
Gecikmiş kemik yaşı	+	BY
Skolyoz	-	BY
5. parmakta klinodaktili	+	BY
Brachymesophalangia	BY	BY
Radius Hipoplazisi	+	BY
Pes planus	BY	BY
Diğer bulgular		
Genital anomaliler	-	BY
Mental retardasyon	BY	+
Basitleşmiş giruslar	+	BY

6.2. Aile Ağacı Analizi

Tek gen hastalıklarının genetik etiyolojisinin tanımlanmasında kullanılan en etkin yöntemlerden biri bağlantı analizidir. Bağlantı analizi çalışmalarında, ailedeki hastalığın kalıtım kalıbının ve informatif bireylerin belirlenmesi en önemli aşamadır. Bu doğrultuda aile bireyleri ile görüşülerek ailedeki akraba evlilikleri, informatif olabilecek hasta ve sağlıklı bireyler belirlendi. İndeks vaka olan DB-2471 nolu bireyin ebeveynleri arasında akrabalık tanımlanırken, ailedeki ikinci etkilenmiş birey olan DB-2475'in anne babası arasında akrabalık tarif edilemedi. Bu hastanın anne ve babasının aynı köyden köken almaları dikkate alınarak akraba olma ihtimallerinin yüksek olduğu düşünüldü (Şekil 6). Ayrıca, DB-2475 nolu bireyin bir kardeşinin de benzer klinik bulgulara sahip olduğu ve doğumdan kısa bir süre sonra ölmüş olduğu belirlendi. Çalışma kapsamında informatif olabilecek bireyleri belirlemeye yönelik yapılan incelemede her iki etkilenmiş bireyin de birer sağlıklı kardeşinin oldu görüldü. Ancak, DB-2475'nin sağlıklı kardeşi çalışmaya katılmayı kabul etmediği için çalışma dışında tutuldu. Sonuç olarak, çalışma için informatif olabilecek ikisi etkilenmiş toplam 7 aile bireyi çalışmaya dahil edildi.

6.3. Karyotip Analizi ve Kardeş Kromatid Değişimi'nin (SCE) İncelenmesi

Seckel Sendromu ile ilişkilendirilen genler tarafından kodlanan proteinlerin DNA hasarına cevapta, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sürdürülmesi ve sitokinez gibi moleküler mekanizmalarda rol aldığı gösterilmiştir. Bu fonksiyonların yerine getirilememesine bağlı olarak çok sayıda hücrede genomik kararsızlık görülmektedir (13). Genomik bütünlüğün korunmasında bir aksaklık olup olmadığını belirlemek amacıyla DB-2471 no'lu hastadan alınan periferik kan örneğinden 72 saatlik lenfosit kültürü yapıldı. Elde edilen metafaz plakları GTG bantlama yöntemi ile boyanarak yapılan karyotip analizinde metafaz plaklarının %13.6'sında (15/110) aneuploidi gözlemlendi (Şekil 10).



Şekil 10. DB-2471 no'lu hastaya ait anöploidik bir karyotip.

Kardeş kromatid değişimi (Sister Chromatid Exchange: SCE), bölünmekte olan hücrelerde genetik olarak aynı olan iki kardeş kromatidin hücre bölünmesi esnasında oluşan çift zincir DNA kırığını takiben spontan parça değiştirmesi olayıdır. Bununla birlikte, kimyasal mutajenlerle uyarılan hücrelerde meydana gelen DNA hasarına bağlı

SCE indüklenmektedir (90). DNA tamir mekanizmasının bozulması durumunda ise indüklenmeye bağlı SCE normale kıyasla artış göstermektedir.

Çalışmada, sağlıklı kontrol bireye ve DB-2471 no'lu hastaya ait periferik kan hücrelerinden 25 metafaz plağında spontan ve Mitomycin C (MMC) uyarımına bağlı SCE analizi yapıldı. MMC ile indüklenen SCE'nin hastaya ait hücrelerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p<0.001$) (Tablo 8).

Tablo 8. DB-2471 no'lu hasta bireye ait lenfosit hücre kültüründe spontan ve MMC ile uyarılmış SCE sıklığı

	Spontan SCE (25 metafaz)	MMC ile indüklenen SCE (25 metafaz)
Kontrol	9.40 ± 3.58	13.16 ± 4.35
Hasta	9.12 ± 4.01	17.48 ± 4.06
Anlamlılık (p)	>0.05	<0.001

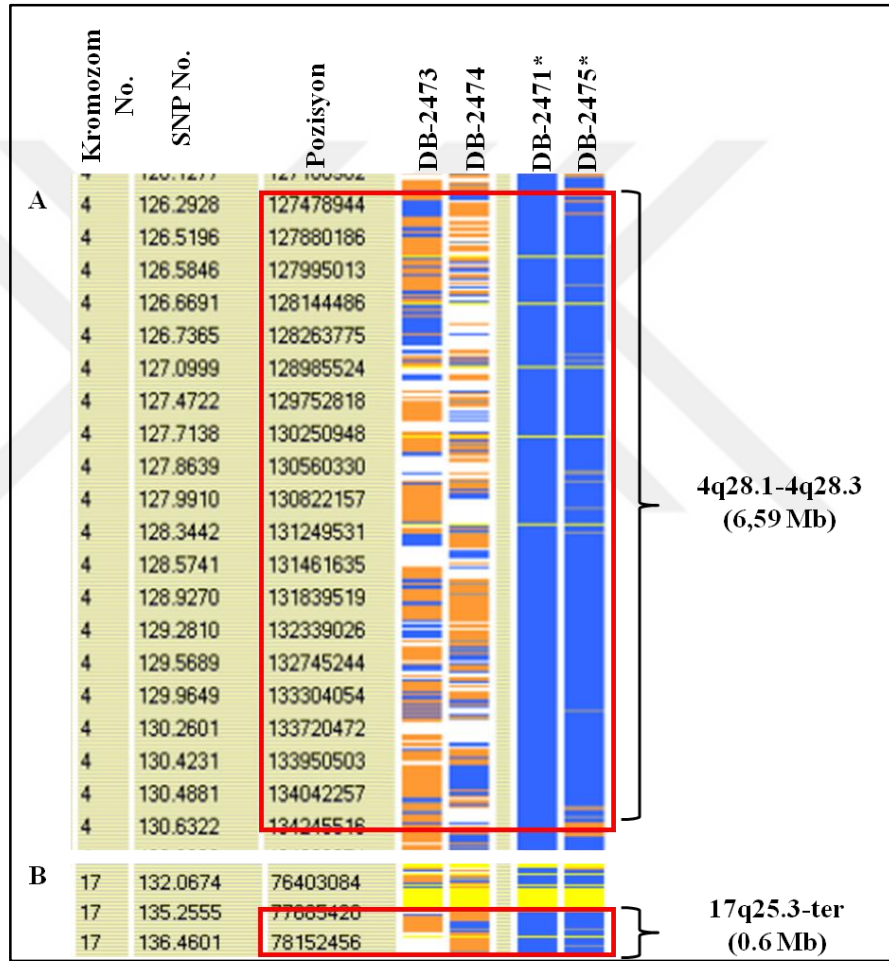
6.4. Genom Taraması ve Bağlantı Bölgesinin Belirlenmesi

6.4.1. Genom Boyu Homozigotluk Taraması

SS_CNS_25 ailesinden DB-2471 (hasta), DB-2473, DB-2474 ve DB-2475 no'lu bireylere ait DNA örnekleri genom boyu homozigotluk taramasına gönderildi. Genom boyu homozigotluk taramasında, Affymetrix GeneChip 250K SNP array platformu kullanıldı. Elde edilen SNP genotip verileri VIGENOS-PLUS yazılım programı ile analiz edildi. Analiz verilerine göre etkilenmiş iki bireyde de ortak olan ve hastalıkla birlikte homozigot olarak kalıtılan iki kritik bölge tespit edildi. Kritik bölgelerden birincisi, 4q28.1-28.3 lokusunda rs12641759-rs17584535 SNP'leri arasında kalan 6,59 Mb'lık bir bölgeydi (Şekil 11A). İkinci kritik bölge ise 17. kromozom üzerinde 17q25.3 lokusunda rs12952655 ve rs7406119 SNP'leri arasında yer alan yaklaşık 0.6 Mb büyüklüğünde bir bölgeydi (Şekil 11B).

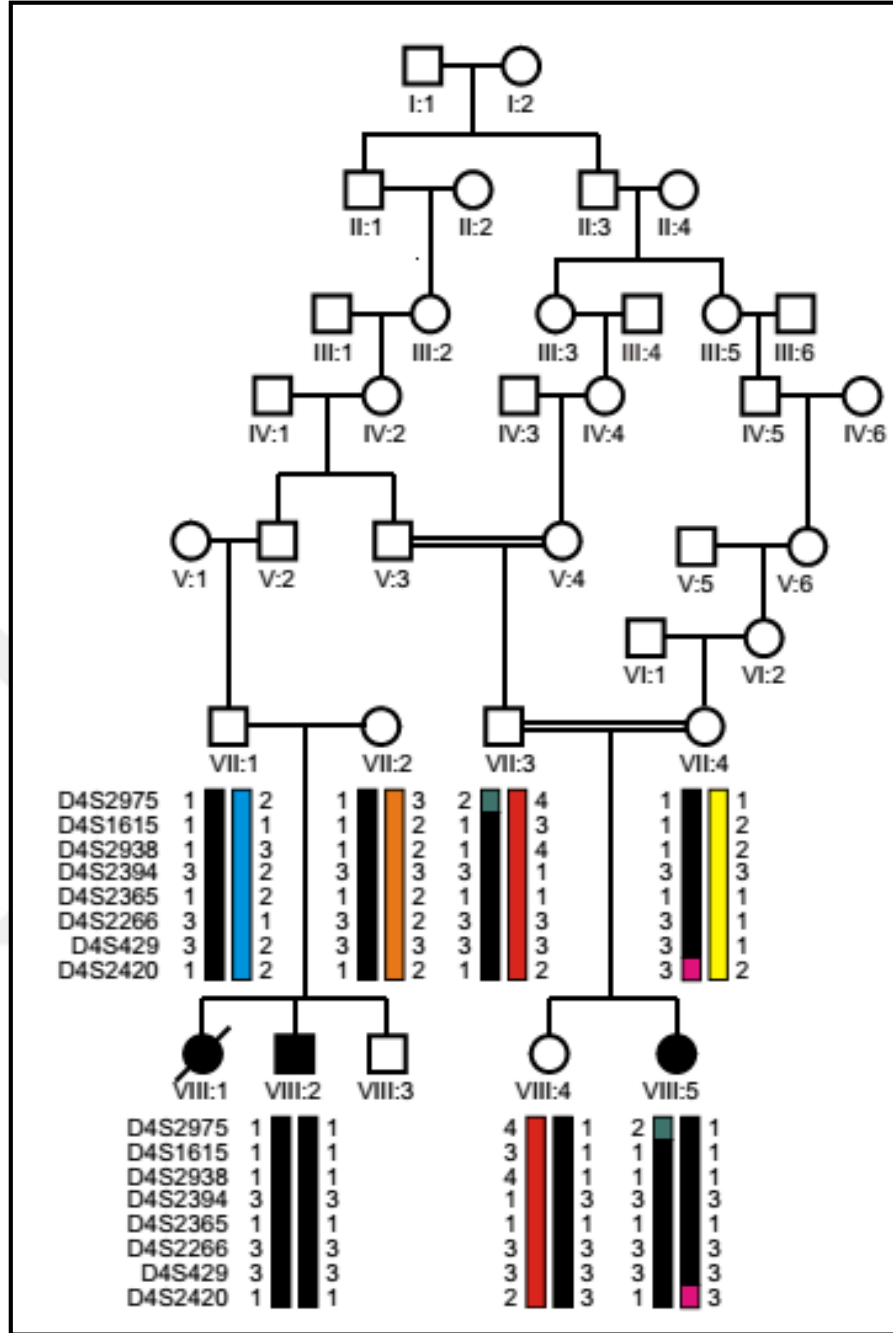
6.4.2. Bağlantı Bölgelerinin STRP Markırları ile Test Edilmesi ve Haplotip Analizi

Genom boyu homozigotluk taramasından 4'üncü kromozom üzerinde q28.1-28.3 lokusunda rs12641759-rs17584535 SNP'leri arasında kalan 6.59 Mb'lık bölge ve 7'inci kromozom üzerinde 17q25.3 lokusunda rs12952655-rs7406119 SNP'leri arasında kalan 0.6 Mb'lık iki kritik bölgenin ailede hastalıkla birlikte kalıtılıp kalıtılmadığı SNP'lere kıyasla daha heterojen olan STRP markırları ile informatif olabilecek bütün aile bireyleri kullanılarak test edildi.

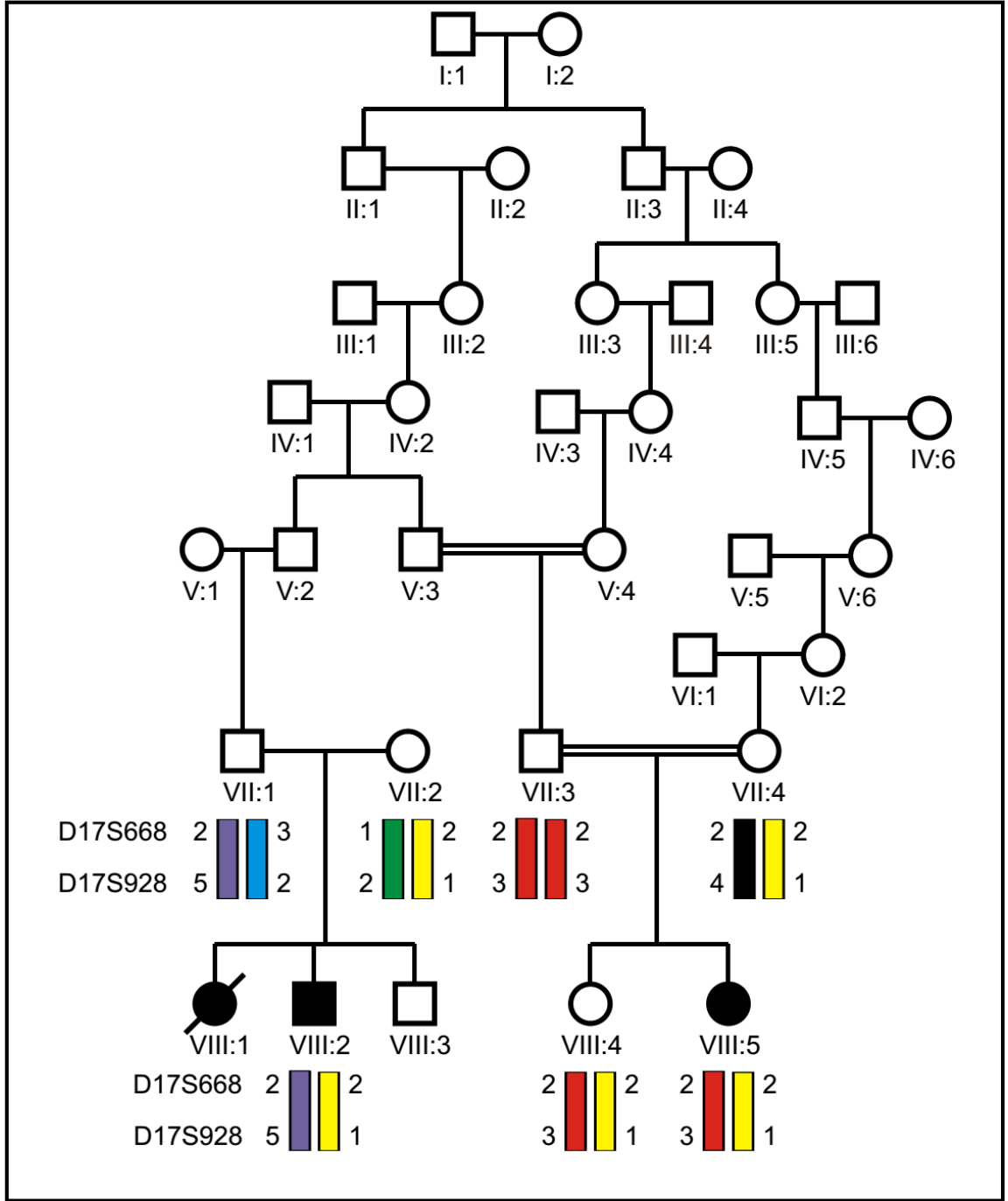


Şekil 11. 250K SNP array verilerinin VIGENOS ile analizi. Proband ile aynı homozigot genotipi (AA, BB) paylaşanlar mavi, probandın tersi homozigot genotipi gösteren bireyler (indeks vakanın AA, diğer bireylerin BB olduğu durumlar) beyaz, heterozigot olanlar (AB) turuncu, bilgi alınamayan genotipler (anne-baba ve indeks vakanın her üçünün de AB olduğu genotipler) ise sarı renkte işaretlendi. Genom taramasına alınan her bir bireyin DNA banka numaraları şeklin üzerinde gösterildi. Hasta bireyler “*” ile işaretlendi. Homozigot kalıtılan bölgeler kırmızı çerçeve içerisinde vurgulanmıştır.

4. kromozom üzerinde belirlenen 6.59 Mb'lık bölge sekiz adet STRP markırı ile 17. kromozom üzerinde belirlenen 0.6 Mb'lık bölge ise 2 adet STRP markırı ile test edildi (Tablo 2). Her iki bölge için oluşturulan haplotip, 4'üncü kromozom üzerinde tespit edilen kritik bölgenin ailedeki etkilenmiş bireylerde (DB-2471 ve DB-2475) aynı haplotipin homozigot olarak kalıtıldığı görüldü (Şekil 12). Hasta bireylerin annelerinde, babalarında ve DB-2471'in sağlıklı kardeşinde ise bölge heterozigot olarak kalıtılmaktaydı. Bu durum, DB-2475 nolu hasta bireyin anne ve babasının akraba olduğunu da göstermekteydi. 4. kromozom üzerinde ailede hastalıkla birlikte kalıtılan bölgenin sentromerik taraftan sınırı D4S2975 ve telomerik taraftan sınırı D4S2420 STRP markırları olarak belirlendi (Şekil 12). Diğer taraftan, SNP analizine göre 17. kromozom üzerinde tespit edilen kritik bölgenin ailede hastalıkla birlikte kalıtılmadığı, SNP analizinin verdiği sonucun yanlış pozitiflik olduğu gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 12. 4q28.1-28.3 kromozom bölgesinin STRP markırları ile haplotip analizi. Siyah bar ailede hastalıkla birlikte kalıtılan mutant haplotipi göstermektedir. STRP markırları UCSC Human Genome Browser Feb.2009 (GRCh37/hg19) veritabanı kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 13. 17q25.3-ter kromozom bölgesinin STRP markırları ile haplotip analizi. STRP markırları UCSC Human Genome Browser Feb.2009 (GRCh37/hg19) veritabanı kullanılarak belirlenmiştir.

6.5. Bağlantı Bölgesinde Bulunan Aday Genlerin Tespit Edilmesi

SS_CNS_25 ailesinde rs12641759-rs17584535 SNP'leri arasında kalan 6,59 Mb'lık kritik bölgede yer alan genler çeşitli veri tabanları kullanılarak incelendi. Bölgede 10 adet bilinen gen (*INTU*, *SLC25A31*, *HSPA4L*, *PLK4*, *MFSD8*, *LARP1B*, *PGRMC2*, *PHF17*, *SCLT1*, *Mir_340*), 7 adet EST (AK090904, C4orf29, AK093416, C4orf33, BC035172, BC041448, BC131768) ve 1 adet U6 dizisi bulunmaktaydı (Şekil 14). Bu genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyonları, etkileştikleri proteinler, hastalıklarla ilişkileri literatür taraması yapılarak incelendi. Bölge içinde yer alan *PLK4* (Polo-like kinase 4) geni tarafından kodlanan PLK4 hücre döngüsü boyunca sentriollerde lokalize olup sentriol duplikasyonunda rol oynamaktadır. PLK4 proteininin Seckel sendromu ile ilişkilendirilmiş olan CEP152 proteini ile etkileşim içinde olması da dikkate alınarak SS_CNS_25 ailesinde *PLK4* geni mutasyon taraması yapmak üzere öncelikli aday gen olarak belirlendi.

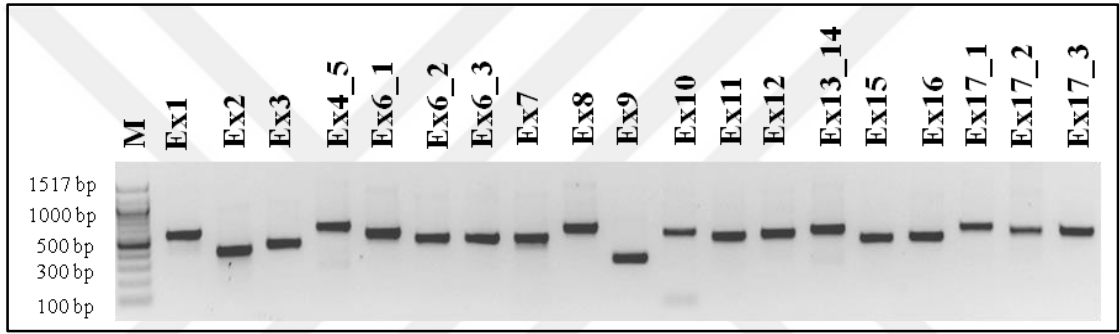


Şekil 14. SS_CNS_25 ailesinde kritik bölge içinde bulunan genler. 4q28.1-4q28.3 kromozom bölgesinde rs12641759-rs17584535 SNP'leri arasında kalan 6,59 Mb'lık bölgede yer alan genler, U6 ve EST'ler. PLK4 geni kırmızı daire içinde gösterilmiştir.

6.6. *PLK4* Geninde Mutasyon Taraması

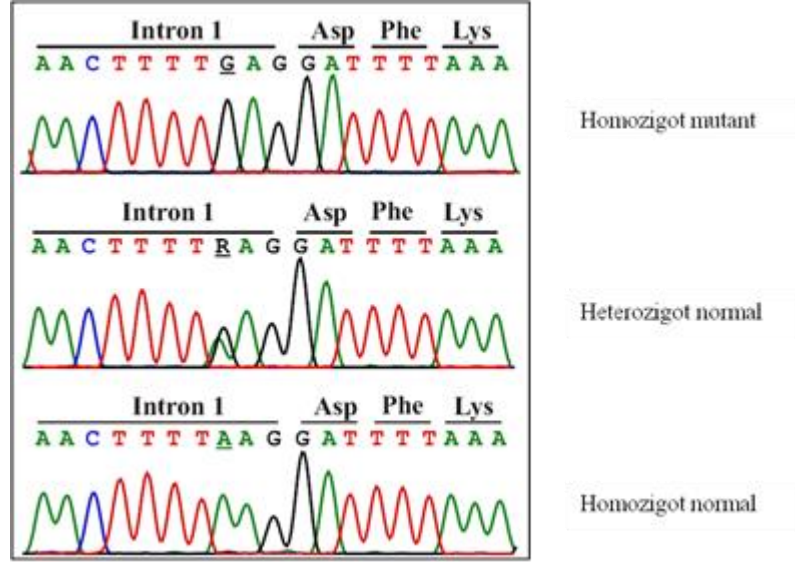
PLK4 geninin, 3 adet kırılma varyantı bulunmaktadır. *PLK4* kırılma varyantı 1 (NM_014264), 16 ekzon içermekte ve 970 amino asitten oluşan bir proteinini kodlamaktadır. *PLK4_2* varyantı (NM_001190799) 15 ekzon içermekte olup 938 amino asitlik *PLK4* proteinini kodlamaktadır. *PLK4_3* varyantı (NM_001190801), 16 ekzondan oluşmaktadır ve 929 amino asitten oluşan bir protein kodlamaktadır.

Mutasyon taraması için DB-2574 no'lu hastanın genomik DNA'sı kullanılarak *PLK4* geninin tüm ekzonları ve ekzon-intron bağlantı bölgeleri amplifiye edildi (Şekil 15)



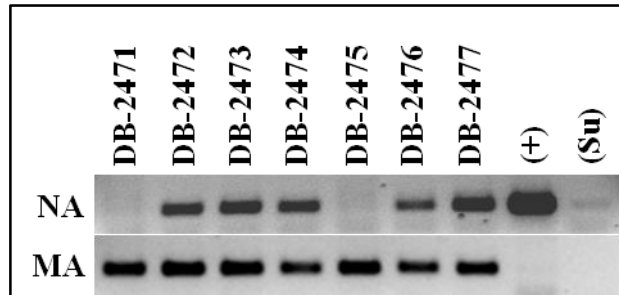
Şekil 15. *PLK4* geninin PCR ile çoğaltılması. Çoğaltılan tüm ekzonlar %2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. M; NEB 100bp Markır; Ex;*PLK4* genine ait ekzonlar

Elde edilen PCR ürünleri temizlendikten sonra amplifikasyon primerleri ile dizlenerek *PLK4* geninin referans dizisi ile karşılaştırıldı ve *PLK4* geninin birinci intronunun evrimsel süreçte korunmuş olan kırılma alıcı bölgesinde bulunan "-3" pozisyonundaki adeninin homozigot olarak guanine dönüştüğü (c.31-3A>G) görüldü (Şekil 16).



Şekil 16. PLK4 geninde meydana gelen c.31-3A>G değişimine ait kromatogram. Üst kısım; homozigot mutant birey, orta kısım; heterozigot normal birey, alt kısım; homozigot normal birey. R: A/T heterozigot

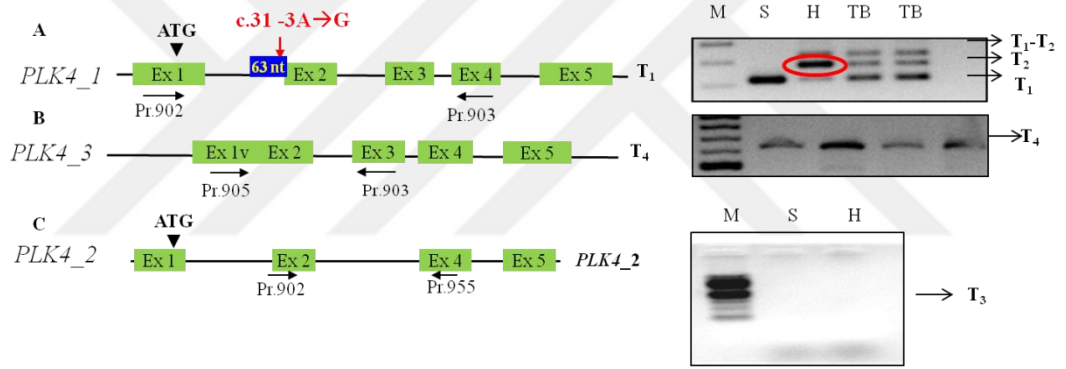
Bilinen SNP'lere karşılık gelmeyen c.31-3A>G değişimi ARMS yöntemi ile tüm aile bireylerinde ve 355 sağlıklı kontrol grubunda (710 kromozom) test edildi. c.31-3A>G değişimi ailede hastalıkla birlikte kalıtılırken (Şekil 17) 355 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda bu değişime rastlanmadı.



Şekil 17. c31-3A>G değişiminin SS_CNS_25 ailesinde dağılımının ARMS yöntemi ile gösterilmesi. NA: Normal allel MA: Mutant Allel, (+): Sağlıklı Birey, (-): Su

6.7. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) ve Quantitative-Real Time PCR (qRT-PCR) ile PLK4 Kırpılma Varyantlarının Analizi

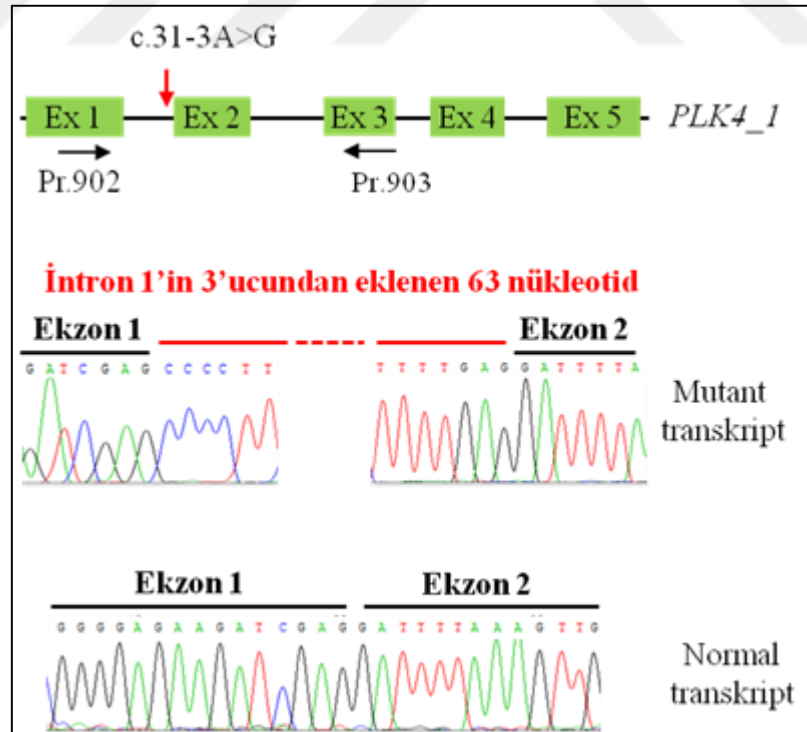
PLK4 geninin birinci intronunun alıcı kırpılma bölgesinde gözlenen c.31-3A>G değişiminin kırpılda bozulmaya neden olup olmadığını tespit etmek için, c.31-3A>G değişimi homozigot olarak bulunduran DB-2471 no'lu hasta bireyden, değişimi heterozigot olarak bulunduran iki bireyden (DB-2471'in anne ve babası), ve sağlıklı bir bireyden alınan periferik kandan izole edilen total RNA RT-PCR ile cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA örnekleri ekzon 1 ve ekzon 3'e özgü primerleri kullanılarak PCR yapıldı ve agaroz jelde analiz edildi (Şekil 18).



Şekil 18. PLK4 cDNA'sının RT-PCR ile çoğaltılması sonucunda görülen değişiklikler. M:Markır, S. Sağlıklı birey, H. DB-2471 no'lu hasta, TB Taşıyıcı ebeveynler. A) T1: Normal transkript (970 aa), T2: Mutant transkript, T1-T2: Heterodupleks. B)T3: *PLK4_3* varyantı (T4). C)*PLK4_2* varyantı (T3).

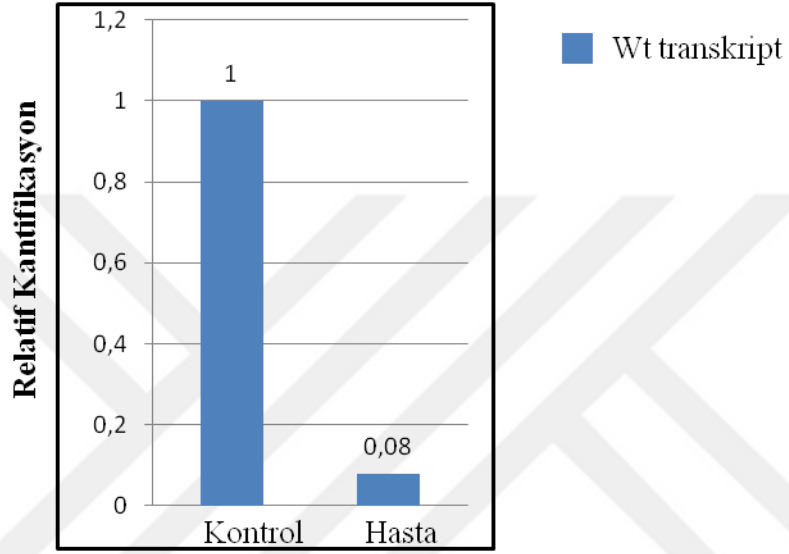
Sağlıklı bireyde beklenen boyutlarda tek band PCR ürünü (T1) gözlenirken, hasta bireyde düşük konsantrasyonlu normal ürünün (T1) yanında daha büyük boyutta bir PCR ürünü bandı (T2) gözlemlendi. Taşıyıcı bireylerde ise normal bireylerde ve hasta bireyde görülen her iki PCR ürünü bandı (T1 ve T2) gözlemlendi (Şekil 18A). cDNA üzerinden yapılan PCR ile elde edilen ürünler jelden alınarak dizilendiğinde T1 bandının sağlıklı bireylerde beklenen ürün olduğu görüldü. Hasta ve taşıyıcılarda gözlenen T2 bandında ise birinci intronun 3' ucundan 63 nükleotidlik bir dizinin c.31-3A>G değişimine bağlı olarak ikinci ekzonun yapısına dahil olduğu gözlemlendi. *PLK4_2* no'lu varyantın ekspresyonuna kanda ve fibroblastlarda rastlanmadı (Şekil 18C) *PLK4_3* no'lu varyantın (T3) ekspresyonunda bir değişime rastlanmadı (Şekil 18B)

In silico analiz, birinci intronun 3' ucundan 63 nükleotidlik bir dizinin kırılma sırasında ekzon 2'ye dahil olması mRNA'nın okuma çerçevesini bozarak protein sentezinin erken sonlanmasına (p.Asp11Profs14Stop) neden olduğunu göstermektedir. (Şekil 19).



Şekil 19. c.31-3A>G değişiminin sonucunda hastada görülen varyantlar. c.31-3A>G değişimi sonucunda Intron1'den 63 nt'nin Ekzon2'ye ilave olduğu mutant transkript ve normal *PLK4_1* varyantı

Hasta bireylerde mutant transkript (T2) ile birlikte düşük miktarda da olsa normal transkriptin (T1) görülmesi üzerine hasta bireylerde normal transkriptin miktarını belirlemeye yönelik Kantitatif-Real Time PCR yapıldı. Çalışmada 970 aa'lık protein kodlayan *PLK4_1* varyantı analiz edildi. Hasta bireylere ait hücrelerde normal *PLK4_1* varyantı transkriptinin 12.5 kat (1/0.08) azaldığı gösterildi (Şekil 20).



Şekil 20. *PLK4_1* qRT-PCR analizi. Normal *PLK4_1* transkriptinin hasta sağlıklı kontrole oranla 12.5 kat azaldığı gösterildi.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Seckel sendromu (OMIM:210600), doğum öncesi ve doğum sonrasında gelişme geriliği, mikrosefali, kısa boy, arkaya eğilimli alın, çıkıntılı burun, küçük çene, iskelet anomalileri gibi dismorfik bulgular ile karakterize otozomal resesif kalıtım gösteren klinik ve genetik olarak heterojen, nadir bir hastalıktır (4, 5, 24, 91). Seckel sendromunun klinik tanımlanması ilk olarak 1960 yılında yapılmış olmasına rağmen hastalıkla ilişkili ilk lokusun keşfi ancak 2000 yılında mümkün olmuştur (26). İnsan genom projesinin sonuçlarının 2003 yılında açıklanması ve bu sonuçlara bağlı olarak gelişen yüksek çözünürlüklü genom tarama, bağlantı analizi, ekzom dizileme ve tüm genom dizileme stratejileri hastalıkların etiyolojisinde rol oynayan genlerin tanımlanmasını hızlandırmıştır (19). Bu bağlamda Seckel sendromundan sorumlu genlerin keşfedilmesi sürecinde de önemli gelişmeler olmuştur (25-27).

Bugüne kadar Seckel sendromu ile ilgili yedi lokus (SCKL1-7) tanımlanmıştır ve bu lokuslardan altısında hastalığın etiyolojisinde rol oynayan gen gösterilmiştir. İlk gen (*ATR*) 2003 yılında Seckel sendromu ile ilişkilendirilirken, diğer altı gen (*CENPJ*, *CEP152*, *CEP63*, *CtIP/RBBP8* ve *NIN*) 2010-2012 yılları arasında tanımlanmıştır (8, 9, 11, 12, 26, 27, 29). Bütün bu gelişmelere rağmen Seckel sendromu tanısı alan ve bilinen lokuslara bağlantı göstermeyen ailelerin varlığı hastalıkla ilişkili olabilecek yeni genlerin var olabileceğini işaret etmektedir.

Bu noktadan hareketle, bu tez çalışması kapsamında Seckel sendromu tanısı almış iki bireyin bulunduğu, akraba evliliği görülen ve bilinen Seckel sendromu genlerine bağlantı göstermeyen SS_CNS_25 ailesinde genom boyu homozigotluk taraması gerçekleştirildi. Homozigotluk taraması sonucunda, 4q28.1-28.3 kromozom lokusunda 6.5 Mb'lık bir bölgenin ailede hastalıkla birlikte kalıtıldığı tespit edildi. Ailede hastalıkla birlikte kalıtılan kritik bölge içerisinde 9 adet protein kodlayan gen (*INTU*, *SLC25A31*, *HSPA4L*, *PLK4*, *MFSD8*, *LARP1B*, *PGRMC2*, *PHF17* ve *SCLT1*), bir mikro RNA kodlayan gen (*Mir_340*), 7 adet EST (*AK090904*, *C4orf29*, *AK093416*, *C4orf33*, *BC035172*, *BC041448*, *BC131768*) ve 1 adet küçük nükleer RNA (*U6*) kodlayan dizisi bulunmaktaydı.

Kritik bölge içinde yer alan ve Polo-like kinaz ailesinin bir üyesi olan PLK4 proteini sentriol duplikasyonunda rol oynamaktadır (80, 92-94). Hücrede sentriol duplikasyonu her hücre döngüsünde bir kez meydana gelecek şekilde kontrol edilmektedir (84). *Plk4*'ün siRNA ile susturulduğu fare fibroblast hücrelerinde, sentriol duplikasyonu engellenmektedir. *PLK4*'ün aşırı ekspresyonunda, hücrelerde gereğinden fazla sentriol duplikasyonu meydana gelmektedir. Bu durum, genomik olarak kararsız hücrelerin oluşumuna yol açmaktadır (83).

Diğer taraftan, PLK4 kriptik polo box domaini ile daha önce Seckel sendromu ile ilişkilendirilmiş olan CEP152 ile etkileşmekte ve bu etkileşim PLK4'ün sentrozoma lokalizasyonunu kontrol etmektedir (92). Buna ek olarak, Seckel sendromu ile ilişkilendirilen CENPJ ve CEP63 proteinleri de sentriol duplikasyonunda rol almakta olup CEP63 proteini CEP152'nin sentrozoma lokalizasyonunu sağlamaktadır (53, 84). *Plk4* geni üzerinde yapılan çalışmalar, bu genin embriyonik gelişimde önemli rol oynadığını göstermiştir (95). Bu verilerden yola çıkılarak, çalışmamızda kritik bölge içerisinde yer alan *PLK4* geni SS_CNS_25 ailesi için aday gen olarak seçildi.

PLK4 geninin kodlayan dizileri ve ekzon-intron bağlantı bölgelerini içine alacak şekilde yapılan dizi analizi sonucunda birinci intronunun kırpılma alıcı bölgesinde homozigot c.31-3A>G değişimi gözlemlendi (Şekil 16). Ailede hastalıkla birlikte kalıtılan ve sağlıklı kontrol bireylerde görülmeyen bu değişim RNA seviyesinde incelendiğinde, p.Asp11Profs14Stop mutasyonuna yol açarak hasta bireylerde 970 aa'lık en uzun varyantın (*PLK4_1*) mRNA sentezinin %92 oranında erken sonlanma ile sonuçlandığı, genin %8 oranında minimal düzeyde fonksiyonel olabilecek mRNA sentezlediği gösterildi.

Günümüze kadar insan genomunda tanımlanmış ve genetik bir hastalıkla ilişkilendirilmiş mutasyonların yaklaşık %9.2'sini kırpılma mekanizmasını bozan mutasyonlar oluşturmaktadır (96). Kırpılma mekanizmasını bozan mutasyonlar normal transkriptin tamamen ortadan kalkmasına neden olabilirken, kırpılmayı kısmi olarak da etkileyebilmekte ve bir miktar fonksiyonel proteinin üretimine fırsat tanımaktadır (97, 98).

Seckel sendromu ile ilk olarak ilişkilendirilen *ATR* geni özellikle tek zincir DNA kırıklarının tamirinde görev alarak genomik kararlılığın korunmasında önemli rol oynamaktadır (33, 99). İnsanda gösterilen ilk *ATR* mutasyonu hipomorfik bir mutasyon olup, minimal düzeyde de olsa protein sentezinin gerçekleştiği gösterilmiştir (12). Bugüne kadar insanda *ATR*'nin fonksiyonunun tamamen ortadan kalkmasına yol açabilecek bir mutasyona rastlanmamıştır. Ayrıca *Atr*^{-/-} farelerin E7.5'inci günde ölmeleri *ATR* geninin yokluğunun tolere edilemeyeceğini göstermektedir (41, 100).

Benzer şekilde, *Plk4*^{-/-} farelerin de embriyonik dönemde ölmesi bu genin yokluğunun yaşamları bağdaşmadığını göstermektedir (82). Çalışmamızda SS_CNS_25 ailesinde *PLK4* geni üzerinde gösterdiğimiz mutasyonun hipomorfik oluşu ve *PLK4_3* (929 aminoasitlik en kısa varyant) varyantının c.31-3A>G mutasyonundan etkilenmemesi, mutasyonu hipomorfik şekilde taşıyan hasta bireylerin yaşamları bağdaşmasının kaynağı olarak görülmektedir. *ATR* ve *PLK4* genlerinin ekspresyonlarının azalması ya da tamamen ortadan kalkması durumunda ortaya çıkan benzer hücresel mekanizmaların etkilenmesi ve ortak fenotipin ortaya çıkması bu iki genin hücre içinde ortak mekanizmalarda rol alabileceğini düşündürmektedir.

Sentrozom, hayvan hücrelerinde mikrotübül demetlerinin geometrilerinin düzenlenmesi, hücrenin şekil, polarite ve hareketliliğinin belirlenmesini, iğ ipliklerinin oluşumu, kromozomların yavru hücrelere dağılımı ve hücre bölünmesinin kinetiğini kontrol eden dinamik bir yapıdır (101, 102). Hücre bölünmeye tek bir sentrozomla başlamaktadır, ancak hücre bölünmesi sırasında sentriollerin kendilerini bir kere duplike etmeleri zorunludur (103). Sentriol duplikasyonunda rol oynayan proteinler genomik kararlılığın sürdürülmesi için de büyük öneme sahiptir (52, 55, 92, 94, 102, 104).

Seckel sendromu ile ilişkilendirilmiş olan *CENPJ*, *CEP152* ve *CEP63* genlerinin kodlağı proteinler sentriol duplikasyonunda ve genomik kararlılığının sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Bu genlerin eksikliğinde genomik kararlılık bozulmakta ve sonuçta hücreler apoptoza yönlendirilmektedir (104, 105). Bu durum gerek prenatal, gerekse postnatal dönemde aşırı kütle kaybına neden olarak Seckel sendromunun en belirgin fenotipik bulgusu olan mikrosefali ve gelişme geriliğine yol açmaktadır (106).

Benzer şekilde, *Plk4^{-/-}* knock-out farelerle yapılan çalışmalar ile Plk4'ün sentriol duplikasyonunda kritik öneme sahip olduğu, Plk4'ün eksikliğinde sentrioller duplike olamazken Plk4'ün aşırı ekspresyonunda sentriollerin kontrolsüz şekilde duplike olduğu gösterilmiştir (107). Ayrıca, *Plk4^{-/-}* farelere ait hücrelerin, hücre döngüsünde yoğun bir şekilde tutuklanarak apoptoza yönlendirildiği, *Plk4^{-/-}* fare embriyolarının normal farelere göre daha küçük olduğu gösterilmiştir (82, 108)

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen bireylere ait mutant *PLK4* lenfositlerinde yapılan karyotip analizi sonucunda %13.6 oranında aneuploidi görülmesi ile birlikte yapılan SCE analizinde de anlamlı seviyede artış gözlenmesi genomik kararlılığın bozulduğunu göstermektedir ve bu durum çalışma kapsamında gösterdiğimiz mutasyonun Seckel sendromu ile ilişkisini desteklemektedir. Diğer taraftan, bu bulgular PLK4 ve daha önce Seckel sendromu ile ilişkilendirilmiş CENPJ, CEP152 ve CEP63 proteinlerinin kesişen moleküler mekanizmalarda rol oynayabileceğine kanıt oluşturmaktadır (29, 52, 53, 104).

DNA hasarlarının tamirinde, ATR tek zincir kırıklarının onarımına katılırken ATM ise çift zincir kırıklarının onarımında anahtar rol oynamaktadır (109). Çift zincir DNA kırıklarının tamirinde Chk2 ve Cdc25'in ATM ile aynı yolda rol oynayarak hücre döngüsünün G2-M geçişini kontrol ettiği bilinirken, PLK4'ün de Chk2 ve CDC25C'yi fosforilleyerek bu yolda görev aldığı gösterilmiştir (110-113).

Kardeş kromatid değişimindeki artış (SCE), çift zincir DNA kırıklarının tamirindeki aksaklığın bir göstergesidir. PLK4 mutant hücrelerde gördüğümüz SCE artışı PLK4'ün DNA tamir mekanizması sürecinde de kritik öneme sahip olduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan CEP152- Seckel hücrelerinde de anlamlı şekilde artan SCE profilinin görülmesi (29), bu iki proteinin genomik kararlılıkta benzer veya kesişen yollarda rol aldıklarını düşündürmektedir.

Seckel sendromu ile ilişkilendirilen genlerin deneysel hayvan modellerinin oluşturulmasından elde edilen verilere göre, *Atr^{-/-}* knock out farelerin ve *Plk4^{-/-}* knock out farelerin embriyonik gelişimin erken safhalarında ölmesi, bu proteinlerin gelişim sırasında kritik öneme sahip olduklarını göstermiştir (82, 114). Bu genlerin insanda embriyonik dönemde yokluğunun yol açabileceği fenotipin doğum öncesi evreyi şiddetli şekilde etkileyerek fetüsün prenatal dönemde kaybına yol açabileceği

düşünülmektedir. Bu nedenle ilave hasta bireylere ulaşmak kolay olmamaktadır. Bunun yanında, Seckel sendromu tanısı almış ve bilinen lokuslara bağlantı göstermeyen ilave ailelerde yapılan mutasyon taramasında, *PLK4* üzerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum, Seckel sendromunun hem nadir kalıtılan bir hastalık olması hem de genetik olarak yüksek heterojenite göstermesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu veriler bize Seckel sendromunun etiyolojisinde başka genlerin de rol oynayabileceğini de düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile literatürde ilk defa, sentriol duplikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarında rol oynayan *PLK4* geninde meydana gelen mutasyonun Seckel sendromuna yol açtığı gösterilmiştir.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Otozomal resesif kalıtım gösteren Seckel sendromunun genetik etiyolojisinin belirlenmesini amaçlayan bu çalışma kapsamında SS_CNS_25 ailesinde genetik haritalama yapıldı ve bu ailede hastalığın 4q21.1-28.3 kromozom bölgesinde rs12641759-rs17584535SNP'leri arasındaki 6.59Mb'lık bölge ile kalıtıldığı belirlendi.
2. Hasta bireylerde *PLK4* geninde yapılan mutasyon taraması sonucunda intron 1'deki kırılma alıcı bölgesinde c.31-3A>G değişimi görüldü.
3. 355 kişiden oluşan sağlıklı kontrol grubunda bu değişime rastlanmadı.
4. *PLK4* üzerinde belirlenen c.31-3A>G değişiminin intron 1'den 63 nükleotidin ekzon 2'ye dahil olarak protein sentezinin erken sonlanmasına (p.Asp11Profs14Stop) neden olduğu gösterildi.
5. Yapılan SCE analizinde *PLK4*'de meydana gelen mutasyon sonucunda hasta bireylerde genomik kararsızlığın arttığı gösterildi.
6. *PLK4* proteininin genomik kararlılık ve DNA tamir mekanizmalarındaki rollerinin araştırılmasının ve *PLK4* kırılma varyantlarının her birinin fonksiyonlarının ayrı ayrı araştırılmasına yönelik yeni çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

9. KAYNAKLAR

1. Gut IG (2013). New sequencing technologies. Clin Transl Oncol 15: 879-881.
2. Consortium IHGS (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 431: 931-945.
3. NCBI (2013). OMIM Statistics for January 7, 2013. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html>. (Accessed 01 Aralık, 2013).
4. Seckel HPG (1960). Bird-headed Dwarfs: Studies in Developmental Anthropology Including Human Proportions. Springfield, Ill.: Charles C Thomas.
5. McKusick VA, Mahloudji M, Abbott MH, Lindenberg R and Kepas D (1967). Seckel's bird-headed dwarfism. N Engl J Med 277: 279-286.
6. Shanske A, Caride DG, Menasse-Palmer L, Bogdanow A and Marion RW (1997). Central nervous system anomalies in Seckel syndrome: report of a new family and review of the literature. Am J Med Genet 70: 155-158.
7. Dauber A, Lafranchi SH, Maliga Z, Lui JC, Moon JE, McDeed C, Henke K, Zonana J, Kingman GA, Pers TH, Baron J, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN, Harris MP and Hwa V (2012). Novel microcephalic primordial dwarfism disorder associated with variants in the centrosomal protein ninein. J Clin Endocrinol Metab 97: E2140-2151.
8. Sir JH, Barr AR, Nicholas AK, Carvalho OP, Khurshid M, Sossick A, Reichelt S, D'Santos C, Woods CG and Gergely F (2011). A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles. Nat Genet 43: 1147-1153.
9. Qvist P, Huertas P, Jimeno S, Nyegaard M, Hassan MJ, Jackson SP and Borglum AD (2011). CtIP Mutations Cause Seckel and Jawad Syndromes. PLoS Genet 7: e1002310.
10. Guernsey DL, Jiang H, Hussin J, Arnold M, Bouyakdan K, Perry S, Babineau-Sturk T, Beis J, Dumas N, Evans SC, Ferguson M, Matsuoka M, Macgillivray C, Nightingale M, Patry L, Rideout AL, Thomas A, Orr A, Hoffmann I, Michaud JL, Awadalla P, Meek DC, Ludman M and Samuels ME (2010). Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. Am J Hum Genet 87: 40-51.
11. Al-Dosari MS, Shaheen R, Colak D and Alkuraya FS (2010). Novel CENPJ mutation causes Seckel syndrome. J Med Genet 47: 411-414.

12. O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA and Goodship JA (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 33: 497-501.
13. Klingseisen A and Jackson AP (2011). Mechanisms and pathways of growth failure in primordial dwarfism. *Genes Dev* 25: 2011-2024.
14. Nussbaum R, McInnes, RR, Willard, HF (2005) Thompson & Thompson: Medical Genetics, 6th ed., Güneş Kitabevi, Ankara, 299-310.
15. Janssen A and Medema RH (2013). Genetic instability: tipping the balance. *Oncogene* 32: 4459-4470.
16. Womack JE, Jang HJ and Lee MO (2012). Genomics of complex traits. *Ann N Y Acad Sci* 1271: 33-36.
17. Weatherall DJ (2000). Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases. *BMJ* 321: 1117-1120.
18. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB and Lowry RB (1988). Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am J Hum Genet* 42: 677-693.
19. Collins FS, Morgan M and Patrinos A (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 300: 286-290.
20. Gorlin RJ, Cervenka J, Moller K, Horrobin M and Witkop CJ, Jr. (1975). Malformation syndromes. A selected miscellany. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11: 39-50.
21. Bongers EM, Opitz JM, Fryer A, Sarda P, Hennekam RC, Hall BD, Superneau DW, Harbison M, Poss A, van Bokhoven H, Hamel BC and Knoers NV (2001). Meier-Gorlin syndrome: report of eight additional cases and review. *Am J Med Genet* 102: 115-124.
22. Majewski F, Ranke M and Schinzel A (1982). Studies of microcephalic primordial dwarfism II: the osteodysplastic type II of primordial dwarfism. *Am J Med Genet* 12: 23-35.
23. Hall JG, Flora C, Scott CI, Jr., Pauli RM and Tanaka KI (2004). Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II): natural history and clinical findings. *Am J Med Genet A* 130A: 55-72.

24. Majewski F and Goecke T (1982). Studies of microcephalic primordial dwarfism I: approach to a delineation of the Seckel syndrome. *Am J Med Genet* 12: 7-21.
25. Faivre L, Le Merrer M, Lyonnet S, Plauchu H, Dagoneau N, Campos-Xavier AB, Attia-Sobol J, Verloes A, Munnich A and Cormier-Daire V (2002). Clinical and genetic heterogeneity of Seckel syndrome. *Am J Med Genet* 112: 379-383.
26. Goodship J, Gill H, Carter J, Jackson A, Splitt M and Wright M (2000). Autozygosity mapping of a seckel syndrome locus to chromosome 3q22. 1-q24. *Am J Hum Genet* 67: 498-503.
27. Borglum AD, Balslev T, Haagerup A, Birkebaek N, Binderup H, Kruse TA and Hertz JM (2001). A new locus for Seckel syndrome on chromosome 18p11.31-q11.2. *Eur J Hum Genet* 9: 753-757.
28. Kilinc MO, Ninis VN, Ugur SA, Tuysuz B, Seven M, Balci S, Goodship J and Tolun A (2003). Is the novel SCKL3 at 14q23 the predominant Seckel locus? *Eur J Hum Genet* 11: 851-857.
29. Kalay E, Yigit G, Aslan Y, Brown KE, Pohl E, Bicknell LS, Kayserili H, Li Y, Tuysuz B, Nurnberg G, Kiess W, Koegl M, Baessmann I, Buruk K, Toraman B, Kayipmaz S, Kul S, Ikbali M, Turner DJ, Taylor MS, Aerts J, Scott C, Milstein K, Dollfus H, Wieczorek D, Brunner HG, Hurles M, Jackson AP, Rauch A, Nurnberg P, Karaguzel A and Wollnik B (2011). CEP152 is a genome maintenance protein disrupted in Seckel syndrome. *Nat Genet* 43: 23-26.
30. Mokrani-Benhelli H, Gaillard L, Biasutto P, Le Guen T, Touzot F, Vasquez N, Komatsu J, Conseiller E, Picard C, Gluckman E, Francannet C, Fischer A, Durandy A, Soulier J, de Villartay JP, Cavazzana-Calvo M and Revy P (2013). Primary microcephaly, impaired DNA replication, and genomic instability caused by compound heterozygous ATR mutations. *Hum Mutat* 34: 374-384.
31. Ogi T, Walker S, Stiff T, Hobson E, Limsirichaikul S, Carpenter G, Prescott K, Suri M, Byrd PJ, Matsuse M, Mitsutake N, Nakazawa Y, Vasudevan P, Barrow M, Stewart GS, Taylor AM, O'Driscoll M and Jeggo PA (2012). Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel Syndrome. *PLoS Genet* 8: e1002945.

32. Cimprich KA, Shin TB, Keith CT and Schreiber SL (1996). cDNA cloning and gene mapping of a candidate human cell cycle checkpoint protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2850-2855.
33. Cimprich KA and Cortez D (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 616-627.
34. Zou L and Elledge SJ (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300: 1542-1548.
35. Walworth NC and Bernards R (1996). rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* 271: 353-356.
36. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA and Elledge SJ (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14: 1448-1459.
37. Wang X, Zou L, Lu T, Bao S, Hurov KE, Hittelman WN, Elledge SJ and Li L (2006). Rad17 phosphorylation is required for claspin recruitment and Chk1 activation in response to replication stress. *Mol Cell* 23: 331-341.
38. Lakin ND, Hann BC and Jackson SP (1999). The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* 18: 3989-3995.
39. Furnari B, Rhind N and Russell P (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 277: 1495-1497.
40. Shirahige K, Hori Y, Shiraishi K, Yamashita M, Takahashi K, Obuse C, Tsurimoto T and Yoshikawa H (1998). Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* 395: 618-621.
41. Brown EJ and Baltimore D (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14: 397-402.
42. Ragland RL, Arlt MF, Hughes ED, Saunders TL and Glover TW (2009). Mice hypomorphic for Atr have increased DNA damage and abnormal checkpoint response. *Mamm Genome* 20: 375-385.
43. Fusco C, Reymond A and Zervos AS (1998). Molecular cloning and characterization of a novel retinoblastoma-binding protein. *Genomics* 51: 351-358.

44. You Z and Bailis JM (2010). DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol* 20: 402-409.
45. Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, Hampshire DJ, Morrison EE, Leal GF, Silva EO, Costa SM, Baralle D, Raponi M, Karbani G, Rashid Y, Jafri H, Bennett C, Corry P, Walsh CA and Woods CG (2005). A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet* 37: 353-355.
46. Gul A, Hassan MJ, Hussain S, Raza SI, Chishti MS and Ahmad W (2006). A novel deletion mutation in CENPJ gene in a Pakistani family with autosomal recessive primary microcephaly. *J Hum Genet* 51: 760-764.
47. Hung LY, Tang CJ and Tang TK (2000). Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex. *Mol Cell Biol* 20: 7813-7825.
48. Ganem NJ, Godinho SA and Pellman D (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460: 278-282.
49. McIntyre RE, Lakshminarasimhan Chavali P, Ismail O, Carragher DM, Sanchez-Andrade G, Forment JV, Fu B, Del Castillo Velasco-Herrera M, Edwards A, van der Weyden L, Yang F, Sanger Mouse Genetics P, Ramirez-Solis R, Estabel J, Gallagher FA, Logan DW, Arends MJ, Tsang SH, Mahajan VB, Scudamore CL, White JK, Jackson SP, Gergely F and Adams DJ (2012). Disruption of mouse Cenpj, a regulator of centriole biogenesis, phenocopies Seckel syndrome. *PLoS Genet* 8: e1003022.
50. Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, Kikuno R, Hirose M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N and Ohara O (1998). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 5: 355-364.
51. Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA and Mann M (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426: 570-574.
52. Cizmecioglu O, Arnold M, Bahtz R, Settele F, Ehret L, Haselmann-Weiss U, Antony C and Hoffmann I (2010). Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome. *J Cell Biol* 191: 731-739.

53. Lukinavicius G, Lavogina D, Orpinell M, Umezawa K, Reymond L, Garin N, Gonczy P and Johnsson K (2013). Selective chemical crosslinking reveals a Cep57-Cep63-Cep152 centrosomal complex. *Curr Biol* 23: 265-270.
54. Loffler H, Fechter A, Matuszewska M, Saffrich R, Mistrik M, Marhold J, Hornung C, Westermann F, Bartek J and Kramer A (2011). Cep63 recruits Cdk1 to the centrosome: implications for regulation of mitotic entry, centrosome amplification, and genome maintenance. *Cancer Res* 71: 2129-2139.
55. Ou YY, Mack GJ, Zhang M and Rattner JB (2002). CEP110 and ninein are located in a specific domain of the centrosome associated with centrosome maturation. *J Cell Sci* 115: 1825-1835.
56. Chen CH, Howng SL, Cheng TS, Chou MH, Huang CY and Hong YR (2003). Molecular characterization of human ninein protein: two distinct subdomains required for centrosomal targeting and regulating signals in cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 975-983.
57. Llamazares S, Moreira A, Tavares A, Girdham C, Spruce BA, Gonzalez C, Karess RE, Glover DM and Sunkel CE (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 5: 2153-2165.
58. de Carcer G, Manning G and Malumbres M (2011). From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle* 10: 2255-2262.
59. Barr FA, Sillje HH and Nigg EA (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 429-440.
60. Lenart P, Petronczki M, Steegmaier M, Di Fiore B, Lipp JJ, Hoffmann M, Rettig WJ, Kraut N and Peters JM (2007). The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* 17: 304-315.
61. Lu LY, Wood JL, Minter-Dykhouse K, Ye L, Saunders TL, Yu X and Chen J (2008). Polo-like kinase 1 is essential for early embryonic development and tumor suppression. *Mol Cell Biol* 28: 6870-6876.
62. Simmons DL, Neel BG, Stevens R, Evett G and Erikson RL (1992). Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Mol Cell Biol* 12: 4164-4169.
63. Ma S, Charron J and Erikson RL (2003). Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. *Mol Cell Biol* 23: 6936-6943.

64. MacKeigan JP, Murphy LO and Blenis J (2005). Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 7: 591-600.
65. Burns TF, Fei P, Scata KA, Dicker DT and El-Deiry WS (2003). Silencing of the novel p53 target gene *Snk/Plk2* leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol* 23: 5556-5571.
66. Liby K, Wu H, Ouyang B, Wu S, Chen J and Dai W (2001). Identification of the human homologue of the early-growth response gene *Snk*, encoding a serum-inducible kinase. *DNA Seq* 11: 527-533.
67. Cizmecioglu O, Warnke S, Arnold M, Duensing S and Hoffmann I (2008). *Plk2* regulated centriole duplication is dependent on its localization to the centrioles and a functional polo-box domain. *Cell Cycle* 7: 3548-3555.
68. Warnke S, Kemmler S, Hames RS, Tsai HL, Hoffmann-Rohrer U, Fry AM and Hoffmann I (2004). Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 14: 1200-1207.
69. Shimizu-Yoshida Y, Sugiyama K, Rogounovitch T, Ohtsuru A, Namba H, Saenko V and Yamashita S (2001). Radiation-inducible *hSNK* gene is transcriptionally regulated by p53 binding homology element in human thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 491-498.
70. Donohue PJ, Alberts GF, Guo Y and Winkles JA (1995). Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J Biol Chem* 270: 10351-10357.
71. Zimmerman WC and Erikson RL (2007). Finding *Plk3*. *Cell Cycle* 6: 1314-1318.
72. Ouyang B, Pan H, Lu L, Li J, Stambrook P, Li B and Dai W (1997). Human *Prk* is a conserved protein serine/threonine kinase involved in regulating M phase functions. *J Biol Chem* 272: 28646-28651.
73. Jiang N, Wang X, Jhanwar-Uniyal M, Darzynkiewicz Z and Dai W (2006). Polo box domain of *Plk3* functions as a centrosome localization signal, overexpression of which causes mitotic arrest, cytokinesis defects, and apoptosis. *J Biol Chem* 281: 10577-10582.
74. Yang F, Camp DG, 2nd, Gritsenko MA, Luo Q, Kelly RT, Clauss TR, Brinkley WR, Smith RD and Stenoien DL (2007). Identification of a novel mitotic

- phosphorylation motif associated with protein localization to the mitotic apparatus. *J Cell Sci* 120: 4060-4070.
75. Ruan Q, Wang Q, Xie S, Fang Y, Darzynkiewicz Z, Guan K, Jhanwar-Uniyal M and Dai W (2004). Polo-like kinase 3 is Golgi localized and involved in regulating Golgi fragmentation during the cell cycle. *Exp Cell Res* 294: 51-59.
 76. Yang Y, Bai J, Shen R, Brown SA, Komissarova E, Huang Y, Jiang N, Alberts GF, Costa M, Lu L, Winkles JA and Dai W (2008). Polo-like kinase 3 functions as a tumor suppressor and is a negative regulator of hypoxia-inducible factor-1 alpha under hypoxic conditions. *Cancer Res* 68: 4077-4085.
 77. Fode C, Motro B, Yousefi S, Heffernan M and Dennis JW (1994). Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the *Drosophila* polo kinase and involved in cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6388-6392.
 78. Karn T, Holtrich U, Wolf G, Hock B, Strebhardt K and Rubsamenwaigmann H (1997). Human SAK related to the PLK/polo family of cell cycle kinases shows high mRNA expression in testis. *Oncol Rep* 4: 505-510.
 79. Matsui S, LaDuca J, Rossi MR, Nowak NJ and Cowell JK (2005). Molecular characterization of a consistent 4.5-megabase deletion at 4q28 in prostate cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 159: 18-26.
 80. R. H (2006). The Human Polo-like Kinase 4 is a Regulator of Centrosome Duplication. *Doktora Tezi, Biyoloji, Münih, Almanya*.
 81. Jana SC, Bazan JF and Bettencourt-Dias M (2012). Polo boxes come out of the crypt: a new view of PLK function and evolution. *Structure* 20: 1801-1804.
 82. Strebhardt K (2010). Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 9: 643-660.
 83. Brito DA, Gouveia SM and Bettencourt-Dias M (2012). Deconstructing the centriole: structure and number control. *Curr Opin Cell Biol* 24: 4-13.
 84. Hatch EM, Kulukian A, Holland AJ, Cleveland DW and Stearns T (2010). Cep152 interacts with Plk4 and is required for centriole duplication. *J Cell Biol* 191: 721-729.
 85. Caenepeel S, Charyczak G, Sudarsanam S, Hunter T and Manning G (2004). The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11707-11712.

86. de Carcer G, Escobar B, Higuero AM, Garcia L, Anson A, Perez G, Mollejo M, Manning G, Melendez B, Abad-Rodriguez J and Malumbres M (2011). Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression. *Mol Cell Biol* 31: 1225-1239.
87. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
88. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: e115.
89. NCBI (2013). Gene. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. (Accessed 01 Aralık, 2013).
90. Kato H and Shimada H (1975). Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C: a new method of detecting DNA damage at chromosomal level. *Mutat Res* 28: 459-464.
91. Lambotte C, Dony G and Bonnet F (1976). Seckel syndrome: bird-headed dwarfism. *Acta Paediatr Belg* 29: 79-82.
92. Kim TS, Park JE, Shukla A, Choi S, Murugan RN, Lee JH, Ahn M, Rhee K, Bang JK, Kim BY, Loncarek J, Erikson RL and Lee KS (2013). Hierarchical recruitment of Plk4 and regulation of centriole biogenesis by two centrosomal scaffolds, Cep192 and Cep152. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E4849-4857.
93. Slevin LK, Nye J, Pinkerton DC, Buster DW, Rogers GC and Slep KC (2012). The structure of the plk4 cryptic polo box reveals two tandem polo boxes required for centriole duplication. *Structure* 20: 1905-1917.
94. Holland AJ, Fachinetti D, Da Cruz S, Zhu Q, Vitre B, Lince-Faria M, Chen D, Parish N, Verma IM, Bettencourt-Dias M and Cleveland DW (2012). Polo-like kinase 4 controls centriole duplication but does not directly regulate cytokinesis. *Mol Biol Cell* 23: 1838-1845.
95. Rosario CO, Ko MA, Haffani YZ, Gladdy RA, Paderova J, Pollett A, Squire JA, Dennis JW and Swallow CJ (2010). Plk4 is required for cytokinesis and maintenance of chromosomal stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 6888-6893.

96. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M and Beroud C (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37: e67.
97. Gandia M, Del Castillo FJ, Rodriguez-Alvarez FJ, Garrido G, Villamar M, Calderon M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F and del Castillo I (2013). A novel splice-site mutation in the GJB2 gene causing mild postlingual hearing impairment. *PLoS One* 8: e73566.
98. Fukuyama M, Ohno S, Wang Q, Shirayama T, Itoh H and Horie M (2013). Nonsense-Mediated mRNA Decay due to a CACNA1C Splicing Mutation in a Patient with Brugada Syndrome. *Heart Rhythm*.
99. Flynn RL and Zou L (2011). ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem Sci* 36: 133-140.
100. Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G, Zediak VP, Velez M, Bhandoola A and Brown EJ (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* 1: 113-126.
101. Nigg EA and Stearns T (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* 13: 1154-1160.
102. Avidor-Reiss T and Gopalakrishnan J (2013). Building a centriole. *Curr Opin Cell Biol* 25: 72-77.
103. Holland AJ, Fachinetti D, Zhu Q, Bauer M, Verma IM, Nigg EA and Cleveland DW (2012). The autoregulated instability of Polo-like kinase 4 limits centrosome duplication to once per cell cycle. *Genes Dev* 26: 2684-2689.
104. Brown NJ, Marjanovic M, Luders J, Stracker TH and Costanzo V (2013). Cep63 and cep152 cooperate to ensure centriole duplication. *PLoS One* 8: e69986.
105. Shi L, Lin Q and Su B (2013). Human-Specific Hypomethylation of CENPJ, a Key Brain Size Regulator. *Mol Biol Evol*.
106. Marthiens V, Rujano MA, Pennetier C, Tessier S, Paul-Gilloteaux P and Basto R (2013). Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol* 15: 731-740.

107. Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Habedanck R, Stierhof YD and Nigg EA (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* 13: 190-202.
108. Hudson JW, Kozarova A, Cheung P, Macmillan JC, Swallow CJ, Cross JC and Dennis JW (2001). Late mitotic failure in mice lacking Sak, a polo-like kinase. *Curr Biol* 11: 441-446.
109. Jun Yang Z-PX, Yun Huang, Hope E. Hamrick, Penelope J. Duerksen-Hughes, Ying-Nian Yu (2004). ATM and ATR: Sensing DNA damage. *World Journal of Gastroenterology* 10(2): 155-160.
110. Lee HJ, Hwang HI and Jang YJ (2010). Mitotic DNA damage response: Polo-like kinase-1 is dephosphorylated through ATM-Chk1 pathway. *Cell Cycle* 9: 2389-2398.
111. Busino L, Chiesa M, Draetta GF and Donzelli M (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 23: 2050-2056.
112. Petrinac S, Ganuelas ML, Bonni S, Nantais J and Hudson JW (2009). Polo-like kinase 4 phosphorylates Chk2. *Cell Cycle* 8: 327-329.
113. Bonni S, Ganuelas ML, Petrinac S and Hudson JW (2008). Human Plk4 phosphorylates Cdc25C. *Cell Cycle* 7: 545-547.
114. O'Driscoll M (2009). Mouse models for ATR deficiency. *DNA Repair (Amst)* 8: 1333-1337.

10. ETİK KURUL ONAYI

Ek.1

KTÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU					
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Seckel Sendromunun Genetik Etiyolojisinin Araştırılması"			
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2013/73			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Ersan KALAY			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR UNVANI/ADI/SOYADI	Arş.Gör.Gülden YORGANCIOĞLU, Prof.Dr.Yakup ARSLAN, Doç.Dr.Cavidan Nur SEMERCI			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ				
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ				
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	UZMANLIK TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐			
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐			
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	☐			
	İLAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
DİĞER:	☐				

Sayfa 1

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 06	Tarih: 30/09/2013
	Prof.Dr.Ersan KALAY'ın sorumluluğunda yürütülen Arş.Gör.Gülden YORGANCIOĞLU'na ait "Seckel Sendromunun Genetik Etiyolojisinin Araştırılması" başlıklı 2013/73 no'lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	Özel Yıldızlı Güven Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Hafız AYDIN Üye:	Ortopedi ve Travmatoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Yüksel ALIYAZICIOĞLU Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr.Hülya ULUSOY Üye:	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Gülşay KARAGÜZEL Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLI
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Y.Doç.Dr. Evrim ÖZKORUMAK Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Fatih Mehmet GÖKÇE Üye:	Fizyoloji	RTE Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Mirac ÇELİK Üye:	Hukuk	KTÜ Hukuk Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Tufan SAĞLAM Üye:	Tekstil	Serbest (Tekstil Mühendisi)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : YORGANCIOĞLU, GÜLDEN
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 02/09/1987, ŞİŞLİ
Medeni hali : Bekar
E-Posta : gulden.yorgancioglu@gmail.com
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD 61080 TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	Halen
Lisans	: Marmara Üniversitesi, Biyoloji	2008
Lise	: Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi	2004

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
1. Araştırma görevlisi (ÖYP)	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2011-halen

YABANCI DİL

Almanca (DSD KMK II)

İngilizce (2010 ÜDS Fen Bilimleri: 88,75)

