

**KKTC
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NEDENİ BİLİNMEYEN DÜŞÜKLERDE CENP-
A METİLASYONU, TOPOİZOMERAZ 2 VE
AURKA GENLERİNİN ROLÜ**

NERMİN ÖZDAĞ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEFKOŞA

ŞUBAT-2016

**KKTC
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NEDENİ BİLİNMEYEN DÜŞÜKLERDE CENP-
A METİLASYONU, TOPOİZOMERAZ 2 VE
AURKA GENLERİNİN ROLÜ**

NERMİN ÖZDAĞ

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. NEDİME SERAKINCI**

**EŞ-DANIŞMAN
Dr. RASİME KALKAN**

**LEFKOŞA
ŞUBAT-2016**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne,

Bu alışma J¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik programında Master Tezi olarak kabul edilmiştir.

J¼ri Başkanı: Prof. Dr. Halit CANATAN
TC Erciyes Üniversitesi



Danışman Prof. Dr. Nedime SERAKINCI
Yakın Doğu niversitesi

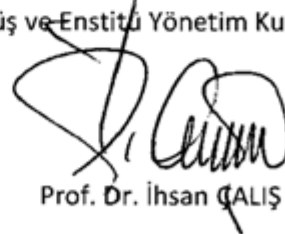


ye Doç. Dr. Özlem DALMIZRAK
Yakın Doğu Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi Lisansst¼ Eğitim- ğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun gr¼lm¼ř ve Enstit¼ Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. İhsan ALIş

Eczacılık Fak¼ltesi Dekanı ve Sağlık Bilimleri Enstit¼ M¼d¼r¼

TEŞEKKÜR

Çalışmamda her türlü bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren ve değerli katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof Dr. Nedime SERAKINCI'ya,

Herzaman yanımda olan ve desteğini benden hiç eksik etmeyen Dr. Rasime KALKAN'a,

Projemi gerçekleştirmem için gereken maddi desteği sağlayan Yakın Doğu Üniversitesi Center of Excellence araştırma fonuna,

İstatistik çalışmalarımda yardımları için ÖZGÜR TOSUN'a, gerekli tüm malzeme ve yardımı ile bana destek olan İntron Sağlık Ürünleri İth.İhr.Tic.Ltd.Şti yöneticisi Sayın Serhat DEMİRKOL'a

Yardımlarını, sevgilerini ve sabırlarını benden esirgemeyen anneme, babama, kardeşime, eşime ve arkadaşlarıma, tüm kalbimle

Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Nermin ÖZDAĞ

ÖZET

Özdağ, N. Nedeni Bilinmeyen Düşüklere CENP-A Metilasyonu, Topoizomerase 2 ve AURKA Genlerinin Rolü. Yakın Doğu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programı. Yüksek Lisans Tezi. Lefkoşa. 2016

Hücre bölünmesinin hatasız gerçekleşmesinde sentromer ve kinetokor aktivitesi büyük rol oynamaktadır. Hücre bölünmesi hatası sonucunda meydana gelen anöploidilerin genetik hastalıklara (Down Send., Turner Send., vb), ölü doğumlara ve düşüklere neden olduğu bildirilmektedir. CENP-A geni sentromer aktivitesinde rol oynamasının yanında CENP-A metilasyonu kinetokor bütünlüğü ve kromozom ayrılmasında anahtar görevi görmektedir.

AURKA, DNA kondensasyonu, sentromer olgunlaşması, bipolar iğ ipliği yapısı, kinetokor/mikrotübül bağlanması, kardeş kromatit ayrılması ve sitokinezde rol oynamaktadır. Serin/treonin kinaz üyesi olan AURKA normal fonksiyonlarının kaybolması, hücre bölünmesi sırasında genomik dengesizliğe ve kromozom anöploidilerine neden olmaktadır.

DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve homolog rekombinasyonun hatasız çalışması DNA topoizomerase adı verilen korunmuş nükleer enzimler tarafından düzenlenmektedir. Topoizomerase 2 (TOP 2), temel olarak DNA replikasyonun son evresinde kromozom kondensasyonu ve kardeş kromatitlerin ayrılması için gerekli olmakla birlikte TOP 2’de gözlenen dengesizlikler hücrelerin metafaz evresinde tutuklanmasına ve bunun sonucunda da hücre bölünmesinde hataların meydana gelmesine neden olmaktadır.

Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliğine 19.01.2011 ve 28.04.2015 tarihleri arasında direkt başvuran veya dış merkezlerden test edilmek amacı ile yönlendirilen 47 olgunun düşük materyalleri ile kontrol grubu olan 85 amniyon örneğine; kültür ve kromozom analizi, AURKA ve TOP 2 genlerinin kopya sayısı değişikliklerinin belirlenmesi amacıyla FISH yöntemi ve CENP- A promotor metilasyonu analizi için DNA izolasyonu, bisülfid dönüşümü ve metilasyon spesifik PCR tekniği uygulanmıştır.

Çalışmamızda düşük materyali ile kromozom anomalisi ($p=0.021$) arasında, AURKA amplifikasyonu ve kromozomal anomalisi arasında istatistiksel olarak anlamlılık ($p=0.002$) saptanmıştır. Ayrıca TOP 2 amplifikasyonu ve düşük materyali arasında ($p= 0.024$) ve TOP 2 amplifikasyonu ile kromozom anomalisi arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir. Bunun yanında kromozomal anomali gözlenen olgular ve CENP-A promotor metilasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur ($p=0.007$).

Bu çalışmada nedeni bilinmeyen düşüklerde; CENP-A epigenetik profilinin belirlenmesi ve epigenetik değerlendirmenin düşüklerde moleküler bir belirteç olarak anlamlılığı araştırılmıştır. Ayrıca TOP 2 ve AURKA gen amplifikasyonlarının nedeni bilinmeyen düşüklerin patogenezindeki rolü araştırılmıştır. Sonuçta kromozomal anomaliye rastlanan olgularda CENP-A metilasyonu veya hemimetilasyonuna rastlanırken TOP 2 düşük amplifikasyonu ve/veya AURKA düşük amplifikasyonu gözlenmiştir. Sonuçta çalışmamızda TOP 2 ve AURKA gen amplifikasyonu sonucunda oluşan apoptozisin nedeni bilinmeyen düşüklere neden olabileceği ileri sürülmektedir. Çalışmamızın ileride yapılacak çalışmalar ve daha geniş bir çalışma grubuyla desteklenmesi önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nedeni Bilinmeyen Düşük, CENP-A metilasyonu, AURKA, TOP2.

ABSTRACT

Özdağ, N. Identification of the role of CENP-A methylation and determining the effects of Topoisomerase 2 and AURKA genes in spontaneous abortus with unexplained etiologies. Near East University, Institute of Health Sciences, M.Sc. Thesis in Medical Biology and Genetics Programme, Nicosia, 2016.

Activities of centromere and kinetochore play important role in accurate segregation of genetic material during cell division. It has been known that, aneuploidies which occur as a result of defects during cell division may lead to genetic disorders (Down Syndrome, Turner Syndrome etc.), stillborn and miscarriages. CENP-A gene plays key role in centromere function and kinetochore assembly as well as methylation of itself.

AURKA plays role in DNA condensation, centromere maturation, bipolar spindle fiber structure, kinetochore- microtubules attachment, sister chromatid segregation and cytokinesis. Aurora A, a member of serine/threonine kinase family, leads to genomic instability and chromosomal aneuploidy if it is not functioning properly.

Accurate functioning of many cellular processes such as DNA replication, transcription and homolog recombination has been regulated by nuclear enzymes that are called DNA topoisomerase. Although TOP 2 is essential for chromosome condensation and segregation of the replicated daughter chromosomes, any possible imbalance of TOP 2 level can lead to cell cycle arrest in metaphase, thus faults in cell division.

Abortion materials from 47 patients used as working groups and amnion materials from 85 patients used as control groups were collected between the dates 19.01.2011 and 28.04.2015, respectively. These samples were collected from the patients of the Near East University Hospital, Department of Medical Genetics laboratory that were directed there by clinicians of either the Medical Genetic polyclinic of the Near East Hospital or by outside clinics.

The techniques that we used during this project were; tissue culture, chromosome analysis, FISH techniques in order to define the copy number variation of AURKA and TOP 2 genes and DNA isolation, bisulfite conversion and methylation specific PCR for CENP-A promoter methylation analysis.

In this study, statistically significant differences were observed between abort materials and chromosomal anomalies ($p=0.021$), also between AURKA amplification and chromosomal anomalies ($p=0.002$). Additionally, TOP 2 amplification was found to be significantly correlated with abort materials and chromosomal anomalies. The cases that have chromosomal anomalies were found to be related with CENP-A promoter methylation ($p=0.007$).

In our study, we determined CENP-A epigenetic profile for the spontaneous abortus with unexplained etiologies; and it's correlated with the abortus in the molecular level. Additionally, the role of TOP 2 and AURKA gene amplifications were investigated in the spontaneous abortus with unexplained etiologies' pathogenesis.

In conclusion, it was observed that within the abortus cases that have chromosomal abnormalities, there are CENP-A methylation or hemimethylation together with low amplification levels of TOP 2 and/or AURKA. We conclude that TOP 2 and AURKA gene amplification related apoptosis might be the reason for spontaneous abortus with unexplained etiologies. Further studies need to be carried out with a larger group of samples and with additional techniques in order to support this study.

Key words: Spontaneous abortus with unexplained Etiologies, CENP-A, AURKA, TOP2.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
İÇİNDEKİLER.....	IX
TABLolar LİSTESİ.....	XIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XV
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Gebelik Kaybı Tanımı Ve Nedenleri.....	4
2.2 Sentromer	6
2.2.1 Sentromer Proteinleri	7
2.2.2 Sentomer Fonksiyonu.....	7
2.3 Kinetokor.....	8
2.3.1 Konstitutif Sentromer İlişkili Ağ (Ccan)	9
2.4 Cenp-A Proteini.....	11
2.4.1 Cenp-A' Nın Kristal Yapısı.....	14
2.4.2 Cenp-A Sentezlenmesi Ve Dekondansasyonu.....	14
2.5 Aurora Kinazlar.....	16
2.5.1 Aurka (Aurora 2/ Btak/ Stk15).....	17
2.5.2 Aurka Fonksiyonları Ve Regülasyonu.....	18
2.5.3 Aurkb.....	19
2.6 Topoizomeraz.....	21
2.6.1 Topoizomeraz Sınıflandırılması.....	22
2.6.2 Topoizomeraz 1.....	24
2.6.3 Topoizomeraz 1 Fonksiyonu.....	24
2.6.4 Topoizomeraz 2.....	25

2.6.5	Topoizomeraz 2 Fonksiyonları.....	26
2.7	Metilasyon.....	27
2.8	Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH).....	30

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1	Gereç	33
3.1.1	Çalışma Grubu.....	33
3.1.2	Materyal alımı.....	33
3.1.3	Kullanılan Gereçler.....	34
3.1.4	Kullanılan Çözeltiler.....	35
3.1.5	Kullanılan Problar.....	37
3.1.6	Kullanılan Kitler.....	37
3.1.7	Oligonukleotidler.....	37
3.2	Yöntem.....	38
3.2.1	Amniyon Hücre Kültürü.....	38
3.2.2	Düşük Materyali Kültürü.....	39
3.2.3	Düşük Materyalinden DNA İzolasyonu.....	40
3.2.4	Amniyon Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	41
3.2.5	DNA Konsantrasyonu.....	42
3.3	FISH Analizi.....	42
3.3.1	Preparat Hazırlaması.....	42
3.3.2	Preparatların Ön Yıkaması ve Denaturasyonu.....	42
3.3.3	Prob Denaturasyonu.....	43
3.3.4	Hibridizasyon.....	43
3.3.5	Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar.....	43
3.3.6	Görüntüleme.....	43
3.3.7	Preparatların Mikroskopi İncelenmesi.....	44
3.4	Değerlendirme.....	44
3.5	Metilasyon Spesifik PCR.....	44
3.5.1	Bisülfite modifikasyonu.....	45
3.5.2	Bisülfite Modifiye DNA' nın Temizlenmesi.....	46
3.6	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	47

3.7	Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi.....	48
4.	Bulgular.....	50
4.1	İstatiksel Analiz.....	52
4.2	Kromozom Analizi Sonuçları.....	52
4.2.1	Düşük Materyali Kromozom Analizi Sonuçları.....	52
4.2.2	Amniyon Örnekleri Kromozom Analizi Sonuçları.....	54
4.3	Moleküler Sitogenetik Sonuçlar.....	55
4.3.1	Top 2 / CEP 17 FISH Sonuçları.....	55
4.3.2	Top2/ Cep 17 FISH Sonuçları ile Karyotip Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	56
4.3.3	AURKA FISH Sonuçları.....	57
4.3.4	AURKA FISH Sonuçları ile Karyotip Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	57
4.4	Moleküler Genetik Sonuç.....	58
4.4.1	CENP-A Metilasyon Spesifik PCR Sonuçları.....	58
4.4.2	CENP-A Promotor Metilasyon Spesifik PZR Sonuçları ile AURKA ve TOP 2 FISH Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	64
5.	Tartışma.....	66
5.1	AURKA FISH Sonuçlarının Literatür İle Karşılaştırılması.....	67
5.2	TOP 2 FISH Sonuçlarının Literatür İle Karşılaştırılması.....	68
5.3	CENP-A Metilasyon Spesifik PZR Sonuçlarının Literatür İle Karşılaştırılması.....	70
5.4	Sitogenetik Sonuçlarının Literatür İle Karşılaştırılması.....	72
6.	Kaynaklar	74

7. EKLER.....	94
7.1 Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Gönüllü Onam Formu.....	94

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarına neden olan faktörler ve yüzdesi.....	5
Tablo 2.2. Farklı organizmalarda Topoizomeraz Sınıfı ve fonksiyonları.....	23
Tablo 2.3. Topoizomeraz 2 Hücre Bölünmesindeki Rolü.....	27
Tablo 3.1. CENP-A promotor bölgesi için sentezlenen primer listesi.....	37
Tablo 3.2. Bisülfıt Modifikasyonu için Thermal Cycler Koşulları.....	46
Tablo 3.3. CENP-A genindeki promotor metilasyonu için kullanılan PZR karışım içeriği ve reaksiyon son konsantrasyonu.....	47
Tablo 3.4. Metilasyon Spesifik PZR Thermal Cycler Koşulları.....	48
Tablo 4.1. Düşük materyali nedeniyle başvuran olguların endikasyonu ve sayısı.....	50
Tablo 4.2. Amniyon Örneği Alınan Olguların Endikasyonu ve Sayısı (yüzdesi %)......	51
Tablo 4.3. Sitogenetik çalışma sonucunda gözlenen anomaliler ve olguların endikasyonları.....	53
Tablo 4.4. Düşük ve Amniyon Örneklerinde Gözlenen TOP 2 Amplifikasyonu.....	55
Tablo 4.5. FISH sonucunda anomali gözlenen olguların sitogenetik sonuçları ile karşılaştırılması ve endikasyon.....	56
Tablo 4.6. AURKA amplifikasyonu gözlenen örneklerin endikasyon ve sitogenetik sonucu.....	58

Tablo 4.7. Düşük ve Amniyon Örneklerinin CENP-A Metilasyon Spesifik PZR Sonuçları.....	60
Tablo 4.8. Kromozomal anomali gözlenen ve gözlenmeyen olguların CENP-A promotor metilasyon durumu.....	61
Tablo 4.9. Kromozomal anomali gözlenen ve gözlenmeyen düşük materyali örneklerinin CENP-A promotor geni metilasyon durumu.....	61
Tablo 4.10. Kromozomal anomali gözlenen ve gözlenmeyen amniyon örneklerinin CENP-A promotor geni metilasyon durumu.....	62
Tablo 4.11. Kromozom analizi sonucunda anomali gözlenen düşük olgularının CENP-A promotor geni metilasyon durumları.....	63
Tablo 4.12. Kromozomal anomali gözlenen amniyon örneklerinin CENP-A promotor metilasyon durumları.....	64
Tablo 4.13. Kromozomal anomali gözlenen olguların CENP-A metilasyon durumu, AURKA ve TOP 2 FISH sonuçları.....	65

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Kinetokor şematik gösterimi ve sentromer proteinleri.....	10
Şekil 2.2 CENP-A, CENP-B ve CENP-C ‘ nin kinetokor ve DNA’ daki lokalizasyonu.....	11
Şekil 2.3. CENP-A ve H3 nukleozomlarının kromozomdaki lokalizasyonu.....	13
Şekil 2.4 Siklin aktivitesinin CENP-A birikiminde rolü.....	15
Şekil 2.5Aurora Kinazların Yapısı	17
Şekil 2.6 Aurora kinaz fonksiyonları.....	20
Şekil 2.7 DNA Topoizomera 2 Fonksiyonları.....	22
Şekil 2.8 Metilasyon Spesifik PCR hazırlık ve çalışma aşamaları.....	30
Şekil 4.1. 45,X karyotip gözlenen olgunun karyotip görüntüsü.....	53
Şekil 4.2. t(1;15) der (1) t(1p22.2-1pter::15q26.1-15qter) der(15) t(15q26.1-15qter::1p22.2-1pter) karyotip gözlenen olgu.....	54
Şekil 4.3. TOP2 geninde düşük amplifikasyon gözlenen olgu görüntüsü.....	57
Şekil 4.4. AURKA geninde düşük amplifikasyon gözlenen olgu görüntüsü.....	58
Şekil 4.5. CENP-A promotor genin amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforezinde görüntüsü.....	59

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleikasit
mRNA	Mesajcı RNA
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
AURKA	Aurora Kinaz A
AURKC	Aurora Kinaz C
TOP2	Topoizomeraz 2 enzimi
CENP-A	Sentromer A proteini
CENP-B	Sentromer B proteini
CENP-C	Sentromer C proteini
CENP-H	Sentromer H proteini
CENP-I	Sentromer I proteini
CENP-K	Sentromer K proteini
CENP-U	Sentromer U proteini
CENP-W	Sentromer W proteini
CENP-X	Sentromer X proteini
TPX2	Xklp2 için hedef protein (Targeting protein for Xklp2)
AURKB	Aurora Kinaz B
SAC	Spindle assembly checkpoint
ATP	Adenozin Trifosfat
INCENP	İç sentromer protein (Inner centromere protein)
CCAN	Konstitutif Sentromer İlişkili Ağ
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
NaCl	Sodyum klorür
HCL	Hidroklorik asit
LTR	Uzun terminal tekrarlar
LINE	Long interspersed nucleotide elements
SINE	Short interspersed nucleotide elements,
NaOH	Sodyum hidroksit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol

PBS	Phosphate buffered saline
SSC	Saline-Sodium Citrate
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
KCI	Potasyum Klorür
bç	Baz Çifti (base pair; bp)
NaCl	Sodyum Klorür
TE	Tris-EDTA kimyasalı
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic Acid
Lysis Buffer	Hücre parçalama Solusyonu
NH ₄ Cl	Amonyum Klorür
KHCO ₃	Potasyum Bikarbonat
Tris	Hydroxymethylaminomethane
TBE	Tris-Borate EDTA
NOR	Nucleolar Organizer Region

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kadınların yaklaşık dörtte biri yaşamları boyunca en az bir kez düşük deneyimi yaşama riskine sahiptir (Stern, J.J. ve diğerleri, 1996). Düşük riskini arttıran faktörler; endokrin (Stephenson, M.D., 1996), immünojenik (Backos, M. ve diğerleri, 1999), anatomik (Rushworth, F.H. ve diğerleri, 2000), enfeksiyon (Branch, D.W. ve diğerleri, 1992), nedeni bilinmeyen ve genetik faktörler olup; genetik faktörler arasında; kromozomal anomalileri (Carp, H.J.A., 2008) ve pıhtılaşma genlerindeki anomaliler (Daya, S. ve diğerleri, 1999) yer almaktadır. Düşük materyallerinde gözlenen kromozom anomali sıklığı %30-57 olarak bildirilmiştir (Dlugi, A.M., 1998; Hirahara, F. ve diğerleri, 1998).

Düşük örneklerine;

1-Tekrarlı gebelik kaybı riski yaşayan çiftlerde olası DNA/RNA tabanlı markerlerin tanımlanması;

2- Gen/protein profillerinin, yolaklarının ve bağlantılarının saptanması amacıyla genetik ve genomik çalışmalar yapılmaktadır (Rull, K. ve diğerleri, 2012).

Gebelik kayıplarında sıklıkla anöploidiler görülmekte olup bu anöploidiler, hücre bölünmesi sırasındaki dengesizliklerden dolayı meydana gelmektedir. Mayotik ve mitotik hücre bölünmesi başta hücre siklus kontrol noktaları olmak üzere birçok siklin, siklin bağımlı kinazlar ve serin/treonin kinazlar tarafından düzenlenmektedir. Hücre bölünmesinde esas unsur olan kromozomların ip ipliklerine bağlanması sentromer ve kinetokorlar aracılığı ile olmaktadır. Sentromerlerin bu görevi yapmamaları, kromozomların doğru ayrışmamasına neden olmakla birlikte sentromer, kinetokor ve/veya serin/treonin kinaz ailesi olan AURKA'nın normal fonksiyonlarının kaybolması genomik dengesizliklere ve kromozomal anöploidilere neden olmaktadır (Rattner, B.J., 1991; Schulman, ve Bloom, 1991; Holland, L.A. ve Cleveland, W.D., 2009; Thompson, L.S. ve diğerleri, 2010).

Nükleozomlar, histon proteinlerinden oluşmaktadır. Nükleozom çekirdeğini oluşturan 4 kanonik histondan biri olan H3'ün bir varyantı CENP-A'dır ve görevi sentromerin doğru fonksiyonu ve kinetokor bütünlüğünü sağlamaktır (Fischle, W. ve diğerleri, 2003; Thompson, L.S. ve diğerleri, 2010). Ayrıca CENP-A metilasyonu, kinetokor bütünlüğü ve kromozom ayrılmasını düzenlenmekte bir anahtar görevi görmektedir (Stimpson, M.K. ve Sullivan, A. B., 2011).

Topoizomeraz 2 (TOP 2), DNA dubleks yapısının açılmasından sorumlu yüksek derecede korunmuş bir enzimdir (Bower, J.J. ve diğerleri, 2010). Hücre bölünmesinin hatasız bir şekilde gerçekleşmesi, kromozom kondensasyonu, sentromer kararlılığı, yavru DNA dubleksinin ayrılması/kesilmesi (dekatensasyonu) ve kardeş kromatidlerin doğru bir şekilde ayrılmasında TOP 2 rol oynamaktadır. TOP 2 enziminin aktivitesini engelleyecek delesyon veya mutasyonlar hücrelerin metafaz evresinde duraksatılmasına böylelikle kromozom ayrılmasında hataların yani poliploidi veya endoreduplikasyonun meydana gelmesine neden olmaktadır (Uemura, T. ve diğerleri, 1987; Zucker, R.M. ve Elstein, K.H., 1991; Sumner, A.T., 1995).

Yapılan çalışmalar gen ifadesindeki değişikliklere; kromozom yeniden düzenlemeleri ve epigenetik modifikasyonların yanı sıra sentromer spesifik H3 varyantı bir başka deyişle, CENP-A hatalı ifadesinin neden olduğunu ileri sürmektedir (Meluh, P.B. ve Strunnikov, A.V., 2002). Ayrıca embriyo gelişimi veya gametogenez sırasında ortaya çıkan anormal DNA metilasyonun, gebelik kayıpları için potansiyel bir neden olduğu öne sürülmektedir (Zheng, H.Y. ve diğerleri, 2012). Çalışmalar spontan düşüklerde aberant DNA metilasyonun istemli sonlandırılan düşüklerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Düşük vakalarında bilindik kromozom anomalilerinin yanı sıra epigenetik dengesizlikler de önem taşımaktadır. Tekrarlayan düşüklerdeki DNA metilasyonun genom ve bölgeye özgü farklılıkların kapsamlı analizi, erken gebeliklerde epigenetik hataların doğasını ve sıklığını değerlendirmek için gereklidir (Hanna, C.W. ve diğerleri, 2013).

Bu çalışmada nedeni bilinmeyen dūřuklerde, CENP-A geni epigenetik profilinin belirlenmesi, TOP 2 ve AURKA gen amplifikasyonlarının dūřuklerdeki anlamlılığının araştırılması ve bu genlerin dūřuk vakalarında moleküler bir belirteç olarak kullanılabilir olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle laboratuvarımıza yōnlendirilen dūřuk materyalleri kromozom analizi sonuçlarına gōre kromozom anomalisi saptanan ve saptanmayan diye iki gruba ayrılmış ve kontrol grubu olarak amniyon ōrnekleri ilave edilmiştir. Çalışmamızda kromozom analizi sonucunda normal karyotip elde edilmesine rağmen dūřukle sonuçlanan vakalarda CENP-A promotor geni epigenetik değişimleri, TOP 2 ve AURKA gen ifadesine bakılmasının yanında kromozom anomalisi gōzlenen vakalarda CENP-A promotor metilasyonu, TOP 2 ve AURKA geni kopya sayısındaki dengesizlikler analiz edilmiştir ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Gebelik Kaybı Tanımı ve Nedenleri

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization ,WHO), gebelik ürününün ağırlığı ve gebelik sürecini kriter olarak yeni bir abortus tanımı getirmiştir (World Health Organization, 2004). Bu tanıma göre; 20. gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetüs ve eklerinin, tamamının ya da bir kısmının uterus kavitesi dışına atılması olayına abortus denilmektedir. Klinik olarak fark edilmiş gebeliklerin yaklaşık olarak %10-15'i spontan abortus ile sonlanırken %1-2'sinde tekrarlayan gebelik kayıpları görülmektedir (Regan, L. ve diğerleri, 1989). Düşüğe; genetik faktörler %3-5 (yapısal veya sayısal kromozomal anomaliler, parental kromozom yeniden düzenlemeler, tek gen hataları) (Carp, H.J.A., 2008), %15-20 endokrin faktörler (polikistik over sendromu (PCOS), hiperprolaktinemi, diabetes mellitus, tiroid hastalığı vb.) (Stephenson, M.D., 1996), %10-15 anatomik faktörler (konjenital üterin anomalileri) (Rushworth, F. H. ve diğerleri, 2000), %15-20 immunolojik faktörler (antifosfolipid antikor sendromu, allojenik faktörler) (Backos, M. ve diğerleri, 1999), %0.5-2 enfeksiyonlar (*Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, rubella, herpes simplex virus (HSV), TORCH, cytomegalovirus, and coxsackieviruses) (Branch, D. W. ve diğerleri, 1992), pıhtılaşma genlerindeki anomaliler (protrombin gen mutasyonu, protein S, protein C ve antitrombin eksikliği) (Daya, S. ve diğerleri, 1999) ve %40 nedeni bilinmeyen faktörler neden olmaktadır (Tablo 2.1). Bunların yanında yüksek dozda radyasyona maruz kalma gibi çevre ve işyeri tehlikeleri, sigara ve alkol kullanımı gibi hayat tarzı ve ileri maternal yaş düşüğe neden olan faktörler arasında sıralanmaktadır. Yapılan çalışmalarda 20'li yaşlarda olan olgularda gebelik kaybı %12-15 arasında görülürken 40 yaşlarda olan olgularda bu oranın %75'lere kadar çıkabildiğini gösterilmiştir (De Brakeleer, M. ve Dao, T.N., 1990; Ford, H. B. ve Schust, D. J., 2009).

Tablo 2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarına Neden Olan Faktörler Ve Yüzdeleri.
(Ford, H. B. ve Schust, D. J. 2009).

Faktörler	Yüzdeleri (%)
Nedeni Bilinmeyen Gebelik Kayıpları	38
Genetik Faktörler • Yapısal ve Sayısal Kromozom Anomalileri • Tek gen Defektleri • Parental Kromozom Yeniden Düzenlemeleri	3-5
Endokrin Faktörler • Polikistik over sendromu (PCOS) • Hiperprolaktinemi • Diabetes mellitus • Tiroid hastalığı	15-20
İmmünolojik Faktörler • antifosfolipid antikor sendromu • allojenik faktörler	15-20
Anatomik Faktörler • konjenital üterin anomalileri	10-15
Enfeksiyonlar • <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Toxoplasma gondii</i>, rubella, herpes simplex virus (HSV), cytomegalovirus, and coxsackieviruses, TORCH)	0.5-2
Trombofilik Bozukluklar • protrombin gen mutasyonu, • protein S, protein C ve antitrombin eksikliği	2-15

Kromozomal anomali ve düşükler arasındaki ilişkinin ilk olarak 1960'lı yıllarda gösterilmesinin ardından (Bowen, P. ve Lee, C.S, 1969), 1975 yılında yapılan sitogenetik çalışmalar bu sonucu güçlendirmişlerdir (Boué, J. ve diğerleri, 1975). Gebeliğin ilk trimesterinde (ilk üç ayında) meydana gelen düşüklerin yaklaşık %50' sinin kromozom anomalilerinden kaynaklandığı ve en sık rastlanan anomalilerin trizomi, poliploidi ve monozomi X olduğu bildirilmiştir (Lauritsen, J.G., 1976; Hassold, T., 1986; Kalousek, D.K. ve diğerleri, 1993). Carr ve diğerleri, 227 spontan düşük materyalinde yaptıkları çalışmada %22 oranında kromozomal anomaliye rastlamışlardır. Bunlar; trizomi ve monozomi gibi sayısal kromozom anomalilerinin yanında triploidi veya tetraploidi (Carr, D.H., 1970). Mayoz bölünme sırasında kromozom ayrılmasında gözlenen aksaklıklar anöploidili embriyolara neden olmakta ve düşük vakalarında sık görülmektedir (Lamb, N.E. ve Hassold, T.J, 2004).

2.2 Sentromer

Sentromer, kelime olarak Yunanca centrol ('centro') ve mere ('part') kelimelerinin birleşmesiyle oluşmaktadır. Sentromer, mitoz ve mayoz bölünme sırasında kromozom ayrılmasını sağlamak amacıyla iğ mikrotübülleri ile etkileşime geçerek genetik materyalin yavru hücrelere doğru olacak şekilde aktarılmasını sağlamaktadır.

Sentromer; içeriğindeki kinetokor mikrotübül sayısına ve etrafında perisentrik heterokromatin olup olmamasına bağlı olarak yapısal farklılık göstermektedir. Genetik olarak özdeş hücrelerin sentromerleri epigenetik özellikleri bakımından farklılık gösterebilmektedir. İnsanlarda, sentromer AT açısından zengin tekrarlar içeren monomer 171 bç, yüksek sıralı diziler halinde uzanmaktadır. Satellit DNA (satDNAs) ve transpozon elementleri (TEs; örneğin LTR, LINE, SINE, DNA transpozonlar) gibi tekrarlı sekanslar, sentromer bölgeleri için majör DNA komponentleri oluşturmaktadır (Yang, J.W. ve diğerleri, 2000; Ugarkovic, D.I., 2009; Plohl, M. ve diğerleri, 2014).

Ancak yapılan çalışmalarda DNA sekansından bağımsız, genomda rastgele bulunan ve α -satellit içermeyen neosentromer olarak tanımlanan sentromerlerin varlığı gösterilmiştir (Voullaire, L.E ve diğerleri, 1993; Marshall, O.J. ve diğerleri, 2008).

Neosentromerlerin, DNA'nın sentromer fonksiyonunu etkilemediği, insan genomunda spontan bir şekilde artmadığı ve normal fonksiyona sahip, herhangi bir saptanabilir fenotipik kusur olmadan nesiller boyunca devam ettiği ileri sürülmektedir. Bugüne kadar yaklaşık 100 neosentromer tespit edilmiştir (Warburton, P. E., 2004).

2.2.1.Sentromer Proteinleri

Hücre bölünmesi sırasında, insan kromozomlarında lokalize olan ve prekinetokor komponenti adayları olarak gösterilen 3 sentromer proteini CENP-A (17 kDa), CENP-B (80 kDa) ve CENP-C (140 kDa) bulunmaktadır (Sullivan, K.F. ve diğerleri, 1994). Sentromer üzerine yapılan çalışmalarda sentromer kararlılığının hem DNA hemde RNA tarafından kontrol edildiği gösterilmektedir (Ugarković, D.I., 2009). CENP-B (80 kDa protein) dimer formunda olup yapılan çalışmalarda CENP-B'nin hücre için gerekli olmadığı gösterilmiştir (Pietras, D.F. ve diğerleri, 1983; Kapoor, M. ve diğerleri, 1998; Perez-Castro, A. ve diğerleri, 1998). CENP-C (140 kDa protein) iç kinetokor plağındaki kromatin ile etkileşim içinde olup laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda DNA'ya bağlandığı ileri sürülmektedir (Yang, C.H ve diğerleri, 1996; Saitoh, H. ve diğerleri, 1992). Ancak CENP-C'nin tek başına sentromerik oluşumunu uyarmak için yeterli olmadığı ileri sürülmüştür (Fukagawa, T. ve diğerleri, 1999).

2.2.2 Sentomer Fonksiyonu

Sentromer, genomik kararlılığın sağlanmasında ve gen ifadesinin düzenlenmesinde; mayoz ve mitoz bölünme sırasında kromozom ayrılması, üreme hücrelerinin ve zigot formasyonun korunması, somatik doku ve organların farklılaşması ve gelişmesinde rol oynamaktadır (Christophorou, N. ve diğerleri, 2013).

Sentromer fonksiyonunun yerine getirilmediği durumlarda hücre bölünmesi sırasında hücre kararsızlığı, mikrotübüllerin kromozomlara bağlanmasında problemler, metafaz plağında hizalanma hataları, anafaz evresinde kromozom ayrılma hataları gözlenmektedir (Rattner, J. B., 1991; Schulman, I. ve Bloom, K. S., 1991).

Sentromerik DNA ve kromatin, hücre bölünmesi sırasında kromozom ayrılmasında önemli kromozomal elementlerdir (Sullivan, K. F., 2001; Cleveland, D. W. ve diğerleri, 2003). Histon şaperonları, histon- modifiye enzimleri, transkripsiyon faktörleri, nükleozom yeniden şekillenme faktörleri ve hatta RNA polimeraz 2 sentromerde epigenetik kontrol basamağında rol oynamaktadır (Ekwall, K., 2007).

2.3 Kinetokor

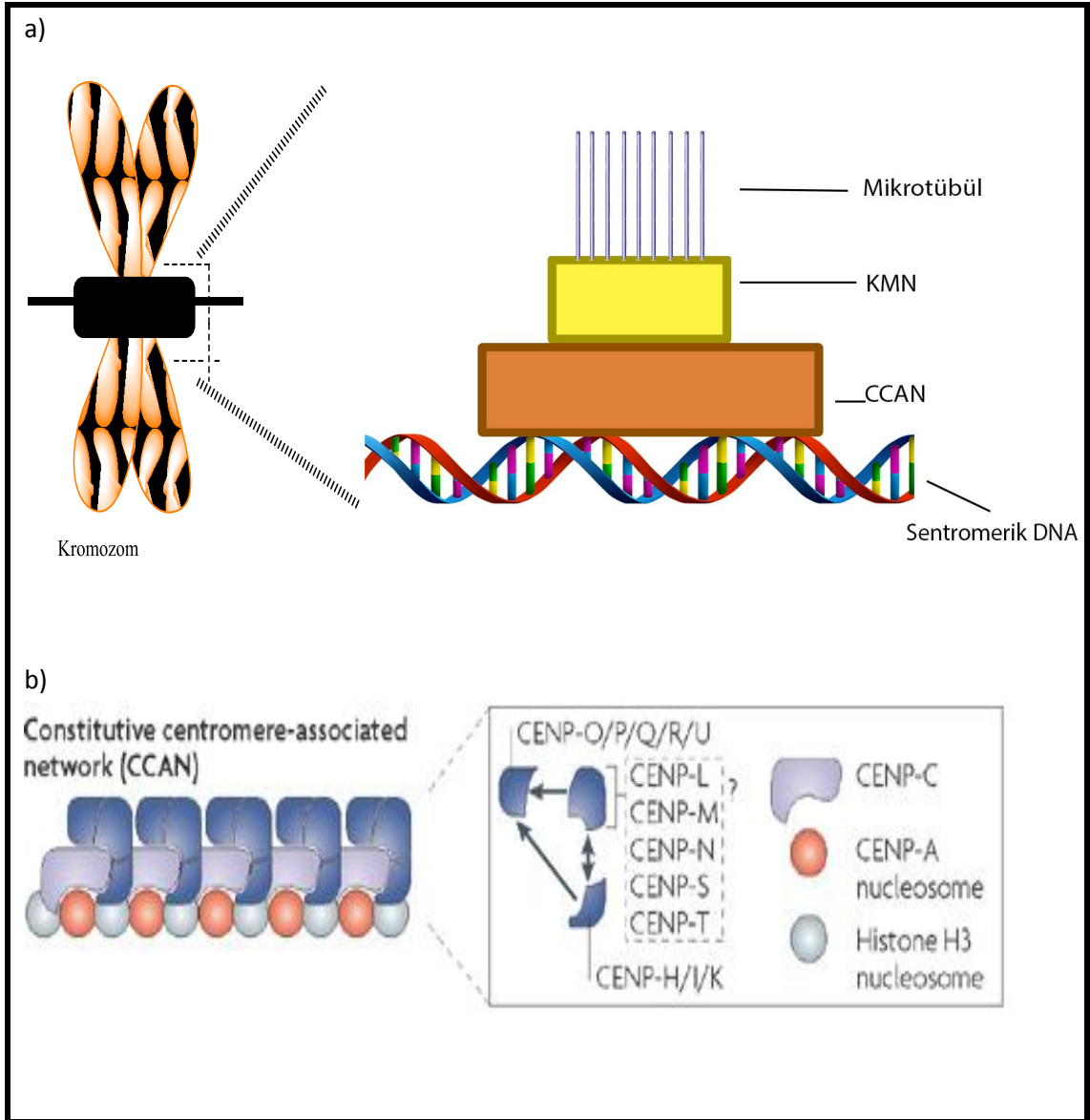
Kinetokor; her bir kromozomun sentromer bölgesinde bulunan mitoz bölünme sırasında iğ ipliklerinin kromozoma doğru bir şekilde bağlanması için sentromer DNA'sında toplanan ve 90'dan fazla proteinden oluşan bir komplekstir. Metafaz plak üzerinde kromozomların iki yönlü dizilmesi ve anafaz evresinde kardeş kromozomların ayrımını sağlamak amacıyla mikrotübülle kordineli çalışmak zorundadır (Cheeseman, M.I ve Desai, A., 2008; McEwen, B. F. ve Dong, Y., 2010). Kinetokor, iğ ipliği birikimi kontrol noktası (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) komponenti ile ilişkili olmakla birlikte bütünlüğünün bozulması kromozom ayrılmasında hatalara, kararsızlığa, tümorigeneze neden olmaktadır (Rattner, B. J., 1991; Schulman, I. ve Bloom, K. S., 1991). Kinetokor proteinleri, ilk olarak memeli hücrelerinde yapılan immünolojik aktivitelerle belirlenmiştir (Moroi, Y. ve diğerleri, 1980; Earnshaw, W.C. ve Rothfield, N., 1985). Kinetokor 3 boyutlu yapısıyla ilgili yapılan çalışmalarda, kinetokor bütünlüğünü sağlayan 90 protein; çekirdekte, ortada ve geçici alanda bulunduğu gösterilmiştir. Genomik kararlılığın sağlanması doğru kinetokor bileşimini gerektirmektedir (Burrack, S.L. ve Berman, J., 2012).

2.3.1 Konstitütif Sentromer İlişkili Ağ (Constitutive Centromere Associated Network, CCAN)

İnsan sentromeri en az 16 histon olmayan proteinden (CCAN; CENP -C, CENP-H, CENP-I, CENP-K, CENP-U, CENP-W ve CENP-X vb.) oluşmaktadır. Bu proteinler kinetokor iç plağında yer almakta ve ‘Konstitütif Sentromer İlişkili Ağ’(Constitutive centromere associated network, CCAN) olarak isimlendirilmektedir (Obuse, C. ve diğerleri, 2004; Foltz, D.R. ve diğerleri, 2006; Okada, M. ve diğerleri, 2006).

CENP-A ve diğer proteinler, kromatinle bir ağ oluşturmak için iğ mikrotübülleri ile etkileşime girerek sentromerik kromatin ve mitotik kinetokor arasında köprü görevi görmektedir (Şekil 2.1).

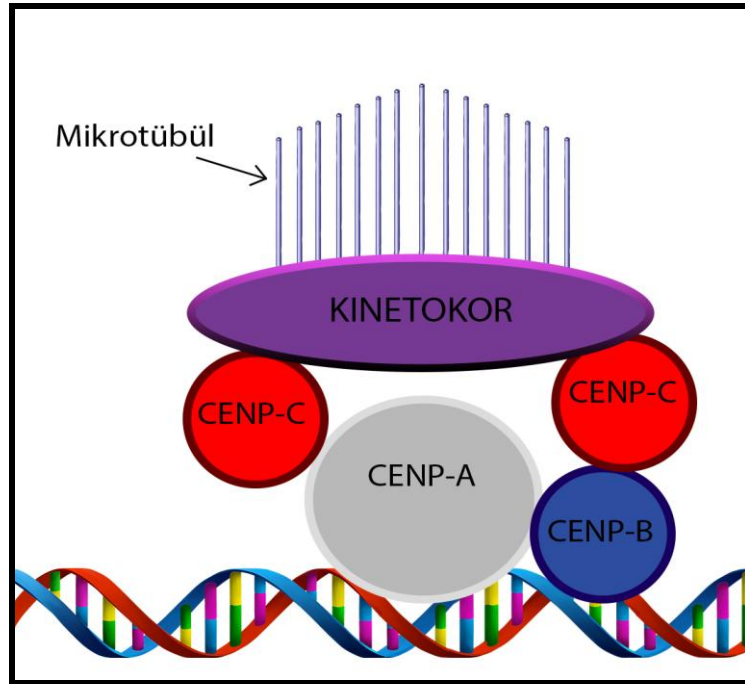
CCAN proteinleri, hücre döngüsü boyunca sentromerik kromatinle ilişkili ve DNA bağlanma aktivitesi veya direkt CENP-A ile etkileşim göstermektedir (Şekil 2.2). CENP-A, CENP-B, CENP-C ve CENP-T/W kompleksi DNA bağlanma özelliği göstermektedir (Pluta, A.F. ve diğerleri, 1992; Sugimoto, K. ve diğerleri, 1994; Yang, C.H. ve diğerleri, 1996; Hori, T. ve diğerleri, 2008). Bu proteinlerin her biri, histon proteinler olmasının yanında transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir kompleks olup histon katlanma alanı oluşturmaktadır (Mariño-Ramírez, L. ve diğerleri, 2011). CENP-T/W/S/X kompleks 100 bp DNA’ya bağlanmakta ve nukleazlara karşı DNA’yı korumaktadır. CENP-T/W/S/X kompleksin kararlılığı, hücre döngüsü boyunca kararlı olan ve S-fazı boyunca korunan CENP-A’dan çok farklıdır. CENP-T ve W, geç S safhasında veya G2’de oluşmaktadır (Slellfox, E.M. ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.1. Kinetokor Şematik Gösterimi Ve Sentromer Proteinleri.

a) Kinetokorun genel organizasyonunun şematik gösterimi. İki multi-kompleks, temel yapıyı oluşturmaktadır. Bunlar KNL-1/Mis 12 kompleks/Ndc80 kompleks (KMN) ve Konstitütif Sentromer İlişkili Ağ (CCAN)'dır (Lampert, F. ve Westermann, S., 2011).

b) Omurgalılarda, kinetokor proteinleri, hücre bölünmesi boyunca CENP-A birlikte bulunmaktadır. Bu proteinler 'Konstitütif Sentromer İlişkili Ağ' (Constitutive centromere associated network, CCAN) olarak isimlendirilir (Cheeseman, M. I. ve Desai, A., 2008).



Şekil 2.2. CENP-A, CENP-B ve CENP-C'nin kinetokor ve DNA'daki lokalizasyonu.

CENP-A'nın C-terminali kinetokor kompleksiyle direk bağlantı halinde olan CENP-C'ye bağlanarak kinetokor bütünlüğüne katkı sağlar. CENP-A ayrıca CENP-B ile birlikte kinetokor bütünlüğü için alternatif bir yolak oluşturmaktadır (French, T. B. ve Straight, F.A., 2013).

2.4. CENP-A Proteini

CENP-A nükleozom, H3 varyantı, 17 kDa ağırlığında bir homodimer olup özellikle sentromer bölgesinde bulunmakta ve kinetokor için yapısal ve işlevsel temel oluşturmanın yanı sıra sentromer oluşumu için epigenetik bir marker olma özelliğine sahiptir (Palmer, D. K. ve diğerleri, 1990; Sullivan, K. F. ve diğerleri, 1994; Csink, A.K. ve Henikoff, S., 1998). İnsanlarda alfa-satellit birimlerine bağlanan CENP-A uzunluğunun kromozomlar ve bireyler arası farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Sullivan, L. L. ve diğerleri, 2011).

CENP-A, kromozom üzerinde 2p23.3 bölgesinde lokalize olmaktadır. Memelilerde CENP-A'nın sessizleştirilmesinin kromozom ayrılmasında hatalara, kinetokor bütünlüğünün bozulmasına ve embriyonik ölüme neden olduğu ileri sürülmektedir (Choo, K. H. A., 1997; Howman, V. E. ve diğerleri, 2000; Bernard, P. ve diğerleri, 2001; Blower, M. D. ve diğerleri, 2002).

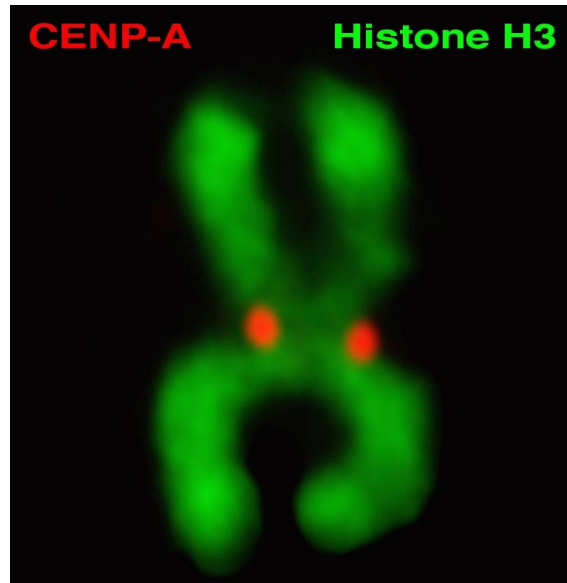
İnsan kromozomlarında CENP-A aktif sentromerlerde lokalize olmakta ve aktif sentromerlerin oluşması için ise CENP-A içeren kromatine ihtiyaç duyulduğu öne sürülmektedir (Warburton, P. E. ve diğerleri, 1997; Palmer, D. K. ve diğerleri, 1990; Saffery, R. ve diğerleri, 2000).

Yapılan çalışmalarda CENP-A ile H3 histon proteinin ortak homolojiyi paylaştığını gösterilirken (Palmer, D.K. ve diğerleri, 1991; Yoda, K. ve diğerleri, 2000) CENP-A ve H3, N terminal kuyrukları büyük ölçüde birbirlerinden farklıdır. CENP-A-H3.1 ile en yüksek homoloji (%62); CENP-A-hedefleme bölgesi olarak tanımlanan 42-amino asit bölgesi hariç, C-terminal katlanma bölgesinde görülmektedir (Sullivan, K. F. ve diğerleri, 1994). CENP-A/histon H4 heterotetramerinin kristal yapısı incelendiğinde, CENP-A içeren histon oktamernin, CENP-A/kanonikal H3 ile aynı kompaktlığa sahip olmadığını ve CENP-A'nın, H-3 histonun içeren nükleozoma göre daha katı olduğu ileri sürülmektedir (Yoda, K. ve diğerleri, 2000; Black, B. E. ve diğerleri, 2004). CENP-A nükleozom blokları kromozomların kutuplarına doğru yayılırken, H3 nükleozom blokları iç kromozom bölgelerinde yer alırlar (Blower, M. D. ve diğerleri, 2002). CENP-A ve H3 nükleozomlarının kromozomdaki lokalizasyonu Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

İnsan CENP-A, N-terminali post-translasyonel olarak üç modifikasyonun kombinasyonu ile modifiye edilebilmektedir. Bunlar; α -amino Gly1 grubunun trimetilasyonu, Ser16 ve Ser18 fosforilasyonudur. CENP-A fosforillenmiş Ser16/Ser18 formu, N- terminalindeki ikinci yapıyı oluşturmakta ve intra ve intermoleküler etkileşimlerin olmasını sağlamaktadır. Fosforillenmemiş CENP-A ifadesinin mitotik hatalara neden olduğu bildirilmektedir. CENP-A, N- terminalinin metilasyonu, RCC1 metiltransferaz (NRMT) ile gerçekleştirilmektedir (Bailey, O. A. ve diğerleri, 2013).

H-3 histonu ökromatin ve heterokromatinden farklı bir modifikasyon göstermektedir: histon asetilasyonu, H3K4 dimetilasyonu, H3K27 metilasyonu, H3K36 metilasyonu gözlenirken H3K9 metilasyonu görülmemektedir. Mitotik nükleozomal CENP-A genellikle trimetile halde olmasına rağmen %10 ‘undan daha azı metile olmayan formda bulunmaktadır (Sullivan, B. A. ve Karpen, G. H., 2004; Lam, A. L. ve diğerleri, 2006).

CENP-A fazla ifadesinin multisentrik kromozomlar oluşumuna neden olduğu bildirilirken (Heun, P. ve diğerleri, 2006) yapılan çalışmalarda tümörlerde CENP-A seviyesinin arttığı ve artmış CENP-A ifadesinin, tümör derecesi ve tümör invazyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca CENP-A ifadesinin azalmasının apoptozu desteklediği ve hücre döngüsünde duraksamalara neden olduğu bildirilmektedir (Athwal, K. R. ve diğerleri, 2015).



Şekil.2.3. CENP-A Ve H3 Nukleozomlarının Kromozomdaki Lokalizasyonu.

İnsan kromozomları H3 histonlarını (yeşil) içermekle birlikte H3 histon varyantı, CENP-A (kırmızı) sentromerde lokalize olmaktadır (Black, B. E. ve diğerleri., 2004).

2.4.1 CENP-A' nın Kristal Yapısı

İki boyutlu immunofloresans çalışmalarda, CENP-A nükleozomunun H4, H2A ve H2B ile oktamerik bir kompleks oluşturduğu ve 120-150 bç DNA bu kompleksin etrafını sarıldığı gösterilmiştir (Yoda, K. ve diğerleri, 2000).

CENP-A'nın tüm sentromer boyunca mevcut olduğu ileri sürülmesine rağmen yeni çalışmalarda CENP-A'nın sentromerin 3'de 1 yüksekliğini ve 3'de 2 genişliğinde ve bunun yanında total DNA'nın küçük (%6-8) bir kısmını kapsadığı ve özellikle kinetokora bakan bölümünün distalinde yoğunlaşmış bir şekilde olduğu gösterilmiştir (Blower, M. D. ve diğerleri, 2002).

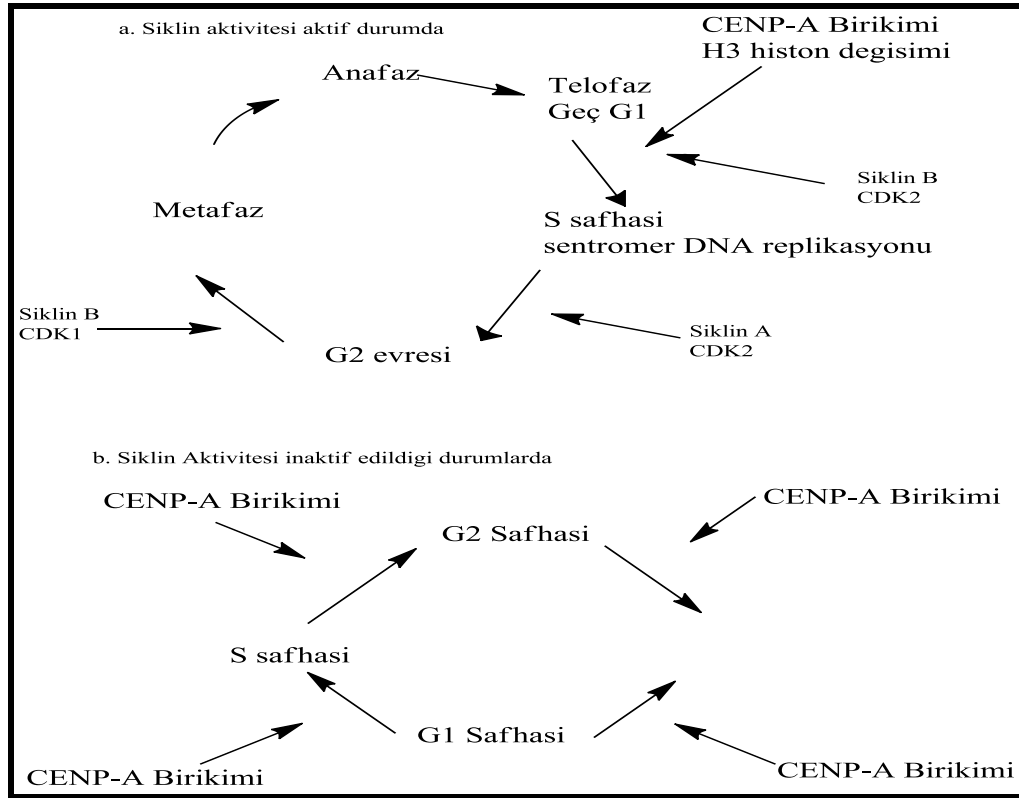
2.4.2 CENP-A Sentezlenmesi ve Dekondansasyonu

CENP-A oluşumu farklı protein kompleksleri içeren üç temel aşamayı kapsamaktadır. Bunlar; başlatma, oluşum ve korunmadır. Hücre bölünmesi sırasında, sentromer lokalizasyonu uyarılmalı ve kromatin CENP-A birikimi için modifiye edilmelidir. Daha sonraki aşamada CENP-A spesifik faktörler ile sentromer ilişki kurarak CENP-A birikimini sağlamaktadır. Son aşamada ise kromozom yeniden düzenlenmesi (remodeling) ve olgunlaşma evresi gerçekleşerek sentromerik kromatin tamamen stabilize edilmektedir (Stellfox, E. M. ve diğerleri, 2013).

CENP-A oluşumu G1 safhası boyunca devam etmekte ve hücre bölünmesinin ilerleyebilmesi için siklinlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda CENP-A birikiminin siklin-bağımlı kontrol mekanizması ile kontrol edildiği gösterilmiştir (Şekil 2.4). Siklin aktivitesinin yüksek olduğu S-safhasında CENP-A birikiminin gerçekleşmezken, mitoz bölünme sonunda siklin B degrede olmakta, Cdk1 aktivatörü inhibe edilmekte ve Cdk1 aktivitesi kaybolduğu durumlarda CENP-A'nın birikimi gerçekleşmektedir (Silva, M. C. ve diğerleri, 2012; Stellfox, E. M. ve diğerleri, 2013).

CENP-A birikiminde siklin aktivitesini öğrenmek amacı ile Silva ve arkadaşları siklin aktivitesini Roscovitine ve Pulvalanol A ile bloklamışlardır. Sonuçta Cdk 2'nin CENP-A birikimini bloklamada yeterli olduğu, Cdk 1'in S safhasında CENP-A birikiminin bloklanmasına katkı yaptığı ancak yeterli olmadığı saptanmıştır.

Ayrıca siklin 1 ve siklin 2 inaktive edildiğinde CENP-A'nın S safhasında da birikimi gerçekleşebilmektedir (Jansen, L. E. ve diğerleri, 2007; Merrick, K. A. ve diğerleri, 2008; Silva, M. C. ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.4. Siklin Aktivitesinin CENP-A Birikiminde Rolü.

CENP-A birikimi siklinler tarafından kontrol edilmektedir. Normal CENP-A birikimi siklin aktivitesinin azaldığı geç mitoz/erken G1'de gerçekleşmektedir. Siklinler inhibe edildiğinde hücre döngüsü boyunca programsız CENP-A yüklemesi ortaya çıkmaktadır (Stellfox, M. E. ve diğerleri, (2013).

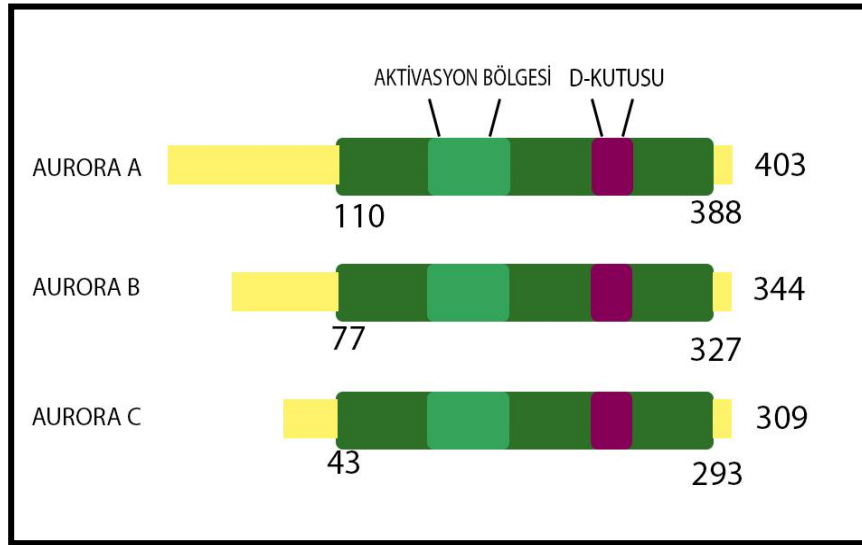
CENP-A içeren nükleozomun, olgun memeli spermatozolarıyla ilişkili ve üreme hücrelerinin bütünlüğünün sağlanmasına rol oynamasından dolayı CENP-A'nın erken embriyogenezde önemli bir role sahip olduğu bildirilmektedir (Palmer, D. K. ve diğerleri, 1990). CENP-A fosforillenmesinin engellenmesi mitoz sırasında hatalı kromozom hizalanmasına ve bunun sonucunda kinetokor mikrotübül bağlanmasında hatalara neden olduğu saptamıştır.

Bir serin/treonin kinaz ailesi üyesi olan AURKA tarafından CENP-A'da Ser7 fosforilasyonun doğru kinetokor fonksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Kunitoku, N. ve diğerleri, 2003).

2.5 Aurora Kinazlar

Aurora kinazlar; DNA kondensasyonu, sentromer olgunlaşması, iki kutuplu iğ ipliği oluşumu, kinetokor/mikrotübül bağlanması, kardeş kromatit ayrılması ve sitokinezde rol oynayan hücre döngüsünde görevli serin/treonin kinaz ailesinin üyeleridir. Omurgalılarda 3 üyesi tanımlanmıştır. Bunlar; AURKA, AURKB ve AURKC'dir (Nigg, E.A. ve diğerleri, 2001; Andrews, P.D ve diğerleri, 2003; Carmena, M. ve Earnshaw, W.C., 2003).

AURKA, AURKB ve AURKC, 309-403 arasında değişen amino asit uzunluğuna sahiptir (Şekil 2.5). AURKA, AURKB ve AURKC'nin kromozom üzerinde sırasıyla 20q13.2, 17p13.1 ve 10q13'de lokalize olduğu gösterilmiştir. Birçok dokuda (kolon, meme, ovaryum, prostat vb.) aurora kinazların aşırı ifadesi genetik kararsızlığa (genomik instabilite) ve sonuçta kansere neden olduğu bildirilmekte ve onkogenik fonksiyonlara sahip oldukları ileri sürülmektedir (Kollareddy, M. ve diğerleri, 2008). AURKA, kromozom ayrılması, kromozom hizalanması ve olgunlaşmasında rol oynarken AURKB ise kromozom bioryantasyonu, kardeş kromozom kohezyonu ve sitokinezde rol oynamaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.5. Aurora Kinazların Yapısı.

İnsan Aurora kinazları 309-409 arasında değişen amino asit uzunluğuna sahiptir. Aurora kinazlarda, NH₂ terminalinde düzenleyici bölge ve COOH terminalinde katalitik bölge olmak üzere iki farklı bölge bulunmaktadır. COOH terminalindeki D-kutusu degradasyondan sorumlu bölgedir (Marumoto, T. ve diğerleri, 2005).

2.5.1 AURKA (Aurora 2/ BTAK/ STK15)

İlk kez meme tümörlerinde 20q13'da tespit edilmiş (Tanner, M.M. ve diğerleri, 1994; Tanner, M.M. ve diğerleri, 1995) ve AURKA'nın ilk ismi meme tümörlerinde mRNA'sı aşırı ifade edildiği ve hücre transformasyonlarında rol oynadığından Breast Tumor Activated Kinases olarak belirlenmiştir. AURKA, S safhasından başlayıp M safhası boyunca ifade edilmekte ve hücre bölünmesinin regülasyonunda görev almaktadır. G2 evresi boyunca γ -tübülünde lokalize olması AURKA'nın sentromer proteini olduğunu göstermektedir (Dutertre, S. ve diğerleri, 2002). Ayrıca bipolar mitotik iğ ipliği kutuplarında bulunan mikrotübül ilişkili bir protein olduğu düşünülmektedir (Roghi, C. ve diğerleri, 1998). 1998 yılından beri, AURKA onkogen olarak belirlenmiş ve birçok tümörde AURKA'nın aşırı ifadesi rapor edilmiştir (Giet, R. ve diğerleri, 2005).

AURKA ifadesinin artışı, genomik kararsızlığa, tümör gelişimi, sentromer amplifikasyonları, multipolar iğ ipliği yapısı ve poliploidilere neden olmaktadır (Bischoff, J.R. ve diğerleri, 1998; Zhou, Y., 2012). Bu yüzden de antikanser ilaçları için mükemmel bir aday olarak gösterilmektedir (Keen, N. ve diğerleri, 2004).

İndirekt immunofluoresans çalışmalarında AURKA'nın G1 safhasının başına kadar dublike olmuş sentrozomda, profaz evresinde sentromer çevresinde, metafaz evresinde iğ ipliği kutupları çevresinde ve mikrotübüllerde, telofaz evresinde ise polar mikrotübüllerde bulunduğu belirtilmektedir (Kollareddy, M. ve diğerleri, 2008). AURKA, mikrotübül-ilişkili proteindir (Roghi, C. ve diğerleri, 1998). AURKA degregasyonu Serin51'in fosforilasyonu ile kontrol edilmekte ve yeni çalışmalarla degregasyonundan sorumlu yeni proteinler tanımlanmaya devam edilmektedir (Kunitoku, N. ve diğerleri, 2003).

Aurora kinazların ATP- bağlanma aktif bölgesi 26 birimden ve 3 varyant ile kaplıdır. Bu varyantların; Leu215, Thr 217, R220 AURKA için spesifik olduğu bildirilmektedir (Kollareddy, M. ve diğerleri, 2008).

Northern-blot analizi AURKA'nın timus, testis, fetal karaciğerde, kemik iliği, lenf nodülü ve dalakta az seviyede bulunduğunu göstermiştir (Bischoff, J.R. ve diğerleri, 1998).

2.5.2 AURKA Fonksiyonları ve Regülasyonu

Memelilerde yapılan çalışmalarda, AURKA'nın sentromer duplikasyonu, sentromer olgunlaşması, bipolar iğ ipliği oluşumu, kromozom ayrılması, hücrelerin mitoz giriş ve mitozdan çıkışını düzenlemek gibi fonksiyonu olduğu bulunmuştur (Marumoto, T. ve diğerleri, 2005). AURKA protein miktarındaki azalma, tetraploid hücre birikimine, iğ ipliği bozukluklarına neden olduğundan hücrelerin G2-M evresinde tutuklanmasına, H3 fosforilasyonunun bloklanmasına ve apoptozun indüklenmesine neden olduğu bildirilmiştir. Hatta Aurora kinazların aktivite inhibisyonu, tümör agresifliğini azalttığından tedavide kemoteropatik ilaç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Dutertre, S. ve diğerleri, 2002; Giet, R. ve diğerleri, 2005).

Kültür hücrelerinde yapılan çalışmalarda AURKA ektojik ifadesinin sentromer amplifikasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Zhou, H. ve diğerleri, 1998; Meraldi, P. ve diğerleri, 2002). AURKA ifadesinin inhibe edilmesi birkaç kısa mikrotübül birikimine ve bunun sonucunda mikrotübül nükleasyon aktivitesinde hatalara neden olduğu gösterilmiştir (Schumacher, J.M. ve diğerleri, 1998; Hannak, E. ve diğerleri, 2001).

Omurgalılarda AURKA'nın aktivitesi fosforilasyon ve defosforilasyon ile hücre döngüsü boyunca düzenlenmektedir (Kollareddy, M. ve diğerleri, 2008). AURKA için bilinen en önemli substrat TPX2'dir. TPX2'nin AURKA için substrat olmasının yanında aktivitesinden de sorumlu olduğu bildirilmektedir (Eyers, P.A. ve diğerleri, 2003). Mitoz bölünme sırasında TPX 2, AURKA'yı iğ kutuplarına taşır. TPX2'nin amino ucu AURKA'nın katalitik bölgesinin karboksil ucundaki T- halka bölgesine bağlanarak AURKA'nın fosforillenerek aktif edilmesini sağlamaktadır (Carmena, M. ve Earnshaw, W.C, 2003; Giet, R. ve diğerleri, 2005).

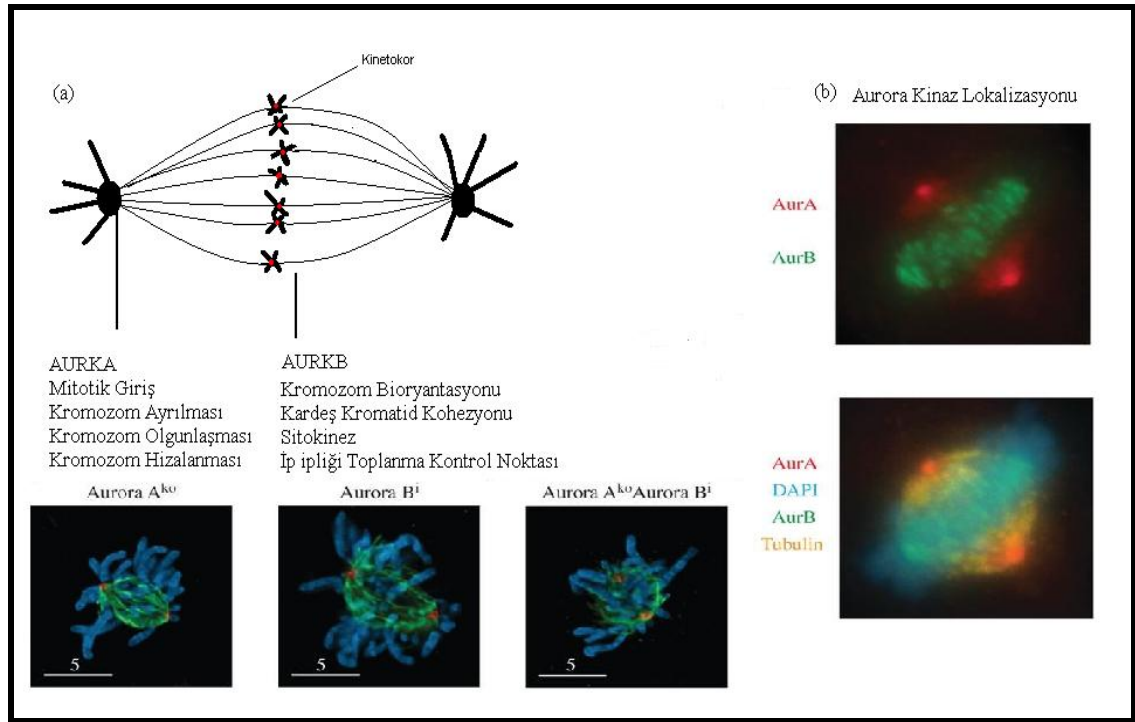
AURKA için bildirilen diğer substratlar: LIM protein 11, Eg5, CDC25B, p53 ve BRCA-1'dir. Yapılan çalışmalarda CENP-A'nın, AURKB ve AURKA için substrat olduğu bildirilmektedir (Zeitlin, S.G. ve diğerleri, 2001; Kunitoku, N. ve diğerleri, 2003).

AURKA, mitoz bölünme boyunca kinetokor bütünlüğünü sağlayan CENP-A'nın profaz evresi boyunca fosforillenmesi sağlamakta ve bu reaksiyon AURKB'nin iç sentromere restriksiyonu için gerekmektedir (Zeitlin, S.G. ve diğerleri, 2001; Kunitoku, N. ve diğerleri, 2003).

2.5.3 AURKB (Aurora B kinaz)

AURKB, kromozom üzerinde 17q13'de haritalanmış bir genidir ve mitoz bölünmenin erken safhalarında sentromer ile ilişkili anafaz evresinde iğ ipliği merkezinde ve sitokinez sırasında kontraktıl halkanın olduğu hücre kortesinde bulunmaktadır (Carmena, M. ve Earnshaw, W.C., 2003). AURKB, geç S evresinden G2 evresinde kadar H3 fosforillenmesinden sorumlu, kromozomal ayrılma, sitokinez, sentrozomdaki doğru protein yerleşimi, doğru mikrotübül kinetokor bağlantısı ve mitotik kontrol noktalarının regülasyonundan sorumlu olan kromozomal taşıyıcı (passenger) protein kodlayan bir genidir (Dar, A.A. ve diğerleri, 2010).

AURKB, iç sentromer proteini (Inner centromere protein, INCEP) ve Survivin’le bir kompleks oluşturmakta ve bu kompleks ‘kromozomal taşıyıcı protein’ olarak isimlendirilmektedir. Taşıyıcı protein kompleksinin (INCEP/Aurora B/Survivin) delesyon veya inhibisyonu sonucunda yapılan fenotipik analizde, Aurora B ve Survivin proteinlerinin mitotik kontrol noktalarında rolünün yanında CENP-A eksikliğinde görülen hatalara benzer; majör ayrılmama hatalarının görüldüğü bildirilmiştir. Mitoz boyunca CENP-A fosforilasyonunun sağlanmasında görev aldığından CENP-A bütünlüğünün korunmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Zeitlin, S.G. ve diğerleri, 2001).



Şekil 2.6. Aurora kinaz fonksiyonları.

AURKA ve AURKA B’nin fonksiyonları. AURKA ve AURKB eksikliğinde iğ ipliklerinde gözlenen dengesizliklerin mikroskop görüntüleri. (b) AURKA ve AURKB’nin insan *Hela* hücrelerindeki sentrozomal ve sentromerik lokalizasyonu (Hochegger, H. ve diğerleri, 2013).

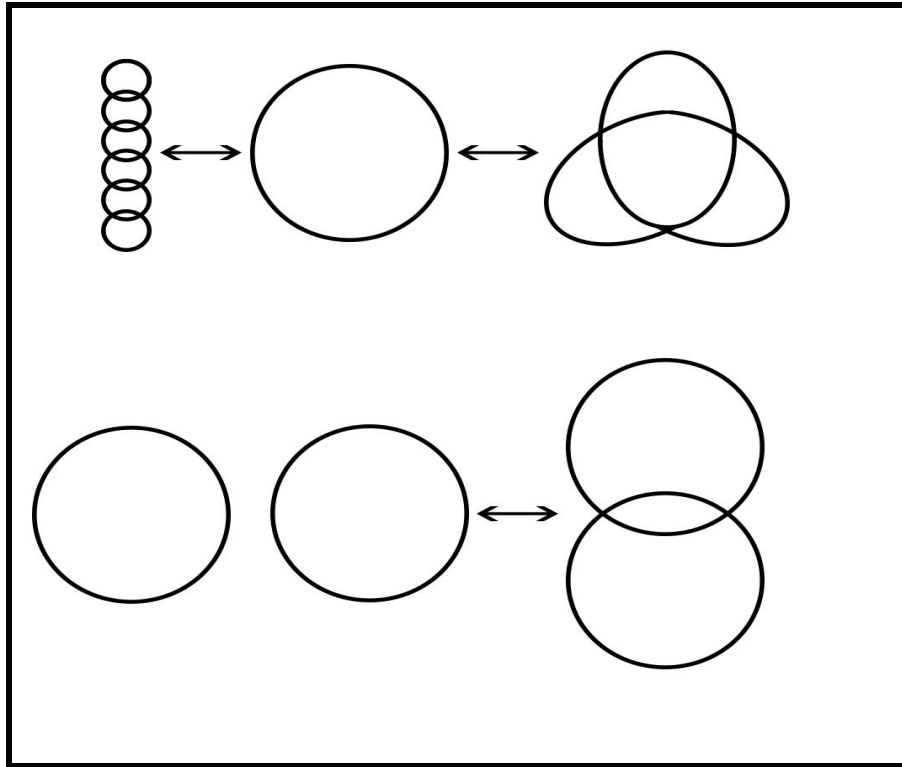
2.6 Topoizomeraz

Transkripsiyon ve replikasyon sırasında görülen topolojik problemler (pozitif süper sarmal vb.) DNA üzerinde stres yaratmakla birlikte DNA ipliklerinin onarılması gerekmektedir (Wang, J.C., 1996; Burden, D.A. ve diğerleri, 1998).

DNA Topoizomerazlar DNA'da geçici kırıklar meydana getirerek nükleotit sekansı ile belirlenmiş olan birincil yapıyı değiştirmeksizin DNA topolojisini modifiye edebilen ve DNA iplik karışıklarının ortadan kaldırılmasını sağlayan korunmuş enzimlerdir (Watt, P. M. ve Hickson, D. I., 1994; Gupta, M. ve diğerleri, 1995; Pommier, Y. ve diğerleri, 1998; Wang, X. ve diğerleri, 1998).

DNA ve RNA polimerazlar gibi enzimlerin işlevini kolaylaştırmak amacıyla replikasyon, transkripsiyon (özellikle Topoizomeraz 1), translasyon ve homolog rekombinasyonda görev almaktadır (Sternglanz, R. ve diğerleri, 1981; Wang, J.C., 1985; Austin, C.A. ve Fisher, L.M., 1990). Bunun yanında Topoizomeraz 2, kromatin kondensasyonu, yavru DNA sarmalının ayrılması/kesilmesi ve mitoz bölünme boyunca anafaz ayrılmasının doğru bir şekilde gerçekleşmesinde rol almaktadır (Şekil 2.7).

DNA Topoizomerazlar katalitik aktivitelerine göre sınıflandırılmaktadır. Tip 1 DNA Topoizomerazlar (E.coli DNA Topoizomeraz 1 ve ökaryotik Topoizomeraz 1), ATP'ye gereksinim duymadan geçici olarak DNA tek zincirinde kırık oluşturmakta ve DNA'nın gevşeme haline dönüşümünü katalizlemektedir. Tip 2 DNA Topoizomerazlar (E.coli DNA giraz ve ökaryotik DNA Topoizomeraz 2), ATP-bağımlı geçici bir çift zincirli DNA kırığı oluşturarak DNA'da oluşan 32 topolojik stresin azalmasını katalizlemekte ve diğer dubleksin ipliğinin geçişi için DNA-bağlı protein kapısı oluşturmaktadır (Downes, C.S. ve diğerleri, 1991; Chen, A.Y. ve Liu L. F., 1994; Watt, P.M. ve Hickson, D.I., 1994). Tip 1 ve Tip 2 Topoizomerazların her ikisi de DNA molekülünü rahatlatıcı etkiye sahipken, Tip 2 Topoizomeraz iç içe geçmiş DNA moleküllerini açılmasını sağladığından kardeş kromozomların ayrılması ve replikasyonda büyük önem taşımaktadır (Käs, E. ve Laemmli, U.K ve diğerleri, 1992). İç içe geçmiş DNA molekülleri hücre bölünmesi sırasında ayrılma hatalarına ve sonucunda hücre ölümüne neden olduğundan DNA süpersarmalının düzenlenmesi gerekmektedir.



Şekil 2.7. DNA Topoizomeraz 2 Fonksiyonları.

DNA Topoizomeraz 2 çift iplikte kırıklıklar meydana getirerek DNA süper heliks karışıklıklarının çözülmesinde ve replike olan DNA'nın ayrılması/kesilmesinde (dekatenasyonunda) rol oynamaktadır (Maxwell, A. ve Gellert, M., 1986).

2.6.1 Topoizomeraz Sınıflandırılması

Topoizomerazın, insanlarda ve yüksek ökaryotik organizmalarda 3 grubu tanımlanmıştır. Birinci grup, Topoizomeraz 1 ve 1B'yi (mitokondrial DNA Topoizomeraz) içerirken ikinci grup, Topoizomeraz 2 enzimleri olan Topoizomeraz 2 α ve β , üçüncü grup, tip 1A enzimleri olan III α ve III β içermektedir. Topoizomeraz 4, bakteriyel tip 2 Topoizomeraz olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda Topoizomeraz 5, prokaryot Topoizomeraz 1'in karşılığı olarak tanımlanmıştır (Kato, J. ve diğerleri, 1990; Slesarev, I.A. ve diğerleri, 1993; Lodge, A.J. ve diğerleri, 2000). Farklı organizmalardaki Topoizomeraz sınıfları ve fonksiyonları Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Farklı Organizmalarda Topoizomeraz Sınıfı ve Fonksiyonları (Maxwell A., 2005).

İsim	Sınıf	Organizma	Fonksiyon
Topoizomeraz 1 (W)	1	E.coli	Negatif süper sarmal DNA gevşemesi
Topoizomeraz 3	1	E.coli	Plasmid ayrılması ve kromozom kararlılığının sağlanması
DNA giraz	2	E.coli	Kromozom replikasyonu ve ayrılması gerekli Negatif süper sarmalın tanıtılması
DNA Topoizomeraz 4	2	E.coli	Kromozom ayrılması ve hücre bölünmesi için gerekli
Revers Giraz	1	Termofilik bakteriler	Pozitif süpersarmal tanıtılması
Topoizomeraz I	1	S. cerevisia	Pozitif ve negatif süper sarmal DNA gevşetmesi
Topoizomeraz 2	2	S. cerevisia	Kromozom ayrılmasında gerekli
Topoizomeraz 3	1	S. cerevisia	Rekombinasyon
Topoizomeraz 1	1	İnsan	Negatif ve pozitif süper sarmal DNA gevşetmesi
Topoizomeraz 2 α	2	İnsan	Fonksiyonu bilinmemekte. Süper sarmal aktivitesine sahip değil
Topoizomeraz 2 β	2	İnsan	Fonksiyonu bilinmemekte. Süper sarmal aktivitesine sahip değil.

Aynı alt grup içerisindeki Topoizomerazlar yapısal ve mekanik olarak aynı özellikleri taşımaktadır. Tip 1 B enzimleri ökaryot, arkea ve bakterilerin çoğunda gözlenmesin rağmen E.coli ve diğer birkaç bakteride gözlenmemektedir. Yapılan çalışmalar canlılarda minimum Topoizomeraz ihtiyacının Top1A ve Top 2 enzimleri olduğunu göstermesine rağmen laboratuvar koşullarında sadece tip 2 enzime sahip canlıların hayatta kaldığı gözlenmiştir (Wang, J.C., 2002). Çok hücreli organizmalarda, farklı gelişim safhaları ve farklı organlara göre DNA Topoizomeraz sayısı değişmektedir.

DNA Topoizomeraz 1'in inaktivasyonu 4-16 hücre safhasında embriyonik ölüme, Topoizomeraz 2 β inaktivasyonun da ölümlere neden olduğu gözlenmiştir. DNA Topoizomeraz 3 α 'nın inaktivasyonu sonucunda implantasyondan kısa bir süre sonra embriyonik ölüm gerçekleştiği, DNA Topoizomeraz 3 β inaktivasyonu sonucunda ise embriyonik ve neonatal anomali gözlenmemesine rağmen ortalama hayat süresinin kısaldığı görülmüştür (Wang, J. C., 2002). Topoizomeraz 3 α ve β genomik kararsızlıkla ilişkili olan Bloom, Werner ve Rothmund-Thomson sendromlarının patojeneziyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Kwan, K.Y. ve diğerleri, 2001; Raynard, S. ve diğerleri, 2006).

2.6.2 Topoizomeraz 1

Tip 1 enzimler, 20q12- 13.2'de lokalize olmakta ve 4kb mRNA'ya spesifik, 91 kDa ağırlığında 765 amino asit içeren katalitik özellikleri bakımından maya tip 1 enzime benzeyen monomerik polipeptidlerdir (Holm, C. ve diğerleri, 1985). İnsan DNA Topoizomeraz 1 enzimi, DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda başlama ve uzama evresinin rol oynamasının yanında translasyon, rekombinasyon, DNA onarımı ve kromozom kodensasyonu gibi hücresel olaylarda rol oynamaktadır.

2.6.3 Topoizomeraz 1 Fonksiyonu

Topoizomeraz 1, DNA'nın tek ipliğinde DNAaz aktivitesi ile geçici olarak tek zincirde DNA kırık oluşturarak herhangi bir enerji gerektirmeden pozitif ve negatif süper kıvrımlı DNA'nın gevşemiş forma dönüşümünü katalizlemektedir. Ayrıca DNA ipliğinin tek ipliğinden kırıklar oluşturarak ikinci ipliğin geçişine izin vermektedir. Topoizomeraz 1, pozitif süper sarmallar ve hareketli RNA polimerazın sarınımları sonucunda oluşan gerginliği rahatlatmak amacıyla döndürme işlemi yapmaktadır (Gouveris, P. ve diğerleri, 2011).

Enzimin aktif bölgesinde bulunan aktif tirozin bölgesinin (Tyr-723) hidrofilik grubu, iki DNA ipliği arasındaki fosfodiester bağlarına nükleofilik saldırı gerçekleştirerek kırık ipliğin 3'ucuna bağlı kalır ve geçici bir kovalent kompleks oluşturmaktadır. Böylece kırık ipliğin 5'ucu serbest kalır ve DNA molekülü dokunulmamış iplik etrafında dönebilir. Bu dönüş, yukarıda belirtilen pozitif ve negatif üste sarınımları gevşemesine de yol açar (Lodish, H., 2000).

2.6.4 Topoizomeraz 2

Topoizomeraz 2, kromozom kodensasyonunda, DNA süper heliksin çözülmesinde ve morfolojik olarak farklı interfaz kromozomlarının toplanmasında esansiyel görev almasının yanında (Gellert, M., 1981; Wang, J.C., 1985 ; Uemura, T. ve diğerleri., 1986; Coelho, A.P. ve diğerleri, 2006) hücre bölünmesi sırasında kromozom ayrılmasının hatasız gerçekleşmesinde rol oynamaktadır (Rattner, B.J. ve diğerleri, 1996).

Topoizomeraz 2, ~160-180 kDa moleküler ağırlığında ökaryotlarda homodimerik yapıdadır (Miller, K.G. ve diğerleri, 1981; Burden, D.A. ve Osheroff, N., 1998). Topoizomeraz 1'den farklı olarak Topoizomeraz 2, birine çok yakın iki izoforma sahiptir. İzomerler (top 2 α ve top 2 β) amino asit sekansları bakımından homoloji (%70) göstermesine rağmen farklı kromozomlarda (insanlarda kromozom 17 ve 3) bulunan genler tarafından kodlanmaktadır (Jenkins, J.R., 1992; Austin, C.A.ve Marsh, K.L., 1998; Capranico, G. ve Binaschi, M., 1998).

Prokaryot enzimler, bakteriyal DNA giraz ve DNA Top 4 A₂B₂ tetramer yapıdadır. Topoizomeraz 2, bakteriyal enzim, DNA giraz ve Top 4 ile benzer sekans ve organizasyona sahip olup Tip 2A Topoizomeraz süper ailesini oluşturmaktadır (Lynn, R. ve diğerleri, 1986; Peng, H. ve Mariani, L.J., 1993; Berger, J. M., 1996).

Ökaryot TOP 2'de her bir alt üniteye 3 katalitik bölge içermektedir. 1-600 amino asit içeren N-terminal bölgesi bakteriyal DNA giraz enziminin B altbirimi ile homolog olup ATP-bağlanma sekanslarını içermektedir. Merkez bölgesi 660-1200 amino asitten oluşmakta ve DNA giraz enziminin A alt birimi ile homolog olup tirozin birimlerini içermektedir. C-terminal bölgesi DNA giraz enzimi ile homoloji göstermemektedir (Corbett, A. H. ve diğerleri, 1993; Berger, J. M., 1996; Wang, J. C., 1996; Burden, D. A. ve Osheroff, N., 1998).

DNA ipliklerinin TOP 2 yolu ile ayrılması sırasında, DNA'nın fosfodiester omurgasına saldırı gerçekleşmekte ve fosfotirozin bağı oluşturmak üzere aktive olan bir tirozin kullanılmaktadır. TOP 2 aktivitesi için, aktif tirozin bölgesi ve TOPRIM etki de dahil olmak üzere, diğer birimler arasındaki bir işbirliğini gerektirmektedir (Burden, D.A. ve Osheroff, N., 1998). Topoizomeraz 2 aktivitesi fosforilasyon gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlarla düzenlenmektedir (Nitiss, J. L., 2009).

2.6.5 Topoizomeraz 2 Fonksiyonları:

Topoizomeraz 2, hücre bölünme sırasında kromozom yapısı ve ayrılmasında birçok önemli fonksiyona sahiptir. Ayrıca TOP 2, transkripsiyon aktivasyonu ve replike olan DNA'nın dekatensasyonunda rol oynamasına rağmen replikasyon için gerekli olmadığı bildirilmektedir (Holm, C. ve diğerleri, 1985; Gasser, S.M. ve diğerleri, 1986; Gimenez- Alban, J. F. ve diğerleri, 2000; Nitiss, J.L., 2009). Ancak TOP 2 replikasyon için gerekli olmamasına rağmen inhibe edildiği durumlarda replikasyonun gerçekleştiği ancak replikasyon çatalında pozitif süper sarmal DNA birikiminin görüldüğü bildirilmiştir. TOP 2 enziminin aktivitesinin gözlenmediği durumlarda hücrelerin DNA replikasyonunu tamamladığı ancak daha sonra mitoz bölünmeye girdiğinde öldüğü bildirilmiştir (Holm, C. ve diğerleri, 1985).

TOP 2 enzimleri birçok organizmada ve hücre tipinde kromozom kodensasyonunu düzenlemektedir (Nitiss, J.L., 2009). Yapılan çalışmalarda kromozom kodensasyonu sonrasında TOP 2 enziminin engellenmesi durumunda hücrelerin metafaz evresinde duraksatıldığı ve kromozom ayrılmasında hataların görüldüğü bildirilmiştir (Tablo 2.3).

Rose ve diğerleri, 1990 yılında yaptıkları çalışmada TOP 2'nin mayoz 1 sırasında rekombinant kromozom ayrılmasında gerekli olduğunu ve inhibe edildiği durumlarda hücrenin mayoz 1 profaz evresinde duraksatıldığını göstermiştir (Rose, D. ve diğerleri, 1990). TOP 2 eksikliğinde kromozom kollarında anormal lokalizasyon ve amfitelik kinetokor bağlanmasında hatalar, küçük kromozom (kolları 250 kb) uçları basit sökülme yoluyla çözülebilmektedir (Spell, R.M. ve Holm, C., 1994).

Topoizomeraz 2'nin transkripsiyona etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda TOP 2 aktivitesinin olmadığı durumlarda polimeraz 1 enziminin etkilendiği ve rRNA transkripsiyonun azaldığı gözlenmiştir (Brill, S.J. ve Sternglanz, R., 1988; Schultz, M. C. ve diğerleri, 1992). TOP 2 tarafından dekatensasyon (ayrılma/kesilme) veya kromozom kodensasyonunun tamamlanmadığı durumlarda TOP 2'yi inhibe eden maddelerin DNA'da hasar oluşturduğu ve DNA hasar kontrol noktaları nedeniyle hücre döngüsünün duraklatılabildiği ileri sürülmüştür (Downes, C.S. ve diğerleri, 1991; Clifford, B. ve diğerleri, 2003).

Bunun yanında Lyu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada TOP 2 β 'nin nöral gelişimde rol oynadığını göstermesinin yanında (Lyu, Y.L. ve diğerleri, 2006) TOP 2' nin proliferatif hücrelerde önemli olduğu ve anti-kanser ajanlarının hedefi olduğu bildirilmektedir (Nitiss, J.L., 2009). Topoizomeraz 2 miktarı azalması sonucunda Aurora kinazların lokalizasyonunda anormali gözlenmiştir (Coelho, A. P. ve diğerleri, 2006).

Tablo 2.3. Topoizomeraz 2 Hücre Bölünmesindeki Rolü.

(Holm, C. ve diğerleri, 1985; Clarke, D. J. ve diğerleri, 1993; Watt, P. M. ve Hickson, D. I., 1994; Sumner, A.T., 1995;).

TOP 2 Fonskiyonları	TOP 2 eksikliğinde Gözlenen Olaylar
Mitoz	
Kromozom Ayrılması	Anormal mitoz,Hücre ölümü
Kromozom Kodensasyonu	Hücrelerin Pre- kondanse kromatid halinde tutuklanması
Mayoz	
Replikasyon	Mayoz 1' de tutuklanma (canlılık korunur)
Rekombinasyonun Baskılanması	Replikasyon engellenmez ancak katenat dimerlerinin birikimi
	rDNA' nın aşırı rekombinasyonu

2.7 Metilasyon

DNA metilasyonu, genomik DNA' nın %3-5'inde, CpG dinükleotidlerindeki sitozin halkasının 5. pozisyonundaki karbona metil grubunun (-CH₃) eklenmesi ile meydana gelen, geri dönüştürülebilen kovalent kimyasal bir modifikasyondur (Gopalakrishnan, S. ve diğerleri, 2008).

Promotor bölgede yer alan genlerdeki DNA metilasyonu; histon düzenlenmesi, transkripsiyonel makine ve transkripsiyon faktörlerinin erişebilirliğini etkileyerek gen ifadesini etkilemekte ve gelişim sırasında epigenetik kararlılığı düzenlemektedir (Herman, G.J. ve diğerleri, 1996; Klose, R.J. ve Bird, A.P., 2006).

İnsan genomunda CpG dinükleotidince zengin, 122 kb uzunluğunda kısa DNA bölgelerine CpG adacıkları denir. Bu adacıklar, genellikle tüm normal dokularda metile değildir ve genlerin 5' ucunda (promotor, ifade edilmeyen bölge-UTR, ekzon-1) bulunmaktadır (Etseller, M. ve Herman, J., 2002). CpG adacıkları ilk olarak, restriksiyon enzimi HpaII için kesim bölgesine sahip kısa genomik DNA bölgeleri olarak tanımlanarak, "HpaII Tiny Fragment (HTF) adacıkları" olarak adlandırılmıştır. CpG adacıkları genomun yaklaşık olarak %2'sini oluşturmakta ve %60-70 oranında guanin ve sitozince (GC) zengin dizilere sahiptir (Clark, S.J. ve Melki, J., 2002). Normal insan doku DNA'sında 5- metilsitozinin oranı; HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ve HCPE (High Performance Capillary Electrophoresis) ile yapılan ölçümlerde %0.75- 1 olarak bildirilmektedir (Etseller, M. ve Herman, J., 2002).

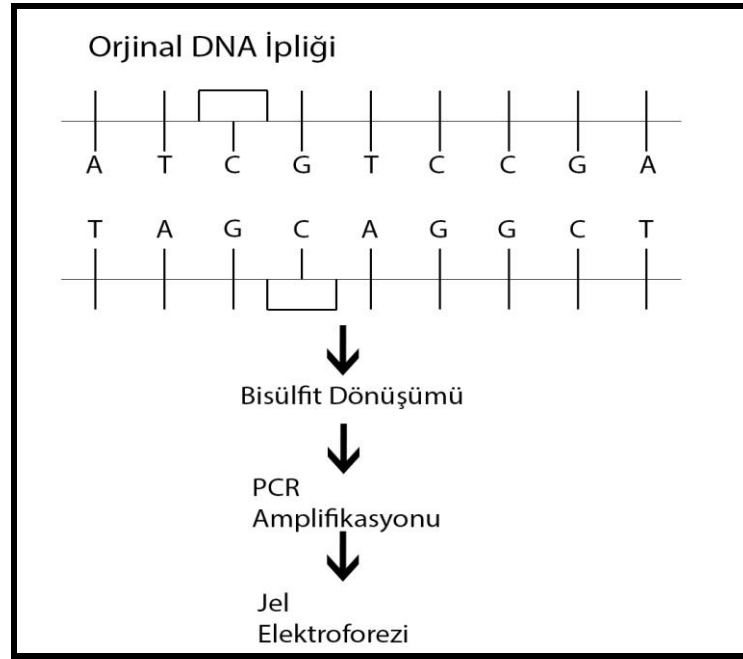
CpG adacıkları, "housekeeping" genleri olarak bilinen temel genlerde, dokuya özgü genlerin 5'promotor bölgelerinde ve ayrıca bazı genlerin 1. ekzonlarında bulunmaktadır. İnsan genomunda bu şekilde tanımlanmış 45.000 CpG adacığı bulunmaktadır. Normal şartlarda CpG adacıkları; işaretlenmiş (imprint) genler, kadınlarda X kromozom genleri, eşey hücrelerine özgü genler ve dokuya özgü genler olmak üzere 4 durumda metile durumda bulunmaktadır (Clark, S. J. ve Melki, J., 2002).

DNA metiltransferaz (DNMTs), CpG dinükleotidlerini (CpG adacıklarını) substrat olarak kullanarak DNA metilasyonunu katalizlemekte ve histon deasetilaz (HDACs), histon metiltransferaz (SUV (39) H1/ 2 ve EZH2) gibi histon düzenleyici enzimlerle ilişki içinde bulunmaktadır (Mompalmer, R.L. ve Bovenzi, V.J., 2000; Gopalakrishnan, S. ve diğerleri, 2008). DNA metiltransferaz, transkripsiyonel inaktivasyon, promotor metilasyonu ile düzenleyerek embiyonik gelişim boyunca hücre farklılaşmasında rol oynamasının yanında genomik imprinting, X inaktivasyonu ve proliferasyonda rol oynamaktadır (Gopalakrishnan, S. ve diğerleri, 2008; Li, Y. ve Tollefsbol, O.T., 2011).

DNA metilasyonunda gözlenen abnormal durumların DNA kararsızlığı ve kanser gibi hastalıkların gelişiminde etkili olduğu bildirilmektedir. Birçok sessizleştirilmiş gen plasental gelişmesinde çok önemlidir ve sıkça plasental ve fetal büyüme düzenlenmesinde rol oynamaktadır. DNA metilasyonu plasentada farklı miktarda olmaktadır (Hanna, C.W. ve diğerleri, 2013). Ayrıca, memeli genomunun büyük bölümü bu yolla işaretlenir (imprint) ve DNA metilasyonu sıklıkla heterokromatin bölgelerde görülür.

Metilasyon durumunun hücre tipine özgüllüğü, farklı malignensiler arasında sıklıkla görülmektedir. Lösemide, CpG adacıklarındaki sitozinlerde metilasyon artışları; hipermetilasyon ve hücre tipi özgüllüğünden kaynaklanmaktadır. Hipermetilasyonla gerçekleşen sessizleşme; DNA tamiri (hMLH1, BRCA1, MGMT), hücre döngüsü ve apoptoz (DAPK, APAF-1) gibi hücresel iletişimdeki tüm yolları etkiler (Clark, S.J. ve Melki, J., 2002). Sentromerik H3K4me2, uzun sürekli kinetokor kararlılığı için gereklidir ayrıca H3K4me2 eksikliği yeni sentezlenen CENP- A birikmesinde sorunlara neden olmuştur (Bergmann, J .H. ve diğerleri, 2011). Histon modifikasyonları aktif veya bastırılmış kromatin göstergesidir ve 'Histon kodu' hipotezine göre spesifik histon modifikasyon kombinasyonları kromatin düzenlemesi için karmaşık işlevsel bir hiyerarşi oluşturmaktadır.

CpG dinukleotitlerindeki metile olmamış olan sitozin urasile dönerken, metile olmuş sitozin bu değişikliklerden korunmaktadır (Şekil 2.8). Metillenmiş DNA ve metile olmayan DNA'nın primer dizaynında, bisülfite modifikasyonundan kaynaklanan dizi farklılıklarından yararlanılmaktadır. Primer dizayn sırasında bisülfite modifikasyonundan sonra sadece metile olmamış DNA amplifiye edilirken timidin sitozine dönüşür ve 3' ucunda yer alır (Smith, E. ve diğerleri, 2009).



Şekil 2.8. Metilasyon Spesifik PZR Hazırlık ve Çalışma Aşamaları.

Metile olmuş ve metile olmayan CpG dinukleotitlerinin saptanmasında bisülfıt dönüşümü kullanılmaktadır. Bisülfıt dönüşümü sonunda metile olmayan tüm sitozinler urasile dönüşürken metile sitozin, sitozin olarak kalmaktadır. Daha sonra PZR amplifikasyonu ve Jel elektroforezi teknikleri kullanılarak metile, metile olmayan kontrol grupları ve ürünler jele yüklenerek karşılaştırılır ve değerlendirme yapılmaktadır.

2.8 Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerini bir araya getiren teknolojiye moleküler sitogenetik denilmektedir. FISH yöntemi; kolay uygulanabilir, duyarlılığı ve güvenilirliğinin yüksek, diğer moleküler DNA hibridizasyon yöntemlerine göre yüksek rezolüsyon gücü ve mozaicism tanısı gibi avantajlarının olması nedeni ile geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

Sitogenetikte rutin Giemsa/ Tripsin (GTG) bantlama tekniğinde > 4Mb, HRB (2000 band düzeyinde) tekniğinde de >2 Mb ye kadar olan düzensizlikler saptanırken, FISH tekniği ile 1-3 Mb arasında olan yapısal düzensizlik saptanabilmektedir.

In Situ Hibridizasyon (FISH), kültüre ihtiyaç duyulmadan, oligonukleotid problemleri kullanılarak işaretlenmiş örneklerin floresan mikroskopunda analiz edilmesini sağlamaktadır. FISH tekniği, hücre fiksasyonu, prob hibridizasyonu ve son olarak ilgili bölgenin floresan mikroskopunda görüntülenmesine dayanmaktadır (Amann, R. ve Fuch, M. B., 2008). Prob; genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif (günümüzde floresan) madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir.

Moleküler sitogenetik metodlar (CGH, ISH, FISH) klasik sitogenetik yöntemlerle tanımlanamayan kromozomal yeniden düzenlemeler, marker kromozom ve kromozomal mikrolezyonlar ve kriptik kırıkları saptayabilmektedir. Bu nedenle FISH, genetik anomalilerin tespit edilmesinde kullanıldığından genetik hastalık teşhisinde önem arz etmektedir (Bishop Ryan, 2010). Kromozom artışı veya azalışı gibi sayısal dengesizlikler lösemi, lenfoma ve tümörlerde tanımlanmıştır. Doğru klinik tanı ve tedavinin başlatılmasında, belirli bir kromozom bölgesi veya gende dengesizlik olup olmadığını bilmek önem taşımaktadır ve birçok olguda FISH veya diğer moleküler çalışmalar olmadan bu kromozomal dengesizliklerin belirlenmesinin imkanı bulunmamaktadır.

Bunun yanında p-53 ve p-21 gibi tümör baskılayıcı genlerin delesyonu, N-myc, C-myc ve HER-2/neu gibi onkogenlerin amplifikasyonlarının tespit edilmesinde FISH yöntemi kullanılmaktadır (Fan, Yao-Shan, 2003).

Nedeni açıklanamayan zeka geriliği ya da gelişim yetersizliği olan hastalar subtelomerik problemler ile FISH yöntemiyle incelenmiştir. Yapılan çalışmada, zeka geriliği gözlenen hastalarda subtelomerik dengesizliklerinden %7.4 olduğunu gösterirken (Knight, S. J. ve diğerleri, 1999) FISH tekniğinden kullanılan subtelomerik problemler açıklanamayan zeki geriliği ve gelişim hatalarının kesin tanı için bir araç olarak kabul edilmiştir (Fan, Yao-Shan., 2003).

Canlı doğum hatalarının %95'inde 13, 18, 21, X, Y kromozom anöploidileri görülmekte ve interfaz FISH tekniği, kültüre edilmemiş amniyon hücrelerinde bu anöploidileri tespit ederek prenatal tanıda kullanılmaktadır (Klinger, K. ve diğerleri, 1992). Yapılan çalışmalar kromozomal mozaizmin insan gelişimini etkilediğini gösterirken FISH, CGH ve diğer moleküler teknikler, erken embriyonik / fetal gelişimde kromozom mosaizmin biyolojik ve klinik öneminin araştırılmasını kolaylaştırmıştır (Lomax, B. ve diğerleri, 1994; Lestou, V.S. ve diğerleri, 1999; Kalousek, D.K., 2000).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 GEREÇ

3.1.1 Çalışma Grubu

Çalışmamızda 19.01.2011 ve 28.04.2015 tarihleri arasında Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliğine direkt başvuran olgular ile dış merkezlerden Tıbbi Genetik Laboratuvarına test edilmek amacıyla yönlendirilen toplam 47 düşük materyali ve Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliğini veya dış merkezlerden amniyosentez işlemi uygulanarak Yakın Doğu Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilen 85 amniyon materyali kontrol grubu olarak çalışmaya katılmıştır.

3.1.2 Materyal Alımı

Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliğinden veya dış merkezden genetik laboratuvarına yönlendirilen düşük materyali, uygun transport besiyeri ve oda sıcaklığında (25° C) en kısa sürede (2 saat içerisinde) laboratuvara ulaştırılmıştır. Eğer transport işlemi 24 saatten uzun sürecekse numunenin +4°C'de saklanması sağlanmıştır.

Çalışmamızda kontrol amaçlı kullanılan amniyon örnekleri 2 ayrı contasız enjektör içerisine alınmıştır. Öncelikle 2-3 ml amniyon sıvısı (maternal kontaminasyonu önlemek amacıyla) ayrı bir enjektör içerisine ve daha sonra yaklaşık 15-20 ml steril enjektör içerisinde alınarak uygun taşıma koşullarında en kısa sürede laboratuvara getirilmiş; bekletilmeden steril bir ortamda ekim ve DNA izolasyonu işlemine geçilmiştir.

Çalışmaya dahil edilecek olgular bilgilendirilmiş ve çalışmayla ilgili detaylı açıklama içeren onam formu imzalatılmıştır (Ek. 7.1).

Çalışma grubu ve kontrol grubu örneklerine kromozom analizi amacıyla hücre kültürü ve bantlama, CENP-A metilasyon analizi için DNA izolasyonu, bisülfıt modifikasyonu, metilasyon spesifik PZR ve AURKA ve TOP2 gen amplifikasyonu analizi için FISH yöntemi uygulanmıştır.

Yapılan çalışmalarda kontaminasyonun en aza indirilmesi amacıyla tüm çalışma, %70'lik alkol ile temizlenmiş ve ultraviyole (UV) ile steril edilmiş laminar kabin içerisinde yapılmıştır. DNA hazırlığı için kullanılan bütün çözeltiler, otoklavlanmış su ile hazırlanmış, olası DNA aerosol kontaminasyonunu azaltmak için her çalışmadan önce çalışma alanına ultraviyole (UV) sterilizasyonu uygulanmıştır.

3.1.3 Kullanılan Gereçler

Çalışmamızda sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerde kullanılan gereçler aşağıda verilmiştir:

Hassas terazi , mikropipet takımı ve uçları (1-10-100-1000 µl) , 37°C CO₂ etüv (Sanyo CO₂ incubator), otoklav (nüve steamart OT40L), buzdolabı +4°C (Sanyo medcool), derin dondurucu -20°C (Sanyo bio-medical freezer), santrifuj (Thermo Haraeus multifuge 3SR+), vorteks (velp scientifica 2X³), ısı bloğu, pH metre, mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi (UV star biometra 312nm), Polimeraz Zincir Reaksiyon cihazı (veriti 96 well thermal cyclers), Zeiss Imager M2 AX10, sıcak su banyosu (Nüve BM201) , 25 ml flask, Steril Plastik pipet, 15'lik falcon ,steril enjektör (5ml-10ml-25 ml), Ependorf Tüpü (1,5 ml lik), PZR tüpleri, 37°C etüv, kapaklı santrifuj tüpleri (1.5 ml), elektroforez aleti (Bio-rad Power Pac TM, Basic, 300 V), lam (Thermo Scientific, Microscope slides 76X26 mm), lamel (24x60, Hounisen 12x12), nanodrop UVS-99 device (ACT gene, USA), Leica DM IL LED invert mikroskop, karıştırıcı (IkoRot basis), hassas tartı (Shimadzu ELB) ve laminar kabin (Thermo Scientific maxisafe 2020) kullanılmıştır.

3.1.4 Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler Yakın Doğu Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir:

GuRR Buffer: 0,235 gr Na_2HPO_4 , 0,235 gr NaH_2PO_4 250 ml distile su içerisine hazırlanıp pH 6.8'e ayarlanır.

% 5 Ba (OH)₂: 500 ml distile su içerisine 11,04 gr Ba(OH)_2 eklenerek hazırlanır.

0,2 N HCL: 1 L distile su içerisine 16,6 mL HCl eklenerek hazırlanır.

20X SSC: 44,150 gr trisodyum dihidrat ve 87,600 gr sodyum klorid (NaCl), 500 ml distile su içerisine eklenerek hazırlanır.

1XSSC: Hazırlanan 20XSSC'den 10 ml alınır 190 ml distile su içerisine eklenerek hazırlanır.

0,1XSSC: Hazırlanan 20X SCC'den 1 ml alınır 199 ml distile su içerisine eklenerek hazırlanır.

2XSSC: Hazırlanan 20XSSC'den 20 ml alınır 180 ml distile su içerisine eklenerek hazırlanır.

Transport Tamponu: 100 ml RPMI içerisine 2 ml penisilin ve 2 ml L-glutamin eklenerek hazırlanır.

Amniyon hücre yıkama tamponu: 100 ml RPMI, 2 ml penisilin, 2 ml L-glutamin ve 20 ml fetal kalf eklenerek hazırlanır.

0,075 M Hipotonik: 250 ml distile su içerisine 1,398 gr KCl (MW 74.5513 g/mol) tartılarak yapılmaktadır. Karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırılması sağlanır.

0,06 M Hipotonik: 250 ml distile su içerisine 1,118 gr KCl (MW 74.5513 g/mol) tartılarak yapılır. Karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırılması sağlanır.

PBS (Phosphate-buffered saline) : 8 gr NaCl , 0,2 gr KCl , 1,15 gr Na_2HPO_4 ve 0,2 gr KH_2PO_4 1 litre içinde çözündürülür. pH 7.4 olmalıdır.

10X Tris-Borat-EDTA (TBE): 100 gr Tris, 55 gr borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA distile su içinde çözüldü, sodyum hidroksit ile pH'sı 8'e ayarlandı ve hazırlanan tampon, otoklav kullanarak sterilize edildikten sonra, oda sıcaklığında saklandı.

1X Tris-Borat-EDTA (TBE): 500 ml 1X TBE stok hazırlamak için, 10X TBE'den 50 ml alınarak 450 ml distile su eklenerek seyreltildi ve hazırlanan çözelti, otoklav ile sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M EDTA: 46,53 gr EDTA 250 ml distile su içinde çözüldü ve pH'sı sodyum hidroksit kullanılarak pH 8.0'e ayarlandı ve otoklav ile sterilize edildikten sonra, oda sıcaklığında saklandı.

Lizis solüsyonu: 10 mM Tris (Hydroxymethyl aminomethane), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl ve 50µl %10'luk SDS 1lt distile su içinde çözülür.

Tamponun pH'sı sodyum hidroksit kullanılarak 10.5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon sterilize edilip +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Tris-EDTA (TE) tamponu: 100 mM Tris HCl (MW 157.56), 10 mM EDTA (MW 292.24) 500 ml distile su içinde çözülür, sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.4'e ayarlanarak hazırlanır. Hazırlanan çözelti oda ısısında muhafaza edilmiştir.

6 M NaCl: 87,66 gr NaCl (MW 58.4428 g/mol) 250 ml distile suda çözülür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklanır.

%10 Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS): 10 gr SDS, 100 ml distile su içinde çözülür, sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.2'e ayarlanarak hazırlanır. Hazırlanan çözelti 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edilir ve oda ısısında muhafaza edilmiştir.

BIOAMF-1 Basal Medium (Cat. # 01-190-1B): 90 ml Bazal Medium, 10 ml supplement (-20°C), 1 ml L- glutamin ve 1 ml penisilin- streptomisin eklenerek hazırlanır.

3.1.5 Kullanılan Problar

Vysis AURKA SpectrumGold FISH Probe Kit (Cat. # 05N93-020)

LSI TOP2/CEP17 Dual-color Probe (Vysis) (Cat. # 03N89-020)

3.1.6 Kullanılan Kitler

EpiTech Bisülfite (48) modifikasyon kiti (Cat. # 59104)

EpiTech Control DNA, methylated (100) (Cat. # 59655)

EpiTech Control DNA, Unmethylated (100) (Cat. # 59665)

3.1.7 Oligonukleotidler

CENP-A promotor bölgesi için sentezlenmiş primerlerin açık dizisi aşağıdaki gibi olup İntron Sağlık Şti. tarafından sentezlenmiştir.

Tablo 3.1. CENP-A Promotor Bölgesi İçin Sentezlenen Primer Listesi.

Methylated Left M	5' -TTTTTTGTTTTTTTATTATCGTCGT-3'
Methylated Right M	5'-TACTCGAACTACCGAATCCG-3'
Unmethylated Left U	5'-TTTTTTGTTTTTTTATTATTGTTGT-3'
Unmethylated Right U	5'-ACTCCTACTCAAACCTACCAAATCCA-3'

3.2 Yöntem

Çalışma grubu ve kontrol grubu olarak kullanılan düşük ve amniyon örneklerine öncelikle kültür ve karyotip analizi işlemi ardından hazırlanan preparatlara AURKA ve TOP 2 lokuslarındaki amplifikasyonları saptamak amacı ile FISH yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca örneklerden DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'lar ile bisülfıt modifikasyonu ve sonrasında metilasyon spesifik PZR tekniği ile metilasyon durumu analiz edilmiştir.

3.2.1 Amniyon Hücre Kültürü

- Amniyosentez sonucunda steril enjektör içerisinde alınan yaklaşık 15-20 ml amniyon sıvısı steril ortamda ve uygun oda koşullarında 15ml'lik 3 ayrı falkon tüpüne bölünür.
- 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edilir. Elde edilen çökelti miktarı not edilir.
- Santrifüj sonrası süpernant atılır ve pellet pipetaj yapıp iyice homojenize edildikten sonra 3 ml Bio-Amf (Cat. #01-190-1B) basal medium içeren flasklara ekilir. Flasklar 37°C %5'lik CO₂ etüvde inkübe edilir.
- Hücre bölünmeleri ve hücre kaliteleri 1 gün ara ile kontrol edilerek yeterli sayıda hücre mitoz evresinde gözlenmişse harvest işlemine geçilir (yaklaşık 15-20 gün).

Harvest;

- Hücrelere colcemid (Biological Industries, colcemid solution (demecolcine) (10ug/ml) eklenerek 3 saat 45 dakika metafaz evresinden bloklanması sağlanır.
- 1300 rpm' de 8 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
- Üzerine 0,075 M KCl hipotonik solusyonunda eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
- 30 dakika sonunda Carnoy's fiksatif solüsyonu (3 metanol- 1 asetik asit) vorteks üzerinde yavaşça ve dikkatlice eklenir.

- 1300 rpm’de 8 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve bu işlem 3 kez uygulanır.

Bantlama;

- Daha sonra yayma ve Giemsa/Tripsin bantlama, C bantlama ve NOR bantlama (Giemsa, C ve NOR) işlemine geçilmektedir. Yapılan bantlamalar Lüleci ve diğerlerinin ‘Sitogenetik Uygulama Yöntemleri’ adlı kitabından alınarak uygulanmıştır (Lüleci ve diğerleri, 1990, g bantlama s. 98-116, c bantlama s. 20 ve nor bantlama s. 23-24).

3.2.2 Düşük Materyali Kültürü

- Uygun saklama ve sıcaklık koşullarında bulunan düşük materyali örnekleri, daha önceden steril edilmiş kabin içerisine alınır.
- Steril bir petri içerisinde diseksiyon mikroskobu altında bistürü yardımı ile villusler mekanik olarak parçalanarak 3 ml Bio-Amf (Cat. # 01-190-1B) içeren steril flask içerisine ekilir.
- 37 °C’lık etüvde inkübasyona bırakılır. Hücreler kontrol edilerek mitoz evresinde yeterli sayıda hücre saptandığında harvest işlemine geçilir.

Harvest;

- Hücrelerin metafaz evresinde tutuklanmasını sağlayan colcemid eklenerek 3 saat 45 dakika 37°C CO₂ etüvünde inkübe edilir.
- Süre sonunda 0,075M KCl hipotonik solüsyonu bir vorteks üzerinde yavaş yavaş eklenerek 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılır.
- 30 dakika sonunda Carnoy’s fiksatif solüsyonu (3 metanol- 1 asetik asit) hazırlanarak vorteks üzerinde yavaşça ve dikkatlice eklenir.
- 1300 rpm’de 8 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve bu işlem 3 kez tekrarlanır.

Bantlama;

- Daha sonra yayma ve Giemsa/Tripsin bantlama, C bantlama ve NOR bantlama (Giemsa, C ve NOR) işlemine geçilmektedir. Yapılan bantlamalar Lüleli ve diğerlerinin ‘Sitogenetik Uygulama Yöntemleri’ adlı kitabından alınarak uygulanmıştır (Lüleci ve diğerleri, 1990, g bantlama s. 98-16, c bantlama s. 20 ve nor bantlama s. 23-24)

3.2.3 Düşük Materyalinden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, Serakıncı ve diğerlerinin yayınladığı protokolü modifiye edilerek ve aşağıda detayları verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Serakıncı, N. ve diğerleri, 2004).

- Diseksiyon mikroskobu altında ayıklanmış villuslar serumsuz solüsyonu içeren 15 ml’lik falkon tüpler içine koyulur. Üzerine 5 ml lizis çözeltisi ve 50µl Proteinaz K (- 20°C) eklenir.
- Tüpler 37°C’lik etüve kaldırılır ve parçalar tamamen sindirilene kadar 10 dakika arayla vorteks yapılır.
- Vorteksleme işleminin ardından iyi bir köpük oluşursa işleme devam edilir. Eğer oluşmamışsa üzerine 5 µl daha Proteinaz K eklenerek vorteksleme işlemine devam edilir.
- Tamamen sindirilmiş sıvı 5 ependorfa paylaştırılır üzerine 330 µl NaCl eklenir ve alt- üst edilir.
- Ependorflar 4°C’de 1300 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir.
- Süpernantant yeni bir epenforfa aktarılarak 4°C’de 1300 rpm’de santrifüjlenir.
- Bütün ependorfların süpernantı bir falkona toplanır ve üzerinde iki katı kadar soğuk %100’lük EtOH eklenir.
- Daha sonra presipite (çökeltme) olmuş DNA gözlenirse 4°C’de 4500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir.

- Süpernantant yeni bir falkona alınır ve pelletin üzerine 100 µl %70 EtOH eklenir.
- 4°C'de 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpler kuruması için bırakılır.
- Kuruyan tüplere 500 µl TE solüsyonu eklenir ve ependorfa alınarak ölçüm işlemlerine geçilir.

3.2.4 Amniyon Örneklerinden DNA İzolasyonu

Amniyon örnekleri DNA izolasyonu, Serakıncı ve diğerlerinin yayınladığı protokol modifiye edilerek uygulanmıştır (Serakıncı, N. ve diğerleri., 2004).

- Laboratuvara gelen amniyon örnekleri 15 ml'lik falkonlara bölünerek 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- Süpernant atılır. Pellet 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktılır.
- 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir. Daha sonra supernant atılır üzerine 0.5 ml lizis solüsyonu ve 100 µl proteinaz K eklenerek 55°C'de 2 saat inkübe edilir.
- Eğer lizis işlemi tamamlanmamışsa 5µl daha proteinaz K eklenerek inkübe edilmeye devam edilir.
- Eğer lizis işlemi tamamlanmışsa 1,5 ml'lik ependorflara 165 µl 6M NaCl eklenerek 15 saniye alt-üst edilir.
- +4°C'de 13000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilir.
- Pellet atılarak süpernant alınır. 1300 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edilir.
- Daha sonra üzerine 2 katı kadar %100'lük alkol eklenerek 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Süpernant atılır. Pellet üzerine 1000µl %70 etanol eklenerek tüpler kurumaya bırakılır.

- Kuruma işlemi ardından üzerine 50-100 µl TE solüsyonu eklenerek ölçüm işlemlerine geçilir.

3.2.5 DNA Konsantrasyonu

DNA izolasyonu sonrası, elde edilen DNA örnekleri kalite ve bütünlük kontrolü amacıyla %2'lik agaroz jel elektroforezinde 90V'da yürütülerek görüntülenmiş ve DNA konsantrasyonu nanodrop (UVS-99 device ACT gene, USA) cihazında 260 ve 280 nm'de ölçüm alınarak saflığı OD 260 / 280 oranı kullanılarak nanogram cinsinden spektrofotometrede ölçülmüştür.

DNA konsantrasyon yoğunluğu 10 ng ve üzeri olan örnekler çalışmaya dahil edilerek her bir PZR reaksiyonu için maksimum 40 µl DNA örneği bisülfıt modifikasyon yapılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.3 FISH Analizi

3.3.1 Preparat Hazırlaması

Çalışmamızda her bir hastadan 2 farklı preparat yayılmıştır. FISH tekniğinde Rieder ve diğerleri tarafından geliştirilen protokol (Rieder H. ve diğerleri, 1998) modifiye edilerek uygulanmış ve Vysis TOP2/ Cep17 ve Vysis AURKA Spectrum Gold FISH Probu (Abbott Molecular) kullanılmıştır.

3.3.2 Preparatların Ön Yıkaması ve Denaturasyonu

- Preparatlar %100, %70, % 50 ve %30'lık metanolde birer dakika tutulur.
- 70°C'de 2XSCC solüsyonunda 30 dk denaturasyona bırakılır.
- Ardından oda sıcaklığındaki %30, %50, %70, %100'lük metanolde birer dakika tutularak dehidratasyon işlemi gerçekleştirilir.
- Daha sonra problama işlemine geçilir.

3.3.3 Prob Denaturasyonu

Çalışmamızda kullanılan problar, üretici firmalar tarafından öngörülen denaturasyon prosedürü modifiye edilerek uygulanmıştır. Vysis AURKA Spectrum Gold FISH Probu ve Vysis TOP2/CEP17 problemleri 70°C’de 8 dakika bekletilerek denature edilmiştir.

3.3.4 Hibridizasyon

Alkol serilerinden geçirelerek dehidre edilen preparatlar üzerinde prob, üretici firmaları tarafından tavsiye edildiği şekilde ve miktarda eklenmiştir. AURKA ve TOP2/CEP17 problemlerinden 3 µl eklenerek üzeri 24X24 mm’lik lamel ile kapatılmış ve 37°C’lik etüvde bir gece hibridizasyona bırakılmıştır.

3.3.5 Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Spesifik olarak bağlanmayan prob DNA’sının ortamdan uzaklaştırılması ve DNA’ya komplementer olan (%80-100) dizilerin hedef bölgede sabit hale getirilmesi amacıyla hibridizasyon sonrası yıkamalar yapılmaktadır. Preparatlar oda sıcaklığında 2XSSC solüsyonunda lamel düşene kadar hafifçe çalkalanır. Ardından 74°C’de önceden ısıtılmış 1XSSC solüsyonunda 5 dk tutularak 2XSCCT solüsyonunda 5 dk bekletilir.

3.3.6 Görüntüleme

Bu aşamada prob ve nükleus DNA’sının hibridize olduğu bölgelerin görünür hale getirilmesi amaçlanmaktadır. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), DNA’da A-T zengin bölgelere bağlanarak hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale getiren floresan boyasıdır. Karanlık odada preparatlar üzerinde 5 µl DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole in 1,4-phenylenediamine glyserol) eklenerek lamelle kapatılır ve analize hazır hale getirilmektedir. Preparatlar inceleme aşamasına kadar karanlık ve -20°C’de bekletilmektedir.

3.3.7 Preparatların Mikroskopi İncelenmesi

Analiz için hazır hale getirilen preparatlar, -20°C'den çıkartılarak Zeiss Imager M2 AX 10 floresan mikroskobunda uygun filtrelerde incelenmiştir. Floresan mikroskoba bağlı soğutmalı kamera ve görüntü analiz sistemi Isis (Applied Imaging) aracılığıyla her olguya ilişkin FISH analizi verileri incelenmiş, fotoğraf çekilmiş ve olgulara ait görüntüler arşivlenmiştir.

3.4 Değerlendirme

Düşük materyali ve kontrol grubu olarak kullanılan amniyon örneklerine AURKA ve TOP2/CEP17 FISH analizi yapılarak her olgu için en az 200 hücre ve en az 20 metafaz değerlendirilerek amplifikasyon analiz edilmiştir. Sinyal değerlendirmeleri yapılırken birbirine çok yakın sinyaller ve sinyal çap büyüklüğü birbirinden farklı olan (iki katı ya da daha fazla) değerlendirmeye alınmamıştır. FISH pozitifliği değerlendirmesi Park H.S. ve diğerlerinin., değerlendirdiği şekilde yapılmıştır (Park H.S. ve diğerleri, 2008).

AURKA ve TOP2/ CEP 17 geni kopya artışları iki grupta incelenmiştir;

- 3-4 kopya sayısı içeren hücreler düşük amplifiye,
- > 4 kopya içeren hücreler yüksek amplifiye olarak sınıflandırılmıştır.
- Değerlendirilen tüm hücrelerin %5'inden fazlasında amplifikasyon gözlemlendiğinde amplifikasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.5 Metilasyon Spesifik PZR

DNA izolasyonu sonrasında restriksiyon enzimlerine gerek duymadan CpG adacıklarındaki herhangi bir grubun metilasyon seviyesinin belirlenmesini sağlayan hızlı ve etkili yöntem olan metilasyon spesifik PZR'ye geçilmiştir.

Bu yöntem için DNA'nın bisülfite ile modifikasyonu gereklidir. Bu modifikasyon ile tüm metile olmamış DNA'da sitozin urasile dönüşürken metile DNA'da dönüşüm gözlenmemekte ve spesifik primerler ile metile ve metile olmamış DNA amplifikasyonu sağlanmaktadır (Herman, G.J. ve diğerleri, 1996).

3.5.1 Bisülfite Modifikasyonu

- İzole edilen DNA ürünlerinin bisülfite modifikasyon işlemi için EpiTech Bisülfite Kit (48) (Qiagen) kullanılmıştır.
- Modifiye edilecek DNA ürünleri -20°C 'den çıkartılarak çözünmeye bırakılır.
- Bisülfite karışımı çıkartılarak her tüp (8 örnek modifiye etmek üzere hazırlanan kit içeriği) içerisine 800 μl RNAase free su eklenir ve 5 dk vorteksenerek karıştırılır.
- Bisülfite modifikasyon işlemi için örnek DNA'lar 'EpiTech Bisülfite Handbook' kullanım klavuzunda belirtilen 'Sodium Bisülfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA from Low- Concentration Solutions' protokolü doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanır:

DNA solüsyonu (1-500 ng)	Değişken (maksimum 40 μl)
RNAase – free water	Değişken
Bisulfite Mix	85 μl
DNA Protect Buffer	15 μl
Toplam	140 μl

Çalışmamızda Bisülfite Modifikasyonu için Thermal Cycle koşulları kullanım klavuzunda belirtilen şekilde yapılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Bisülfite Modifikasyonu için Thermal Cycler Koşulları. EpiTech Bisülfite Handbook kullanım klavuzu, ‘Sodium Bisülfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA from Low- Concentration Solutions’.

	Sıcaklık (°C)	Süre (Dk.)
Denaturasyon	95	5
İnkübasyon	60	25
Denaturasyon	95	5
İnkübasyon	60	85
Denaturasyon	95	5
İnkübasyon	60	175
	20	∞

3.5.2 Bisülfite Modifiye DNA’ nın Temizlenmesi:

- Bisülfite reaksiyonun ardından PZR tüplerindeki ürünler yıkanarak temizlenme aşamalarına geçilmek üzere 1,5 ml’lik santrifüj tüplerine aktarılır.
- Üzerine 10 µg/ml taşıyıcı (carrier) RNA içeren 560 µl Buffer B1 eklenir. Vortekslenir ve EpiTech Spin kolonlara aktarılarak maksimum hızda 1 dk santrifüj edilir.
- Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve üzerine 500 µl Buffer BW eklenerek maksimum hızda 1 dk santrifüj edilir.
- Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve üzerine 500 µl Buffer BD eklenerek 15 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır, ardından maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir.
- Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve üzerine 500 µl Buffer BW eklenerek maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir, bu işlem 2 kez tekrarlanır.
- Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve üzerine bir şey eklenmeden tekrar santrifüj edilir.

- Spin tüpleri temiz ependorf tüplerine alınarak daha önce 56-60°C sıcaklığa getirilmiş olan ısıtıcı blok üzerine ağızları açık olarak bırakılır. 5 dakika inkübe edilerek kalan sıvının buharlaşarak uzaklaştırılması sağlanır.
- Spin kolon yeni bir ependorfa aktarılır ve spin tüplere 20 µl EB buffer eklenir. Maksimum seviyede 1 dakika santrifüj edildikten sonra 20 µl EB daha eklenmiştir.

3.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Bisülfıt dönüşüm işlemi sonucunda DNA konsantrasyonu (UVS-99 device ACT gene, USA) ölçülerek dönüşüm sonrasındaki DNA miktarları değerlendirilmiştir. Ardından CENP-A geninin promotor bölgesi PZR işlemi ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu toplam 25 µl hacminde olup Tablo 3.3’de PZR protokolü verilmiştir.

Tablo 3.3. CENP-A Genindeki Promotor Metilasyonu için Kullanılan PZR Karışım İçeriği ve Reaksiyon Son Konsantrasyonu.

Kalıp DNA	10-50 ng
10x reaksiyon tamponu	1X
2.5 mm dNTP	0.2 mM
25 mM MgCl ₂	1.5 mM
İleri primer	100 nM (1 µl ,10pmol)
Ters Primer	100 nM (µl, 10 pmol)
Hot Taq DNA Polimeraz	2.0-2.5 U
dsH ₂ O	19,3 µl
Toplam:	25 µl PZR reaksiyon karışımı

Hazırlanan örneklerin Thermal Cyler Koşulları Tablo 3.4’de gösterilmiştir

Tablo 3.4. Metilasyon Spesifik PZR Thermal Cyler Koşulları.

PZR Döngü	Döngü sayısı	PZR sıcaklık koşulları	İnkübasyon Süresi
Denatürasyon	1	95 ⁰ C	15 dk
Denatürasyon	35	94 ⁰ C	30 sn
Bağlanma (annealing)		55 ⁰ C	30 sn
Uzama (elongation)		72 ⁰ C	30 sn
Tamamlanma	1	72 ⁰ C	10 dk

PZR işlemi sırasında primerlerin T_m (°C) bağlı olarak annealing sıcaklığının ayarlanması amacıyla kontrol amaçlı gradient PZR yapılmıştır. Annealing sıcaklığının 55°C’de optimum olduğu gözlenmiş ve sonraki işlemlerde bu sıcaklık kullanılmıştır. Son işlemde örnekler 72°C’de 10 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanır.

3. 7 Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroze Jel Elektrofrezisi İle İncelenmesi

PZR ürünleri, %2’lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edilmiştir.

- 3 gram toz agaroz tartılarak 1X TBE solüsyonu ile 150 ml’ye tamamlanır ve mikrodalga fırında %100’lük güçten % 10’luk güce kadar kademeli olarak azaltılarak berrak bir görüntü elde edilene kadar kaynatılır.
- Agaroz jele, son konsantrasyon 5 µg /ml olacak şekilde hazırlanan etidyum bromür çözeltisi ilave edilir.
- DNA yükleme kuyucukları oluşturmak amacıyla elektrofrezis jel dökme tablasına tarak yerleştirilir ve çözelti yaklaşık 50-60°C’ye kadar soğutulduktan sonra jel tablasına dökülür.
- 30 dakika jelin polimerleşmesi için beklenir. Jel polimerleştikten sonra üzerine, iyon hareketini sağlamak amacıyla kullanılan 1 X TBE (Tris- Borate- EDTA) tamponu ilave edilir.

- 121 gr Tris (1 M), 61.7 gr borik asit (1M) ve 7.44 gr EDTA (20 mM) tartılarak, 1000 ml distile su içerisinde karıştırıcı yardımı ile çözülerek 20 X TBE Stok Solüsyonu hazırlanır.
- Amplifikasyon ürünlerinden alınan 10 μ l DNA örneği, 1 μ l yükleme tamponu (Loading dye) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenir. Ayrıca jele 3 μ l ladder eklenerek 90 V'luk elektrik akımı verilerek 30 dakika yürütülmüştür.
- Boyanan jel, UV lambası altında gözlenerek, reaksiyon sonucu oluşan PZR bantları incelenir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 19.01.2011 ve 28.04.2015 tarihleri arasında Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliğine direkt başvuran olguların yanında dış merkezlerden Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen 47 düşük materyali ve kontrol grubu olarak 85 amniyon materyali dahil edilmiştir.

Kromozom analizi sonucunda normal karyotip elde edilen vakalarda CENP-A promotor genindeki epigenetik değişimlerin düşükler üzerindeki etkisine bakılmış ve nedeni bilinmeyen düşüklerde epigenetik değerlendirmenin moleküler bir belirteç olarak anlamlılığı araştırılmıştır. Bunun yanında FISH yöntemiyle değerlendirilen TOP 2 ve AURKA genlerinin kopya sayısındaki dengesizliğin nedeni bilinmeyen düşüklerdeki etkisine bakılmıştır. Ayrıca kromozomal anomali gözlenen olgularda, CENP-A promotor geni metilasyonu, TOP 2 ve AURKA amplifikasyonunun kromozom anomalilere ve düşüğe olası etkisi araştırılmış ve her üç grup arasındaki farklılıklar ortaya konulmuştur.

Düşük nedeniyle laboratuvarımıza başvuran olguların endikasyonu ve sayısı (yüzdelik %) Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Düşük Materyali Nedeniyle Başvuran Olguların Endikasyonu ve Sayısı.

Endikasyon	Olgu Sayısı (Yüzde%)
Missed Abortus	26 (55.31%)
In utero ex	9 (19.15%)
Anormal USG	1 (2.13%)
Habitual Abortus	10 (21.28%)
Parsiyelmol?	1 (2.13%)

Düşük materyali nedeniyle yönlendirilen olguların yaş ortalaması 7.01 ± 31 ve gebelik haftası 7.43 ± 9 'dır..

Kontrol grubu olarak amniyon örneği alınan olguların yaş ortalaması 5.60 ± 33 ve gebelik haftaları $2.31 \pm 17,94$ haftadır. Kontrol grubu olgularının endikasyon ve olgu sayısı (yüzdelik %) Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Amniyon Örneği Alınan Olguların Endikasyonu ve Sayısı (yüzdes %).

Endikasyon	Olgu Sayısı (Yüzde%)
İkili Tarama Testi Yüksek Risk	15 (17.64%)
Üçlü Tarama Testi Yüksek Risk	11 (12.94%)
Dörtlü Tarama Testi Yüksek Risk	16 (18.82%)
Kombine Tarama Testi Yüksek Risk	1 (1.17%)
Anomalili USG Bulgusu	13 (15.29%)
İleri Maternal Yaş	19 (22.35%)
Kötü Obstetrik Öykü	6 (7.05%)
Anne anksiyetesi	1 (1.17%)
Akraba Evliliği	1 (1.17%)
Talasemi Taşıyıcılığı	1 (1.17%)
DMD?	1 (1.17%)

4.1 İstatiksel Analiz

Çalışmamızda tespit edilen kromozomal anomaliler, TOP 2 ve AURKA gen amplifikasyonları ve CENP-A epigenetik profili değerlendirilmesi için SPSS 15.0 istatistik programı kullanılmıştır.

Fisher's Exact Testine göre p değerleri anlamlılıkları hesaplanmıştır. Ayrıca kromozomal anomaliler ve metilasyon durumunun karşılaştırılmasının yanında kromozomal anomaliler ve TOP 2, AURKA gen ifadesinin karşılaştırılması Pearson Chi-Square Testi ile yapılmıştır.

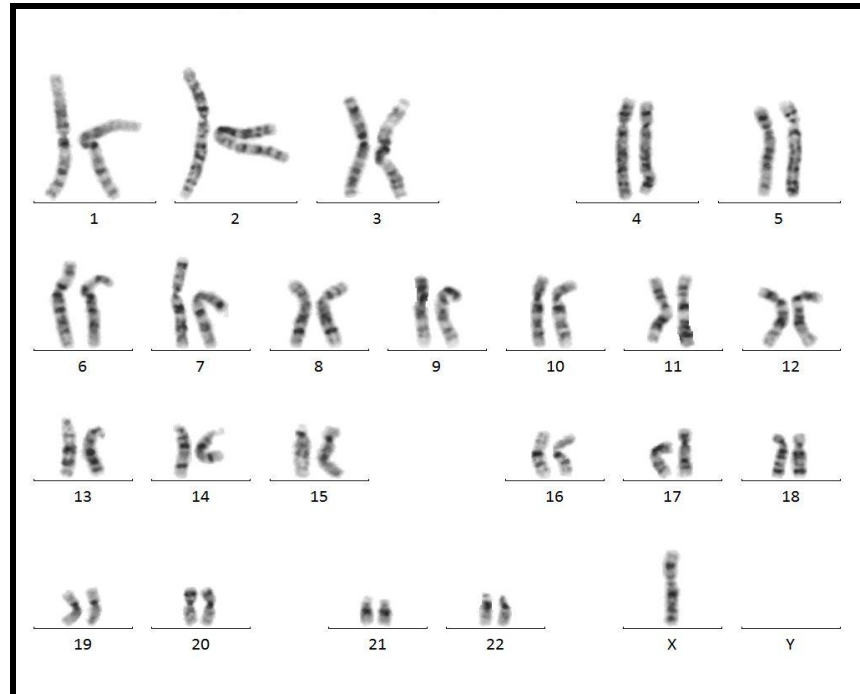
4.2 Kromozom Analizi Sonuçları

4.2.1 Düşük Materyali Kromozom Analizi Sonuçları:

Kültür ve harvest işlemi sonrasında GTB ile boyanan örneklerin kromozom analizi yapılmış, Zeiss Imager M2 AX 1 mikroskobu ile kromozomlar görüntülenmiş ve her bir örnekten 50 metafaz mikroskop görüntüsü alınarak değerlendirilmiştir. Çalışılan 47 düşük materyali olgusunun 16'sında (%34) kromozomal anomaliye rastlanmıştır. Gözlenen kromozomal anomalilerin 12'si sayısal ve 4'ü yapısalıdır. En çok rastlanan anormali 45,X (Şekil 4.1), 4 olguda (%25) iken ikinci sırada cinsiyet kromozomları trizomisi (%18.75) yer almaktadır. Olgularda gözlenen kromozomal anomalilerin detayları ve endikasyonları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Sitogenetik Çalışma Sonucunda Gözlenen Anomaliler ve Olguların Endikasyonları.

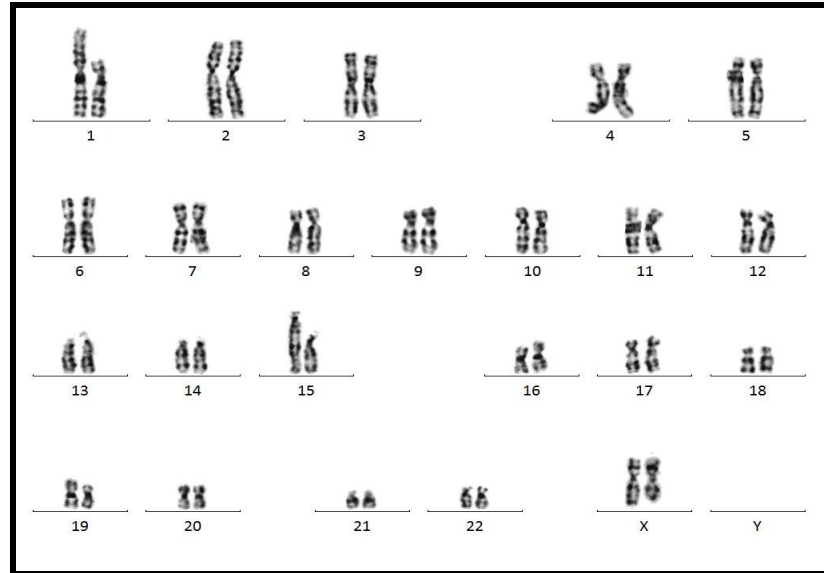
Gözlenen Anomaliler	Endikasyon
45,X	Missed- abortus
45,X	Habitual - abortus
46, XY,inv(9) (p12q13)	Habitual-abortionus
69,XXX,+ mar	Missed- abortus
69,XXX	Missed-abortionus
47,XXY	In utero ex
45,X	Missed- abortus
45,X	In utero ex
47,XXY	Habitual Abortus
47,XY,+8	Missed- abortus
47, XY ,+ 7	Missed- abortus
46,XX ,del (5)(p15)	Habitual-abortionus
47, XY, +21	Habitual Abortus
46,XX , -19p?, + der 822) , t(19;22) (p13:p12p)?	Missed- abortus
47,XXY	Habitual Abortus
69,XXX	Habitual- abortus



Şekil 4.1. 45,X Karyotip Gözlenen Olgunun Karyotip Görüntüsü.

4.2.2 Amniyon Örnekleri Kromozom Analizi Sonuçları:

Amniyon örnekleri kültür ve bantlama işlemi sonrasında 50 metafaz görüntüsü mikroskopta analiz edilmiş, görüntüleri çekilip arşivlenmiştir. Laboratuvarımızda çalışılan 85 amniyon örneğinden 71'inde (%83.53) kromozomal anomaliye rastlanmazken 14'ünde (%16.66) kromozomal anomaliye rastlanmıştır. Gözlenen anomaliler; 5 olguda (%35.71) trizomi 21, 2 olguda (%14.29) 9 inversiyonu, 2 olguda (%14.29) mozaik klinefelter sendromu (47,XXY), 1 olguda (%7.15) 5. kromozom delesyonu, 1olguda (%7.15) mozaik turner sendromu (45,X), 1 olguda (%7.15) t(1;15), 1olguda (%7.15) add(22) ve 1 olguda (%7.15) add (9) (?p11.p13) olarak saptanmıştır. Şekil 4.2'de, t(1;15) der (1) t(1p22.2-1pter::15q26.1-15qter) der(15) t(15q26.1-15qter::1p22.2-1pter) gözlenen olgu görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.2. t(1;15) der (1) t(1p22.2-1pter::15q26.1-15qter) der(15) t(15q26.1-15qter::1p22.2-1pter) Karyotip Gözlenen Olgu.

Sitogenetik bulgular ışığında düşük ve amniyon örneklerine Pearson Chi-Square testi uygulanmış, çalışma grubu kromozom analizi sonuçları ile kontrol grubu karşılaştırılmış ve düşük materyalinde gözlenen kromozomal anomalilerinin (%34) amniyon örneklerinde gözlenenlere (%16.5) göre daha yüksek ve istatistiksel anlamlı bulunmuştur ($p=0,021$).

4.3 Moleküler Sitogenetik Sonuçlar

4.3.1 TOP 2/ CEP 17 FISH Sonuçları

Çalışmamızda kromozom analizi sonuçlara göre çalışma grubu; nedeni bilinmeyen ve kromozom anomali saptanan olgular olarak 2 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak TOP 2/Cep 17 amplifikasyonun değerlendirilmesi, Vysis TOP 2/Cep17 probu kullanılarak FISH yöntemi ile yapılmıştır.

Değerlendirme;

- 3-4 kopya sayısı içeren hücreler düşük amplifiye;
- 4 ve daha çok kopya içeren hücreler yüksek amplifiye;
- Değerlendirilen tüm hücrelerin %5'inden fazlasında amplifikasyon gözlemlendiğinde amplifikasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir (Park, H.S. ve diğerleri, 2008).

Örnekler Zeiss Imager M2 AX10 floresan mikroskobu ve Isis programıyla analiz edilmiş, Zeiss AxiaCam MRm kamerası ile resimleri çekilmiş ve arşivlenmiştir. Her bir olgudan en az 500 hücre sayılmıştır. FISH analizi sonucunda 8 olguda (%6.06) düşük amplifikasyon gözlenmiştir (Şekil 4.3). Amplifikasyon gözlenen 8 olgudan 6'sı (%75) kromozom anomalisi gözlenen düşük materyali, 2'si (%25) kromozom anomalisi gözlenen amniyon örneğidir.

Fisher's Exact Testi kullanılarak yapılan değerlendirmede düşük materyalinde gözlenen TOP2 amplifikasyonunun amniyon örneklerinde gözlenen sonuçlara göre istatistiksel olarak farklı olduğu ve TOP2 amplifikasyonu ve düşük arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$, Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Düşük ve Amniyon Örneklerinde Gözlenen TOP 2 Amplifikasyonu.

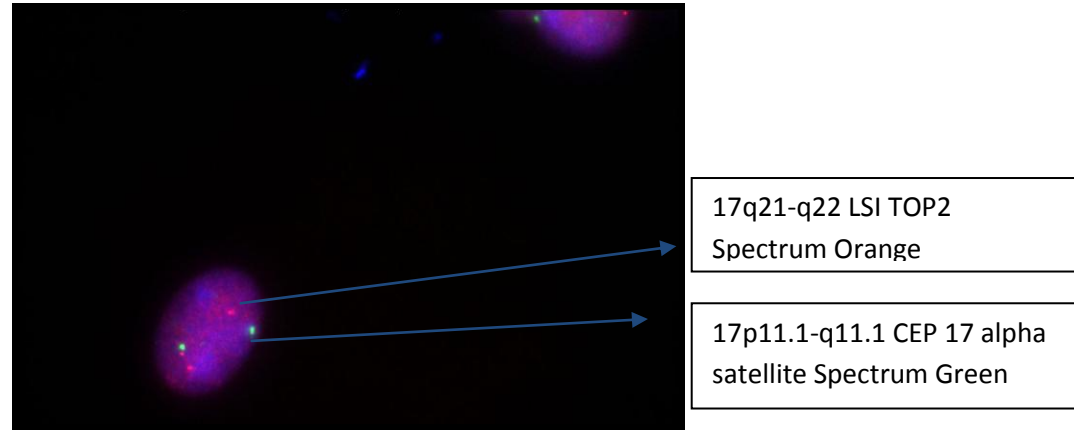
	Düşük Amp	Normal
Amniyon Materyali	2 (%2.4)	83 (% 97.6)
Düşük Materyali	6 (%12.8)	41 (%87.23)
Fisher's Exact Testi	$p < 0,05$ ($p=0,024$)	

4.3.2 TOP 2/Cep 17 FISH Sonuçları ile Karyotip Sonuçlarının Karşılaştırılması

TOP 2A/Cep 17 FISH analizi sonucunda düşük amplifikasyon gözlenen olguların tamamında kromozomal anomali rastlanmasına rağmen çalışma grubunda kromozomal anomali gözlenen 10 olguda ve kontrol grubunda kromozomal anomali gözlenen 12 olguda TOP 2 amplifikasyonuna rastlanmamıştır. FISH sonucunda anomali gözlenen olguların sitogenetik sonuçları ve geliş nedenleri Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. FISH Sonucunda Anomali Gözlenen Olguların Sitogenetik Sonuçları İle Karşılaştırılması ve Endikasyon.

Sitogenetik Sonucu	TOP2/CEP17 FISH Sonucu	Endikasyon
69, XXX	Düşük Amplifikasyon (3 kopya)	Habitual- Abortus
46, XY inv(9)	Düşük Amplifikasyon (3 kopya)	Habitual- Abortus
69,XXX	Düşük amplifikasyon (3 kopya)	Missed- abortus
47, XY, +21	Düşük amplifikasyon(3 kopya)	Anormal USG Bulgusu
70,XXX, +mar	Düşük Amplifikasyon (3 kopya)	Missed-abortion
46,XX, t(1;15)	Düşük Amplifikasyon(3 kopya)	Anormal USG Bulgusu
46,XXY	Düşük amplifikasyon (3 kopya)	Habitual- abortus
46,XXY	Düşük amplifikasyon (3 kopya)	Habitual- abortus



Şekil 4.3. TOP 2 Geninde Düşük Amplifikasyon Gözlenen Olgu Görüntüsü.

4.3.3 AURKA FISH Sonuçları

AURKA FISH analizi sonucunda, çalışmaya dahil edilen tüm örneklerin (47+85) 7'sinde (%5.30) düşük amplifikasyon saptanırken amplifikasyon saptanan 4 olgunun (%57.14) kromozomal anomali gözlenen düşük materyali, 1 olgunun (%14.29) kromozomal anomali gözlenmeyen düşük materyali ve 2 olgunun (%28.57) ise kromozomal anomali gözlenen amniyon materyali olduğu saptanmıştır. AURKA geninde düşük amplifikasyon gözlenen olgunun floresan mikroskop görüntüsü Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

4.3.4 AURKA FISH Sonuçları ile Karyotip Sonuçlarının Karşılaştırılması

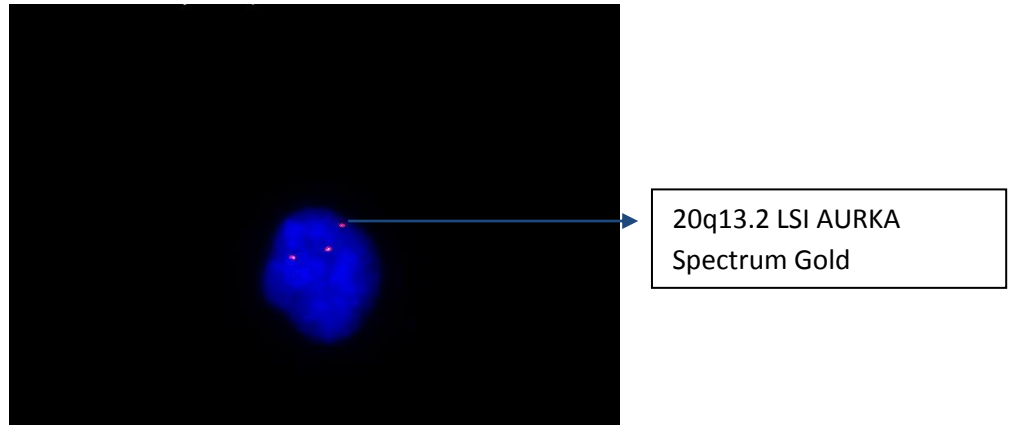
AURKA FISH analizinde, AURKA gen bölgesi olan 20q13.2'de 7 olguda düşük amplifikasyon gözlenmiştir. Düşük amplifikasyon gözlenen 7 olgunun sadece birinde kromozomal anomaliye rastlanmamıştır.

FISH sonucunda düşük amplifikasyon gözlenen olguların 2'si 69,XXX, 1'i 70,XXX,+mar, 2'si 47,XXY , 1'inde trizomi 21 ve 1'inde normal karyotip olarak gözlenmiştir. Amplifikasyon gözlenen olguların sitogenetik sonuçları ve endikasyonları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda kromozomal anomali ile AURKA amplifikasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.002$).

Tablo 4.6. AURKA Amplifikasyonu Gözlenen Örneklerin Endikasyon ve Sitogenetik Sonucu.

Sitogenetik Sonucu	AURKA düşük amplifikasyonu Durumu	Endikasyon
47,XXY	+	Habitual abortus
69,XXX	+	Habitual abortus
46,XX	+	Missed- abortus
69,XXX	+	Missed- abortus
70,XXX,+mar	+	Missed-abortion
47,XXY	+	4'lü tarama testi risk artışı
47, XY,+21	+	Anormal USG Bulgusu



Şekil 4.4. AURKA Geninde Düşük Amplifikasyon Gözlenen Olgu Görüntüsü.

4.4 Moleküler Genetik Sonuçları

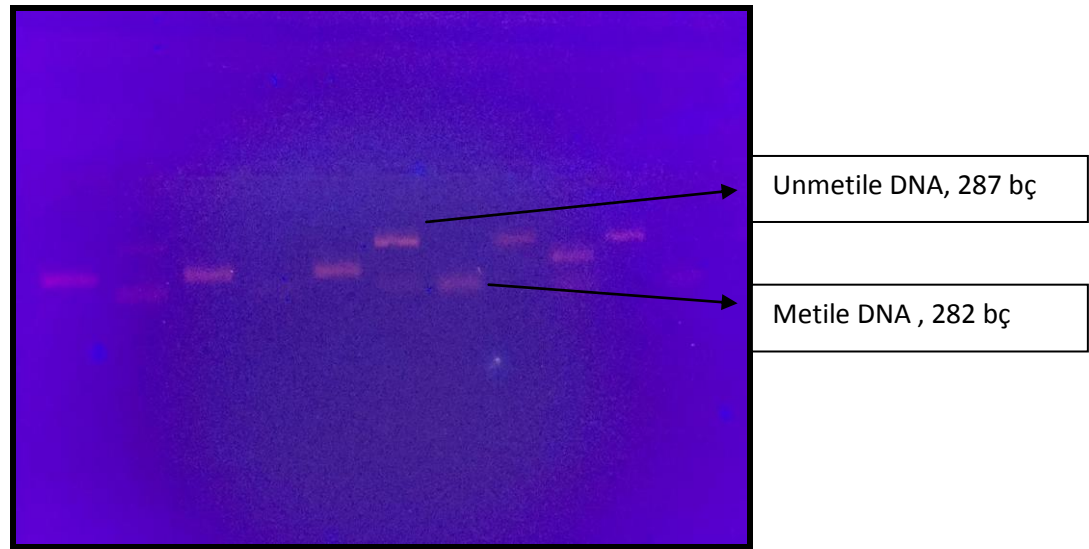
4.4.1 CENP-A Metilasyon Spesifik PZR Sonuçları

Çalışmamızda metilasyon spesifik PZR tekniği kullanılarak CENP-A geni promotor bölgesinin metilasyon durumu değerlendirilmiştir. CENP-A promotor geni jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.5’de gösterilmiştir.

Gerçekleştirilen CENP-A promotor metilasyon analizi sonucunda toplam 61 olguda (%46.2) hemimetilasyon, 55 olguda (%41.7) metilasyon ve 16 olguda (%12.1) unmetilasyon gözlenmiştir.

Düşük materyallerinde 21 olguda (%44.7) hemimetilasyon, 16 olguda (%34.0) metilasyon ve 10 olguda (%21.3) unmetilasyon , amniyon örneklerinde ise 40 (%47.1) olguda hemimetilasyon, 39 olguda (%45.9) metilasyon ve 6 olguda (%7.1) unmetilasyon bulunmuştur.

Çalışma ve kontrol grubu arasında CENP-A promotor metilasyon durumu ile ilgili yapılan istatistiksel analiz sonucunda düşük materyallerinde CENP-A geni unmetilasyonu amniyon örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$, Tablo 4.7).



Şekil 4.5. CENP-A Promotor Genin Amplifikasyon Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Görüntüsü.

Tablo 4.7. Düşük ve Amniyon Örneklerinin CENP-A Metilasyon Spesifik PZR Sonuçları.

Materyal Türü	Hemimetile olgu sayısı (Yüzde %)	Metile olgu sayısı (Yüzde %)	Unmetile olgu sayısı (Yüzde %)
Düşük Materyali	21 (%44.7)	16 (%34.0)	6 (%7.1)
Amniyon Materyali	40 (%47.1)	39 (%45.9)	10 (%21.3)
Pearson Chi-Square Analiz $p=0,047$			

Çalışmamızda kromozomal anomali gözlenen olguların CENP-A metilasyon durumuna bakıldığında 19 olgu (%63.3) metile, 11 olgu (%36.7) hemimetile olarak gözlenirken; kromozomal anomali gözlenmeyen ve başarılı şekilde metilasyon spesifik PZR analizi gerçekleştirilen 102 olgunun CENP-A metilasyon durumu; 36 olgu (%35.3) metile, 50 olgu (%49) hemimetile ve 16 olgu (%15.7) unmetile olarak bulunmuştur.

Kromozomal anomali gözlenen olgularda CENP-A promotor metilasyon durumu ile ilgili yapılan istatistiksel analiz sonucunda anomali gözlenen olgular ve CENP-A promotor metilasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur ($p=0.007$). Ayrıca kromozomal anomali gözlenmeyen olgularda ise CENP-A promotor unmetilasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Kromozomal Anomali Gözlenen Ve Gözlenmeyen Olguların CENP-A Promotor Metilasyon Durumu.

Sitogenetik Sonucu	Hemimetilasyon gözlenen olgu sayısı (%)	Metilasyon gözlenen olgu sayısı (%)	Unmetilasyon gözlenen olgu sayısı (%)
Kromozomal anomali gözlenen	11 (%36.7)	19 (%63.3)	-
Kromozomal anomali gözlenmeyen	50 (%49.0)	36 (%35.33)	16 (%15.7)
Pearson Chi-Square $p=0.007$			

Düşük materyalinde kromozomal anomali gözlenen olgularda CENP-A metilasyon durumu; 10 olgu (%62.5) metile ve 6 olgu (%37.5) ise hemimetile olarak saptanmıştır. Kromozomal anomali gözlenmeyen 6 olgu (%19.35) metile, 15 olgu (%48.39) hemimetile ve 10 olgu (%32.26) unmetile olarak saptanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Kromozomal Anomali Gözlenen Ve Gözlenmeyen Düşük Materyali Örneklerinin CENP-A Promotor Geni Metilasyon Durumu.

Materyali Türü	Sitogenetik Analiz Sonucu	Metilasyon Spesifik PZR Analizi
Düşük Materyali Örneği 47	Üreme gözlenen olgu sayısı:47	Başarılı Metilasyon spesifik PZR analizi gerçekleştirilen olgu sayısı:47
	Kromozomal anomali gözlenen olgu sayısı:16 (%36.36)	10 metile (%62.5) 6 hemimetile (%37.5)
	Kromozomal anomali gözlenmeyen olgu sayısı: 28 (%63.64)	6 metile (%19.35) 15 hemimetile (%48.39) 10 unmetile (%32.26)

85 amniyon örneğinde gerçekleştirilen sitogenetik analizde 14 olguda (%16.67) kromozomal anomali saptanırken 70 olguda (%83.33) anomali saptanmamıştır. Kromozomal anomali gözlenen 14 olgunun 9'u (%64.29) metile ve 5'i (%35.71) ise hemimetile olarak bulunmuştur. Kromozomal anomali gözlenmeyen 70 olgunun 30'u (%42.25) metile, 35'i (%49.3) hemimetile ve 6'sı (%8.45) unmetile olarak saptanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Kromozomal Anomali Gözlenen Ve Gözlenmeyen Amniyon Örneklerinin CENP-A Promotor Geni Metilasyon Durumu.

Materyali Türü	Sitogenetik Analiz Sonucu	Metilasyon Spesifik PZR Analizi
Amniyon Örneği 85	Üreme gözlenen olgu sayısı:85	Başarılı Metilasyon spesifik PZR analizi gerçekleştirilen olgu sayısı:85
	Kromozomal anomali gözlenen olgu sayısı: 14 (%16.67)	9 metile (%64.29) 5 hemimetile (%35.71)
	Sitogenetik anomali gözlenmeyen olgu sayısı: 71 (%85.53)	30 metile (%42.25) 35 hemimetile (%49.3) 6 unmetile (%8.45)

Kromozom analizi sonucunda anomali gözlenen 16 (%36.36) olguda gözlenen anomaliler ve CENP-A promotor geni metilasyon durumu Tablo 4.11 ' de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. Kromozom Analizi Sonucunda Anomali Gözlenen Düşük Olgularında Gözlenen Anomaliler Ve CENP-A Promotor Geni Metilasyon Durumları.

Gözlenen Kromozomal Anomaliler	CENP-A promotor geni Metilasyon Durumu
45,X	Hemimetile
45,X	Hemimetile
46, XY,inv(9) (p12q13)	Hemimetile
69,XXX,+ mar	metile
69,XXX	Metile
47,XXY	hemimetile
45,X	Metile
45,X	Metile
47,XXY	Metile
46,XY,+8	Metile
46, XY ,+ 7	Metile
46,XX ,del (5)(p15)	Hemimetile
47, XY, +21	Metile
46,XX , -19p?, + der 822) , t(19;22) (p13:p12p)?	Hemimetile
47,XYY	Metile
69,XXX	Metile

Kontrol grubu olarak kullanılan ve kromozomal anomali saptanan 14 (%16.67) olguda saptanan anomaliler ve CENP-A promotor metilasyon durumu Tablo 4.12’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.12. Kromozomal Anomali Gözlenen Olgularda Gözlenen Anomaliler Ve CENP-A Promotor Metilasyon Durumları.

Kromozomal Anormali	CENP-A Promotor Metilasyon Durumu
47,XY,+21	metile
47, XY,+21	metile
47,XX,+21	metile
45, X	metile
46,XX,t(1;15) der(1)t(1p22.2)	metile
47,XX,+21	metile
47,XXY	hemimetile
46,XX,inv(9)	hemimetile
47,XY,+21	hemimetile
46,XX, inv(9)	metile
46,XY,add(22)	hemimetile
47,XXY	metile
46, XX? Add (9) (?p11.p13)	hemimetile
47,XXY	metile

4.4.2. CENP-A Promotor Metilasyon Spesifik PZR Sonuçları ile AURKA ve TOP 2 FISH Sonuçlarının Karşılaştırılması

TOP 2 FISH analizi sonucunda anomali görülen 8 olgunun 5'inde CENP-A promotor geni hemimetile olarak gözlenirken 3 olgu metile olarak saptanmıştır. AURKA FISH sonucunda anomali gözlenen 6 olgunun 3'ünün CENP-A hemimetile, 3'ünde metile olarak gözlenmiştir. TOP 2 ve AURKA gen ifadesinde anomali gözlenen 14 olgunun 13'ü (%93.33) düşük materyali ve 1'i (%6.67) amniyon örneğidir.

AURKA ve TOP 2 FISH analizi sonucunda amplifikasyon gözlenen olguların CENP-A metilasyon durumu ve kromozom analizi sonucu Tablo 4.13’de gösterilmiştir.

Tablo 4.13. Kromozomal Anomali Sözlendi Olguların CENP-A Metilasyon Durumu, AURKA Ve TOP 2 FISH Sonuçları.

Kromozomal Anomalili Olgular	CENP-A Metilasyon	AURKA FISH	TOP2 FISH
47,XXY	Hemimetile	Düşük Amplifikasyon	Düşük amplifikasyon
69,XXX	Hemimetile	Düşük amplifikasyon	Düşük amplifikasyon
70,XXX,+mar	Metile	Düşük amplifikasyon	Düşük amplifikasyon
46,XX,t(1;15) der(1)t(1p22.2)	Metile	Normal	Düşük amplifikasyon
69,XXX	Metile	Düşük amplifikasyon	Düşük amplifikasyon
46,XY,inv(9)	Hemimetile	Normal	Düşük Amplifikasyon
46, XX del (5)p (15)	Hemimetile	Normal	Düşük Amplifikasyon
47,XY, +21	Hemimetile	Düşük amplifikasyon	Düşük Amplifikasyon
47,XYX	Metile	Düşük amplifikasyon	Normal

5.TARTIŞMA

Hücre bölünmesi sırasında kromozom ayrılmasında meydana gelen hatalar anöplöidilere neden olmakla birlikte hücre bölünmesinin hatasız gerçekleşmesinde sentromer ve kinetokor rol oynamaktadır. CENP-A geni sentromer fonksiyonu ve kinetokor bütünlüğünde rol oynamasının (Fischle, W. ve diğerleri, 2003; Thompson, L.S. ve diğerleri, 2010) yanında CENP-A metilasyonu, kinetokor bütünlüğü ve kromozom ayrılmasını düzenlenmekte bir anahtar görevi görmektedir (Stimpson, M.K. ve Sullivan, A.B., 2011). Bu yüzden CENP-A epigenetik profili, nedeni bilinmeyen düşük vakalarının açıklanmasında yol gösterici olabileceğinden önem taşımaktadır.

Sentromer kararlılığı, yavru DNA dubleksinin ayrılması/kesilmesi (dekatensasyonu) ve kardeş kromatidlerin doğru bir şekilde ayrılmasında TOP 2 rol oynamaktadır (Uemura, T. ve diğerleri, 1987; Zucker, R.M. ve Elstein, K. H., 1991; Sumner, A.T, 1995). Bunun yanında serin/ tirozin kinaz ailesinden olan AURKA ifadesinin artışı, genomik kararsızlığa, tümör gelişimine, sentromer amplifikasyonlarına ve poliploidilere neden olmaktadır (Bischoff ve diğerleri, 1998; Zhou, Y., 2012).

AURKA ve TOP 2 gen ifadesindeki dengesizliklerin genomik instabilite ve kromozom anöplöidilerine neden olması dolayısıyla kanser hücrelerindeki rolünün araştırıldığı birçok çalışma bulunmasına rağmen düşük materyalleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla çalışma yapılmamıştır.

Bu nedenle çalışmamız düşük olgularında; CENP-A metilasyonu, AURKA ve TOP 2 gen ifadesi ilişkisinin araştırıldığı literatürdeki ilk çalışma olma niteliğindedir.

5.1 AURKA FISH Sonuçlarının Literatür ile Karşılaştırılması

AURKA kinaz aşırı ifadesini birçok kanserde gösterilmiştir. Aurora kinazın; ovaryum, serviks, kolon (Zhou, H. ve diğerleri., 1998), glioma (Reichardt, W. ve diğerleri, 2003), prostat (Zhou, H. ve diğerleri., 1998; Buschhorn H.M. ve diğerleri., 2005), pankreatik tümörlerinde (Chen, J. ve diğerleri., 2007), meme ve akciğer kanserinde aşırı ifadesi veya amplifikasyona rastlanması bu geni kanser tedavisinde çekici hale getirmiştir (Zhou, H. ve diğerleri., 1998; Gu, J. ve diğerleri., 2007).

Meraldi ve diğerlerinin 2002 yılında immunoprespitasyon, kinaz belirleme ve immunoblotlama yöntemlerini kullanarak yaptıkları çalışma, AURKA ile indüklenen poliploidi hücrelerin p53-Rb yolağında bağımlı olarak hücre bölünmesinin G1 evresinde tutuklandığı ve apoptozis yoluyla öldüğünü göstermiştir. Ayrıca çalışmada p53^{-/-} hücrelerde hiperpoliploidi rastlanmazken DNA replikasyonu ve hücre bölünmesinin gerçekleştiği bunun sonunca anöploidi ve anormal sentromer sayısına sahip hücrelerin görüldüğü bulunmuştur (Meraldi, P. ve diğerleri, 2002).

AURKA aşırı ifadesi, iğ ipliği kontrol noktalarını geçersiz kılarak anormal iğ ipliği oluşumuna neden olmakta ve hücre anafaz evresinde girdiği zaman kromozom ayrılma hatalarında artış gözlenmektedir (Anand, S. ve diğerleri, 2003). Yapılan çalışmalarda AURKA tarafından uyarılan sentromer amplifikasyon ve selüler transformasyonlarda p53 baskılanmış ve AURKA'nın p53'ü fosforillereyerek aktivitesini inhibe ettiği ve bunun sonucunda proteinin degregasyonunu desteklediği bulunmuştur (Liu, Q. ve diğerleri, 2004).

Darr ve diğerlerinin 2008 ve 2010 yılında yaptıkları çalışmalarda, kanser hücrelerinde AURKA geninin aşırı ifadesi yüksek tümör derecesi ve anöploidilerle ilişkili olmasının yanında P13K/ AKT ve β -katenin gibi onkogenik sinyal yollarının upregülasyonuna neden olduğu (Dar, A.A. ve diğerleri, 2010) ve p53 aile üyelerinden olan p73 genin regülasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Dar, A.A. ve diğerleri, 2008).

Ayrıca AURKA aşırı ifadesi, hücrelerin daha hızlı hücre bölünmesine girmesini teşvik etmesinin yanında telomeraz aktivitesi ve c-myc upregülasyonu yolu ile insan telomeraz revers-transkriptaz (hTERT) enziminin aktivitesi indüklemektedir. Telomeraz aktivitesinin artması, hücrelerin daha uzun hayat döngüsüne sahip olmasına neden olmaktadır (Yang, H. ve diğerleri, 2004).

Çalışmamızda yapılan AURKA FISH analizi sonucunda 7 olguda (%5.30) amplifikasyona rastlanmıştır. Amplifikasyon gözlenen 6 olguda kromozomal anomali gözlenmesine rağmen sadece 1 olguda kromozom anomalisi görülmemiştir ve kromozomal anomalisi ile AURKA amplifikasyonu sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur ($p=0.002$). Çalışmamız literatür çalışmalarında da belirtilen AURKA geninin sentromer kararlılığında , iğ ipliği kontrol noktalarına rol oynamasının yanında anöploidilere neden olduğu ile ilgili yapılan çalışmalarla korelasyon göstermektedir.

Ayrıca AURKA ile indüklenerek aşırı ifadesinin sağlandığı hücrelerde gözlenen apoptozis yoluyla hücre ölümünün AURKA amplifikasyonu gözlenen düşüklerin moleküler patogeneizde rol oynayabileceğini sonuçlarımız ileri sürmektedir. Ancak ileride yapılacak çalışmalar ve daha geniş çalışma grubu ile bu sonuçların desteklenmesi önem arz etmektedir.

5.2 TOP 2 FISH Sonuçlarının Literatür ile Karşılaştırılması

Uemura ve diğerleri, 1987 yılında yaptıkları çalışmada TOP 2 kodlayan gen aktivitesini inhibe ederek TOP 2'nin kromozom dekonsasyonu ve ayrılmasında gerekli olduğunu göstermişlerdir (Uemura, T. ve diğerleri, 1987).

Gonzalez ve diğerleri, TOP 2 ifadesi azalması durumunda mitoz ve hücre döngüsü sürecinin arttığını, kromozom kodensasyonu ve kardeş kromatid ayrılmasının etkilendiğini, hücre döngüsünde hataların görüldüğünü ve bunun sonucunda ise hücrelerin öldüğü veya poliploidi hücrelere dönüştüğünü bulmuşlardır. Ayrıca çalışma TOP 2'nin DNA replikasyonunu etkilememesine rağmen G2 evresinin uzamasına neden olduğu ve memeli hücre döngüsünü etkilediğini göstermiştir (Gonzalez, R.E. ve diğerleri, 2011).

Ishida ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada, TOP 2 aktivitesini ICRF-193 ile inhibe etmişler ve sonuçta TOP 2'nin hücre bölünmesinin M safhasında etkili olduğu ve TOP 2 inhibisyonu sonucunda DNA poliploidilerinin gözlemlendiğini belirtmişlerdir (Ishida, R. ve diğerleri, 1994).

Clifford ve diğerleri, TOP 2 inhibisyonunun hücrelerin mitoz geçişinin engellediği ve G2 evresinde tutuklanmasına neden olduğunu belirtmiştir. G2 evresinde bulunan kontrol noktaları, metafaz/anafaz geçişi sırasında kardeş kromozomlardaki kırılmayı önlemek için gerekli olmakla birlikte TOP 2, G2/M geçişinde rol oynamaktadır. G2 kontrol noktasında meydana gelen hatalar sonucunda genomik instabilite ve tümör oluşumu meydana gelmektedir (Clifford, B. ve diğerleri, 2003).

Zucker ve diğerleri 1991 yılında murin eritrolösemi hücreleriyle (MELC) ve Sumner, 1995 yılında insan lenfosit hücrelerinde yaptıkları çalışmada, TOP 2 aktivitesini engellemişlerdir. Sonuçta farklı seviyede poliploidi ve endoduplikasyonların ortaya çıktığını bildirmişlerdir (Zucker, M.R. ve diğerleri, 1991; Sumner, T.A. ve diğerleri, 1995).

Cortés F. ve diğerleri, TOP 2'nin anafaz evresi öncesinde doğru kromozom ayrılmasında rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. TOP 2 aktivite eksikliğinde, anafaz evresinde kromozom ayrılma hataları gözlenirken hücreler poliploidi veya endoduplike haline gelmektedir. Ayrıca fonksiyonel olmayan bir TOP 2 aktivitesine sahip hücrenin, mitoz bölünmede belirli bir noktaya kadar geldiği ancak sonunda öldüğü ileri sürülmüştür. (Cortés, F. ve diğerleri, 2003).

Yapılan çalışmada, TOP 2-DNA kırılma kompleks miktarının çok az seviyeye geldiği durumda yavru kromozom ayrılmasının doğru gerçekleşmediği ve mitotik hatalar görülerek hücrenin öldüğü bulunmuştur. Eğer TOP 2/DNA kırılma kompleks seviyesi çok yüksek miktara ulaşırsa kalıcı DNA kırıkları meydana gelmekte ve bunun sonucunda esansiyel DNA işlemlerinin inhibe edilmesinin yanında rekombinasyon/hata onarım yolları başlatılmakta ve kromozom translokasyonları ve diğer DNA aberasyonlar meydana gelmektedir. Bunun sonucunda hücre apoptozise uğrayarak ölmektedir (Deweese, J. E. ve Osheroff, N., 2009).

TOP 2 enziminin çalışmasının engellenmesi DNA'ya bağlı enzim miktarını arttırarak DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna engel olur. Bunun sonucunda ise programlanmış hücre ölümü (apoptozis) meydana gelmektedir (Nitiss, J. L, 2009).

Daha önce düşük vakalarında TOP 2 aktivitesi ilgili çalışma bulunmamakla birlikte çalışmamızda analiz edilen TOP 2 geni yukarıda bildirilen bilgiler ışığında, ileri yıllarda nedeni bilinmeyen düşüklerin açıklamasına katkıda bulunacak aday bir gen olduğundan çalışmamıza dahil edilmiştir.

Kromozom ayrılmasında etkili olduğu birçok çalışma ile gösterilen TOP 2 gen amplifikasyonunun nedeni bilinmeyen düşüklerdeki rolü, çalışma grubu olarak kromozom anomalisi gözlenen ve gözlenmeyen düşüklerde kontrol grubu olarak amniyon örneklerinde incelenmiş ve TOP 2 amplifikasyonu saptanan 8 olgunun 6'sının (%6.06) kromozom anomalisi gözlenen düşük materyali, 2'sinin (%25) kromozom anomalisi gözlenen amniyon örneğidir.

Yapılan istatistiksel analizde, TOP 2 amplifikasyonu ile düşük arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olduğu saptanmış ($p < 0,05$) ve sonuçlarımız TOP 2 amplifikasyonun nedeni bilinmeyen düşüklerde kromozom ayrışması, mitoz bölünmede hataları ve dengesizliklere yol açarak gebelik kayıplarına yol açabileceğini ileri sürmektedir.

5.3 CENP-A Metilasyon Spesifik PZR Sonuçlarının Literatür İle Karşılaştırılması

Sentromer spesifik, H3 histon varyantı CENP-A, nükleozomal seviyede sentromer-spesifik kromatin organizasyonunu direkt etkilediğinden epigenetik düzenlemede aday bir protein olarak gösterilmektedir (Howman, V. E. ve diğerleri, 2000).

Yapılan çalışmalarda, anöploidi ve onkogenezin hücre bölünmesi sırasında kromozom ayrılma hatalarından kaynaklandığını göstermekle birlikte kanser hücrelerinde CENPA eksikliği ve metilasyonun kromozom ayrılma hataları ve kinetokor bütünlüğünün bozulduğu gösterilmiştir (Tomonaga, T. ve diğerleri, 2003; Sullivan, L.L. ve diğerleri., 2011; McGovern, S. L. ve diğerleri, 2012; Wu, Q. ve diğerleri., 2012; Qiu, J. J. ve diğerleri, 2013).

İnsanda kanserli hücre serilerinde yapılan çalışmalar ayrıca CENP-A aşırı ifadesinin kromozom bölgelerinde ektopik lokalizasyonlara neden olabileceğini göstermiştir (Tomonaga, T. ve diğerleri, 2003; Lacoste, N. ve diğerleri, 2014).

Howman ve diğerlerinin farelerle yaptıkları çalışmada, maternal CENP-A'yı inhibe ederek mitotik dengesizliklerin ortaya çıktığını göstermişler ve CENP-A inhibisyonuna bağlı kromozomal ayrılma hataları sonucunda micronuklei, makronuklei , nuklear köprüler (Briding) görülmüştür (Howman, V.E. ve diğerleri, 2000).

Çalışmamızda nedeni bilinmeyen düşüklerde CENP-A epigenetik profilinin çıkartılması ve düşükle ilişkisinin bulunması amaçlanmıştır. Bu çalışmada kromozomal anomali gözlenen 30 olgunun CENP-A metilasyon durumunda 19 olgu (%63.3) metile, 11 olgu (%36.7) hemimetile olarak gözlenirken; kromozomal anomali gözlenmeyen 102 olgudan 36 olgu (%35.3) metile, 50 olgu (%49) hemimetile ve 16 olgu (%15.7) unmetile olarak bulunmuştur.

Kromozomal anomali gözlenen olgularla CENP-A promotor metilasyonu ile kromozom anomalisi gözlenmeyen olgularda CENP-A promotor unmetilasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p=0.007$) ve bu sonuçlar kromozom anomalisine bağlı gebelik kayıplarını destekleyici niteliktedir.

5.4 Sitogenetik Sonuçlarının Literatür İle Karşılaştırılması

Düşük vakalarıyla ilgili sitogenetik çalışmalar uzun yıllardan beri yapılmaya devam etmektedir. Carr, 1970 yılında spontan düşüklerde yaptığı çalışmada 227 olgunun %22'sinde kromozomal anomali bulunmuştur. Anomalilerin 11'inde poliploidilere rastlanırken 9'unda triploidi, 2'sinde tetraploidiye rastlanmıştır (Carr, H.D., 1970).

Kajii T. ve diğerlerinin 639 düşük olgusunda yaptıkları çalışmada 339 olguya kromozom analizi yapılmıştır. Sonuçta olguların 241'inde (%54) kromozomal anomaliye rastlanmıştır. Bu anomalilerin 230'u sayısal anomaliler olmakla birlikte 11'i yapısaldır. Sayısal anomalilerin %31'i otozomal trizomiler, %10'u 45, X, %6.5'i triploidiler ve %1.8'i tetraploidiler olarak bulunmuştur (Kajii, T. ve diğerleri., 1980).

Doria ve diğerlerinin 232 örnekte yaptıkları çalışmada 38 örnekte kromozomal anomaliye rastlanırken bunların %55'i trizomi, %20'si poliploidi ve %9'u monozomi X olarak, (Doria, S. ve diğerleri., 2009) Schaeffer ve diğerleri çalışmalarında kromozomal anomali oranını %39 olarak bulurken anomalilerin %81'i trizomi, %6'sı poliploidi ve %6'sı monozomi X olarak bulunmuştur (Schaeffer, J. A. ve diğerleri., 2004). Ayrıca Sullivan ve diğerleri 2004 yılında 150 olguda yaptıkları çalışmada kromozomal anomali oranını % 42 olarak bulurken anomalilerin %63'ü trizomi, %21'i poliploidi ve %9'u monozomi X olarak saptamışlardır (Sullivan, B. A. ve diğerleri., 2004).

Çalışmamızda çalışma grubu olan 47 düşük materyali örneğinin 16'sında (%34) kromozomal anomaliye rastlanmıştır. Gözlenen kromozomal anomalilerin 12'si sayısal ve 4'ü yapısaldır. Bu oran Schaeffer ve diğerleri., Diego-alvarez ve diğerleri, Sullivan ve diğerleri, Doria ve diğerlerinin yaptıkları çalışmalardaki sitogenetik sonuçlarıyla korelasyon göstermektedir (Schaeffer, J. A. ve diğerleri, 2004; Sullivan, B.A. ve diğerleri, 2004; Diego-alvarez, D. ve diğerleri, 2007; Doria, S. ve diğerleri, 2010).

Kromozomal anomali gözlenen olguların % 25'inde 45, X gözlenirken bu sonuç Robberecht ve diğerlerinin 2009 yılında 109 düşük örneğiyle yaptığı çalışmayla korelasyon göstermektedir (Robberecht, C. ve diğerleri, 2009).

Sonuç olarak çalışmamızda, kromozom anomalisi gözlenen olgularda CENP-A metilasyonu veya hemimetilasyonun gözlenmesinin yanında TOP 2 düşük amplifikasyonu ve/veya AURKA düşük amplifikasyonuna rastlanmıştır. Bu çalışma sonuçları ile TOP 2 ve AURKA gen amplifikasyonuna bağlı apoptozisin nedeni bilinmeyen düşüklerde rol oynayabileceği ve bu nedenle düşüğün gerçekleşebileceği ileri sürülmektedir.

Bu çalışma, CENP-A, TOP 2 ve AURKA'nın nedeni bilinmeyen düşüklerin moleküler patogenezinde rol oynayabileceği ve düşüklerin CENP-A sessizleştirilmesi, TOP 2 veya AURKA gen ifadesi bozukluklarına bağlı mitoz dengesizlikleri sonucunda gerçekleşebileceğini ileri sürmesi ve düşüklerde yapılan ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Amann, R., ve Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*, 6(5), 339-348.
- Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., Venkitaraman, A. R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*, 3(1), 51-62.
- Andrews, P. D., Knatko, E., Moore, W. J., Swedlow, J. R., (2003). Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr. Opin. Cell Biol*, 15(6), 672–683.
- Athwal, K. R., Walkiewicz, P.M., Baek, S., Fu, S., Bui, M., Camps, Jordi. ve diğerleri. (2015). CENP-A nucleosomes localize to transcription factor hotspots and subtelomeric sites in human cancer cell. *Epigenetics & Chromatin*, 8(2), 1-23.
- Austin, C. A., Fisher, L. M. (1990). Isolation and characterization of a human cDNA clone encoding a novel DNA topoisomerase II homologue from HeLa cells. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS)*, 266(1-2), 115-117.
- Austin, C. A., Marsh, K. L. (1998). Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays*, 20(3), 215-226.
- Backos, M., Rai, R., Baxter, N., Chilcott, I. T., Cohen, H., Regan, L. (1999). Pregnancy complications miscarriage associated with in women with recurrent antiphospholipid antibodies treated with low dose aspirin and heparin. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 106(2), 102-107.
- Bailey, O. A., Panchenko, T., Sathyan, M. K., Petkowski J. J., Pai, Pei-Jing., Bai, L. D., ve diğerleri. (2013). Posttranslational modification of CENP-A influences the conformation of centromeric chromatin. *Proceddings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 110(29), 11827-11832.
- Bates, A. D. ve Maxwell A. (2005). DNA Topoisomerases. DNA Topology. Oxford University Press: United States, 125-141.
- Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C., Wang JC. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, 379(6562), 225-232.

Bergmann, J. H., Rodríguez, M. G., Martins, N. M. C., Kimura, H., Kelly, D. A., Masumoto, H. L. V., Jansen, L. E. T., Earnshaw, W. C. (2011). Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *European Molecular Biology Organization J.(EMBO)*, 30(2), 328–340.

Bernard, P., Maure, J. F., Partridge, J. F., Genier, S., Javerzat, J. P., Allshire, R. C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science.*, 294(5551), 2539-2542.

Bishop, R. (2010). Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*, 3(1), 85-95.

Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B. ve diğerleri. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *European Molecular Biology Organization J.(EMBO)*, 17(11), 3052-3065.

Black, B. E., Foltz, D. R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V. L., Jr., Cleveland D. W. (2004). Structural determinants for generating centromere chromatin. *Nature* , 430(6999), 578-582.

Blower, M. D., Sullivan, B., Karpen, G. (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Developmental Cell*, 2(3), 319-330.

Boué, J., Bou, A., Lazar, P. (1975). Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology.*, 12(1), 11-26.

Bowen, P., Lee, C. S. (1969). Spontaneous abortion. Chromosome studies on 41 cases and an analysis of maternal age and duration of pregnancy in relation to karyotype. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 104(7), 973-983.

Bower, J. J., Karaca, F. G., Zhou, Y., Simpson, A. D., Cordeiro-Strone, M., Kaufmann, K. W. (2010). Topoisomerase 2 alfa maintains genomic stability through decatenation G2 checkpoint signaling. *Oncogene*, 29(34), 4787-4799.

Branch, D. W., Silver, R. M., Blackwell, J. L., Reading, J. C., Scott, J. R. (1992). Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. *Obstetrics & Gynecology*, 80(4), 614-620.

Brill, S. J., Sternglanz, R. (1988). Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell*, 54(3), 403-411.

Burden, D. A., Osheroff, Neil. (1998). Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400(1-3), 139-154.

Burrack, S. L. ve Berman, Judith. (2012). Flexibility of centromere and kinetochore structures. *Trends in Genetics*, 28(5), 204–212.

Buschhorn, H. M., Klein, R. R., Chambers, S. M., Hardy, M. C., Green, S., Bearss, D. ve diğeri. (2005). Aurora-A over-expression in high-grade PIN lesions and prostate cancer. *Prostate.*, 64(4), 341-346.

Capranico, G., Binaschi, M. (1998). DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons., *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1400(1-3), 185-94.

Carmena, M., Earnshaw, W.C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(11), 842–852.

Carp H. J., (2008). Recurrent Miscarriage: Genetic Factors and Assessment of the Embryo. *The Israel Medical Association Journal*, 10(3), 229-231.

Carr, D. H. (1970). Chromosome Studies in Selected Spontaneous Abortions: 1. Conception After Oral Contraceptives. *Canadian Medical Association Journal*, 103(4), 343-348.

Cheeseman, M.I., Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 33-46.

Chen, A. Y., Liu, L. F. (1994). DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annual Review Pharmacol and Toxicology*, 34, 191-218.

Chen, J., Li, D., Wei, C., Sen, S., Killary, A. M., Amos, C. I., Evans, D. B.,

Abbruzzese, J. L., Frazier, M. L. (2007). Aurora-A and p16 polymorphisms contribute to an earlier age at diagnosis of pancreatic cancer in Caucasians. *Clinical Cancer Research*, 13(10), 3100-3104.

Choo, K. H. A. (1997). *The Centromere*. USA: Oxford University Press.

Christophorou, N., Rubin, T., Huynh, Jean-Rene' (2013). Synaptonemal Complex Components Promote Centromere Pairing in Pre-meiotic Germ Cells. *A Peer-Reviewed Open-Access Journal*, 9(12), 1-9.

Clark, S. J., Melki, J. (2002). DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?. *Oncogene*, 21(35), 5380-5387.

Clarke, D. J., Johnson, R. T., Downes, C. S. (1993). Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. *Journal of Cell Science*, 105, 563-569.

Cleveland, D. W., Mao, Y., Sullivan, K. F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, 112(4), 407-421.

Clifford, B., Beljin, M., Stark, G. R., Taylor, W. R. (2003). G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Research*, 63(14), 4074-4081.

Coelho, A. P., Machado- Queiroz, J., Carmo, M. A., Pereira-Moutinho, S., Maiato, H., Sunkel, E. C. (2006). Dual Role of Topoisomerase 2 in Centromere Resolution and Aurora B Activity. *Public Library of Science*, 6(8), 1-20.

Corbett, A. H., Hong, D., Osheroff, N. (1993). Exploiting mechanistic differences between drug classes to define functional drug interaction domains on topoisomerase II. Evidence that several diverse DNA cleavage-enhancing agents share a common site of action on the enzyme., *The Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 14394-14398.

Cortés, F., Pastor, N., Mateos, S., Domínguez, I. (2003). Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis. *Mutation Research*, 543(1), 59-66.

Csink, A. K., Henikoff, S. (1998). Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends in Genetics*, 14(5), 200-204.

Dar, A. A., Belkhiri, A., Ecsedy, J., Zaika, A., El-Rifai, W. (2008). Aurora kinase A inhibition leads to p73-dependent apoptosis in p53-deficient cancer cells. *Cancer Research*, 68(21), 8998-9004.

Dar, A. A., Goff, L. W., Majid, S., Berlin, J., El-Rifai, W. (2010). Aurora kinase inhibitors—rising stars in cancer therapeutics?. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2), 268–278.

Daya, S., Gunby, J., Porter, F., Scott, J., Clark, D. A. (1999). Critical analysis of intravenous immunoglobulin therapy for recurrent miscarriage. *Human Reproduction Update*, 5(5), 475-482.

Deweese, J. E., Osheroff, N. (2009). The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Research*, 37(3), 738-748.

Diego-Alvarez, D., Rodriguez de Alba, M., Cardero-Merlo, R., Diaz-Recasens, J., Ayuso, C., Ramos, C. & Lorda-Sanchez, I. (2007). MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenatal Diagnostic*, 27(8), 765-771.

Dlugi, A. M. (1998). Hyperprolactinemic recurrent spontaneous pregnancy loss: a true clinical entity or a spurious finding?. *Fertility and Sterility*, 70(2), 253-255.

Doria, S., Carvalho, F., Ramalho, C., Lima, V., Francisco, T., Machado, A.P. ve diğerleri. (2009). An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *European Journal Of Obstetrics & Gynecology Reproductive Biology*, 147 (2) 144-150.

Downes, C. S., Mullinger, M. A., Johnson, T. R. (1991). Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells but do not prevent exit from mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 88(20), 8895-8899.

Dutertre, S., Descamps, S., and Prigent, C. (2002). On the role of aurora- A in centromere function. *Oncogene*, 21(40), 6175-6183.

Earnshaw, W. C., ve Rothfield, N. (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma (Berl)*, 91, 313-321.

Ekwall, K. (2007). Epigenetic Control of centromere behavior. *Annual Review Genetics.*, 41, 63-81.

Etseller, M. ve Herman, J. (2002). Cancer is an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *Journal Pathology*, 196(1), 1-7.

Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G., Maller, J. L. (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Current Biology*, 13(8), 691-697.

Fan, Yao-Shan. (2003). Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications. Totowa: Humana Press Inc.

Fischle, W., Wang, Y., Allis, C. D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*, 425, 475-479.

Foltz, D. R., Jansen, E. T. L., Black, B. E., Bailey, O. A., John, R. Y., Cleveland, W. D. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nature Cell Biology*, 8(5), 458–469.

Ford, B. H ve Schust, D. J. (2009). Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy. *Obstetrics & Gynecology*, 2(2), 76-83

Fukagawa, T., Pendon, C., Morris, J., Brown, W. (1999). CENP-C is necessary but not sufficient to induce formation of functional centromere. *European Molecular Biology Organization J. (EMBO)*, 18(15), 4196-4209.

Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E., Laemmli, U. K. (1986) . Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *Journal of Molecular Biology*, 188(4), 613–629.

Gellert, M. (1981). DNA topoisomerase. *Annual Review of Biochemistry.*, 50, 879-910.

Giet, R., Petretti, C., Prigent, C. (2005). Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link?. *Trends in Cell Biology.*, 15(5), 241-250.

Giménez-Abián, J. F., Clarke, D. J., Devlin, J., Giménez-Abián, M. I., De la Torre, C., Johnson, R. T., Mullinger, A. M., Downes, C. S.(2000). Premitotic chromosome individualization in mammalian cells depends on topoisomerase II activity. *Chromosoma*, 109(4), 235-244.

Gonzalez, R. E., Lim, C. U., Cole, K., Bianchini, C. H., Schools, G. P., Davis, B. E. ve diğerleri. (2011). Effects of conditional depletion of topoisomerase II on cell cycle progression in mammalian cells. *Cell Cycle.*, 10(20), 3505-3514.

Gopalakrishnan, S., Van Emburgh, B. O., Robertson, K. D. (2008). DNA methylation in development and human disease. *Mutation Research.*, 647(1-2), 30-38.

Gouveris, P., Skopelitis, E., ve Tsavaris N. (2011). Topoisomerase 1 and 2 Expression in Recurrent Colorectal Cancer Cells : A Dubious Matter. (Herve Seligmann). Biochemistry, Genetics and Molecular Biology 'DNA Replication-Current Advances' (Chapter 29). Athens:INTECH.

Gu, J., Gong, Y., Huang, M., Lu, C., Spitz, M. R., Wu, X. (2007). Polymorphisms of STK15 (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians. *Carcinogenesis.*, 28(2), 350-355.

Gupta, M., Fujimori, A., Pommier, Y. (1995). Eukaryotic DNA Topoisomerases-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1262(1), 1-14.

Hanna, C. W., McFadden, D. E., Robinson, W. P. (2013). DNA methylation profiling of placental villi from karyotypically normal miscarriage and recurrent miscarriage. *American Journal of Pathology.*, 182(6), 2276-2284.

Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. A., Oegema, K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology.*, 155(7), 1109-1116.

Hassold, T. (1986) Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends in Genetics.*, 2, 105–110.

Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, D. B. ve Baylin, B. S. (1996). Methylation-specific PZR: A novel PZR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 93(18), 9821-9826.

Heun, P., Erhardt, S., Blower, D. M., Weiss, S., Skora, D. A., Karpen, H. G. (2006). Mislocalization of the Drosophila Centromere-Specific Histone CID Promotes Formation of Functional Ectopic Kinetochores. *Developmental Cell*, 10(3), 303–315.

Hirahara, F., Andoh, N., Sawai, K., Hirabuki, T., Uemura, T., Minaguchi, H. (1998). Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. *Fertil Steril*, 70(2), 246-252.

Hochegger, H., Hégarat, N., Pereira-Leal, B. J. (2013). Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle. *Open Biology*, 3(120185), 1-13.

Holland, J. A., Cleveland, W. D. (2009). Boveri revisited: Chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 478- 487.

Holm, C., Goto, T., Wang, J. C., Botstein, D. (1985). DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell*, 41(2), 553-563.

Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., Backer, C. B., Welburn, J. P., Dong, Y. ve diğerleri. (2008). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell*, 135(6), 1039-1052.

Howman, V. E., Fowler, J. K., Newson, J. A., Redward, S., MacDonald, C. A., Kalitsis, P. Ve diğerleri. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 97(3), 1148–1153.

Ishida, R., Sato, M., Narita, T., Utsumi, K. R., Nishimoto, T., Morita, T. (1994). Inhibition of DNA topoisomerase II by ICRF-193 induces polyploidization by

uncoupling chromosome dynamics from other cell cycle events. *Journal of Cell Biology*,126(6), 1341-1351.

Jansen, L. E., Black, B. E., Foltz, D. R., Cleveland, D. W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *Journal of Cell Biology*,176(6), 795-805.

Jenkins, J.R., Ayton, P., Jones, T., Davies, S. L., Simmons, D. L., Harris, A. L. ve diğ erleri. (1992). Isolation of cDNA clones encoding the beta isozyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Research*.,20(21), 5587-5592.

Kajii, T., Ferrier, A., Niikawa, N., Takahara, H., Ohama, K., Avirachan, S., (1980) Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Human Genetics*, 55(1), 87-98.

Kalousek, D. K., Pantzar, T., Tsai, M., Paradice, B. (1993). Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3,912 cases. *Birth Defects*, 29(1), 53-61.

Kalousek, D. K. (2000). Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *American Journal of Medical Genetics*, 91(1), 39-45.

Kapoor, M., Montes de Oca, L. R., Liu, G., Lozano, G., Cummings, C., Mancini, M., Ouspenski, I., Brinkley, B. R. May, G. S. (1998). The cenpB gene is not essential in mice. *Chromosoma*.,107(8), 570-576.

Käs, E. ve Laemmli, U. K. (1992). In vivo topoisomerase II cleavage of the Drosophila histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics. *European Molecular Biology Organization J. (EMBO)*,11(2), 705–716.

Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., Suzuki, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli. *Cell*., 63(2), 393-404.

Keen, N., Taylor, S. (2004). Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews Cancer* , 4(12), 927-936.

Klinger K., Landes G., Shook D., Harvey R., Lopez L., Locke P. (1992). Rapid detection of chromosome aneu-ploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *American Journal of Medical Genetics*. 51(1), 55–65.

Klose, R. J., Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*., 31(2), 89-97.

Kollareddy, M., Dzubak, P., Zheleva, D., Hajduch, M. (2008). Aurora Kinases: Structure, Functions and Their Association with Cancer. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia Journal*, 152(1), 27-33.

Knight, S. J., Regan, R., Nicod, A., Horsley, S. W., Kearney, L., Homfray, T. (1999). Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *The Lancet*, 354(9191), 1676–1681.

Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O. ve diğ erleri. (2003). CENP-A Phosphorylation by Aurora-A in Prophase Is Required for Enrichment of Aurora-B at Inner Centromeres and for Kinetochore Function. *Developmental Cell*, 5(6), 853–864.

Kwan, K. Y., Wang, J. C. (2001). Mice lacking DNA topoisomerase III β develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*.,98(10), 5717-5721.

Lacoste, N., Woolfe, A., Tachiwana, H., Garea, A. V., Barth, T., Cantaloube, S. ve diğ erleri. (2014). Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. *Molecular Cell*., 53(4), 631-644.

Lam, A. L., Boivin, C. D., Bonney, C. F., Rudd, M. K., Sullivan, B. A. (2006). Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*,103(11), 4186-4191.

Lamb, N. E., Hassold, T. J. (2004). Nondisjunction--a view from ringside. *The New England Journal of Medicine*., 351(19), 1931-1934.

- Lampert, F. ve Wastermann, S. (2011). A blueprint for kinetochores — new insights into the molecular mechanics of cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(7), 407-412
- Lauritsen, J. G. (1976). Aetiology of spontaneous abortion. A cytogenetic and epidemiological study of 288 abortuses and their parents. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 52, 1–29.
- Lestou, V. S., Lomax, B., Barrett, I. J., Kalousek, D. K. (1999). Screening of human placentas for chromosomal mosaicism using comparative genomic hybridization. *Teratology*, 59(5), 325–330.
- Li, Y. ve Tollefsbol, O. T. (2011). DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis Methods. *Molecular Biology*, 791, 11–21.
- Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Chen, J., Cheng, J. Q. (2004). Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *The Journal of Biology Chemistry.*, 279(50), 52175-52182.
- Lodish H., Berk A., Zipursky L. S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000). The Role of Topoisomerases in DNA Replication. *Molecular Cell Biology* (bölüm 12.3). New York:W.H. Freeman.
- Lodge, A. J., Anderson, J. J., Ng, S. W., Fenwick, F., Steward, M., Haugk, B. ve diğerleri. (2000). Expression of topoisomerase IIIalpha in normal and neoplastic tissues determined by immunohistochemistry using a novel monoclonal antibody. *British Journal of Cancer.*, 83(4), 498-505.
- Lomax, B., Kalousek, D. K., Kuchinka, B., Barrett, I. J., Harrison, K.J, and Safavi, H. (1994). The utilization of interphase cytogenetic analysis for the detection of mosaicism. *Human. Genetics*, 93(3), 243–247.
- Lüleci, G., Başaran, S., Bağcı, G., Keser, İ. (1990). Sitogenetik Uygulama Yöntemleri. ANKARA: Meteksan Co.

Lynn, R., Giaever, G., Swanberg, S. L., Wang, J.C. (1986). Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase. *Science.*, 233(4764), 647-649.

Lyu, Y. L., Lin, C. P., Azarova, A. M., Cai, L., Wang, J. C., Liu, L. F. (2006). Role of topoisomerase II β in the expression of developmentally regulated genes. *Molecular and Cellular Biology.*, 26(21), 7929-7941.

Mariño-Ramírez, L., Levine, K. M., Morales, M., Zhang, S., Moreland, R. T., Baxeavanis, A. D. Ve diğlerleri. (2011). The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins. *Database (Oxford).*, 2011, 1-7.

Marshall, O. J., Chueh, A. C., Wong, L. H., Choo, K. H. (2008). Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *American Journal of Medical Genetics*, 82(2), 261-282.

Marumoto, T., Zhang, D., Saya, H. (2005). Aurora-A — A guardian of poles. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 42-50.

Maxwell, A. ve Gellert, M. (1986). Mechanistic aspects of DNA topoisomerases. *Advances in Protein Chemistry*, 38, 69–107.

McEwen, B. F. ve Dong, Y. (2010). Contrasting models for kinetochore microtubule attachment in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, 67(13), 2163-2172.

McGovern, S. L., Qi, Y., Pusztai, L., Symmans, W. F., Buchholz, T. A. (2012). Centromere protein-A, an essential centromere protein, is a prognostic marker for relapse in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Research.*, 14(3), 1-11.

- Meluh, P. B. ve Strunnikov, A. V. (2002). Beyond the ABCs of CKC and SCC. Do centromeres orchestrate sister chromatid cohesion or vice versa?. *European Journal of Biochemistry*, 269(9), 2300–2314.
- Meraldi, P., Honda, R., Nigg, E. A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *European Molecular Biology Organization J. (EMBO)*, 21(4), 483-492.
- Merrick, K. A., Larochelle, S., Zhang, C., Allen, J. J., Shokat, K. M., Fisher, P. R. (2008). Distinct activation pathways confer cyclin-binding specificity on Cdk1 and Cdk2 in human cells. *Molecular and Cellular Biology*, 32(5), 662–672.
- Miller, K. G., Liu, F. L., Englund, T. P. (1981). A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *European Journal of Biochemistry*, 256(17), 9334–9339.
- Momparler, R. L., Bovenzi, V. J. (2000). DNA methylation and cancer. *Cell Physiology*, 183(2), 145-154.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., Steigerwald, J., Tan, E. M. (1980). Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 77(3), 1627–1631.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(1), 21–32.
- Nitiss, J. L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 327-337.
- Obuse, C., Yang, H., Nozaki, N., Goto, S., Okazaki, T., Yoda, K. (2004). Proteomics analysis of the centromere complex from HeLa interphase cells: UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB-1) is a component of the CEN-complex, while BMI-1 is transiently co-localized with the centromeric region in interphase. *Genes Cells*, 9(2), 105-120.

Okada, M., Cheeseman, I. M., Hori, T., Okawa, K., McLeod, I. X., Yates, J. R. ve diğeri. (2006). The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nature Cell Biology*, 8(5), 446-457.

Palmer, D. K., O'Day, K., Margolis, R. L. (1990). The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma*, 100(1), 32-36.

Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H. L., Charbonneau, H., Margolis, L. R. (1991). Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 88(9), 3734–3738.

Park, H. S., Park, W. S., Bondaruk, J., Tanaka, N., Katayama, H., Lee, S. ve diğeri. (2008). Quantitation of Aurora kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(19), 1401-1411.

Peng, H., Mariani, K. J. (1993). Escherichia coli topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24481-24490.

Perez-Castro, A. V., Shamanski, F. L., Meneses, J. J., Lovato, T. L., Vogel, K. G., Moyzis, R. K. ve diğeri. (1998). Centromeric protein B null mice are viable with no apparent abnormalities. *Developmental Biology*, 201(2), 135-143.

Pietras, F. D., Bennett, L. K., Siracusa, D. L., Woodworth-Gutai M., Gross W.K. ve diğeri. (1983). Construction of a small Mus musculus repetitive DNA library: identification of a new satellite sequence in Mus musculus. *Nucleic Acids Research*, 11(20), 6965–6983.

Plohl, M., Plohl, N. P., Plohl B. P. (2014). Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma*, 123(4), 313–325.

Pluta, A. F., Saitoh, N., Goldberg, I., Earnshaw, W.C. (1992). Identification of a subdomain of CENP-B that is necessary and sufficient for localization to the human centromere. *The Journal of Cell Biology.*, 116(5), 1081-1093.

Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., Strumberg, D. (1998). Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1400(1-3), 83-105.

Qiu, J. J., Guo, J. J., Lv, T. J., Jin, H. Y., Ding, J. X., Feng, W. W. ve diğerleri. (2013). Prognostic value of centromere protein-A expression in patients with epithelial ovarian cancer. *Tumor Biology.*, 34(5), 2971-2975.

Rattner, B. J. (1991). The structure of the mammalian centromere. *Bioessays.*, 13(2), 51-56.

Rattner, B. J., Hendzel, J. M., Furbee, S. C., Muller, T. M., Bazett-Jones, P. D. (1996). Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *The Journal of Cell Biology*, 134(5), 1097-1107.

Raynard, S., Bussen, W., Sung, P. (2006). A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *European Journal of Biochemistry.*, 281(20), 13861-13864.

Regan, L., Braude, P. R., Trembath, P. L. (1989). Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *British Medical Bulletin J*, 299(6698), 541-545.

Reichardt, W., Jung, V., Brunner, C., Klein, A., Wemmert, S., Romeike, B. F. ve diğerleri. (2003). The putative serine/threonine kinase gene STK15 on chromosome 20q13.2 is amplified in human gliomas. *Oncol Reports.*, 10(5), 1275-1279.

Rieder, H., Bonwetsch, C., Janssen, L. A., Maurer, J., Janssen, J. W., Schwartz, S. ve diğeri. (1998). High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*,12(9), 1473-1481.

Robberecht, C., Schuddinck V., Fryns J. P., Vermeesch, R.J. (2009). Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls. *Genetics in Medicine*, 11 (9), 646–654.

Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R. ve diğeri. (1998). The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *Journal of Cell Science*.,111, 557-572.

Rose, D., Thomas, W., Holm, C. (1990). Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II. *Cell*., 60(6), 1009-1017.

Rull, K., Nahirnaja, L., Laan, M. (2012). Genetics of Recurrent Miscarriage: Challenges, Current Knowledge, Future Directions. *Frontiers in Genetics*, 3(34), 1-13.

Rushworth, F. H., Backos, M., Rai, R., Chilcott, I. T., Baxter, N., Regan, L. (2000). Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. *Human Reproduction*,15(7), 1637-1639.

Saffery, R., Irvine, D. V.,Griffiths, B., Kalitsis, P.,Wordeman, L. ve Choo, K. H. A. (2000). Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functional important kinetochore-associated proteins. *Human Molecular Genetics*, 9(2), 175-185.

Saitoh, H., Tomkiel, J., Cooke, C. A., Ratrie, H., Maurer, M., Rothfield, N. F., Earnshaw, W. C. (1992). CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell*., 70(1), 115-125.

- Schaeffer, J. A., Chung, J., Heretis, K., Wong, A., Ledbetter, H. D., Martin, L. C. ve diğeri. (2004). Comparative genomic hybridization-array analysis enhance the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *The American Journal of Human Genetics*, 74 (6), 1168–1174.
- Schulman, I., Bloom, K. S. (1991). Centromeres: an integrated protein/DNA complex required for chromosome movement. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 7, 311-336.
- Schultz, M. C., Brill, S. J., Ju, Q., Sternglanz, R., Reeder, R. H. (1992). Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes & Development*, 6(7), 1332-1341.
- Schumacher, J. M., Ashcroft, N., Donovan, P. J., Golden, A. (1998). A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*, 125(22), 4391-4402.
- Serkancı, N., Guldberg, P., Burns, S. J., Abdallah, B., Schrodder H., Jensen, T. ve diğeri. (2004). Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene*, 23(29), 5095-5098.
- Silva, M. C., Bodor, D. L., Stellfox, M. E., Martins, N. M., Hochegger, H., Foltz, D. R. ve diğeri. (2012). Cdk activity couples epigenetic centromere inheritance to cell cycle progression. *Developmental Cell*, 22(1), 52-63.
- Slesarev, I. A., Stetter, O. K., Lake, A. J., Gellert M., Krah Regis & Kozyavkin A. S. (1993). DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature*, 364, 735-737.
- Smith, E., Jones, M. E., Drew, P. A. (2009). Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BioMed Central Cancer*, 9(123), 1-12
- Spell, R.M, Holm, C. (1994). Nature and distribution of chromosomal intertwinings in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology*, 14(2), 1465–1476.

- Stellfox, E.M., Bailey, O.A., Foltz, R.D. (2013). Putting CENP-A in its place. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(3), 387-406.
- Stephenson, M. D. (1996). Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril*, 66(1), 24-29.
- Stern, J. J., Dorfmann, A. D., Gutiérrez-Najar, A. J., Cerrillo, M., Coulam, C. B. (1996). Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertility and Sterility*, 65(2), 250-253.
- Sternglanz, R., DiNardo, S., Voelkel, A. K, Nishimura, Y., Hirota, Y., Becherer, K. ve diğerleri. (1981). Mutations in the gene coding for Escherichia coli DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 78(5), 2747–2751.
- Stimpson, M. K., Sullivan, A. B. (2012). Centromeres Poised En Pointe: CDKs Put a Hold on CENP-A Assembly. *Developmental Cell previews*, 22(1), 1-2.
- Sugimoto, K., Yata, H., Muro, Y., Himeno, M. (1994). Human centromere protein C (CENP-C) is a DNA-binding protein which possesses a novel DNA-binding motif. *The Journal of Biochemistry*, 116(4), 877-881.
- Sullivan, K. F, Hechenberger, M., Masri, K. (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *Journal of Cell Biology*, 127(3), 581-92.
- Sullivan, B. A, Karpen, G. H. (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(11), 1076-1083.
- Sullivan, K. F. (2001). A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(2), 182-188.
- Sullivan, L. L., Boivin, D. C., Mravinac, B., Song, Y. I., Sullivan, A. B. (2011). Genomic size of CENP-A domain is proportional to total alpha satellite array size at human centromeres and expands in cancer cells. *Chromosome Research*, 19(4), 457–470.

Sumner, A. T. (1995). Inhibitors of topoisomerase II delay progress through mitosis and induce a doubling of the DNA content in CHO cells. *Experimental Cell Research*, 217(2), 440-447.

Tanner, M. M., Tirkkonen, M., Kallioniemi, A., Holli, K., Collins, C., Kowbel, D. ve diğeri. (1995). Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clinical Cancer Research*, 1(12), 1455-1461.

Tanner, M. M., Tirkkonen, M., Kallioniemi, A., Collins, C., Stokke, T., Karhu, R. ve diğeri. (1994). Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. *Cancer Research*, 54(16), 4257-4260.

Tomonaga, T., Matsushita, K., Yamaguchi, S., Oohashi, T., Shimada, H., Ochiai, T., Yoda, K., Nomura, F. (2003). Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Research*, 63(13), 3511-3516.

Thompson, L. S, Bakhoum, F. S and Compton, A. D. (2010). Mechanisms of Chromosomal Instability. *Current Biology*, 20(6), 285-295.

Uemura, T., Morikawa, K., ve Yanagida, M. (1986). The nucleotide sequence of the fission yeast DNA topoisomerase II gene : structural and functional relationships to other DNA topoisomerases. *European Molecular Biology Organization J. (EMBO)*, 5(9), 2355-2361.

Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell*, 50(6), 917-925.

Ugarković, D. I. (2009). Centromere-competent DNA: structure and evolution. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 48, 53-76.

Voullaire, L. E., Slater, H. R., Petrovic, V., ve Cho, K. H. (1993). A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere ?. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 52(6), 1153–1163.

Wang, J. C. (1985). DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 54, 665-697.

Wang, J. C. (1996) . DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 65,635-692.

Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(6), 430-440.

Wang, X., Wang, L. K., Kingsbury, W.D., Johnson, R. K., Hecht, S. M. (1998). Differential effects of camptothecin derivatives on topoisomerase I-mediated DNA structure modification. *Biochemistry*, 37(26), 9399-9408.

Warburton, P. E., Cooke, C. A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B. A., Stetten, G. ve diğerleri. (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Current Biology*, 7(11), 901-904.

Warburton, P. E. (2004). Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. *Chromosome Research*, 12(6), 617-626.

Watt, P. M ve Hickson, D. I. (1994). Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochemistry J*, 303, 681-695.

World Health Organization. (2004). Unsafe abortion: Global and regional estimates of incidence of unsafe abortion and associated mortality in 2000, 4th Edition, 1-82.

Wick, W., Weller, M., van den Bent, M., Sanson, M., Weiler, M., von Deimling, A. ve diğerleri. (2014) *MGMT* testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature Reviews Neurology*, 10(7), 372-385.

Wu, Q., Qian, Y. M., Zhao, L. X., Wang, M. S., Feng, Xiao-Jun., Chen, Xin-Fang ve diğerleri. (2012). Expression and prognostic Significance of Centromere protein A in human lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 77(2), 407– 414.

Yang, C. H, Tomkiel, J., Saitoh, H., Johnson, D. H, Earnshaw, W. C. (1996). Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Molecular and Cellular Biology*, 16(7), 3576-3586.

Yang, H., Ou, C. C., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Kruk, P. A., Cheng, J. Q. (2004). Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian and breast epithelial cells. *Cancer Research*, 64(2), 463-467.

Yang, J. W., Pendon, C., Yang, J., Haywood, N., Chand, A. and Brown, W.R. (2000). Human mini- chromosomes with minimal centromeres. *Human Molecular Genetics*, 9(12), 1891-1902.

Yoda, K., Ando, S., Morishita, S., Houmura, K., Hashimoto, K., Takeyasu, K. ve diğ erleri. (2000). Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 97(13), 7266-7271.

Zeitlin, S. G., Shelby, R. D., Sullivan, K. F. (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 155(7), 1147-1157.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A. ve diğ erleri. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nature Genetics*, 20(2), 189-193.

Zhou, Yan. (2012). Regulation of Aurora A activity during checkpoint recovery. Master of science, Uppsala University, Sweden.

Zucker, R. M., Elstein, K. H. (1991). A new action for topoisomerase inhibitors., *Chemico-Biological Interactions*, 79(1), 31-40



GENETİK TANI VE TEDAVİ TETKİKLERİ İÇİN AYDINLATILMIŞ HASTA ONAM FORMU

Hasta Adı - Soyadı:

Cinsiyet: ☐ K ☐ E

Hasta ID No:

Doğum Tarihi:

Baba Adı:

Kimlik No:

Sayın Hastamız / Hasta Yakınımız,

Hekiminizin değerlendirmesi ve yapılan tetkikler sonucunda belirlenen ön tanı / tanınızın netleşmesi için ek tetkik yapılması gerekmektedir. Bu form, sizin, uygulanacak olan tetkikin yöntemi ve olası riskleri hakkında bilgilendirilmeniz amacıyla hazırlanmıştır. Lütfen bu formu tamamen ve dikkatle okuyunuz ve formu okuduktan, ilgili işlem hakkında tüm tereddütleriniz hekim tarafından giderildikten sonra bu onam formunu imzalayınız.

1. ÖN TANI / TANI:

TETKİK HAKKINDA GENEL BİLGİ:

2. ÖNERİLEN TETKİK:

- ☐ Kan ve/veya Kemik iliğinden kromozom analizi
☐ Amniyosentez ve/veya CVS kromozom analizi
☐ DNA ve/veya Mutasyon analizi
☐ Kromozomda moleküler sitogenetik analiz (FISH)
☐ Moleküler biyoloji patojen testleri (HPV, HBV, HCV, Memenjit paneli)

Kan, kemik iliği, CVS, amniyosentez örnek alımlarında işlemi uygulayacak ABD uzmanı tarafından işlem detayları ile ilgili bilgilendirilerek onam alınacağı konusunda bilgi verildi.

3. YÖNTEM:

4. ÖNERİLEN TETKİKİN RİSKLERİ:

5. TETKİK SIRASINDA / SONRASINDA HASTANIN YAPMASI / DİKKAT ETMESİ GEREKENLER:



ÖNERİLEN TETKİKİN KAPSAMI VE ONAY

- ✓ Doktorum tarafından önerilen tetkik ile ilgili sözel olarak detaylı bilgilendirildim, işlem için hazırlanmış olan bilgileri okudum. Açıklama istediğim tüm sorularım, yeterli şekilde cevaplandırıldı.
- ✓ Ulusal ve uluslararası bilimsel etik kurallara bağlı kalınmak kaydıyla ve uzman tarafından bana açıklandığı ve sorularıma yanıt verildiği biçimde, tanı veya tedavi için gerekli görülen genetik test(ler)in yapılmasına ve bunun için benden/hastadan uygun materyal(ler)in alınmasına izin veriyorum.
- ✓ Önerilen tetkikin ortalama maliyeti konusunda bilgi aldım.

Ben, bu formun içeriğini anladım Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi'nde uygulanacak olan tetkiki bilincim yerinde olarak kabul ediyorum.

İmzası:

Tarih:

Saat:

ÖRNEKLERİN ARAŞTIRMADA KULLANIMI:

Ben, ben alınacak materyalden elden edilen sonuçların ve materyallerin kimliğim saklı tutulmak kaydıyla toplum bazlı araştırmalarda kullanılması için Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi'ne bilincim yerinde olarak izin veriyorum.

İmzası:

Tarih:

Saat:

Onay Hastanın Yasal Temsilcisinden Alındı ise;

Yasal Temsilcinin Yakınlık Derecesi:

- ☐ Hastanın bilinci kapalı ☐ Hasta 18 yaşından küçük ☐ Hasta anlatılanları anlayabilecek düzeyde değildir

Şahit (hastane çalışanı haricinde bir kişi mevcutsa);

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Saat:

Bilgilendirmeyi Yapan Hekimin;

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Saat:

Tercümanın (ihtiyaç duyulması halinde);

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Saat:

- 18 yaşın üzerindeki hastaların kendilerinden,
- 15-18 yaş arasındaki hastaların kendilerinden ve ayrıca yasal temsilcilerinden,
- Bilinci kapalı olan, 15 yaşın altında olan, karar verme yetisi bulunmayan ve anlatılanları anlayabilecek düzeyde olmayan hastaların yasal temsilcisinden rıza alınır.