TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜM GENOM TRANSKRİPT PROFİLLEMESİYLE NON-SENDROMİK PREMAKSİLLER ARTI DİŞ OLGULARINDA YENİ ADAY GENLERİN ARAŞTIRILMASI

DT. BARHAN PEKEL

DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF.DR. ALİ R. MENTEŞ

İKİNCİ DANIŞMAN
PROF.DR. BELGİN SÜSLEYİCİ

İSTANBUL – 2016

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-100914-0312 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Doktora
Anabilim Dalı	: Pedodonti
Tez Sahibi	: Barhan PEKEL
Tez Başlığı	: Tüm Genom Transkript Profillemesiyle Non-Sendromik Premaksiller Artı Diş Olgularında Yeni Aday Genlerin Araştırılması
Sınav Yeri	: Pedodonti Anabilim Dalı Seminer Salonu
Sınav Tarihi	: 19/12/2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Prof. Dr. Ali R. Menteş	Marmara Üniversitesi	
2. Danışman		
Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ	Marmara Üniversitesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. İlknur TANBOĞA	Marmara Üniversitesi	
Prof. Dr. Işın ULUKAPI	Okan Üniversitesi	
Prof. Dr. Ahu ACAR	Marmara Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun .....29/12/2016 tarih ve 10.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Barhan PEKEL

TEŞEKKÜR

Pedodonti Anabilim Dalı'ndaki doktora eğitimim süresince varlığı ve akademik bilgisi ile güven veren, pedodonti eğitimini en iyi koşullarda almamız için her türlü ortam ve şartı hazırlayan; desteğini, samimi ilgisini ve sevgisini esirgemeyen çok değerli hocam Pedodonti Anabilim Başkanı **Prof. Dr. İlknur TANBOĞA**'ya,

doktora eğitimim sırasında ve tüm tez çalışmam boyunca büyük bir özveri ile bana destek olan; akademik deneyim ve bilgileri ile tezimin her aşamasında büyük sabır ve titizlikle bana yol gösteren, her zaman desteğini hissettiğim çok değerli danışman hocam **Prof. Dr. Ali MENTEŞ**'e ve ikinci danışman hocam Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ**'ye,

pedodonti eğitimime katkıları bulunan değerli hocalarım **Prof. Dr. Serap AKYÜZ, Prof. Dr. Betül KARGÜL'**e, doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan **tüm Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyelerine**,

doktora eğitimim süresince bölümümüzde beraber çalışmış olduğum **tüm doktora/master ve uzmanlık öğrencisi ve mezun arkadaşlarıma**,

tez izleme komitemde bulunan ve doktora çalışmam boyunca bana destek veren Okan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof. Dr. Işın ULUKAPI** 'ya,

tezimin genetik deneyleri boyunca her türlü yardımını esirgemeyen SEM Laboratuvarı çalışanı **M.Sc. Halil İbrahim KISAKESEN**'e, Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğrencisi **Uzm. Bio. Mehtap ÇEVİK**'e ve **Dr. Bio. Meliha KOLDEMİR GÜNDÜZ**'e,

hayatım boyunca beni sürekli destekleyen, her zaman yanımda olan, büyük özveri ve sevgiyle yaklaşan, aynı zamanda mesleğimi seçmemi sağlayarak her daim yol gösteren canım annem **Dt. Işık PEKEL**'e, değerli babam **Gürol PEKEL**'e; biricik kardeşim **Serhan PEKEL**'e, ve sevgisini sürekli hissettiğim eşim **Dt. Vesna PEKEL**'e,

en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Dt. Barhan PEKEL

İÇİNDEKİLER

Beyan	iii
Teşekkür	v
İçindekiler	vi
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi	x
Şekiller Listesi	xviii
Resimler Listesi	xx
Tablolar Listesi	xxii
1 ÖZET	1
2 SUMMARY	2
3 GİRİŞ VE AMAÇ	3
4 GENEL BİLGİLER	6
4.1 Genetik	6
4.1.1 DNA ve İnsan Genom Çeşitliliği	6
4.1.1.1 Normal Çeşitlilik	7
4.1.1.1.1 Polimorfizmler	7
4.1.1.1.2 Tekrarlayan DNA	7
4.1.1.2 Patojenik Değişimler	8
4.1.1.2.1 Nokta mutasyonları	8
4.1.1.2.2 Kopya Sayısı Değişimleri (KSD)	9
4.1.2 KSD Mekanizmaları	9
4.1.2.1 KSD Oluşturan Tekrarlayıcı Elementler	11
4.1.2.2 KSD ve Hastalık	11
4.1.2.3 KSD Saptama Yöntemleri	12
4.1.2.4 Tüm genom KSD Saptama Yöntemleri	13
4.1.2.5 Hedefe Yönelik KSD Saptama Yöntemleri	13
4.1.3 RNA	14
4.1.3.1 RNA ve DNA Kıyaslaması	15
4.1.3.2 RNA Sentezi	15
4.1.3.3 RNA Tipleri	15
4.1.4 RNA ve DNA Mikrodizin Deneyleri	18
4.1.4.1 RNA Mikrodizini	19
4.1.4.2 DNA Mikrodizini	20
4.2 Diş Gelişimi ve Sinyalleşme Yolları	21
4.2.1 Diş Şekil ve Paterninin Çeşitliliği	21
4.2.2 Temel Sinyalleşme Yolları	21
4.2.3 Körelmiş Diş Gelişiminin Tetiklenmesi	23
4.2.4 Yeni (De Novo) Diş Formasyonun Tetiklenmesi	25

4.2.5 Sinyalleşme Yollarının Modülasyonları 26
4.2.6 Mine Düğümleri ve Tüberkül Şekillenmesi 26
4.2.7 Sürekli Büyüyen Dişlerdeki Regülasyon 27
4.2.8 Aynı Diş Tiplerinin Gelişimi 29
4.3 Artı Diş 31
4.3.1 Non-Sendromik Artı Diş Sınıflaması 33
4.3.2 Non-Sendromik Artı Dişlerin Prevalansı 34
4.3.3 Non-sendromik Artı Diş Tanısı 35
4.3.3.1 Anamnez 35
4.3.3.2 Klinik Muayene 36
4.3.3.3 Palpasyon 36
4.3.3.4 Radyografik Muayene 37
4.3.4 Non-sendromik Artı Diş Tedavi Zamanlaması 39
4.3.5 Non-sendromik Artı Diş Etiyolojisi 40
4.3.5.1 Atavizm 41
4.3.5.2 Embriyolojik Aberasyonlar 41
4.3.5.3 Dikotomi 41
4.3.5.4 Hiperaktivite ve Dental Lamina 42
4.3.5.5 İlerleyici Alan Teorisi 43
4.3.5.6 Birleştirilmiş Etiyoloji 43
4.3.5.7 Herediter Teori 43
5 GEREÇ VE YÖNTEM 44
5.1 Klinik Değerlendirme 45
5.2 Moleküler Değerlendirme 45
5.2.1 Mikrodizin için Gereçler 47
5.2.2 DNA ve RNA Mikrodizin Profillemesi 49
5.2.2.1 RNA Mikrodizin Analizi için Hasta Grubunun Oluşturulması 49
5.2.2.1.1 Dokuların Toplanması ve Taşınması 49
5.2.2.1.2 Dokuların Homojenizasyonu 51
5.2.2.1.3 RNA İzolasyonu 52
5.2.2.1.4 RNA Kalite Kontrol Analizi 54
5.2.2.1.4.1 RNA Konsantrasyonunun Nanofotometre İle Ölçümü 54
5.2.2.1.4.2 Jel Elektroforez Yöntemi ile RNA'lara ait RIN değerlerinin belirlenmesi 55
5.2.2.2 RNA Mikrodizin Örneklerine Göre DNA Mikrodizini için Hasta Grubu Belirlenmesi 57
5.2.2.2.1 Tükürüklerin Toplanması ve Taşınması 57
5.2.2.2.2 DNA İzolasyonu 58
5.2.2.2.3 DNA'nın Kalite Kontrol Analizi 59
5.2.2.3 RNA Mikrodizin Deneyi 60

5.2.2.3.1 RNA Spike Karışımının Hazırlanması 61
5.2.2.3.2 Etiketleme Reaksiyonunun Hazırlanması 62
5.2.2.3.3 cDNA Sentezi 62
5.2.2.3.4 cRNA Sentezi ve Amplifikasyonu 63
5.2.2.3.5 cRNA Saflaştırılması 63
5.2.2.3.6 RNA Kalite Ölçümü 65
5.2.2.3.7 RNA Mikrodizin Hibridizasyonu 66
5.2.2.3.8 RNA Mikrodizinlerinin Yıkanması 68
5.2.2.3.9 RNA Mikrodizinlerinin Taranması ve Görüntü Dosyalarının Elde Edilmesi 69
5.2.2.3.10 RNA Mikrodizin Verilerinin Analizi 71
5.2.2.3.11 RNA Mikrodizin Verilerinin Normalizasyonu 71
5.2.2.3.12 RNA Mikrodizin Verilerinin Kalite Kontrolü 72
5.2.2.3.13 RNA Mikrodizin Verilerinin İstatistiksel Değerlendirilmesi 72
5.2.2.4 DNA Mikrrodizin Deneyi 74
5.2.2.4.1 DNA Sınırlandırma Kesimi 74
5.2.2.4.2 DNA'nın Floresans Etiketlenmesi 75
5.2.2.4.3 Etiketlenmiş DNA'nın Saflaştırılması 77
5.2.2.4.4 DNA Kalite Ölçümü 77
5.2.2.4.5 DNA Mikrodizin Hibridizasyonu 79
5.2.2.4.6 DNA MikrodizinlerinYıkanması 80
5.2.2.4.7 DNA Mikrodizinlerin Taranması ve Görüntü Dosyalarının Elde Edilmesi 81
5.2.2.4.8 DNA Mikrodizin Verilerinin Analizi 82
6 BULGULAR 83
6.1 Klinik Bulgular 83
6.2 DNA ve RNA Mikrodizin Profilleme Bulguları 87
6.2.1 RNA ve DNA Mikrodizin Bulguları 88
6.2.2 RNA Mikrodizin Bulguları 90
6.2.2.1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Kıyaslanması 90
6.2.2.2 Hasta ve Kontrol Gruplarının Cinsiyete Göre Kıyaslanması 105
6.2.2.3 Hasta ve Kontrol Gruplarının Artı Diş Sayısına Göre Kıyaslanması 107
6.2.2.4 Hasta ve Kontrol Gruplarının Artı Diş Tipine Göre Kıyaslanması 113
6.2.3 DNA Mikrodizin Bulguları 115
6.2.3.1 Hastalarda Saptanan Kopya Sayısı Varyantları 115
6.2.3.1.1 İ.D. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 117
6.2.3.1.2 C.Ç. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 118
6.2.3.1.3 S.K. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 119

6.2.3.1.4 E.Ş. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 120
6.2.3.1.5 K.D. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 121
6.2.3.1.6 B.B. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 122
6.2.3.1.7 T.G. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 123
6.2.3.1.8 E.N.B. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 125
6.2.3.1.9 A.K. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 126
6.2.3.1.10 H.U. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 127
6.2.3.1.11 M.K. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 128
6.2.3.1.12 Y.A. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi 129
7 TARTIŞMA 130
7.1 Klinik Bulguların Tartışması 130
7.2 DNA ve RNA Mikrodizin Profillemesi Bulgularının Tartışması 135
7.2.1 RNA Analiz Bulgularının Tartışması 135
7.2.2 DNA Analiz Bulgularının Tartışması 139
8 SONUÇLAR
9 KAYNAKLAR
10 EKLER

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
aCGH	*Array Comparative Genomic Hybridisation*
ACSM6	*acyl-CoA synthetase medium-chain family member 6*
ADAM18	*ADAM metallopeptidase domain 18*
ADAMDEC1	*ADAM-like, decysin 1*
ADORA2A	*adenosine A2a receptor*
AKAP4	*A kinase (PRKA) anchor protein 4*
ANKRD31	*ankyrin repeat domain 31*
APOC1	*apolipoprotein C-I*
APOOP5	*apolipoprotein O pseudogene 5*
ATOH8	*atonal homolog 8 (Drosophila)*
BARX1	*BARX homeobox 1*
BCL2A1	*BCL2-related protein A1*
BCL2L15	*BCL2-like 15*
BMP2K	*Bone Morhegeneic-2-inducible protein kinase*
BMPR1A	*bone morphogenetic protein receptor, type IA*
BMS1P20	*BMS1 pseudogene 20*
BRD7P3	*bromodomain containing 7 pseudogene 3*
C15orf48	*chromosome 15 open reading frame 48*
C17orf78	*chromosome 17 open reading frame 78*
CATSPER2	*cation channel, sperm associated 2*
CCDC149	*coiled-coil domain containing 149*
CD19	*Cluster of Diffrentiaion 19 molecule*
CD27	*Cluster of Diffrentiaion 27 molecule*
CD38	*Cluster of Diffrentiaion 38 molecule*
CDH18	*cadherin 18, type 2*
cDNA	komplementer DNA
CHI3L2	*chitinase 3-like 2*

CLEC3B	*C-type lectin domain family 3, member B*
COL21A1	*collagen, type XXI, alpha 1*
COX7A1	*cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)*
cRNA	*komplementer RNA*
CRTAC1	*cartilage acidic protein 1*
CXCL10	*chemokine (C-X-C motif) ligand 10*
CXCL12	*chemokine (C-X-C motif) ligand 12*
CXCL13	*chemokine (C-X-C motif) ligand 13*
DEFB108B	*defensin, beta 108B*
DHH	*desert hedgehog*
DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9
DKT	düşük kopya tekrarları
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DNAH12	*dynein, axonemal, heavy chain 12*
DNAJC6	*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6*
DRD5	*dopamine receptor D5*
DUSP5	*dual specificity phosphatase 5*
DVT	*Dental Volümetrik Tomografi*
ECSCR	*endothelial cell surface expressed chemotaxis and apoptosis regulator*
FAM107A	*family with sequence similarity 107, member A*
FAM167B	*family with sequence similarity 167, member B*
FAM46C	*family with sequence similarity 46, member C*
FAM92A1P2	*family with sequence similarity 92, member A3*
FCRL2	*Fc receptor-like 2*
FCRL3	*Fc receptor-like 3*
FCRL5	*Fc receptor-like 5*
FCRLA	*Fc receptor-like A*
FGF20	*fibroblast growth factor 20*
FISH	*Fluorescence In Situ Hybridization*
FLJ46120	*uncharacterized LOC647008*
FN1	*fibronectin 1*

FoSTeS	Çatal Durdurucu ve Şablon Çevirici
GFRA1	*GDNF family receptor alpha 1*
GJB7	*gap junction protein, beta 7, 25kDa*
GLUL	*glutamate-ammonia ligase*
GPAT2	*glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitochondrial*
GSTT2	*glutathione S-transferase theta 2 (gene/pseudogene)*
GUCA2B	*guanylate cyclase activator 2B (uroguanylin)*
GUCY2F	*guanylate cyclase 2F, retinal*
HAMP	*hepcidin antimicrobial peptide*
HERC2	*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*
HRCT1	*histidine rich carboxyl terminus 1*
HSD11B1	*hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1*
IGLL1	*immunoglobulin lambda-like polypeptide 1*
IGLL5	*immunoglobulin lambda-like polypeptide 5*
IL13RA2	*interleukin 13 receptor, alpha 2*
IL5RA	*interleukin 5 receptor, alpha*
IRF4	*interferon regulatory factor 4*
IRF5	*interferon regulatory factor 5*
JSRP1	*junctional sarcoplasmic reticulum protein 1*
KATNAL2	*katanin p60 subunit A-like 2*
KCTD16	*potassium channel tetramerization domain containing 16*
KD	kısmi düplikasyonlar
KIAA0125	*KIAA0125*
KLHL6	*kelch-like family member 6*
KLRC1	*killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1*
KRBOX1	*KRAB box domain containing 1*
KSD	Kopya Sayısı Değişimleri
LAX1	*lymphocyte transmembrane adaptor 1*
LILRB1	*leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1*
LILRB4	*leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with*

	TM and ITIM domains), member 4
LINC00458	*long intergenic non-protein coding RNA 458*
LINC00470	*long intergenic non-protein coding RNA 470*
LINC00607	*long intergenic non-protein coding RNA 607*
LINC00877	*long intergenic non-protein coding RNA 877*
LINC00971	*long intergenic non-protein coding RNA 971*
LINC01010	*long intergenic non-protein coding RNA 1010*
LINC01204	*long intergenic non-protein coding RNA 1204*
LINC01352	*long intergenic non-protein coding RNA 1352*
LINC01432	*long intergenic non-protein coding RNA 1432*
LINC01436	*long intergenic non-protein coding RNA 1436*
LIPH	*lipase, member H*
LMO1	*LIM domain only 1 (rhombotin 1)*
LMOD3	*leiomodin 3 (fetal)*
lnc-AL035696.1-5	*lnc-AL035696.1-5:1*
lnc-AP001496.1-2	*lnc-AP001496.1-2:1*
lnc-C13orf15-1	*lnc-C13orf15-1:1*
lnc-C14orf79-2	*lnc-C14orf79-2:2*
lnc-C20orf197-4	*lnc-C20orf197-4:1*
lnc-DCAF4L1-1	*lnc-DCAF4L1-1:1*
lnc-MAT2B-3	*lnc-MAT2B-3:8*
lnc-PRDM2-1	*lnc-PRDM2-1:1*
lnc-RAP1GDS1-2	*lnc-RAP1GDS1-2:1*
lnc-TMEM135-2	*lnc-TMEM135-2:1*
LOC100507351	*uncharacterized LOC100507351*
LOC100507616	*uncharacterized LOC100507616*
LRP5L	*Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 Like*
MCEMP1	*mast cell-expressed membrane protein 1*
MEI1	*meiosis inhibitor 1*
MGP	*matrix Gla protein*
MIA	*melanoma inhibitory activity*
miRNA	Mikro RNA

ml	mililitre
MLLT6	*myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6*
MLPA	*Multiplex Ligation---dependent Probe Amplification*
MMAB	*methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type*
MMBIR	Mikrohomoloji aracılı ara-tesirli replikasyon
MMEJ	Mikromoloji yönlendirmeli uç bağlanması
MMP7	*matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)*
MOGAT1	*monoacylglycerol O-acyltransferase 1*
MRGPRF	*MAS-related GPR, member F*
mRNA	Mesajcı RNA
MS4A1	*membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1*
MTURN	*maturin, neural progenitor differentiation regulator homolog (Xenopus)*
MZB1	*marginal zone B and B1 cell-specific protein*
NAHR	Non-allelik homologoz rekombinasyon
NCRNA00250	*non-protein coding RNA 250*
ng	*Nano gram*
NHEJ	*Non-homologoz son bağlanması*
NLRC4	*NLR family, CARD domain containing 4*
NLRP7	*NLR family, pyrin domain containing 7*
NOP56	*NOP56 ribonucleoprotein*
NRP2	*neuropilin 2*
NTN1	*netrin 1*
NUGGC	*nuclear GTPase, germinal center associated*
OPN1MW	*opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive*
OPN4	*opsin 4*
OR1J1	*olfactory receptor, family 1, subfamily J, member 1*
OR1N2	*olfactory receptor, family 1, subfamily N, member 2*
PLA2G7	*phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)*
PNOC	*prepronociceptin*

POU2AF1	*POU class 2 associating factor 1*
PTN	*pleiotrophin*
PXDN	*peroxidasin*
qPCR	*Quantitive Polymerase Chain Reaction*
RAB11FIP1	*RAB11 family interacting protein 1 (class I)*
RAB39B	*RAB39B, member RAS oncogene family*
RAD21L1	*RAD21-like 1 (S. pombe)*
RNA	*Ribonükleik asit*
RNF103	*ring finger protein 103*
RNF183	*ring finger protein 183*
RPS6KA5	*ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5*
rRNA	Ribozomal RNA
SAA2	*serum amyloid A2*
SAMD12-AS1	*SAMD12 antisense RNA 1*
SCGB1A1	*secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)*
SCIMP	*SLP adaptor and CSK interacting membrane protein*
SD	*segmental düplikasyonlar*
SEL1L3	*sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)*
SELP	*selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)*
SERP2	*stress-associated endoplasmic reticulum protein family member 2*
SERPING1	*serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1*
SERTAD4-AS1	*SERTAD4 antisense RNA 1*
SLAMF6	*SLAM family member 6*
SLAMF7	*SLAM family member 7*
SLC19A3	*solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 3*
SLC26A5	*solute carrier family 26 (anion exchanger), member 5*
SLC39A12-AS1	*SLC39A12 antisense RNA 1*
SLC45A4	*solute carrier family 45, member 4*
SLC7A11	*solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter*

	light chain, xc- system), member 11
SMCO1	*single-pass membrane protein with coiled-coil domains 1*
SMIM2-AS1	*SMIM2 antisense RNA 1*
SNED1	*sushi, nidogen and EGF-like domains 1*
SNORA45B	*small nucleolar RNA, H/ACA box 45B*
SNORA53	*small nucleolar RNA, H/ACA box 53*
SNORA81	*small nucleolar RNA, H/ACA box 81*
SNORD45B	*small nucleolar RNA, C/D box 45B*
SNORD94	*small nucleolar RNA, C/D box 94*
SNP	*single nucleotid polimorphism*
SNTG1	*syntrophin, gamma 1*
SPHKAP	*SPHK1 interactor, AKAP domain containing*
SPIB	*Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)*
STXBP5L	*syntaxin binding protein 5-like*
SULT1C2	*sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2*
TAS1R3	*taste receptor, type 1, member 3*
TBX2-AS1	*TBX2 antisense RNA 1*
TCL1A	*T-cell leukemia/lymphoma 1A*
TDO2	*tryptophan 2,3-dioxygenase*
TIGIT	*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*
TMEM176B	*transmembrane protein 176B*
TMEM221	*transmembrane protein 221*
TNFAIP6	*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6*
TNFRSF17	*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17*
TNP	Tek nükleotid polimorfizmleri
TNRC18	*trinucleotide repeat containing 18*
TP53TG3D	*TP53 target 3D*
TRIM36	*tripartite motif containing 36*
tRNA	*Transfer RNA*
TSPAN10	*tetraspanin 10*
TSPAN16	*tetraspanin 16*
UTR	Transle edilmeyen bölge, *Untranslated Region*

VMO1	*vitelline membrane outer layer 1 homolog (chicken)*
x g	Yer çekimi katı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İnsan geninin organizasyonu ve pre-mRNA ve mRNA ile protein oluşumu

Şekil 2: Diş gelişiminde sinyalleşme yolları

Şekil 3: Non-sendromik artı diş sınıflaması

Şekil 4: Verilerin normalizasyon öncesi ve sonrası yazılım görüntüleri

Şekil 5: Analiz dışı bırakılan örneğin diğer örneklerle beraber korelasyon görüntüsü

Şekil 6: Slayt ve slayt tutucu

Şekil 7: RNA ve DNA çalışmalarının akış şeması

Şekil 8: GUCA2B geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 9: COL21A1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 10: PTN geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 11: LIMO1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 12: KATNAL2 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 13: MIA geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 14: FCRL5 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 15: TAS1R3 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 16: CD38 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 17: MZB1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 18: IRF4 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 19: BARX1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 20: MMP7 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 21: KIAA0125 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 22: TNFRSF17 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 23: MCEMP1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 24: JSRP1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 25: IGLL5 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 26: IGLL1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği (Box Whisher Plot)

Şekil 27: Tek ve iki artı diş gruplarında kontrole göre tespit edilen prob sayılarının Venn diagramı

Şekil 28: Artı diş gruplarında üç farklı tip artı diş gruplarına göre tespit edilen genlerin Venn diagramı

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Artı diş tanısı kliniğimizde konmuş hastanın görüntüleri

Resim 2: Yumuşak doku saklama solüsyonu

Resim 3: Sıvı Azot Taşıma Kabına sıvı azot doldurulması

Resim 4: Sıvı Azot doldurulan a) havan b) dokuların ezilmesi

Resim 5: Dokudan RNA İzolasyon Kiti

Resim 6: Nanofotometre cihazı

Resim 7: Jel Elektroforez a) örneklerin yüklenmesi b) vortekslenmesi c) Bioanalyzer cihazı

Resim 8: Tükürük örnekleri

Resim 9: DNA izolasyon kiti

Resim 10: Termal döngü cihazı

Resim 11: *Array*'lere örneklerin yüklenmesi ve slaytların kapatılması

Resim 12: Hibridizasyon fırını

Resim 13: Slayt Yıkama Ortamları

Resim 14: Slaytların a) okuyucuya yerleştirilmesi b) okuma sonrası bilgisayar ekranı görüntüsü

Resim 15: Hasta ve kontrol DNA'ları

Resim 16: DNA mikrodizini bilgisayar yazılım görüntüsü

Resim 17: DNA mikrodizin bulgu analizi

Resim 18: İ.D. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 19: E.N.B. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 20: S.K. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 21: E.Ş. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 22: K.D. isimli hastanın a) ve b) klinik ağıziçi görüntüsü c) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 23: B.B. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 24: T.G. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 25: E.N.B. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü c) üç boyutlu dental volümetrik radyografi görüntüsü

Resim 26: A.K. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 27: H.U. isimli hastanın a) ve b) klinik ağıziçi görüntüsü c) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 28: M.K. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

Resim 29: Y.A.. isimli hastanın a) ve b) klinik ağıziçi görüntüsü c) panoromik radyografik görüntüsü

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Kopya sayısı değişimlerini yaratan mekanizmalar

Tablo 2: Artı diş görülen sendromik hastalıklar

Tablo 3: Non-sendromik artı diş hastaları ile ilgili yapılan son çalışmalar

Tablo 4: Dokuların saklama solüsyonu içinde soğutma basamakları

Tablo 5: RNA mikrodizin deneyi çalışma akışı

Tablo 6: Spike karışımının *Cyanine* 3 etiketlenmesi için dilüsyonlar

Tablo 7: cDNA ana karışımı

Tablo 8: Transkripsiyon ana karışımı

Tablo 9: 8'li Mikrodizin için Fragmantasyon Karışımı

Tablo 10: Yıkama ortamları

Tablo 11: Mikrodizin başına gerekli DNA miktarı

Tablo 12: Ana kesim karışımı

Tablo 13: DNA'nın termal döngü cihazı kullanılarak kesilmesi

Tablo 14: Termal döngü cihazı floresans etiketleme programı

Tablo 15: Etiketleme ana karışımı (EAK)

Tablo 16: Termal döngü cihazı kullanılarak DNA etiketlenmesi

Tablo 17: 4 *Array*'li mikrodizin slaydı için hibridizasyon ana karışımı

Tablo 18: Isıl döngü Cihazı Programı

Tablo 19: Yıkama Ortamları

Tablo 20: Enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri

Tablo 21: Artı diş hastalarının yaşlarına göre dağılımı

Tablo 22: Artı dişlerin sayısına ve cinsiyete göre dağılımları

Tablo 23: Artı dişlerin konumlarına ve cinsiyete göre dağılımları

Tablo 24: Artı dişlerin tiplerine ve konumlarına göre dağılımları

Tablo 25: RNA çalışmasına dahil edilen bütün örneklerin dağılımı

Tablo 26: RNA ve DNA mikrodizin deneyi yapılan örneklere ait hasta listesi

Tablo 27: Tüm artı diş hastalarının kontrol hastalarıyla kıyaslandığında anlamlı derecede farklı bulunmuş problar, değişim katsayıları, p değerleri, ilgili genler

Tablo 28: Tüm artı diş hastalarının kontrol hastalarıyla kıyaslandığında up regüle olmuş sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Tablo 29: Tüm artı diş hastalarının kontrol hastalarıyla kıyaslandığında down regüle olmuş sitobandlar, değişim katsayıları (>3) ve ilgili genler

Tablo 30: Erkek artı diş hastalarının erkek kontrol hastalarıyla kıyaslandığında up regüle olduğu tespit edilen sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Tablo 31: Erkek artı diş hastalarının erkek kontrol hastalarıyla kıyaslandığında down regüle olduğu tespit edilen sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Tablo 32: Kız artı diş hastalarının kız kontrol hastalarıyla kıyaslandığında up regüle olduğu tespit edilen sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Tablo 33: Kız artı diş hastalarının kız kontrol hastalarıyla kıyaslandığında down regüle olduğu tespit edilen sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Tablo 34: Tek ve iki artı dişi olan hastalarda ortak sitobandlar ve ilgili genler

Tablo 35: Üç farklı diş grubunda tespit edilen ortak iki gen

Tablo 36: DNA örneklerinin spesifik aktivite değerleri

Tablo 37: Hastaların cinsiyet, yaş, artı diş sayısı, tipi, KVS kazınım ve kayıpları

Tablo 38: İ.D. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 39: C.Ç isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 40: S.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 41: E.Ş. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 42: K.D. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 43: B.B. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 44: T.G. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 45: E.N.B. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 46: A.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 47: H.U. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tablo 48: M.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Tüm Genom Transkript Profillemesiyle Non-Sendromik Premaksiller Artı Diş Olgularında Yeni Aday Genlerin Araştırılması

Barhan PEKEL

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Ali R. Menteş, Prof. Dr. Belgin Süsleyici

1. ÖZET

Amaç: Artı diş, fazla diş, süpernümere veya hiperdonti tanımı normal diş sayısı dışında olan dişler için kullanılmaktadır. Artı dişler birçok sendrom ve hastalıkla beraber görülebildiği gibi, non-sendromik artı diş olguları da bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı Türk toplumunda Non-sendromik premaksiler artı diş teşhisi konmuş çocukların diş tiplerini, konumlarını araştırmak ve tüm genom transkript profillemesiyle DNA ve RNA mikrodizin yöntemleri kullanılarak yeni aday genleri tespit etmektir. **Gereç ve Yöntem:** Kliniğimize başvuran çocuk hastalarda tespit edilen artı dişlerin tanıları tarafımızca kondu ve diş tipleri ile konumları kayıt altına alındı. Hastalardan toplanan tükürük örnekleri ile klinik veya cerrahi çekimi yapılan artı dişlerin çevre doku örnekleri uygun şekilde toplandı ve saklandı. Saklanan tükürük ve doku örnekleri DNA ve RNA izolasyon kitleri kullanılarak mikrodizin çalışması için uygun hale getirildi. Kalite kontrol işlemleri sonrasında seçilen uygun kalitedeki örneklerin cDNA ve cRNA sentezleri, amplifikasyonları ve saflaştırma işlemlerinin ardından hibridizasyonları yapıldı. Mikrodizin tarayıcısına yüklenen bütün örneklerden elde edilen veriler, DNA/RNA yazılımlarıyla incelendi. **Bulgular:** Klinik bulgularda; 210 artı diş hastasında toplam 250 artı diş tespit edilmiş olup; erkek kız oranının 1,958:1 olduğu; tüm hastalara göre bir adet artı dişi olan hastaların dağılımı %60,80 olduğu, en çok görülen artı diş tipinin ise %46,80 ile konik tip olduğu tespit edildi. **Sonuçlar:** DNA mikrodizini sonucu 34 kopya sayısı değişikliği içinde kemik gelişimi ve şekillenmesiyle ilişkili BMP2K, BMPR1A, LRP5L genlerinde artış şeklinde; WNT7B, MIA, PLD3 genlerinde ise kayıp olarak tespit edildi. RNA mikrodizin gen anlatım sonucu elde edilen gen anlatım profillemesi deneylerinde ise BARX1, MMP7, TAS1R3, FGF20 genlerinin anlatımlarının azaldığı; MIA, GUCA2B, COL21A1, CCL13 gen anlatımlarının ise arttığı saptandı.

Anahtar Sözcükler: Artı dişler, hiperdonti, sürnümerer dişler, tüm genom mikrodizin profillemesi, transkript mikrodizin profillemesi

A Genome-Wide Transcript Profilling Assay for New Candidate Genes in Patients with Non-Syndromic Premaxillary Supernumerary Teeth

Barhan PEKEL

Supervisors: Prof. Dr. Ali R. Menteş, Prof. Dr. Belgin Süsleyici

2. SUMMARY

Aim: Supernumerary, extra teeth or hyperdontia definition is used for any structure more than usual number of teeth. Supernumerary teeth are diagnosed together with many syndromes and disease, as well as also without any syndromes. The aim of this study was to determine the types and locations of supernumerary teeth in Turkish children with non-syndromic premaxillary supernumerary teeth; and also to investigate new candidate genes using whole genome transcript profiling by DNA and RNA microarray kits. **Materials and Methods:** From children referred to our clinic, we diagnosed supernumerary teeth and recorded their types and locations. Saliva and soft tissues samples were collected during clinical or surgical supernumerary extraction patients. Preserved samples were processed for DNA and RNA microarray experiments following cDNA and cRNA synthesis, amplification, purification and hybridization steps. After processing by microarray scanner, data from the samples were analyzed by DNA/RNA software. **Results:** Clinical results from 250 supernumerary teeth of 210 patients showed that boy to girl ratio was 1,958:1; the most diagnosed supernumerary teeth number is one tooth with a 60,80% of all patients and the most frequently diagnosed type is conical shaped with 46,80%. **Conclusions:** DNA microarray results showed 34 copy number variations. Copy gain was observed in the gene regions which are known to be related with bone development and remodeling, such as BMP2K, BMPR1A, LRP5L; as well as copy loss in the gene regions where genes located such as WNT7B, MIA, PLD3. Gene expression results from RNA microarray experiment showed the most down regulated genes were BARX1, MMP7, TAS1R3, FGF20 and up regulated genes were MIA, GUCA2B, COL21A1, CCL13.
Keywords: Supernumerary teeth, hyperdontia, whole-genome microarray profilling, microarray transcript profilling

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Konjenital ve gelişimsel ağız ve diş anomalileri ilk olarak bebek ve çocuklarda teşhis edilir. Çünkü hemen doğum sonrası veya ilk aylarda görülebilen natal veya neonatnal dişlerde olduğu gibi; büyüme gelişim sırasında ortaya çıkan iskeletsel anomaliler ile diş sürmesi ile beraber görülen mine hastalıkları, sayı ve şekil anomalileri bebek ve çocukların rutin muayeneleri sırasında veya aileler tarafından derhal göze çarpar. Bu yüzden dental anomalilerin en sık teşhis edildiği klinikler çocuk dişhekimliği klinikleridir. Ayrıca birçok sendrom ve hastalık ağız ve dişlerde anomalilere sebep olduğundan, çocuklarda görülen dental anomaliler bu sendromların teşhisinde ve sendromların teşhisi sonrası oluşabilecek dental komplikasyonların önlenmesi oldukça önemlidir. (Gallucio ve ark., 2012)

Artı diş, fazla diş, süpernümere veya hiperdonti tanımı kişide normal diş sayısı dışında olan dişler için kullanılmaktadır. Burada "artı diş" tanımı dental ark içindeki herhangi bir bölgede diş germinden oluşmuş her iki diş dizisinin normal sayısından artı olarak (20 süt dişi 32 sürekli diş) tespit edilen diş ve diş kökenli her tür doku için kullanılmaktadır. Bu doku veya dokular tek veya birden fazla sayıda, tek taraflı veya her iki yarı çenede, maksilla özellikle premaksilla veya mandibulada, süt veya daimi diş dizisi içinde olabilir. Ayrıca normal sürme yönünde veya ters yönde, düz, rotasyonlu veya ters konumda, ektopik sürme veya sürememe şeklinde gelişebilirler. Artı dişler morfolojik olarak konik (peg-shaped), tüberküllü, suplemental (normal diş formu) veya odontoma tipinde olabilirler. Konum yönünden bakıldığında ise ön kesici dişlerin arasındaysa meziodens, molarlar bölgesindeyse paramolar, üçüncü büyük azıdan sonra ise distomolar olarak isimlendirilir (Garvey ve ark., 1999).

Artı dişlerin oluşumu konusunda birkaç hipotez geliştirilmiş olmasına rağmen henüz kesin bir neden bulunamamıştır. Ancak güncel literatür bilgisi, özellikle kalıtsal geçişin artı diş oluşumu nedenlerinden biri olduğunu vurgulamaktadır. Burada her şeyden önce bazı genetik hastalıklarla birlikte görülen artı diş olgularını ayırt etmek gerekir. Genetik hastalıklara sahip bireylerde sebep genetik mutasyonlardır. Artı diş görülen sendrom ve hastalık en sık görülen örnekleri arasında; dudak ve damak yarıkları, kleidokranial dizostozis, ailesel adenomatöz polipozis bulunmaktadır (Lubinsky ve Kantaputra, 2016).

Genetik sendromlarla birlikte görülen artı dişleri saptanan hastalar ile non-sendromik dediğimiz bir genetik hastalık bağlantısı olmadan artı diş görülen hasta gruplarını birbirinden ayrı değerlendirilmektedir (Wang ve Fan, 2011).

Non-sendromik (sendroma bağlı olmayan) artı dişlerin görülme sıklıkları ülkemiz dahil, genetik olarak farklı birçok gruplarda incelenmiş ve etnik farklılıklar tespit edilmiştir. Doğu Asya topluluklarında artı diş varlığı daha yüksek oranlarda görülmektedir. Genellikle süt dişlenmede artı diş görülme sıklığı %0,3 ile %0,8 arasında olup, daimi dişlenmede %0,1'den %3,8'e kadar artmaktadır. Cinsiyet açısından ise, non-sendromik artı dişlerin erkeklerde görülme sıklığının kadınlara göre iki katı daha fazla olduğu özellikle bildirilmiştir. Ancak birçok çalışmada artı dişi olan hastaların cinsiyet oranları 1,4:1'den 2,8:1'e kadar değişiklik göstermektedir ve mevcut verileri değerlendirirken bir toplumda artı diş varlığı taraması etik nedenlerden dolayı sağlıklı olarak yapılamayacağından, çalışmalarda sadece çeşitli nedenlerle hasta olarak başvurmuş bireyler değerlendirilebilmektedir (Anthonappa ve ark., 2013).

İnsanda non-sendromik artı diş olgu raporlarında fenotipik özelliklere dayanılarak soya bağlı geçiş hipotezleri sunan çalışmalar bulunmasına rağmen gen mutasyonlarını gösteren moleküler çalışmalar insanda embriyolojik deneylerin etik açıdan uygun olmamasından dolayı oldukça sınırlı sayıdadır (Huang ve ark., 2014; Olley ve ark., 2014). Bu yüzden birçok çalışma mutasyonlu fareler üzerinde genlerin insan homologları kullanılarak artı diş olgularının moleküler düzeyde açıklanmasına yönelik şekilde yapılmıştır (Wang ve Fan, 2011).

Artı dişlerin moleküler mekanizmasını ortaya çıkarmak amacıyla yapılan transjenik fare çalışmaları, insana göre azalmış olan memeli dentisyonuna sahip farelerde özellikle dişsiz diastema bölgesinde diş oluşumu üzerine yoğunlaşmış olup Fgf, Eda, Bmp ve Wnt sinyalleşme aile üyelerinin oluşturduğu yolakların rol aldığı ortaya konulmuştur. Ancak aynı gen ailelerinin insandaki etkileşimleri henüz bilinmemektedir (D'Souza ve Klein, 2007). Bu gen aileleri OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) ve GeneCards veritabanlarında ayrıntılı olarak yer almaktadır. Diş ve çevre dokularının gelişimini araştırmış çalışmaların sonucuna dayanan iki büyük veritabanı bulunmaktadır. Bu veritabanlarından ilki *Gene expression in tooth,* Helsinki Üniversitesi "Biyoteknoloji Enstitüsü" tarafından yapılan Gelişimsel Biyoloji

Programının Diş ve Kraniyofasyal Grubu tarafından hazırlanan Dişte Gen anlatımı veritabanıdır (http://bite-it.helsinki.fi Erişim tarihi: 09 Eylül 2016). İkinci veritabanı olarak ise *ToothCODE* (http://compbio.med.harvard.edu/ToothCODE/index.html Erişim tarihi: 09 Eylül 2016) internet sitesi üzerinden Harvard Tıp Fakültesi ve Brigham and Women's Hastanesi Genetik Bölümünün Maas laboratuvarı tarafından yürütülen diş rejenarasyon projesinde elde edilen bilgilerin halka açık olarak yayımlanan veritabanı kullanılmıştır. Bulunan her yeni gen ve sinyalleşme yoluyla ilgili araştırma ile bu veritabanlarının daha da geliştiği görülmektedir. Farelerde tespit edilen artı diş ile ilişkili olduğu tespit edilen genlerin insanlardaki karşılığı insan genetik çalışmalarında bulunmamıştır. Bu nedenle non-sendromik artı dişi bulunan hastalar ve ailelerinin genleri ve bu anomaliye neden olan genetik değişimlerin tespiti bize çok değerli bilgi sunmaktadır (D'Souza ve Klein, 2007).

Bu tez çalışmamızda Türk toplumunda non-sendromik premaksiller artı diş teşhisi konan çocuk hastalarda;

a) Artı dişlerin sayı, şekil ve konum prevalanslarını belirlemek,
b) Tüm genom RNA mikrodizin analiz yöntemi (Transkript mikrodizin profilleme) ile gen anlatımlarındaki artış ve azalmaları tespit etmek,
c) Tüm genom DNA mikrodizin profilleme yöntemi ile gen kopya sayısı varyasyonları, insersiyonları, delesyonları, düplikasyonların saptanması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Genetik

4.1.1 DNA ve İnsan Genom Çeşitliliği

İnsan genomu 3.1 Gb'lık geniş bir çekirdek genom ile 16.6 kb lık ayrı küçük bir mitokondrial genomdan oluşmaktadır. Çekirdek genomun yaklaşık 26,000 geni 22 otozomal çift ve cinsiyet kromozomlarını içeren 46 kromozomda taşınmaktadır. DNA'nın genden zengin bölgeleri yüksek seviyede metile CpG adacıkları içerir ki bunlar kromozomların Gieamsa boyamasında (G bağlayan) ışık bantları şeklinde görülür. Protein kodlayan genler boyut olarak <1 kb dan >2 Mb ya kadar değişkenlik gösterirler. Protein kodlayan genlerdeki ortalama ekson sayısının 10 olduğu fakat en büyük genlerin 300'den fazla ekson içerdiği bilinmektedir. Birçok gen aynı zamanda değişik boyutlarda intronlar içermektedir. Buna rağmen bütün genler protein kodlamamakta, fakat örnek olarak; psödogenler, retrogenler ve kodlanmamış RNA'lar protein sentezinde, RNA maturasyonunda, DNA sentezinde, gen regülasyonu ve transpozon kontrolünde görev almaktadır. Hepsi beraber düzgün çalışan genom için önemli, oldukça çeşitli ve değişken bölüm ve kısımları içerir (Lander ve ark., 2001; McPherson ve ark., 2001; Venter ve ark., 2001).

İnsan genomunun kişiler arasında %99,9 oranında aynı olduğu bilinmektedir. Bütün kişilerin DNA kayıtlarının normal ve hastalığa sebep olan kısımlarının kalan %0,1'lik farklılık gösteren bölgeler ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Kruglyak ve Nickerson, 2001).

4.1.1.1 Normal Çeşitlilik

4.1.1.1.1 Polimorfizmler

Polimorfizm insan genomundaki normal çeşitliliklerdendir. Tek nükleotid polimorfizmleri (TNP/ *Single Nucleotid Polimorphisms, SNP*) %1 sıklıkla bütün toplumda görülen bir nükleotid değişiklikleridir. Her kişinin genomlarında yaklaşık 3 milyon TNP taşıdıkları tahmin edilmektedir. *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) tarafından hazırlanan TNP veritabanı 150 milyondan fazla TNP içermektedir.

Kopya Sayısı Polimorfizmleri (KSP), diğer adıyla iyi huylu kopya sayısı çeşitlilikleri, büyük yapısal değişimlerdir. Bunlar herhangi hastalık veya bozukluk ile ilişkilendirilmemiş iyi huylu düplikasyonlar, delesyonlar veya inversiyonlardır. Kopya sayısı değişimleri aslında DNA'nın bir bölümünde 1 kb'den büyük DNA kopya sayısı değişimleri olarak tanımlanmıştır. Genomik değişkenler veritabanı 490,000 KSP içermektedir.

4.1.1.1.2 Tekrarlayan DNA

İnsan DNA'sı aynı zamanda gen bölümlerinin içsel ve dışsal olmak üzere, çok farklı sayıda farklı tekrarlayıcı bölümler içerir. İnsan genomunun çeşitli tekrarlayıcı elemanları düşük kopya tekrarları (DKT) ve yüksek kopya tekrarları (YKT) olmak üzere iki grupta incelenir.

Serpiştirilmiş tekrarlayan elementler en sık yüksek kopya tekrarlarıdır ve genom boyunca dağılmışlardır. Ayrıca insan genomunun yaklaşık %45ini kapladıkları tahmin edilmektedir. İnsandaki en çok tekrarlayan genomun yaklaşık %17'sini kaplayan element LINE-1 (uzun serpme elementi)'dir. LINE ailesi otonom transpozisyon yapabilir ve hala aktif transpozisyon üyelere sahiptir. LINE-1 elementleri, transpozisyon için gerekli proteinleri kodlayan yaklaşık 6 kb'lık uzun elementlerden oluşur. Örnek olarak; nükleik asit bağlayan protein, endonükleaz ve ters

transkriptaz aktivitesi proteini verilebilir. Alu tekrar elementi ise SINE element ailesine bağlı olup, bölümlerinde bulunan Alu sınırlama alanı bulunduktan sonra adlandırılmıştır (Beck ve ark., 2011).

Düşük kopya tekrarları (DKT) ayrıca kısmi düplikasyonlar (KD) olarak bilinir ve insan genomunun %5'ini kapsarlar. KD'ler genomda iki veya daha fazla tekrarlayabilir. KD'ler genellikle 10-300 kb'lık büyüklükte, %95-97 oranında aynı dizi benzerliğini gösteren ve genelde 50 kb-10 mb'lık örtüşen dizileri bulunur (Gu ve ark., 2008).

4.1.1.2 Patojenik Değişimler

DNA mutasyonu her DNA replikasyon olayında meydana gelir ve genellikle hücresel DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilir. Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sadece o kişiyi etkilerken, gametositlerde meydana gelen mutasyonlar soy boyunca iletilebilir. Mutasyonlar evrimin en önemli yollarından biridir. İnsan genomunda mutasyon oranı yaklaşık jenerasyon başına $1,5 \times 10^{-8}$ nokta olduğu düşünülmektedir. Mutasyonlar DNA'da değişiklikler yaratarak kişinin çevreye uyumunun artmasını sağlamaktadır. Mutasyonlar genellikle sessiz olup, protein seviyesinde herhangi bir etki yapmazlar. Fakat mutasyonlar aynı zamanda hastalık gibi yan etkilere sebep olabilir. Mutasyonlar, DNA seviyesinde gen üretiminde hatalara sebep olan kalıtsal değişimler şeklinde tanımlanabilir (Conrad ve ark., 2010).

4.1.1.2.1 Nokta Mutasyonları

Nokta mutasyonları DNA dizisindeki sadece bir nükleotidi değiştirir. Değişikliğe bağlı olarak, bu bir amino asit değişimine, prematür dur-kodona, anormal kesintiye veya sesiz bir mutasyona sebep olabilir. Bir anlamsızlık mutasyonuna bir diğerinin yerine geçecek kodlanmış amino asit sebep olur. Bir amino asidin değişimi, korunmuş DNA dizisinde kaldığında veya proteinin önemli fonksiyon alanını değiştirdiğinde, zararlı olabilir. Bir *non-sense mutation* prematür stop kodona sebep olabilir ki bu kesilmiş bir protein üretimine veya daha sıklıkla anlamsızlaşmış bir

mRNA boşluğuna sebep olabilir. Sessiz bir mutasyon nükleotidi değiştirir fakat amino asidi değiştirmez. Nokta mutasyonları gende intron ve eksonların kesilip yeniden birleştirildiği mevcut bölgelere yenilerini ekleyebilir. Yukarıda bahsedilen nokta mutasyonları RNA işlenmesi sırasında ekson ve intronların kesildikten sonra birleşme hatalarına neden olur.

4.1.1.2.2 Kopya Sayısı Değişimleri (KSD)

Translokasyon ve inversiyon gibi yapısal değişimler bir veya daha fazla kromozomun yapısını değişiklik yapan geniş bozulmalardır. Bozulmalar bazen DNA segmentinde kopya sayısı değiştirmeden dengelenebilir. Lokusa özel *de novo* mutasyonların nükleotid substitüsyonundan daha fazla mutasyon oranı olduğu tahmin edilmektedir. Genelde belli bir genin her allelde iki kopyası bulunur. Kopya sayısı kazanımlarına düplikasyon, kopya sayısı azalmalarına delesyon denir. Eğer bir genin içinde olursa, okuma çerçevesini değiştirebilir ve bir prematür stop kodonu meydana gelebilir. Fakat bir delesyon veya düplikasyon çerçeve içi mutasyon oluştururursa, daha kısa veya daha uzun gen ürünü oluşturabilir. Bazı KSD'ler birkaç mega bazlık alan kaplayabilirler, bu yüzden bütün geni veya birkaç geni içerebilirler (Zhang ve ark., 2009).

4.1.2 KSD Mekanizmaları

KSD oluşumuna birçok farklı mekanizma sebep olabilir. Tablo 1 de mekanizmaların özeti verilmiştir. Non-allelik homolog rekombinasyon (NAHR) en sık mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir. NAHR, non-allelik homolog DNA segmentlerinin *crossing-over* ve hizalanamamasından dolayı oluşur. Bu homolog DNA segmentleri segmental düplikasyonlar (SD) gibi tekrarlayıcı segmentler olabilir. NAHR oluşabilmesi SD'ler gibi az etkili ilerleyici segmentlere ihtiyacı vardır. SD'lerin homolojisi ve iki segment arasındaki mesafe NAHR verimliğini etkiler (Gu ve ark., 2008).

DNA tamir mekanizmalarının çalışmaması aynı zamanda DNA segmentlerinin kaybına veya kazanımına sebep olabilir. Non-homolog uç bağlanması (NHEJ) patolojik çift sarmallı DNA boşluklarının düzeltilmesi için sık kullanılan bir mekanizmadır. NHEJ hücre döngüsü boyunca etkindir ve homolog bir kromozom veya özel bir diziye ihtiyaç duymamaktadır. NHEJ, farklı nükleaz, polimeraz ve ligaz aktiviteleri sonucu esnektir. NHEJ dört basamak içerir; çift sarmallı duraksamanın belirlenmesi, kırılmış DNA uçlarının moleküler köprülenmesi, uçların modifikasyonu ve ligasyonu (Gu ve ark., 2008).

Mikromoloji yönlendirmeli uç bağlanması (MMEJ), DNA tamiri ve KSD oluşumunda nispeten yeni önerilen bir metottur. Ayrıca alternatif NHEJ olarak ta adlandırılır. Birleşmiş DNA bölgeleri arasında homolog olan küçük bir DNA segmenti olan mikromoloji, MMEJ için gereklidir. Bu mikromoloji segmentlerin birleşmesinden önce DNA dizilerinin hizalanması için kullanılır. NHEJ de mikrohomolojiyi kullanabilir, fakat MMEJ mikrohomolojisi için homolog genişlemenin geniş olması gerekmektedir (Lieber ve ark., 2008).

Çatal Durdurucu ve Şablon Çevirici (FoSTeS), KSD sebep olan replikasyon temelli bir mekanizmadır. DNA replikasyonu sırasında replikasyon çatalı durursa, geri kalmış sarmal asıl şablondan ayrılıp, başka bir replikasyon çatalına birleşip DNA sentezine devam edebilir. Eğer sarmal aşağıya yönlü bir çatala değişirse bu delesyona sebep olur. Eğer sarmal yukarı yönlü bir çatala değişirse bu düplikasyona sebep olur (Lee ve ark., 2007).

Mikrohomoloji aracılı ara-tesirli replikasyon (MMBIR) ise başka bir replikasyon temelli tamir mekanizmasıdır. MMBIR da kırılmış DNA sarmalının 3´ çıkıntısı başka bir kromozomu ele geçirerek, mikrohomolojiyi kullanarak, replikasyona oradan devam eder ve kromozomun sonuna kadar varır.

Kromozomun yıkılması (Kromotripsiz) yakın zamanda bulunmuş ve karmaşık değişikler sonucu felaket düzeyde olaylara sebep olduğu düşünülen bir fenomendir. Ara noktaların aşırı bir kümelenmesi söz konusudur. Kromotripsizin, non-homolog

mekanizmalar ile tamir edilen ard arda birçok çift sarmallı DNA duraksamalarından meydana geldiği düşünülmektedir.

4.1.2.1 KSD Oluşturan Tekrarlayıcı Elementler

KSD oluşmasında bazı tekrarlayıcı elementlerin olduğu bilinmektedir. "Alu" tekrarları homolog rekombinasyona iki yolla dahil olabilir. Birincisi; homolog rekombinasyon için gerekli proteinlerin bağlanma alanları olarak görev yaparlar. İkincisi; DNA sarmal değişimini doğrudan kendileri artırabilirler. Farklı çalışmalar Alu tekrarlarının, NHEJ, FoSTeS veya MMBIR gibi homolog olmayan mekanizmalar aracılığı ile koromozomal yer değiştirmelere ortam sağlayabildiği farklı çalışmalarda bildirilmiştir (Shaw ve Lupski, 2005; Vissers ve ark., 2009). Alu tekrarları gibi tekrarlayıcı diziler, duraksama noktalarında ek delesyonların yeniden düzenlenmesine yatkınlık kazandırabilir. Dahası, Alu elementlerinin, yapısal ve evrimsel kromozom düzenlemelerinde önemli görev üstlendiği farklı araştırıcılar tarafından ifade edilmektedir. DMD genini kodlayan distrofinin Alu ve tandem tekrarlarını içeren dağılmış duraklama noktaları ile farklı KSD delesyonları taşıdığı gösterilmiştir. Bir başka konjenital sapma çalışmasında, çalışılmış duraksama noktalarının %70'inde tekrarlayıcı elementlerin olduğu tespit edilmiştir (Vissers ve ark., 2009). Bunlar SINE, LINE, DNA tekrarları ve uzun terminal tekrarlarıdır.

4.1.2.2 KSD ve Hastalık

KSD'ler iyi huylu olabilir veya özellikle genleri içeren zararlı etkileri olabilir. KSD'ler konjenital olabileceği gibi kazanılmış hastalıklarla da görülür. Örneğin KSD doza hassas genler veya bir delesyon içerdiğinde fenotipi daha çok etkiler. KSD'ler çok küçük olsa bile eğer bir geni etkilerlerse sorunlara neden olabilirler. Dahası, KSD'ler hastalığa sebep olan genler içermese bile patojenik olabilirler.

Son yıllarda çeşitli mikrodizin teknikleri çok sayıda yeni KSD ortaya çıkarmış ve hastalığa sebep olan birçok KSD'nin de keşfedileceği tahmin edilmektedir. Bir rahatsızlığın patogenetik mekanizmasının anlaşılması her hastalık için önem

taşımaktadır. Tablo 2'de ki KSD sebep olan mekanizmalar gösterilmiştir (Gu ve ark., 2008; Kloosterman ve ark., 2011; McVey ve Lee, 2008; Vissers ve ark., 2009, Liu ve ark., 2012).

4.1.2.3 KSD Saptama Yöntemleri

KSD'lerin hastalığın teşhisindeki önemi arttıkça, yeni KSD'leri tespit etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Yeni yöntemlerde daha yüksek çözünürlük kullanılarak yeni KSD bölgeleri bulunmaya çalışılmaktadır. Teknolojinin desteğiyle çözünürlük artmış, daha küçük KSD'ler saptanmaya başlamıştır. KSD araştırmalarında kullanılan iki tip yöntem vardır; tüm genom KSD saptama yöntemleri ve hedefe yönelik KSD saptama yöntemleri.

Tablo 1: Kopya sayısı değişimlerini yaratan mekanizmalar

İsim	Kısaltma	Mekanizma	Görev Yeri	Özelliği	Sonuç
Non-Allelik Homolog Rekombinasyon	NAHR	Non-Allelik Homolog DNA segmentlerinin yanlış yerleşimi sonucu *crossing-over* olması	Mayoz ve mitoz	Homolog non-allelik dizi	Delesyon, düplikasyona, inversiyon ve mozaik değişiklikler
Non-homolog son bağlanma	NHEJ	Çift sarmallı DNA'da kırılmaları tespit etmek, moleküler köprü kurmak	Mayoz ve mitoz	Herhangi bir dizi	Delesyon, düplikasyona, translokasyon
Mikrohomoji aracılığı ile uç birleşmesi	MMEJ	Kırılmış DNA'nın mikrohomoloji ile birleşmesi	Mitoz	Mikrohomoloji	Delesyon, translokasyon
Çatal Durdurucu ve Şablon Çevirici	FosTeS	Çatal uçların replikasyonu, ayrılan sarmalın şablondan uzaklaşması ve başka bir çatal uca bağlanması	DNA replikasyonu	Mikrohomoloji	Delesyon, düplikasyona, triplikasyon, inversiyon, kompleks değişiklikler
Mikrohomoloji aracılığıyla baskılanmış replikasyon	MMBIR	Kırılmış DNA sarmalının başka bir kromatidin içine girmesi	DNA replikasyonu	Mikrohomoloji	Düplikasyon, Delesyon, inversiyon, translokasyon
Kromotripsis	-	DNA'nın anlık kırılmasının tamiri	DNA tamiri	Yüzlerce kırılma noktasının tamiri	Kompleks değişiklikler

4.1.2.4 Tüm genom KSD saptama yöntemleri

a) Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon Dizin Analiz Yöntemi (*Array Comparative Genomic Hybridisation, aCGH):* Floresan boya ile işaretlenmiş hasta DNA'sının ve referans DNA'nın, DNA parçacıklarının oluşturduğu bir tabanda hibridize edilmesi ve hibridizasyon oranlarının ölçülmesine dayanan bir tekniktir.

b) SNP Dizinleme *(SNP Array)*: yöntemi tek nükleotid değişikliklerini (SNP) mikrodizin üzerine hibridize etmeye ve bunları floresan yöntemle taramaya dayanır. Her bir SNP'den alınan yoğunluk oranları referans DNA yoğunluklarıyla karşılaştırılır. Bu yöntem göreceli kopya sayısı (log2 oranı) belirlenmesini sağlar ve kayıp ya da kazanç olarak bildirilir. Bu analizde CGH mikrodizinden farklı olarak sentetik SNP dizileri kullanılır.

c) Yeni Nesil Dizileme *(Next Generation Sequencing)*: Yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanıma girmesi sayesinde nadir hastalıkların genetik temellerini inceleme adına yeni bir sayfa açılmıştır. Özellikle tüm ekzom dizileme uygulamasının yaygın kullanımı hem araştırma hem de sağlık hizmetine sağlayacağı katkı açısından kritik öneme sahiptir. Kopya sayısı değişimlerinin yüksek çözünürlüklü yeni nesil dizileme verileri kullanılarak analiz edilmesi son yıllarda farklı gruplarca test edilmiştir. Bazı gruplar yüksek okuma kapasiteli tüm genom dizileme verileri üzerinden kopya sayısı değişimlerini tespit edebilmişken, tüm ekzom dizileme verilerinde bu yaklaşımlar henüz verimli olmamıştır. Şu anda bölgeye yönelik tüm genom dizileme çalışmalarında KSD tespiti yapılabilmekte ise de ek yazılımlar gerekli olmaktadır.

4.1.2.5 Hedefe Yönelik KSD Saptama Yöntemleri

a) Floresans in situ Hibridizasyon *(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH):* Bu yöntemde floresan işaretli prob Hibridize olduğu zaman kromozomlar floresan boyadan yayılan ışığın belirli bir dalga boyunda ile görünür hale gelirler. Bu

hibridizasyon sinyali (bu prob ile hibridize olan DNA segmentinin lokalizasyonu) floresan mikroskop altında görülür. Böylece bir DNA parçasının eksikliği ya da fazlalığı anlaşılabilir.

b) Mültipleks Ligasyon Bağımlı Prob Çoğaltımı *(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA):* Genomik DNA dizisindeki normal olmayan kopya sayısının tespitini sağlayan bir mültipleks PCR yöntemidir. Hedef diziye yönelik tasarlanan MLPA problarının hibridizasyonun çoğaltılması ve hibridizasyon ile yapılan bir yöntemdir. 500 bp'ye kadar çoğaltmada başarıyla kullanılmaktadır.

c) Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon Dizin Analiz Yöntemi *(Comparative genomic hybridization array, aCGH):* Hedefe Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yönteminin tüm genomu değil de hedeflenen DNA parçalarını karşılayacak şekilde özelleştirilmesi ile sağlanan yöntemdir. Hedeflenen bölgeye daha yüksek çözünürlükte veri sağlarken, diğer bölgeler hakkında bilgi vermez.

d) Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu *(Quantitive Polymerase Chain Reaction, qPCR):* Kantitatif PZR, DNA amplifikasyonu devam ederken çift zincirli DNA'dan yayılan floresan miktarını ölçen PZR cihazları ile yapılır. qPZR'ın amacı gerçek zamanlı olarak her bir reaksiyondaki nükleik asit miktarını göreceli olarak belirlemektedir.

4.1.3 RNA

RNA, DNA'dan birçok açıdan farklıdır. DNA'da nükleotidleri yapan şeker molekülü deoksiriboz iken RNA'da ise şeker riboz'dur. DNA'daki timin RNA'da urasil ile yer değiştirmiştir. Urasil, adenin tamamlayıcısıdır. Ayrıca birçok RNA, çift sarmallı olmayıp tek sarmallıdır. Son olarak RNA'lar DNA'lardan daha kısa yapıda olup, daha az stabil durumdadır ve bazen enzim gibi hareket ederler.

4.1.3.1 RNA ve DNA Kıyaslaması

RNA ve DNA, üç temel açıdan birbirlerinden farklılık gösterir. Birincisi, DNA çift iplikli olmasına karşın, çoğu biyolojik fonksiyonunda RNA tek ipliklidir, ve DNA'dan çok daha kısadır. İkincisi, DNA'yı oluşturan şeker molekülleri deoksiriboz, RNA'yı oluşturanlar ise ribozdur, yani DNA'da pentoz halkasının 2' konumunda bir hidroksil grubu yoktur, RNA'da ise pentoz halkasının iki hidroksil grubu vardır. RNA'da fazladan bulunan hidroksil grupları, hidroliz nedeniyle onun DNA'dan daha az dayanıklı olmasına neden olur. Üçüncüsü, adenin bazını tümleyen baz DNA'daki gibi timin değil, urasildir. RNA genelde tek iplikli olmasına rağmen, çoğu RNA molekülü katlanarak baz eşleşmesi ile çift sarmallı bölgeler oluşturur. DNA'dan farklı olarak RNA'lar uzun çift iplikli sarmallar değil, kısa ve tek iplikli moleküllerdir. Bu baz eşleşmeleri RNA molekülüne belli bir şekil verir ve bazların fonksiyonel grupların bir araya gelmesi sonucu reaktif özelliğe sahip olan yapılar ortaya çıkar. Bu sayede RNA, bir enzim gibi, kimyasal katalizör olarak işlev verebilir. Örneğin, peptid bağını oluşturan bir enzim olan ribozomun aktif merkezi tamamen RNA'dan oluşmaktadır (Higgs, 2000; Nissen ve ark., 2000).

4.1.3.2 RNA Sentezi

RNA sentezi genelde DNA'yı bir şablon olarak kullanarak, RNA polimeraz enzimi tarafından katalizlenir. Sentezin başlaması DNA üzerinde, RNA'ya yazılacak bölgenin hemen "yukarı" tarafındaki bir diziye enzimin bağlanması ile olur. DNA çifte sarmalı, RNA polimerazın helikaz aktitivitesi ile açılır. Sonra, enzim DNA'nın şablon ipliği üzerinde 3'- 5' doğrultusunda ilerler ve bunun dizisini tümleyici bir diziye sahip bir RNA zincirini 5'-3' doğrultusunda sentezler. DNA üzerinde bulunan belli bir dizi, RNA sentezinin nerede sona ereceğini belirler (Nudler ve Gottesman, 2002).

4.1.3.3 RNA Tipleri

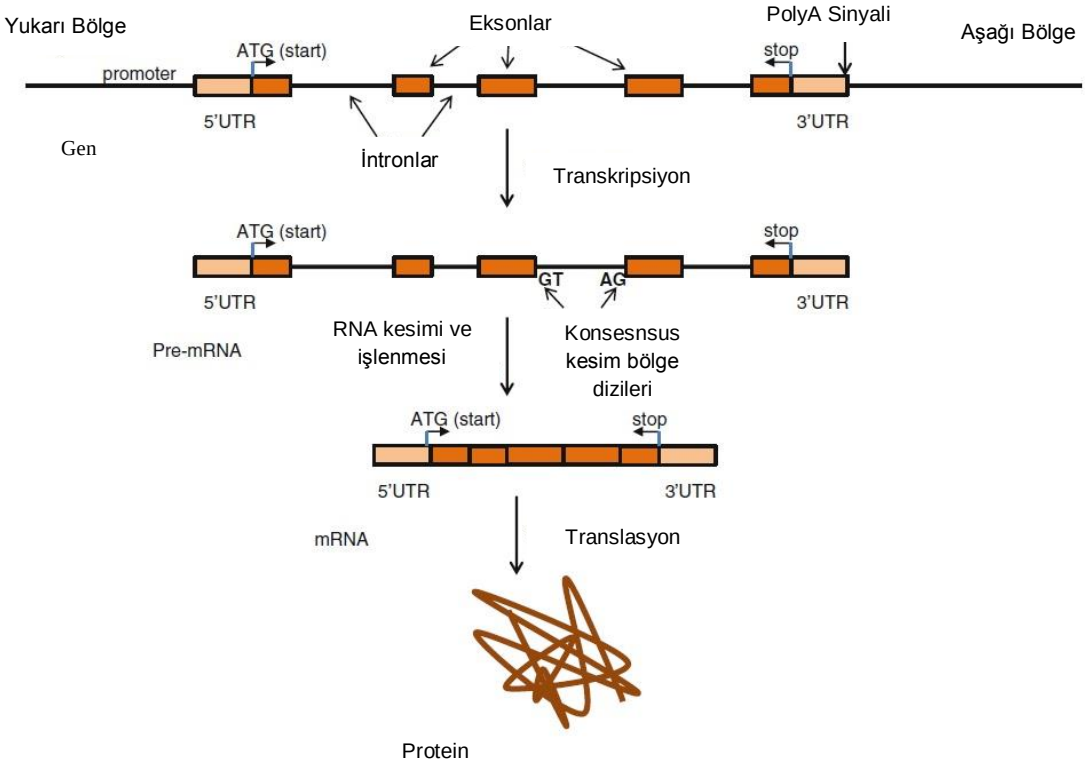
Mesajci RNA (mRNA) DNA'daki bilgiyi protein sentezi (translasyon) için ribozomlara taşıyan RNA'dır. mRNA'daki kodlayıcı nükleotit dizisi ondan üretilen proteinin amino asit dizisini belirler. RNA genleri proteine çevrilmeyen, RNA kodlayan genlerdir, bunlar kodlamayan RNA veya küçük RNA olarak adlandırılır. Kodlamayan RNA'lar intronlardan da ortaya çıkabilir. Kodlamayan RNA'ların en

belirgin örnekleri taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA)'dır, bunların ikisi de translasyon sürecinde rol oynarlar. Gen düzenlemesi, RNA işlenmesi ve başka işleveleri olan RNA'lar da vardır. Bazı RNA'lar, başka RNA'ların kesilmesi ve birleştirilmesi (ligasyon) ve ribozomda peptit bağı oluşumu gibi kimyasal tepkimeleri katalizleme yeteneğine sahiptir; bu tip RNA'lar ribozim olarak adlandırılırlar. Çift iplikli RNA, birbirini tümleyici iki iplikten oluşmuş RNA'dır, bu bakımdan şekli DNA'ya benzer. Çift iplikli RNA, bazı virüslerin (çift iplikli virüslerin) genetik malzemesini oluşturur. Ökaryotlarda, virüs RNA'sına benzeyen uzun çift iplikli RNA'lar RNA enterferansını harekete geçirir. RNA enterferansında, siRNA (İng. small interfering RNA, kısa enterfreanscı RNA) olarak adlandırılan kısa çift iplikli RNA'lar gen ifadesini susturur (Berg ve ark., 2002).

Mesajcı RNA (mRNA) bir proteinin amino asit dizisi hakkında bilgiyi protein sentez yeri olan ribozomlara taşır. Bu bilgi, her üç nükleotit (bir kodon) bir amino asite karşılık gelecek şekilde şifrelenmiştir. Ökaryotlarda bir öncül (prekürsör) mRNA (pre-mRNA) DNA'dan yazıldıktan sonra ergin mRNA'ya dönüştürülür. Bu işlem sırasında pre-mRNA'nın protein kodlamayan kısımları (intronlar) çıkartılır, ayrıca mRNA'nın iki ucuna, onu nükleazlardan koruyucu eklemeler yapılır. Bunun ardından mRNA çekirdekten sitoplazmaya taşınır, orada ribozomlara bağlanır ve tRNA'nın yardımıyla çevirisi (translasyonu) yapılır. Prokaryotlarda, çekirdek olmadığından, RNA'nın transkripsiyonu sürerken ribozomlar tarafından çevirisi başlar. Bir süre sonra mesajcı RNA ribonükleazlar tarafından parçalanır. Taşıyıcı RNA (tRNA) yaklaşık 80 nükleotit uzunluğunda bir RNA zinciri olup, ribozomun protein sentez konumunda büyümekte olan polipeptide spesifik aminoasitler taşır. Yapısında, mRNA'daki kodonları tanımak için onlarla hidrojen bağı kuran bir antikodon bölgesi ve amino asidin ona bağlanması için gerekli bölgeler vardır. Ribozomal RNA (rRNA) ribozomların katalitik kısmıdır. Ökaryotik ribozomlar dört RNA içerirler: 18S, 5.8S, 28S and 5S rRNA. Bu rRNA'lardan üçü çekirdekçikte sentezlenir. Sitoplazmada ribozomal RNA ve proteinler bir araya gelip ribozomu oluştururlar. Ribozom mRNA'ya bağlanır ve protein sentezini gerçekleştirir. Bir mRNA'ya aynı andan birkaç yüz ribozom bağlanabilir. Tipik bir ökaryotik hücre sitoplazmasındaki RNA konsantrasyonu 10 mg/ml'dir, bunun %80 rRNA'dan oluşur (Cooper ve ark., 2004).

Bazı RNA tipleri genin belli bir kısmının dizisine tümleyici olarak gen ifadesinin aşağı ayarlayabilirler. Ökaryotlarda bulunan mikro RNA'lar (miRNA; 21-22 nt) RNA enterferans yoluyla etki eder. RNA enterferansında miRNA ve enzimlerden oluşan bir kompleks, miRNA'nın tümleyici olduğu bir mRNA'yı parçalayabilir, veya mRNA'nın translasyonunu bloke edebilirler, veya promotörün metilasyonuna neden olarak genelde geni aşağı ayarlarlar. Bazı miRNA'lar ise genlerin çalışmasını uyarırlar (RNA aktivasyonu). Küçük enterferansçı RNA *(small ınterfering RNA, siRNA)*'lar 20-25 nt uzunlukta olup, genelde viral RNA'nın parçalanmasından meydana gelmelerine karşın, bu RNA tiplerinin endojen kaynakları da mevcuttur. siRNA'lar, miRNA'ya benzer şekilde (RNA aktivasyonu da dahil olmak üzere) RNA enterferansı aracılığıyla etki ederler. Hayvanlarda bulunan Piwi etkileşimli RNA'lar *(Piwi-interacting RNAs, piRNA; 29-30 nt)* eşey hücrelerinde etkindirler, transpozonlara karşı savunmaya yaradıkları ve gametogenezde rol oynadıkları düşünülmektedir. Dişi hayvanlarda görülen X kromozom inaktivasyonu, X kromozomlarından birini kaplayarak onu inaktive eden Xist adlı bir RNA tarafından meydana gelir. Ters anlamlı RNA bakterilerde yaygındır; çoğu genleri aşağı ayarlar ama bazıları da transkripsiyon aktivatörüdür. Bir mRNA'nın kendisi de 5′ çevrilmeyen bölgesinde veya 3′ çevrilmeyen bölgesinde riboanahtar gibi düzenleyici elemanlar içerebilir. İnsan geninin organizasyonu ve pre-mRNA ve mRNA ile protein oluşumu Şekil 1'de görülmektedir.

Çoğu RNA başka RNA'ların modifikasyonunda rol oynar. Örneğin uç birleştirmede, pre-mRNA'daki intronların çıkartılmasını sağlayan splisozom, küçük nükleer RNA (snRNA)'lar içerir. RNA'yı oluşturan nükleotitler A, C, G ve U'dan farklı bazlara değişime uğrayabilir. Ökaryotlarda RNA nükleotitlerinin modifikasyonu genelde çekirdekçik ve Cajal cisimlerinde bulunan küçük nükleolar RNA *(small nucleolar RNA, snoRNA; 60-300 nt)* tarafından yönlendirilir. SnoRNA'lar enzimlerle birleşip onları RNA üzerindeki belli bir noktaya yönlendiriler, bunu sağlamak için RNA ile baz eşleşmesi yaparlar. Bu enzimler sonra o noktadaki nükleotit modifikasyonunu gerçekleştirirler. rRNA ve tRNA bu şekilde büyük oranda değişime uğrarlar, ama snRNA ve mRNA'ların da bu yolla modifiye oldukları görülmüştür.



Şekil 1: İnsan geninin organizasyonu ve pre-mRNA ve mRNA ile protein oluşumu

4.1.4 RNA ve DNA Mikrodizin Deneyleri

Mikrodizin teknikleri, DNA'nın küçük bölgelerindeki delesyon veya düplikasyonların tespitini yaparak karmaşık kalıtımsal hastalık modellerinin oluşturulmasında önemli rol oynar. Mikrodizin teknolojisi ilk olarak 1995 yılında ortaya çıkmıştır (Schena ve ark., 1995). İlk mikrodizin, polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinde elde edilen tamamlayıcı DNA'dan üretildi. *Array* evde yapılan bir robot tarafından basılmış ve Arabidopsis thaliana bitkisinin 48 genini paralel olarak gen anlatım şekilleri ölçülebilmiştir. Mikrodizin teknolojisindeki ilerleme ve insan genomunun tamamının haritalanması sonrası aynı anda on binlerce mRNA transkriptinin anlatım seviyelerini ölçmek mümkün olmuştur.

RNA mikrodizin terimi RNA seviyesinde ölçüm yapan *array'*ler, DNA mikrodizinleri ise DNA dizi veya seviyesinde ölçüm yapan *array'*ler için kullanılmaktadır. RNA mikrodizinleri, iki veya daha fazla biyolojik durum karşılaştırıldığında hücre ve dokulardaki regüle olan genleri, yolakları veya gen ağlarını tespit etmek için kullanılır. Mikrodizin yöntemi ile biyolojik mekanizmalar, hücre programları, embriyonik gelişim, hücre görevleri, hormonları etkileyen gen regülasyonları, ilaç-hastalık modelleri incelenebilmiştir. Mikrodizinler aynı zamanda hastalığa bağlı gen düzenlenmesi, kanserlerdeki gen biyobelirteçleri, enfeksiyöz hastalık, iltihabi hastalık, nörolojik ve psikiyatrik hastalık tespitinde kullanılmaktadır (Duncan ve ark., 2008).

İnsanlardaki birçok hastalığın gelişiminde, örneğin tümör gibi, oluşan yıkım genomik materyalde kazanç veya kayba yol açar (Visser ve ark., 2005). Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KSD), bütün genomdaki DNA kopya sayısı değişiklerinin belirlenmesini sağlar. KSD *array* yaklaşık 1 ile 100 kilobaz işaret boşlukları bırakarak yüksek çözünürlükte çalışma sağlar. Bu teknik hasta bireylerdeki gen KSD'lerinin veya kromozom bölgelerindeki delesyon ve düplikasyonlarının tespiti için oldukça yararlıdır (Vissers ve ark.,2005).

4.1.4.1 RNA Mikrodizini

cDNA mikrodizinlerini cama basılması ilk geliştirilen mikrodizin tekniklerinden biridir ve hala kullanılmaktadır. cDNA'lar veritabanında yer alan bire bir klonlardan yükseltilerek oluşturulur. Her cDNA fragmanı belli bir geni temsil edecek şekilde cam slayda sabitlenmiş ve DNA yapıştıran kimyasallarla boyanmıştır. Bu mikrodizin slaytları bütün genom mikrodizinleri olarak veya belirli bir gen seçimi ile basılabilmektedir.

İki renkli cDNA mikrodizin deneyinde kontrol ve hasta örneklerden elde edilen mRNA'lar karşılaştırılmak üzere ters transkripsiyon yapılır, iki farklı tespit edilebilir floresan boya ile işaretlenir. Her örnekteki RNA miktarı sınırlı olduğu için tek veya birkaç hücrede yapılan deneylerde floresans boyama öncesi yükseltme işlemi mutlaka gerekmektedir. İşaretlenmiş örnekler ardından karıştırılıp mikrodizin öncesi hibridize

edilir. İşaretli probların fazlaları yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, her bir mikrodizin konumundaki floroforların yoğunluğu lazer tarayıcı ile okunur. Hibridizasyon yoğunluğu floresans emisyon miktarı ile temsil edilir. Bu şekilde farklı örneklerdeki her bir transkriptin göreceli miktarını sağlar.

Mikrodizinler ilgi duyulan dizileri içeren kütüphane verileri kullanılarak hazırlanır. Kütüphane içinde, her bakteri klonu bir genin mRNA'sından elde edilen benzersiz dizi içeren plazmid taşır. cDNA kütüphanesi, 500 bp ile 2 kb arasında değişecek şekilde PZR aracılığı ile genin spesifik komşu primerleri kullanılarak amplifiye edilir. Amplifiye edilen cDNA parçalarının saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra konsantrasyonları ölçülür. Her bir klonun kalitesi jel elektroforezi ile kontrol edilerek sonuçlar kaydedilir.

4.1.4.2 DNA Mikrodizini

Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu (KGH) ile DNA kopya sayısı değişiklik tespiti için kısmi veya tüm genom analizi yapılabilmektedir. Bir KGH DNA deneyinde, bakteriden elde edilmiş genomik fragmanları bilinen yapay kromozomlar cam yüzey üzerine sabitlenerek, floresans işaret testi ve kontrol DNA'ları ile hibridize edilmiştir. Array üzerindeki floroforların floresans yoğunluk oranları her bir mikrodizin analizi için ölçülmüştür. Bu oran gen kopya sayısı ile örnek arasındaki göreceli farkın ölçülmesini sağlamaktadır. Bu yöntem hastalıklı bireylerde dokuya özel delesyonların veya düplikasyonların tespitinde oldukça yararlıdır.

İyi kalitedeki genomik DNA genellikle KGH deneyinin hassasiyetini ve doğruluğunu artırır. DNA saf ve diğer genomik DNA kaynakları gibi kirletici maddelerden arındırılmış olmalıdır. Genomik DNA; kan, ağız içi sürüntü hücreleri, kültür hücreleri, doku ve parafin emdirilmiş dokular gibi farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir. Birçok ticari kit yüksek kaliteli genomik DNA elde edebilmek için belli bir örnek kaynağını hedef almaktadır.

4.2 Diş Gelişimi ve Sinyalleşme Yolları

4.2.1 Diş Şeklinin (Paterninin) Çeşitliliği

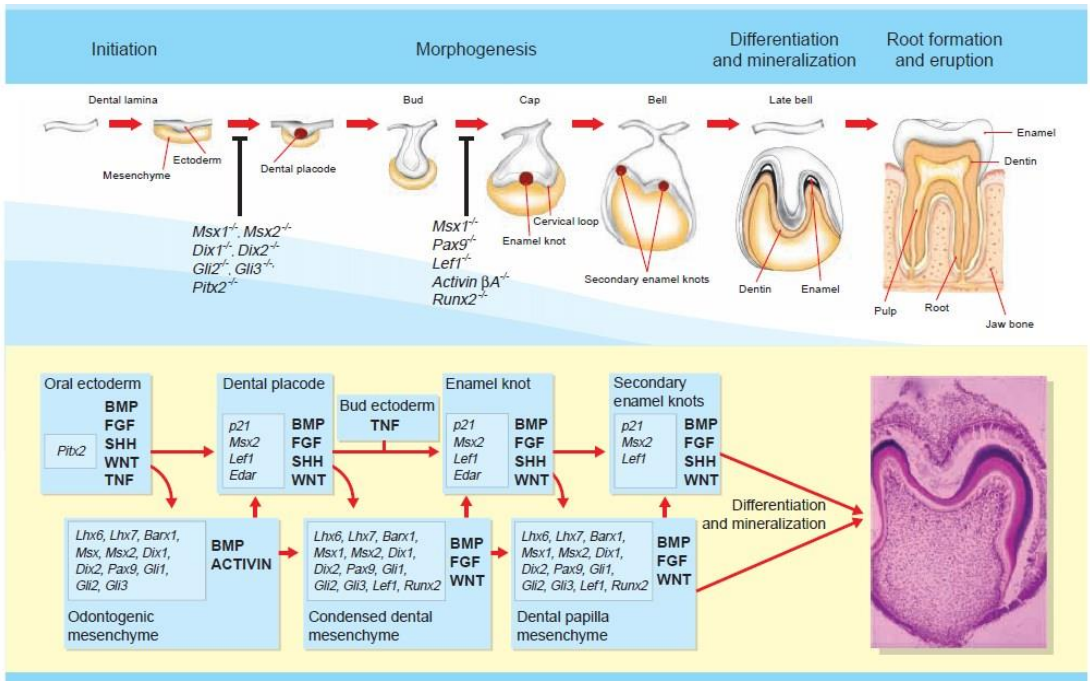
Dişlenmenin organizasyon ve şeklinin farklı hayvanlar arasında oldukça değişmekle beraber birçok özellik aynıdır. Birçok balık, amfibik, ve timsahın homodont dişlenmesi vardır (bütün dişler aynı şekildedir) ve dişleri hayat boyu değişir. Diğer yandan memeli dişleri heterodonttur; konum olarak dört farklı gruba ayrılmıştır (önden arkaya kesiciler, kaninler, premolarlar, molarlar). Memelilerin dişleri genel olarak hayatta bir kere değişir. Memeli sınıf içindeki diş formülünün temel soy şeklinde yaygın değişiklikler vardır. Dişlenme her bir tür için karakteristik olduğundan; dişlerin şekilleşme, sayı, ve şekil değişiklikleri fosil kayıt incelemeleri ve memeli evrimini anlamak için esastır (Tummers ve Thesleff, 2009).

Form ve patternleşmenin gelişimsel genetik mekanizmaları ile açıklandığı noktaya gelmiş bulunuyoruz. Zamanla yaygınlaşan ana ilke genetik geçiştir. Form geçişi genellikle yeni genetik yollar veya çözümler bularak sağlanmaz fakat olanları değişime uğratarak sağlanabilir. Evrim sırasındaki zengin tamir olma geçmişi dikkate değer karışık ve interaktif bir genetik yollar sistemine neden olmuştur. Sinyalleşme yolları ile sinyalleşme bölümleri arasındaki karşılıklı etkileşimlerin karmaşıklığı dental şekilleşmeyi kolaylaştırmıştır (Thesleff, 2003).

4.2.2 Temel Sinyalleşme Yolları

Hücre ve doku etkileşimlerinin arabuluculuğunun moleküler temelinin aydınlatılması son 20 yılda gelişimsel biyoloji araştırmalarındaki en büyük buluştur. Şimdi biliyoruz ki, arabulucular dört korunmuş aileye ait olan sinyalleşme molekülleridir; TgfBeta, Wnt, FGF, Hedgehog. Şekil 1'de hem epitelde hem mezenkimde bulunan sinyalleşme yolları şematik olarak gösterilmiştir (Thesleff, 2003). Ve bu aynı sinyaller ileri diş gelişimi sırasında tekrar tekrar kullanılmaktadır. Diş gelişimi bu dört sinyalleşme yolu silindiğinde veya değiştirildiği birçok transjenik farede diş gelişimi durmuştur. Asıl sinyalleşme yollarının değiştirildiği veya

bozulduğu bu şekildeki genetik değişimler fenotipik sonuç açısından çok karmaşık değildirler. Gen fonksiyonun silinmesi plakod formasyonu ve tomurcuklanmanın bile öncesinde veya çan evresindeki morfogenez öncesinde diş gelişiminin tamamen durmasına sebep olur.



Şekil 2: Diş gelişiminde sinyalleşme yolları (Thesleff, 2003)

Örneğin diş gelişimi Gli2/Gli3 çift mutant farelerinde Shh sinyalleşmesi ihtiyacını gösterecek şekilde, diş plakodlarının başlangıç ve öncesinde durmuştur (Hardcastle ve ark., 1998). Msx1/Msx2 çift mutantlarında benzer bir fenotip BMP sinyalleşmesi için önerilmiştir (Satokata ve ark., 2000). Erken diş gelişimindeki FGF sinyalleşmesinin rolü diş oluşumun başlangıç safhasında durmasıyla sonuçlanan Fgf8 in ağız epitelinde şartlı silinmesiyle gösterilmiştir (Trumpp ve ark., 1999). Aynı şekilde Wnt sinyalleşmesinin plakod formasyonu öncesi gerekliliği Wnt inhibitörü Dkk1 in ektodermde Keratin 14 kullanılarak aşırı eksprese edilmesiyle gösterilmiştir (Andl ve ark., 2002).

Diğer bazı mutantlarda diş morfogenezisi tomurcuk safhasından çan safhasına geçişte olmuştur. Bunun ilk örneği, Msx1 olmayan mutantın Bmp4'ün epitel ve mezenkim arasındaki karşılıklı anahtar görevini doğrulamasıdır (Vainio ve ark., 1993;

Bei ve ark., 2000). Diş gelişimi ayrıca K14 promteri altında Bmpr1 kopya kusuru olan transjenik farelerde de durmuştur (Andl, ve ark., 2004). Tomurcuktan çana geçiş safhası Lef1 ve Runx2 olmayan mutant farelerde de sonlanmıştır. Lef1, Wnt sinyalleşmesini sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. Ve Lef1 in epitelde çalışması Runx2'nin ise mezenkimde çalışması gereklidir. Lef1 ve Runx2 her ikisi de dental epitel ile mezenkim arasındaki FGF sinyalleşmesini düzenler (Kratochwil ve ark., 2002; Aberg ve ark., 2004).

Hayati düzenleyici genlerdeki değiştirmeler genellikle embriyonun erken ölümüne sebep olmaktadır. Aynı şekilde diş gelişimdeki hayati genlerin değişimi diş gelişiminin erken safhaların birinde durmasına sebep olmaktadır. Bu durum bu tür özel genleri diş şekil ve şekilleşmesinde ufak değişikliklere sebep olan ince düzenleyici tamir eden başlıca aday genler yapmaktan alıkoymaktadır. Doğal olarak erken diş gelişiminin durmasının en klasik örneği kuşlardır. Kuşlar 70-80 milyon yıl önce diş çıkarma yeteneklerini kaybetmişlerdir. Özet olarak bu ana sinyalleşme yollarından birinin yok olmasıyla olmuştur. Bunun yanında, nöral kresti hücre popülasyonu fareninkiyle yer değiştirilen tavuklarda, dental mezenkim oluşumuna sebep olacağından dişler ortaya çıkabilmektedir. Tavukların nöral kresti diş oluşturamasa bile, tavukların oral ektodermi transplante edilmiş fare nöral krestine öğretici sinyaller göndermekte hala başarılı olur ve karşılıklı interaktif sinyalleşme başlar. Kuşlarda dişler milyonlarca yıl önce yok olmasına rağmen, diş oluşumunun temel programı hala kuşlarda kalmış ve potansiyel olarak aktif edilebilir. Gerçi kuş nöral krest mezenkimi epitel bölümünden bu başlangıç sinyali işleme kapasitesini kaybetmiştir.

4.2.3 Körelmiş Diş Gelişiminin Tetiklenmesi

Körelmiş diş tomurcukları farelerin keser ve molar bölgelerinde tanımlanmıştır (Peterkova ve ark., 2002). Körelmiş diş tomurcukları kemirgen evrimi başlangıcı sırasında yok olmuş diş kalıntılarıdır. Körelmiş diş germleri epitelyal tomurcuklanmanın farklı safhalarında durmuşlar ve çan safhasına gelememişlerdir. Dişe özel birkaç gen eksprese ederler (Tureckova ve ark., 1995; Keranen ve ark., 1998) ve apoptozis sırasında yok oldukları düşünülmektedir (Tureckova ve ark., 1996).

Ayrıca yabani tip fare embriyolarında molarların önünde, körelmiş premolar kalıntıları bölgesinde, lokalize Shh anlatımı sonucu ilkel bir mine düğümü de geliştirebilirler (Kangas ve ark., 2004).

İlginç olarak, bazı transjenik farelerde premolarların olası bölgesinde konumlanmış ektopik ve premolara benzer dişler rapor edilmiştir. Bunların kurtarılan körelmiş diş artıkları olduğu akla yatkındır. Bu tür fare türlerinin başında, aşırı diş eksikliğine sebep olan hipohidrotik ektodermal displazi sendromuna sebep olan TNF sinyalinden sorumlu ektodizplazini aşırı eksprese eden fare gelmektedir (Kere ve ark., 1996). Bu tür transjenik farelerde premolara benzer dişler hayvanların yarısında oluşmuştur (Kangas ve ark., 2004; Mustonen ve ark., 2004). Bu bölgede artmış Shh anlatımından görüleceği üzere dişin sinyalleşme merkezi olan genişlemiş mine düğümü, körelmiş dişin bölgesinde bulunabilir. Polaris geni bulunmayan mutantlarda da, körelmiş diş kalıntılarını Shh anlatımını stimüle ettiğini düşündüren benzer artı premolarlar oluşmaktadır (Zhang ve ark., 2003). İlginç olarak, K14 Eda ve Polaris -/- farelerinde artakalan diş kurtarma mekanizmasını benzerini düşündüren Ektodisplazin sinyalleşmesinin olası doğrudan hedefi Shh'dir. Artı dişler ayrıca, Fgf sinyalleşmesinin hücre içi inhibitörleri olan Sprouty genlerinin baskılanması sonucu birinci azıların önünde oluşmaları ile karakterizedir. Bu farelerin ayrıca muhtemelen kalıntı kurtarılmış tomurcuklardan oluşan artı keser dişleri vardır. Sonuçlar Fgf'nin diş oluşumu simülatörü olarak önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir. Aynı şekilde Sprouty genleri diş oluşumunda Fgf aktivitesini modüle eden önemli endojen inhibitörlerdir (Klein ve ark., 2006). Hem premolarlar, hem keserler Sostdc1 olmayan mutant farelerde bulunmaktadır. Sostdc1 (Wise veya Ectodin de denir) Bmp ve Wnt inhibitörü olarak tanımlanmıştı. Fakat halen kalıntı diş formasyonu inhibisyonundaki Bmp veya Wnt sinyalleşmesinin inhibitörü olarak hareket edip etmediği belli değildir (Kassai ve ark., 2005). Bu çalışmalar topluca kalıntı dişlerin gelişim duraklamasında Fgf, Shh, Bmp ve Wnt yollarının özel inhibitörlerinin önemli rol oynadığını göstermektedir. Sonuç olarak bazı ana sinyalleşme yollarının modifikasyonu farelerde artık diş gelişim programını yeniden başlatabileceği mümkün görülmektedir.

4.2.4 Yeni (De Novo) Diş Formasyonun Tetiklenmesi

Memelilerde tek diş değişikliği dışındaki diş rejenerasyonu bulunmamaktadır. Değişen dişler dental araştırmaların ana modeli olan fare dişlenmesinde olduğu gibi genelde kayıptır. Sadece tek bir dişlenmesi olan modellere odaklanmak diş rejenerasyonundaki moleküler mekanizmaları anlamamızı büyük ihtimalle engellemiştir (Huysseune ve Thesleff, 2004). Yine de farelerde yeni diş oluşumu oral ektodermde Wnt sinyalleşmesinin stimülasyonu ile tetiklenebilir (Jarvinen ve ark., 2006; Kuraguchi ve ark., 2006). Çok sayıda artı dişler, ektodermde stabilize formdaki Beta-katenin şartlı anlatımı olan transjenik farelerde uyarılmıştır (Jarvinen ve ark., 2006). Transjenik modeller bu yüzden ektodermdeki sürekli aktif Wnt sinyalleşmesini temsil ederler. Fareler öldükten sonra diş fenotipi embriyonik molar diş tomurcukları sadece normal farenin böbrek kapsülünde transplante olarak büyüdüklerinde geçerli olur. 3 haftalık kültür sonrası, transplante edilen tek bir diş germi 40 kadar yeni diş yaratabilir. Bu dişler devamlı seri diş üretiminin gelişimsel safhalarını temsil etmektedir. Dişlerin bir diğer ilginç yanı ise genellikle basit konikal kuronlarının olması ve bu yüzden çok tüberküllü memeli kuronlarından çok balık veya timsah kuronlarına benzemesidir.

Yeni dişler BetaKetatin farelerinin oral epiteli boyunca ektodermdeki çok sayıda mine düğümü benzeri merkezlerde oluşur. Mine düğümleri oral epitelde geniş bir alana yayılmış olmasına rağmen dişler sadece dental epitelde oluşur. Dişlerini sürekli yenileyen balık ve timsahların yanı sıra ikinci dişlenmeye sahip olan bazı memelilerde sonradan gelen dişlerin dental lamina epitelinden oluşmaya başladığı gösterilmiştir (Osborn, 1971, Fraser ve ark., 2006; Jarvinen ve ark., 2009). Bu süreç normalde farelerde bastırılmıştır fakat transjenik farelerde bu baskınlığın durdurulduğu düşünülmektedir. Diş değiştirme kapasitesi Wnt sinyalleşme aktivitesine bağlı olabilir ve farelerde ikinci diş oluşumunun eksikliği Wnt sinyal yolunun baskılanmasıyla ilgili olabilir.

4.2.5 Sinyalleşme Yollarının Modülasyonları

Genleri baskılanmış fare çalışmaları birçok gen ve ilgili sinyalleşme yollarının ortaya çıkarılmasında yararlı olmuştur. Fakat gelişim sırasındaki düzenleme sinyalleşmelerinin ince tamir etkilerini ortaya çıkarmakta faydalı olmamışlardır. Genetik yolların, çoklu negatif ve pozitif geribildirim yoları içeren karmaşık ve iç içe geçmiş yapısı ile etkileşimleri aslında sistemi daha güçlü kılarak kontrollü bir şekilde fenotipin mikro-modifikasyonunu kolaylaştırmaktadır (Salazar-Ciudad ve Jernvall, 2002). Ve aslında olası fenotipik değişikliği tahmin edilebilir aralıkta tutarak genişletir. Embriyonik morfogenez üzerindeki sinyalleşme yollarının artan karmaşıklığı ve ince ayarın önemli rolü sadece son yıllarda ortaya çıkmıştır.

Birçok aktivatörün yanı sıra, dört korunmuş sinyal yollarının her biri için çok sayıda spesifik inhibitör keşfedilmiştir. Buna ek olarak bazı bazı inhibitörler arasındaki kooperasyon aynıdır. Tek bir inhibitörün etkisiz kalması fonksiyonel fazlalık için bilgi verici olmadığından bu durum inhibitör analizi açısından bariz engeller teşkil etmektedir. Ayrıca tek inhibitörün silinmesi farenin genetik geçmişine bağlı olarak çok hafif derece fenotipe sebep olabilir. Bu durum birçok aktivatör ve inhibitör içeren karışık sistemin ne kadar güçlü olduğunu göstermektedir. Sinyal regülasyonun karmaşıklığını gösteren en derinlemesine çalışılan örnek muhtemelen Xenopus embriyosunun dorsal-ventral patternleşmesi sırasında çoklu TGFBeta sinyallerinin ve inhibitörlerinin çoklu hareketleridir (Reversade ve De Robertis, 2005). Diş morfogenezi sırasında ince ayarın önemli görevleri olduğuna dair artan kanıtlar bulunmaktadır.

4.2.6 Mine Düğümleri ve Tüberkül Şekillenmesi

Birincil mine düğümü azı kuronlarının şekillenmesinde merkezi görevi bulunmaktadır. Tüberkül gelişimini başlatan ikincil mine düğümlerini uyararak diş formunu düzenler (Jernvall ve Theslejff, 2000; Jernvall ve ark., 2000).. Birincil mine düğümlerinin büyüklüğü ve sinyal aktivitesi özellikle kuron büyüklüğü ve tüberkül şekillenmesi ile ilişkilidir. Jernvall ve arkadaşları mine düğümü sinyalleşmesinde etkin

aktivatör, inhibitör ve lateral inhibisyon mekanizmalarını temel alan bir matematik modeli önermişlerdir. Bu model diş tüberküllerinin şekillenmesini tahmin eden ikincil mine düğümleri ve tüberküllerinin tipine özel çeşitli şekillenmeler üretebilir (Salazar-Ciudad ve Jernvall, 2004).

Bu model sonuçları mine düğüm formasyonu etkilenmiş ve azı tüberkül şekillenmesinde değişiklikler gösteren bazı mutant farelerle doğrulanmıştır. İlginç olarak mutant farelerde tüberkül şekillenmesi oldukça farklıdır. Her ne kadar K14-Eda azıları kanguranınkine benzese de, Sostdc1 olmayan mutantların azıları gergedanınkine benzerlik göstermektedir (Kangas ve ark., 2004; Kassai ve ark., 2005). Bunun yanında Spouty mutant farelerinde diş kuronlarında çok ufak değişiklikler olmuş ve normal farelerinkine benzemiştir (Klein ve ark., 2006). Follistatin ve K14-follistation fonksiyonu kazandırılmış farelerde tüberkül şekillenme sorunları görülmektedir (Wang ve ark., 2004). Ayrıca Ectodysplasin baskılanmış kalmalarında ufak mine düğümlerine bağlı tüberkül şekillenme defektleri oluşmaktadır (Pispa ve ark., 1999). Merak uyandırıcı şekilde, Sosdc1, ektodisplazin ve follistatin BMP sinyalleşme ile ilişkilidir. Sosdc1 ve follistatin BMP inhibitörütür. Follistatin ve bir diğer BMP inhibitörü CCN2 ise Ektodisplazin hedefidir (Pummila ve ark., 2007). Bu şekilde BMP sinyalleşeme yolu tüberkül şekillenmesi için düzenleyici olmaktadır. Mutant farelerin tüberkül şekillenmesi diğer türlerin tüberkül şekillenmesini taklit edecek şekilde, tam tip değişikliğinden çok hafif dereceye kadar değişiklikler göstermektedir. Mine düğümlerindeki düzenleyici moleküllerin ekspresyon şekillenmelerinde ince değişiklikler artıkça daha fazla ara fenotiplerin ortaya çıkacağını öne sürebiliriz. Bu durum diğer modern türlerde, fosil türlerinde veya en basitinden varsayım şeklinde bulunmaktadır.

4.2.7 Sürekli Büyüyen Dişlerdeki Regülasyon

Kemirgen kesicilerinin diğer memelilerde bulunmayan iki belirgin özellikleri vardır: sürekli olarak büyümeleri ve minenin asimetrik olarak depo edilmesi. Bu şekilde sadece dudak yüzeyi mine ile kaplı olurken, dil yüzeyi dentin ve sementle kaplı olup azı köklerine benzer. Bu özel şekillenme bir takım özel fonksiyon özellikler getirmektedir: üst ve alt kesicilerle kemirgenin karşılıklı ve kendinden keskinleşen,

rejenere olabilen bıçaklara sahip olmasını sağlar. Aralıksız büyüme hayvanların yaşamları boyunca diş sert dokularını üreten özelleşmiş hücreleri yenilenen kök hücre varlığına sahip olmasını gerektirmektedir. Fare kesicilerinin servikal kenarlarında epitel kök hücreleri bulunduran kök hücre merkezleri bulunur (Harada ve ark., 1999).

Servikal kenarın tipik bir histolojik yapısı bulunmaktadır. Kök hücreler stellat retikulum katmanında bulunur ve doku tek tabaka bazal epitel ile çevrelenmiştir. Kök hücreler ilerleyerek, bazal epitelin içine girerler, diş apeksine doğru hareket ederler, ve farklılaşarak mine şeklinde ameloblastlara dönüşürler. İlginç şekilde, fare kesicilerindeki epitel kök hücre merkezinin morfolojik özellikleri yeni araştırılmış iki insan epitel kök hücre merkezine benzemektedir. Bunlar bağırsakta, saç folikülünde ise *bulge* diye adlandırılır (Moore and Lemischka, 2006). Bunlara benzer şekilde diş dokusunda, epitel hücre katmanı mezenkimal hücrelerle çevrilidir. Bunlar epitel hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması için düzenleyici sinyaller sağladıkları önemlidirler.

Kemirgen kesicisindeki kök hücre merkezini yöneten ve ardından soyun farklılaşmasını sağlayan sinyalleşme düzenleyicileri üzerine iyi çalışılmıştır. Öne sürülen ilk sinyaller FGF3 ve FGF10 idi. Bu ikisi fare kesicilerinde karşılıklı olarak epitel proliferasyonunu uyaran anahtar öğretici sinyallerdir (Harada ve ark., 1999; Harada ve ark., 2002; Wang ve ark., 2007). Etkileri TGFBeta ailesinin iki mezankimal sinyali ile değiştirilir. FGF3 ün anlatımı BMP4 tarafından baskılanır ve Aktivin BMP4 etkisine karşı atağa geçer (Wang ve ark., 2007). Böylece ameloblast progenitörleri için aralıksız destek ve proliferasyon stimülasyonu sağlanır. Keserdeki labio-lingual asimetri servikal kavisteki aşırı büyüme farkının kanıtıdır. İnce lingual servikal kavis sadece birkaç kök hücre barındırırken labial servikal kavis geniştir ve çok sayıda kök hücre barındırır. Bu fark mine formasyonunda ve büyümedeki labio-lingual farklılığı yaratır. Bu fark Aktivin ve BMP dengesi ile belirlenir. Aktivinin labial yönde aşırı asimetrik anlatımı BMP4 ün kök hücreler üzerindeki inhibitör etkisini engeller. Ayrıca, TGFBeta inhibitörü olan ve tercihen lingual epitelde eksprese olan Follistatin, lingual kök hücre merkezinde Aktivinin fonksiyonunu engeller. Bunu BMP4 ün FGF3ü inhibe etmesi ile bu şekilde kök hücre proliferasyonunu azaltması ile yapar

(Wang ve ark., 2007). İlginç olarak epitel hücrelerinin ameloblastlara farklılaştığı alanda, Follistatin lingual olarak BMP4ün artırıcı etkisini inhibe eder ve ameloblast farklılaşması ile mine formasyonunu engeller (Wang ve ark., 2004). Keser asimetirisini kontrol eden diğer bir önemli grup ise Fgf'lerin hücreiçi inhibitörlerini kodlayan Sprouty genleridir. Bu genler mine üreten ameloblastların lingual inhibisyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Klein ve ark., 2008).

Follistatinin aşırı anlatımı kök hücre proliferasyonunu engeller (Aktivin etkisini inhibe ederek) ve keserler küçük kalırlar. Follistatin BMP4 ün ameloblast farklılaşması üzerindeki artırıcı etkisini inhibe ettiği sırada mine oluşumunda engeller. Follistation fonksiyonun ortadan kalmasının ters etkileri vardır: lingual taraftaki kök hücre katmanının büyüklüğünü artırır ve lingual yüzeydeki mine oluşumunu stimüle eder. FGF fonksiyonunun Fgf3 -/-; Fgf10+/- birleşik mutant farelerinde inhibisyonu bastırılmış büyüme ve aşırı mine hipoplazi ile sonuçlanmaktadır. (Wang ve ark., 2007). BMP inhibitörü olan Noggin'in aşırı anlatımı, kök ve progenitör hücrelerde hiperproliferasyona yol açarak kesicilerin aşırı büyümesine sebep olur. Bu kesicilerin mine bulunmaz çünkü BMP kaynaklı ameloblast diferansiyayonu engellenmiştir. (Plikus ve ark., 2005). Çift taraflı Sprouty 4 ve Sproouty 2 genleri baskılanmış farelerde dudak ve dil tarafında mine bulunan genişlemiş kesicilerin oluşmasını sağlar (Klein ve ark., 2008). Farklı transjenik farelerde ortaya çıkan aşırı farklar karmaşık sinyal yollarının epitel kök yuvasını regüle ederek dişin büyüklüğünü ve dudak-dil farklılaşma şeklini belirlediğini göstermektedir. Belli başlı sinyalleşme yollarının yanısıra diğer düzenleyici faktörler proliferasyon ve farklılaşmayı etkiler. Heparin bağlayan MK ve HB-GAM molekülleri birbiri üzerinde düzenleyici etkisi yanısıra, dairesel döngü içinde proliferatif etkileri olup belli başlı sinyalleşme yollarını etkilerler.

4.2.8 Aynı Diş Tiplerinin Gelişimi

İlginç bir şekilde kesicilerin labial ve lingual yüzeyleri dişlerin kuron ve kök alanlarını temsil ettiği varsayılır. Keser diş servikal sınırındaki kök hücre oluşumlarının incelenmesi sonucu dişlerin proksimo-distal şekilleşmesinde etkisi olduğu görülmektedir. Kuron oluşumundan kökün oluşumuna aralıksız devamı

servikal döngü içindeki kök hücrelerin azalması sonucu sadece çift katman bazal epitel içeren Hertwig epitel kınına denen yapıya dönüşmesine sebep olur. Kurondan köke doğru olan dönüşümün düzenleyici mekanizmasının doğası tam bilinmemektedir. Sürekli büyüyen dişler ile süreli büyüyen dişler arasında mezenkimal Fgf10'da azalma vardır. (Kettunen ve ark., 2000; Tummers ve Thesleff, 2003). Nfı-C/Ctf -/- olan transjenik farelerde ise kökler tamamen eksiktir. (Steele-Perkins ve ark., 2003). Shh sinyalleşmesi kök gelişimi ile ilişkilendirilmiş olup, etkilenmesi sonucu kısa kökler ve diş sürmesinde bozulma görülmektedir (Nakatomi ve ark., 2006). Ayrıca BMP sinyalleşmesinin kök gelişimi üzerinde önemli rolü olduğu, kök ucundaki mezenkimde Bmp2 ve Bmp4'ün eksprese olması ve Msx2'nin Hertwig Epitel kınında eksprese olması ile gösterilmiştir (Yamashiro ve ark., 2003). Transjenik farelerde K14 promoteri altında noggin'in eksprese olduğu yerlerde kök gelişimi duraksamış ve patternleşme etkilenmiştir (Plikus ve ark., 2005). Kök oluşumu sırasında bazı sinyalleşme yollarının aktif olduğu tahmin edilse de günümüzdeki genetik mekanizmalar ile kök gelişimi tam anlaşılamamıştır.

Memeli dişlerinin soy durumu süreli büyüme ve göreceli olarak küçük kuron kök oranı ile karakterizedir. Servikal döngü transiyonundaki Herwig Epitel kınına dönüşmesindeki gecikme kuron boyunun uzamasına ve bu yüzden kök boyuna oranla daha uzun kuronların oluşmasını açıklamaktadır (Tummers ve Thesleff, 2003; MacFadden, 2000). Yüksek kuron boyu ve sürekli kuron büyümesi birçok memelide görülen bir durumdur. Farelerde sürekli büyüyen molarlarda benzer anatomik servikal döngü kesicilerde de bulunmaktadır. (Tummers ve Thesleff, 2003). Aynı şekilde guinea domuzlarında farelerdekine benzer servikal döngü yapıları bulunmuştur. Benzer bir yapı tembel hayvanın azı dişlerinin sürekli büyümesinde görülmüştür (Tummers ve Thesleff, 2008). Bu büyümenin diğerlerinden farkı minenin oluşmaması ve köklerin sürekli olarak büyümesidir. Bu durum soya bağlı kısa kuronlu süreli büyüme modelinden, devamlı büyüyen kuronsuz bir modele geçişin örneğidir. Düzenleyici ağların karmaşıklığı bize her dişin kendi şekil ve yapısını oluşturup geçmişte kendi düzenleme mekanizmasını kurduğunu göstermektedir.

4.3 Artı Diş

Artı dişler için literatürde şimdiye kadar birçok tanım kullanılmıştır. 20 süt dişi ve 32 kalıcı diş şeklindeki normal sıralama dışındaki fazla diş oluşumları (Schulze, 1970); normal sayıdan fazla dişler (Nazif ve ark. 1983); normal seri dışındaki ek dişler (Garvey ve ark., 1999); 20 süt dişi ve 32 kalıcı diş dışındaki dişler veya diş benzeri oluşumlar (Schröder, 2000); normal olan dışındaki ek dişler (Gabris ve ark., 2006); normal diş formülünden fazla dişler (Montenegro ve ark., 2006) şeklinde tanımlar kullanılmıştır.

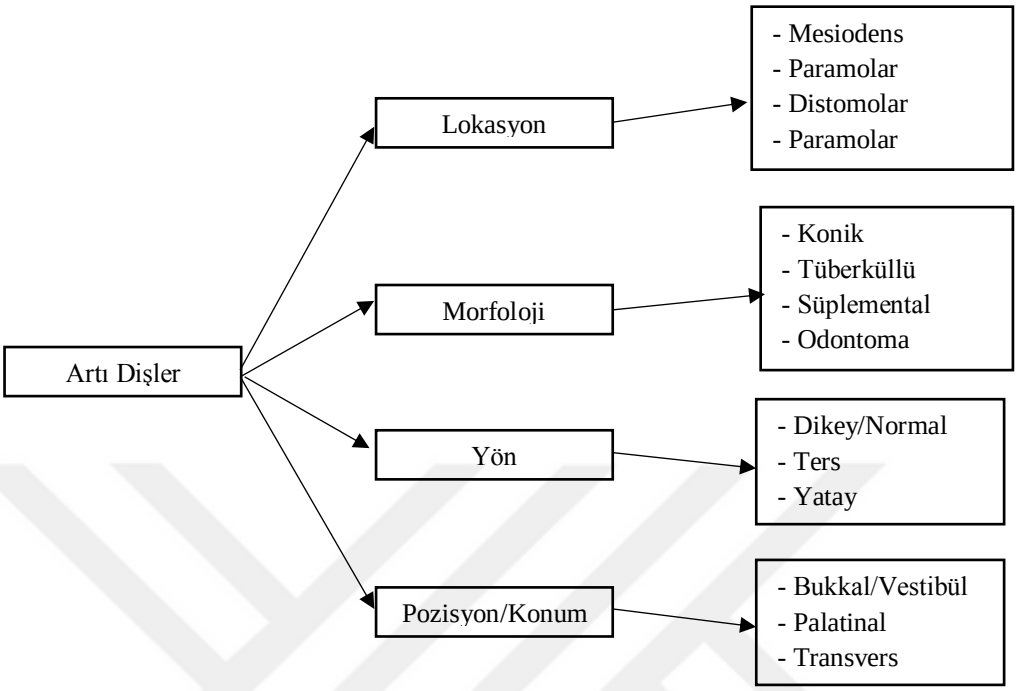
Bu tanımlar fazla dişlerin normal dişlerden fazlaca olduğunu gösterse de, fazla dişlere ait gelişimsel bozukluğu tam doğru şekilde tanımlayamazlar. Ömer ve arkadaşlarının artı diş tanımına göre; diş arkının herhangi bir belirlenen bölgesinde olması gereken diş sayısından fazla diş germi kaynaklı odontojenik yapı veya diştir (Ömer ve ark., 2010).

Tablo 2: Artı diş görülen sendromik hastalıklar

Sendrom	**OMIM No.**	**İlişkili Faktörler**	**Gen**	**Molekül**	**Kalıtım**	**Sitoband**
Klediokraniyal Displazi (CCD)	119600	Kemik displazisi	RUNX2 (CBFA1)	Transkripsiyon faktörü	Otozomal Dominant	6p21
Ailesel Adenomatöz Polipozis	175100	Kolon polipozisi, odontomlar, artı dişler, sürmemiş dişler	APC	Wnt nin negatif regülaörü	Otozomal Dominant	5q21-q22
Robinow Sendromu	180700	Mezomelik uzuv kısalması, yüz ve genital anomaliler	WNT5A		Otozomal Dominant	3p
	268310	Kesici ve üst dişetlerinin açığa çıkaran üçgen ağız Hipodonti Hiperdonti Kök malformasyonu Dişeti hipertrofisi, ankiglosi ve mikrognati Geniş retromolar kenar, alveolar kenar deformasyon ve maloklüzyonu	ROR2		Otozomal Resesif	9q22.31

Sendrom	**OMIM No.**	**İlişkili Faktörler**	**Gen**	**Moleküller**	**Kalıtım**	**Sitoband**
Nance-Horan Sendromu	302350	Katarakt, sıradışı yüz Mesiodens, konik şekilde dişler	NHS	Nükleer protein	X	Xp22.13
Triko-Rino-Falangeal Sendromları	190350	Saç, yüz, seçilmiş kemikler, ince ve yavaş büyüyen saç, geniş nazal uç, uzun ve düz filtrum, ince üst dudak, geniş ve çıkıntılı kulaklar, falangeal kemik epifizlerinin konik şekilli olması, kalça malformasyonları	TRPS1	Nükleer protein	Otozomal Dominant	8q23.3
	150230		TRPS1 ve EXT1			8q24.11-q24.13
	190351		TRPS1			8q23.3
Opitz G/BBB sendromu	300000	Göz anomalileri, laringotrakeosofageal kleft, konjenital kalp hastalığı, genitouriner anomaliler ve gostrointestinal hastalıklar Mandibular ön bölgede artı dişler, ankiloglosi, CLP	MID1	Protein fosfotaz 2Ac nin mikrotübüle bağlı katalitik alt ünitinin übikitine özel düzenleyicisi	X e bağlı resesif	Xp22
Ellis-van Creveld	225500	Neonatal dişler, hipodonti, iskeletsel displazi, kısa uzuv, kısa kaburga, postaksiyal polidaktili ve ince malforme tırnak ve dişler Konjenital kalp defektleri	EVC1, EVC2	Silia Shh sinyalleşmesinin positif protein transmembranı	Otozomal resesif	4p16
Kraniyosinoztozis ve diş anomalileri (Kreiborg-Pakistani sendromu)	614188	Kraniyostozis, maksiller hipoplazi, gecikmiş diş sürmesi, artı dişler	IL11RA	IL11RA geninde missense mutasyonu	Otozomal resesif	9p13.3
Mikrofitalmi (Anofitalmi-Özofegal-Genital Sendrom)	206900	Anofitalmi veya mikrofitalmi, çeşitli beyin anomalileri, çok sayıda artı diş	SOX2	SOX2 geni heterozigoz mutasyonu		3q26.33

4.3.1. Non-sendromik Artı Diş Sınıflaması



Şekil 3: Non-sendromik artı diş sınıflaması

Artı dişlerin sınıflaması için birçok öneri bulunsa da genellikle morfolojileri ve konumlarına göre sınıflandırılırlar. Morfolojik sınıflama; konik, tüberculate, süplemental ve odontoma şeklindedir. Konumlarına göre ise; mesiodens, parapremolar, paramolar, distomolar şeklindedir (Bolk, 1914; Scheiner ve Sampson, 1997).

Birçok yazar mesiodens'leri orta keser dişler arasında bulunan konik şekilli dişler olarak tanımlar. Bu Bolk tarafından 1917'deki ilk makalesinde belirttiği durumun yanlış yorumlanmasıdır. Yazar bu tip dişleri "Kayıp Keser" olarak tanımlamış ve diğer artı dişlerden ayırt edebilmek için "en mesial konumlu diş" anlamına gelen "mesiodens" olarak tanımlamıştır. Ayrıca çizimlerinde mesiodens'in premaksillanın herhangi bir yerinde tek taraflı veya çift taraflı olabileceğini göstermiştir (Bolk, 1917).

Bolk aynı zamanda bir diğer yayınında "paramolar" adını verdiği, azı dişlerin özelliklerini taşımayan ve azı diş sırasının başında yer alan bir anomaliyi

tanımlamıştır. Aynı şekilde azı diş sırasının sonunda yer alan anomaliler için "distomolar" terimini geliştirmiştir.

4.3.2 Non-sendromik Artı Dişlerin Prevalansı

Artı dişlerin rapor edilen prevalansı süt dişlerinde %0,05 (Miyoshi ve ark., 2000) ile %7,8 (Huang ve ark., 1992) arasında, kalıcı dişlerde ise %0 (Ingervall, 1974) ile % 6,7 (Van der Merwe ve ark., 2008) arasında değişiklik göstermektedir. Gruplar arasındaki bu belirgin farkların örnek grubundaki sayı, çalışma grubu tasarımı ve farklı etnik gruplardan oluşması ile teşhis yöntemlerinin şekli ve kullanım sıklığı etkilemektedir.

Tablo 4: Non-sendromik artı diş hastaları ile ilgili yapılan son çalışmalar

Çalışma	Yıl	Hasta Sayısı	Cinsiyet Oranı	Yaş Aralığı	Ortalama Yaş	Artı Diş Sayısı	1 AD	2 AD	>3 AD
Patchett ve ark.	2001	159	2,2:1	4-13	9 yaş 4 ay	215	110	43	6
Rajab ve Hamdan	2002	152	2,2:1	5-15	10 yaş 3 ay	202	117	28	7
Salcido-Garcia ve ark.	2004	72	1,1:1	2-55	14 yaş ve 4 ay	102	63	-	-
Fernandez Montenegro ve ark.	2006	102	1,4:1	5-56	17,6 yaş	147	77	14	9
Liu ve ark.	2007	487	2,6:1	5-44	-	626	351	133	3
Leco-Berrocal ve ark.	2007	21	2,4:1	7-34	20 yaş 2 ay	24	-	-	-
Ferres-Padro ve ark.	2007	79	1,8:1	5-19	10 yaş 3 ay	113	52	22	5
Anthonappa ve ark.	2008	208	3,1:1	2-16	7,3 yaş	283	128	-	-
De Oliveira ve ark.	2008	305	2,1:1	3-16	9,3 yaş	460	192	94	80
Hong ve ark.	2009	431	4:1	-	8,8 yaş	471	-	-	-
Küchler ve ark.	2011	27	2:1	6-12	8,9 yaş	29	25	2	0
Mukhopadhyay	2011	64	1,78:1	4-14	-	78	50	14	0
Kara ve ark.	2011	288	1:1,29	14-43	23,45 yaş	351	227	59	2
Minguez-Martinez ve ark.	2012	200	2,3:1	2-14	8,1 yaş	303	135	51	14
Ramesh ve ark.	2013	55	1:2,05	14	14	82	28	-	-
Arıkan ve ark.	2013	74	1,8:1	3-16	9,53	84	52	-	-
Karayılmaz ve ark.	2013	179	1,94:1	6-18	9,79	219	147	33	2
Singh ve ark.	2014	46	1,3:1	6-14	-	55	38	7	1
Tatlı ve ark.	2014	112	1,03:1	5-58	19,5	156	85	21	6
Anegundi ve ark.	2014	790	1,55:1	3-14	-	847	673	85	2
Demiriz ve ark.	2015	141	1,43:1	5-18	-	177	110	29	2
Ferres-Amat ve ark.	2015	33	2:1	1-17	6 Yaş 4 ay	46	26	6	1
Burhan ve ark.	2015	39	1,78:1	12,2-20,5	16,13	46	38	4	-
Uluakay ve ark.,	2015	51		8-14	11,4	55	47	4	-

Cinsiyet farklılıkları birçok yazar tarafından erkeklerde daha fazla görülecek şekilde rapor edilmiştir. Erkeklerde kadınlara göre 2:1 oranı birçok yazar tarafından Kafkas kökenli çalışma gruplarında rapor edilmiştir (Byrd, 1943; Ravn, 1971; Brook, 1974; Högström ve Andersson, 1987; Mitchell, 1989).

Artı dişlerin prevelans ölçümleri yapılırken mümkün olduğunca pedodonti kliniklerinde ilk muayeneye gelen hastaların dahil edilmesi çok önemlidir. Çocukluk dönemi sonrasında yapılan muayenelerde çoğu zaman daha önce farklı kliniklerde çekilmiş, herhangi bir kaydı bulunmayan hastalar olabilmektedir. Bu nedenden ötürü ileri yaşları kapsayan prevalans çalışmalarında artı diş görülme cinsiyet oranları değişmektedir. Demiriz ve arkadaşlarının 5 ile 18 yaşları arasında 6535 hastada yaptıkları çalışmada erkek-kız oranı 1,43:1 bulunurken, 18 yaş ve üstü 7348 hastada yaptıkları çalışmada bu oran 1,27:1 bulunmuştur (Demiriz ve ark., 2015).

4.3.3 Non-sendromik Artı Diş Tanısı

4.3.3.1 Anamnez

Eksik bir orta keser diş, diğer orta keser diş ağızda aylardır bulunduğundan dolayı bir semptom göstergesi olabilir. Diğer kesici dişler tamamen sürüp, eksik dişin olduğu alanın kapanmasına sebep olmaya başlamasıyla ailelerin endişe gittikçe artar (Mitchell ve ark., 1992). En doğrusu çocukların önceden bir çocuk diş hekimine rutin muayene olmaları ve durum görüldüğünde ortodontist tarafından görüş alınmasıdır. Bazen hastalar doğrudan ortodontiste de gidebilir. Travma sonrası akut gömülme vakaları hariç hastaların hiçbirinde ağrı ve şişlik gibi semptomlar görülmez (Kjaer ve ark., 2001).

Sürmemiş kalıcı orta keseri olan bir hasta ilk defa geldiğinde genel tıbbi anamnezi tam olarak kaydedilmelidir. Cerrahi girişimin dahil olacağı bir tedavi planlaması gereksinimi her zaman akılda olmalıdır. Önceki hastalıklar; özellikle akut

romatizmal ateş, alınan ilaçlar, kanama yatkınlığı gibi sorular sorulmalı ve not edilmelidir.

Daha önceki olası travma geçmişiyle ilgili bütün sorular sorulmalıdır. Aileye çocuğun travmaya yatkın olup olmadığı ile ilgili sorular sorulmalıdır. Bu soruya verilen doğrudan cevaplar; bisiklet kazaları, sandalye ve merdivenden düşmeler, herhangi bir oyun sırasındaki ağız yaralanmaları dikkatlice kayıt edilmeli ve olay sırasına göre yazılmalıdır (Andreasen, 1994). Saklanmış olası bir taciz durumundan şüphelenildiği durumlar kayıt edilmeli ve polise bildirilmelidir. Bölümümüzde, Kural ve arkadaşlarının yaptıkları tez çalışmalarında çocuklarda ihmal ve istismarın sonuçlarının dişhekimleri tarafından fark edilebilmesinin önemi vurgulanmıştır (Kural ve ark., 2014).

4.3.3.2 Klinik Muayene

Hastaların birçoğunun diş tedavi geçmişi ve anamnezini kısa muayene sonrası ortaya çıkarmak çok kolaydır. Fissür örtücü, dolguların varlığı; diş eksikliği, dişeti iltihabı, ağız hijyeni hem hastanın gösterdiği önemi hem de dişhekiminin koruyucu ve tedavi edici işlemlerine verdiği önemi gösterir. Hasta şikayet ile geldiğinde genellikle süt keser dişinin varlığı veya yokluğu genellikle önemsizdir. Genellikle sürmemiş dişin her iki tarafındaki dişler boşluğa doğru yatmış durumda ve sürme için yetersiz boşluk olduğu görülür. Yan yana bulunan dişlerin uzun akslarının köke doğru ayrılıyor konumda bulunmaları olası bir teşhis edilmemiş bir engelin göstergesi olabilir.

4.3.3.3 Palpasyon

Diş sürmesine engel bulunan vakalarda, süremeyiş diş genelde alveolar sırtın dudak tarafında bulunur. Buna ek olarak ve küçük düzensiz alveolar kalınlaşmalar bulunabilir. Bunlar en iyi palpasyonla tespit edilebilir. Her zaman labio-lingual sırtta kalınlaşma olur. Eğer alveolar sırtın kenarına doğru incelme oluyorsa dişlerin bu seviyede olmadığının göstergesi olabilir.

Palpasyonun bu bölgedeki önemi göz ardı edilmemelidir çünkü gerektiği gibi yapılmadığında önemli bir teşhis kaçırılmış olabilir. Dilasere bir orta keser dişin varlığı ancak en derin labial sulkusa yapılan klinik muayene ile tespit edilebilir. Normalde üst orta hat alanı anterior nazal spinanın çıkıntısı ile belirgin ve her iki tarafında hafif çöküntü hissedilir. Dilasere bir dişin kuronunun palatal yüzeyi ileri doğru bakar hafif çöküntü olması gereken yerde şişlik meydana getirir. Gerilmiş alanda oral mukozanın üst dudağı yukarı doğru iterek serbestçe hareket ettiği görülebilir. Bu durum dişin singulum hattına belirginleştirir.

Dilasere orta keserlerin palpasyonu iki yerden yapılabilir. Dişin koronal kısmının anormal pozisyonu yüzünde, kök kısmının sonraki gelişimi linguale doğru eğilimli olabilir ve kök ucunun kapanmasının ileri safhalarında, apeks ucu küçük sert bir nokta olarak damakta hissedilebilir. Bu durum birçok hekimin gözardı ettiği ve çok kolay kolay bulamayacağı bir ayrıntıdır. Kuron konumunun yanlış teşhisi sıradışı bir durumdur çünkü hem ortodontistin hem de çene cerrahisi uzmanının klinik muayene ve radyografik muayene sonrası aynı hatayı yapmaları biraz zordur (Stewart, 1978).

4.3.3.4 Radyografik Muayene

Sürmemiş orta keser diş vakalarının çoğunda bu durum açıkça bir takım patolojiler ile görülür. Sert doku engelleri (artı diş tipleri), yumuşak doku lezyonları (kistler, tümörler) ve sürmemiş dişin kök ve kuron morfolojisi. Bu noktadan sonra dişin sürmeme nedeninin ortaya çıkması kolaylaşmaktadır.

Eğer artı dişler veya odontomalar radyografide görülüyorsa; orta hatta ve kesici dişlere olan büyüklüklerini, sayılarını ve mezio-distal ilişkilerini de bağdaştırmak gerekmektedir. Buna rağmen bunların komşu dişlere göre labio-lingual konumları bu radyografiden anlaşılmayabilir. Periapikal radyografiler horizontal plana göre oblik olarak açılandığı için, labial konumda bulunan artı diş, palatinal bölgede bulunana göre aynı yüksekte olmasına rağmen vertikal plandan daha aşağıda görülür. Buna bağlı olarak, dişin yüksekliğinin değerlendirilmesi doğrudan dişin labio-lingual konumuna

bağlıdır. Sürmüş dişin gömülü dişe göre bukko-lingual ilişkisinin tespit edilmesi, radyografi tüpünün vertikal kaydırılma metodunu temel almaktadır.

Etiyolojinin sürmemiş artı diş olduğu ve tedaviye başlayacak yaşta olan hastalarda, gerçek lateral, tanjansiyel radyografi; orta ve yan keserlerin, süt ve sürmemiş kaninlerin, artı dişlerin üst üste görüntülenmesinden dolayı işe yarar değildir. Paralaks ilkesini kullanarak, daha distal bir noktadan yönlendirilmiş ikincil bir periapikal radyografi, sürmemiş dişin göreceli konumunun tespit edilmesine yardımcı olacaktır. Benzer şekilde, aynı paralaks ilkesini bu sefer vertikal yönde kullanarak, ön bölge oklüzal radyografisi sürmemiş dişlerin görüntülerinin ayırt edilmesinde kullanılabilir. Bu şekilde ilişkili yüksekliklerin hesaplanması için gerekli bilgi edinilebilir (Chaushu ve ark., 2003).

Ön dişin uzun aksı boyunca yönlendirilecek, iyi bir verteks oklüzal radyografi, özellikle yer değiştirme varsa, dişin labio-lingual konumu hakkında anlaşılır bir kanıt sağlar. Buna rağmen yeterli kontrastın sağlanabilmesi için gereken uzun ışınlama süresi sonucu kar/zarar yararlılığı bu metodun kullanılmamasına sebep olmuştur.

Labial yönde yer değiştirmiş dilasere orta keser dişlerin periapkikal radyografide oldukça belirgin bir görüntüsü vardır. Kuronal kısmın uzun aksı X ışını geliş yönüne paralel yönde bulunur. Böylece kuronun kesit şeklindeki görüntüsü ile kökün en uzun kısmının üst üste bindiği yoğun bir görüntü elde edilir. Bu durumda labial yüzey yukarı doğru bakacak şekilde ve singulum aşağıda kalacak şekilde olduğu anlaşılır. Kökün apikal kısmı, gelişimi devam ettikçe labial yönde ve vertikal arka doğru 90 derece veya daha fazla açı yapacak şekilde dönebilir. Kökün apeksi dişin labial yüzey görüntüsünün üstünden uzayacak şekilde kısa bir "kuyruk" gibi görünür.

Periapikal radyografi dişin alveol kemiğindeki yüksekliği hakkında bir fikir verse dahi dişin kök-insizal konumu tam tespit edilemez. Teşhisin teyidi ve şiddeti tanjansiyal veya lateral sefalometrik radyografi ile tam anlaşılabilir. Bu görüntü özellikle dişin morfolojisi, yüksekliği ve uzun akslarının tam konumu ile ilgili ayrıntılı bilgi verir.

Bilgisayarlı tomografiler gömülü keser vakalarında, dişim tam konumunun belirlenmesini ve üst üste binmeleri elenmesini sağlar. Aynı zamanda kökteki bükülmeyi tam olarak tespit ederek, tork uygulandıktan sonra dişe apikoektomi gerekip gerekmeyeceği hakkında fikir verir. Benzer şekilde, gömülü dişin artı dişe göre konumunun tam tespiti cerrahın nereden başlangıç flebini açmaya ve her iki dişi birbirinden daha iyi ayırt etmeye yardım eder. Aynı zamanda ortodontik tedavi sırasında gömülü dişin sürdürülmesi için gerekli aygıtların doğru şekilde hazırlanmasına için yararlı bilgi sağlar (Chaushu ve ark., 2004).

4.3.4 Non-sendromik Artı Diş Tedavi Zamanlaması

Sürme gecikmesine sebep olacak her tür engel veya diğer patolojiler herhangi bir ortodontik tedaviye ihtiyaç duyulmadan önce kaldırılmalıdır. Hastaların çocuk dişhekimine ilk ziyareti en geç 3 yaşına kadar olması önerilmektedir (Witsenberg ve Boering, 1981). Ara yüz çürüklerinin tespitinde genellikle ısırma radyografileri alınmakta ve protokolün devamı niteliğinde ön bölge periapikal görüntüleri de eklenmektedir. Bu radyografide, gelişmekte olan orta keser kalıcı dişler, orta hat sütürü ile birbirinden ayrılmış olarak ve her iki tarafında yan keser dişlerle örtüşecek şekilde görülür. Bu radyografi aynı zamanda orta hatta bulunan herhangi bir artı dişin varlığını da ortaya çıkarır. Bu konumda bulunan artı diş genellikle sürmeye engel olmaz fakat bu olasılık vardır.

Bu aşamada hasta velisi ve dişhekimi arasındaki iletişim ve işbirliği ile en uygun önleyici tedavi protokolü takip edilerek sonra oluşabilecek sorunlar engellenmeye çalışılır. Mesiodensin çekimi sürmemiş kalıcı dişlerin herhangi bir tedaviye kalmadan ve tam yerine, doğru gelişebilmesi hekim tarafından tercih edilir. Erken cerrahi, oldukça dar olan bu bölgede genellikle dental foliküllere gelebilecek istenmeyen hasardan dolayı cerrah tarafından pek istenmez. Aynı zamanda bu işlem gerekli yolu açabilmek için süt dişlerinin çekimi olmadan yapılamamaktadır. Eğer kalıcı keserlerin sürme zamanları yakın değilse, süt dişleri çekimini takip eden yara

tamiri ve doku kalınlaşması sonradan sürecek kalıcı dişlerin normal sürmelerini geciktirebilir.

Genel olarak cerrahın fikrinin alınmasının yanı sıra, kök gelişimi ile tespit edilen çocuğun dişlerinin normal sürmesi başladığında, çekim doğrudan yapılması söz konusu olabilir.

Buna rağmen travma bir kere meydana gelip dilaserasyon başladıktan sonra herhangi önleyici tedavi bulunmamaktadır. Hasta girişimsel tedavi için uygun zamanı beklemek zorundadır.

Hastada bir orta keser diş ve her iki yan keser diş sürmüş olduğunda, diğer orta keser diş için sürme zamanı gecikmiştir. Gömülü diş periapikal radyografide olması gereken kök boyunun üçte iki oluşmuş şekilde, yani gelişimsel olarak sürme zamanının geldiğini gösterir şekilde bulunur. Bu yüzden ortodontik ve cerrahi uygulamalar hem dilasere hem de engel bulunan gömülü vakalar için endikedir.

Genellikle bu erken safhada, belki diğer ortodontik tedaviler için de gereksinim olabilir ve normalde bunun başlanması için üç ila dört yıl beklenmesi önerilebilir. Fakat tek aşamalı bir ortodontik tedavi planlaması için bütün dişlerin kalıcı dentisyona gelmesini bekleyerek gömülü orta keserin tedavisini geciktirmek mantıklı değildir. Gömülü dişin hizalanması en etkili şekilde diğer ayrıntılara bakılmadan yapılmalıdır. Kökün düzeltilmesi ve tork verilmesi belirtildiği üzere yapılmalı fakat ideal, estetik ve son hizalama bu safhanın amacı değil ve kontrendikedir.

4.3.5 Non-sendromik Artı Diş Etiyolojisi

Birçok hipotez ortaya konulmasına rağmen artı dişlerin etiyolojisi hala tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde, artı dişlerin oluşumuna, zamanlamasına dair herhangi bir kanıt veya hipotez bulunmaktadır. Artı dişler hem süt hem karışık hem sürekli dişlenmede bulunması sonraki komplikasyonlarla oluşmasında bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda moleküler genetik alanındaki gelişmeler diş

oluşumu ve gelişiminin farklı mekanizmaları anlamamızı ilerletmiştir. Non-sendromik artı dişlerin etiyolojisi için birçok hipotez önerilmiştir. Aşağıda bu hipotezler açıklanmaktadır.

4.3.5.1 Atavizm

Atavizm; "türlerdeki soydan gelen durumların tekrarlanması veya soya benzer şekle dönmesi" şeklinde tanımlanmaktadır. Asıl olarak, artı diş oluşumunun doğanın dişleri yeniden çıkarmanın bir yolu olarak kabul edilmiş olup, evrim sırasında kaybolan bir süreç olduğu düşünülmektedir. Buna rağmen, bu fikir büyük oranda ret edilmiştir. Çünkü; (i) insanlarda ve alt memelilerde ikincil bir kanin dişinin eski haline dönmesi düşünülemez, çünkü geriye dönecek kalıtsal bir durum bulunmamaktadır, (ii) üçüncü bir kesici, üçüncü bir premolar veya dördüncü bir azı olması aşırı uzun zamanlardaki, kırk milyon yıl gibi, süreler alacağından bu teoriyi desteklemek için yeterli değildir, (iii) artı dişler ektopik konumlarda oluşular, bozuk morfolojiye sahiptirler ve genelde ayrı olurlar (iv) bütün memelilerin diş evrimlerinin paleontolojik kayıtlarında artı dişlere bakıldığında atavizm için herhangi bir kanıt görülmemiştir.

4.3.5.2 Embriyolojik Aberasyonlar

Bazı teoriler artı dişlerin gelişiminin embriyolojik oluşum sırasındaki diş germlerinin dikotomisi, dental laminanın hiperaktivitesi, epitel hücrelerin artıkları gibi aberasyonlara bağlamaktadır.

4.3.5.3 Dikotomi

Dikotomi kelimesi eşit veya eşit olmayan iki parçaya ayrılma demektedir. Bu yüzden bu bölünmenin artı diş oluşumuna sebep olacak diş tomurcuğunu ortaya çıkardığı düşünülmektedir. Bu bölünmeler embriyonik oluşum ve travma sırasında aberasyonlara istinaden olabilir. Diş tomurcuğunun tam ve eşit bölünmesi suplemental veya eş bir diş oluşmasıyla sonuçlanabildiği, eşit olmayan bir bölünmenin ise normal bir diş ile göreceli olarak küçük boyutlarda başka bir diş oluşturduğu düşünülmektedir.

Premaksilla ve intermaksilla kemikleri farklı değişkenleri ortaya çıkarmaktadır. Genellikle, kesici sütür alveolde hemen kaninin yanında (%50), kanin ve lateral arasında (%42), kanin ile premolar arasında (%5) bitmektedir. Bunların yanında bu bölgede bulunan sayısız foramen ve kanalların çeşitli kemik çıkıntıları ile birleşmesi sonucu gelişmekte olan diş tomurcuklarının premaksillada bölünmeye yönlendirmektedir.

Birkaç hayvan deneyi travmanın prolifere epitel kalıntılarını stimule ettiğini göstermiştir. Bunlar genellikle Hertwig epitel kınından türemiş ve septumlar arasındaki kalıntıları artı dişlerin oluşmasına sebep hücrelerin farklılaşmasını sağlar. Ranta ve Ylipaavalniemi rapor ettiği iki hastada premolar bölgede meydana gelen fraktür kırıklarında, yıllar sonra kırık hatlarına bitişik bölgede artı dişler oluştuğunu rapor etmiştir.

Her ne kadar çene kırığı ile artı dişler arasında sebep-sonuç ilişkisi olduğu önerilse de bir olgunun bulgularının literatürde bir kanıt oluşturmasından daha çok tesadüf olabilme olasılığı daha yüksektir. Ayrıca mandibular artı premolar diş geçmişi olan hastaların çoğunda kırık hikayesi bulunmamaktadır.

4.3.5.4 Hiperaktivite ve Dental Lamina

Embriyolojik çalışmaları temel alan, Black in 1909 önerdiği artı dişlerin oluşumu ile ilgili açıklaması araştırmacılar tarafından genel olarak kabul görür. Özet olarak, mine organının diş oluşumunda ilk başlangıcından itibaren en önemli yapısı olduğu, ve varlığının konektif dokudaki dentin papillasının oluşumuna sebep olduğu belirtilmiştir. Bu mine organı, embriyonik oral epitelden derive olmuş düz plaka olan dental laminanın proliferasyonundan ortaya çıkar. Bunun yanında, papillanın ve dişin boyutu ve şekli mine organının boyut ve şekline bağlıdır. Eğer proliferasyon uygun sıra ve sayıda olursa, diğer dental organlar her biri uygun düzende ve sayıda gelişirler (Black, 1909).

Dental lamina kökenli hücrelerin eşzamanlı çalışması genellikle mine organının oluşmasını sağlar fakat her seferinde tek seferlik proliferasyon yerine bazen ek tomurcuklar oluşması gözlenir. Ancak laminadaki epitel hücrelerinin proliferasyonu, yeterli boyut ve derinlikte ise mine organının ve ardından diş oluşmasına izin verir.

Bu yüzden artı dişler iki kaynaktan meydana gelebilir; (i) epitel bandından veya normal dişleri oluşturan epitel kordların tomurcuklarından kaynaklı fazla tomurcuklardan, (ii) epitel kordların birbirinden ayrılması sırasında oluşan kalıcı epitel hücre kıvrımlarından.

4.3.5.5 İlerleyici Alan Teorisi

Osborn, Lunsden, Schwartz'ın çalışmalarına dayanarak artı dişlerin, belli sıralar sonunda diş üreten prolifere diş sıraları sonucu oluştuğunu önermişlerdir. Bu yüzden, artı bir dişin normal bir kesici, kanin veya azı diş serisinin anterior veya posteriorinde olması ile belirgindir. Bu hipotez antropoid primat örnekleri üzerine yapılan az sayıda çalışma ile desteklenmiştir (Osborn, 1971).

4.3.5.6 Birleştirilmiş Etiyoloji

Bu hipotez Brook tarafından 1984 yılında önerilmiştir. Multi faktöryel bir modele bağlı olarak bu hipotez diş sayı ve botuna bağlı olarak devamlı ölçü ve eşikler sergiler. Genetik ve çevresel faktörlerin kümülatif etkileri ölçekteki konumu belirler. Bu polijenik yarı devamlı özellikli model artı dişlerin megadonti, oligodonti ve mikrodonti gibi diğer anomaliler ile beraber görülmesini açıklamaktadır. Bazen bir kromozom veya tek bir gen anomalisi artı dişlerin diğer anomalilere göre oluş sıklığını açıklayabilmektedir (Brook, 1984).

4.3.5.7 Herediter Teori

Literatürde, artı dişi olanların akrabalarında artı diş olma yatkınlığını gösteren birçok olgu sunumu bulunmaktadır. Kawashima ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir anket çalışmasında ailesinde artı diş olanların olmayanlara göre 5,9 kat daha fazla meydana gelme ihtimali olduğunu göstermiştir. Brunin ve arkadaşları (1957) artı dişer erkeklerde kadınlara göre daha fazla görüldüğünden cinsiyete bağlı bir geçiş önermişlerdir. Niswander ve Sujaku ise Japon popülasyonunda yaptıkları çalışmalarında artı diş oluşumunun kadınlarda otozomal resesif bir genin hafif penetransı ile bir geçiş olabileceği hipotezini sunmuşlardır (Kawashima ve ark., 2006; Niswander ve Sujaku, 1963)

Finn 1967'de sunduğu bir olgu raporunda üç nesli içeren ve kan bağı ile birbirine bağlı 5 ailenin soyağacında 14 kadının etkilenmesi ve 3 erkekte ise artı diş görülmemesi üzerine X genine bağlı kadınlarla sınırlı otozomal dominant bir geçiş olduğunu önermiştir. Cadenat ve arkadaşları (1977) ise resesif otozomal bir gen ile X krozomomu üzerinde baskılayıcı bir gen olduğunu önermişlerdir. Buna rağmen birçok yazar bazı nesillerde artı dişlerin hiç oluşmadığına dayanarak otozomal dominant bir geçiş olduğunu savunmaktadır (Sedano ve ark.,1969; Batra ve ark., 2005; Wang ve ark., 2007).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Klinik Değerlendirme

Bu tez çalışmasının klinik aşaması, Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniğinde Eylül 2011 - Nisan 2015 tarihleri arasında yapıldı. Kliniğimize ilk defa başvuran hastalara artı diş tanısı klinik ve radyografik verilere dayanılarak konuldu.

Çalışmaya başlamadan önce Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan Klinik Araştırma B.30.2.MAR.0.01.02/ AEK/130001789 numaralı kararı ile izin alındı. (Ek 1) Çalışmaya katılmak isteyen bütün hasta ve kontrol grubu velilerinden yazılı onam formu alındı (Ek 2).

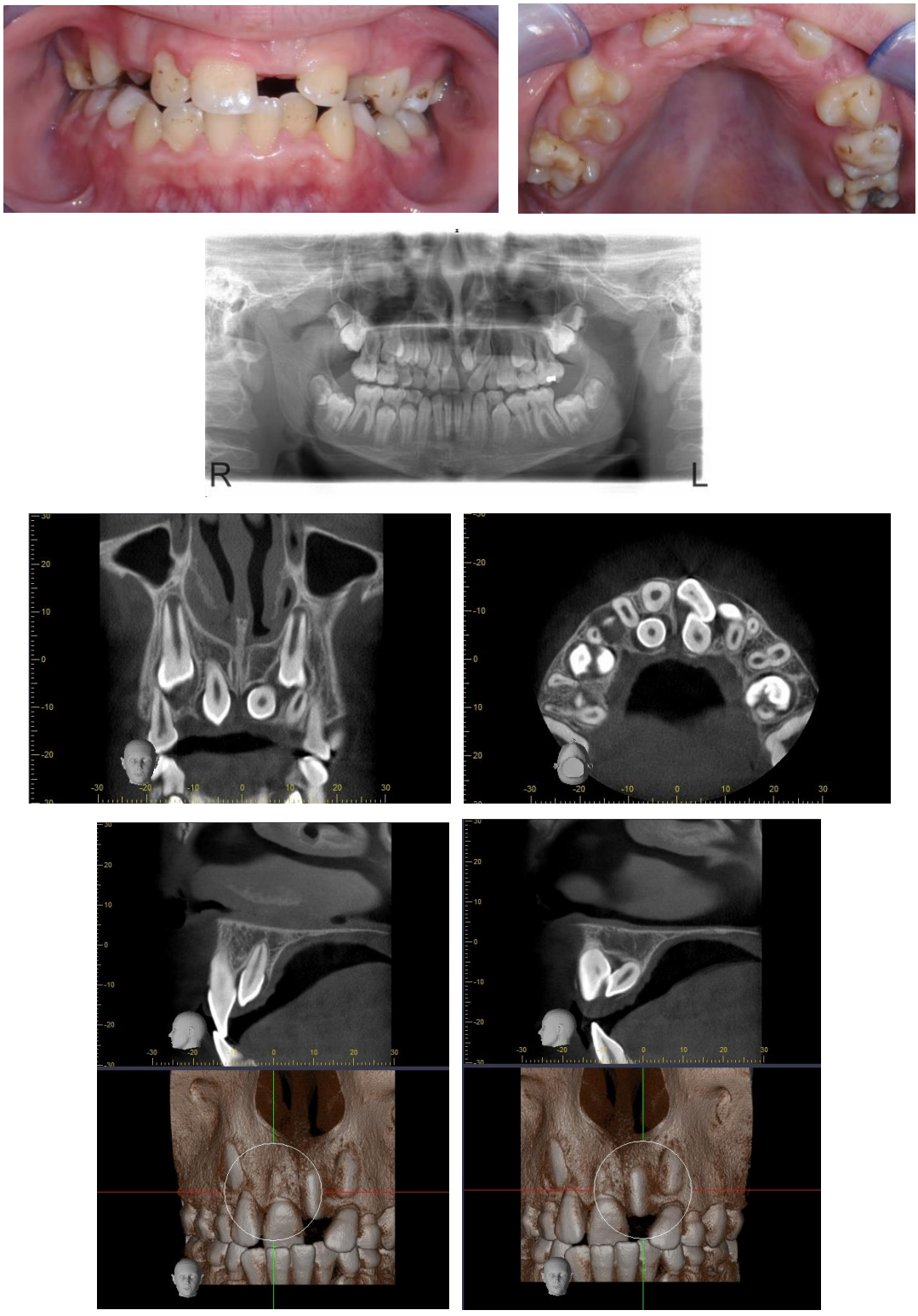
Çalışma grupları oluşturulurken artı dişi bulunan hastalarda alınan anamnezde herhangi bir sistemik hastalığı olan veya sendrom tanısı konmuş hastalar çalışma dışında bırakıldı. Ayrıca ağıziçi ve ağızdışı muayenesi sonrası herhangi bir sendrom şüphesi olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Ayırıcı tanı olarak germ eksiklikleri, dislokasyonlar, ektopik sürmeler, odontodisplazi ile travma veya enfeksiyonlara bağlı ankiloz, kök dilaserasyonları, kist-tümör oluşumları içeren olgular tespit edilerek çalışma dışı bırakıldı.

Ağıziçi muayenesi sırasında sürmüş artı dişler klinik muayene ile teşhis edildi. Sürmemiş artı dişlerin ön teşhisi palpasyon ile yapılmaya çalışıldı, kesin teşhis için periapikal radyografi ve gerektiğinde ise Dental Volümetrik Tomografi (DVT) kullanıldı.

Her çocuk hastanın yaşı, cinsiyeti ve artı dişlerin sayısı, tipleri, konumları tespit edilerek kayıt edildi.

Bu hastalar içinde premaksiller bölgede tek veya iki sayıda artı diş tanısı konan olgular moleküler çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubu olarak, Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı kliniğine başvuran herhangi bir sistemik veya kalıtımsal hastalığı bulunmayan, artı diş veya germ eksikliği olmayan sağlıklı çocuklardan çalışma grubu hastalarının cinsiyet ve yaşları ile en yüksek oranda örtüşecek şekilde seçildi.



Resim 1: Artı diş tanısı kliniğimizde konmuş hastanın **a)** ağızıçi fotoğrafları **b)** panoromik radyografi görüntüsü **c)** koronal kesiti alınmış DVT görünütüsü **d)** aksiyel kesiti alınmış DVT görüntüsü **e)** 11 numaralı dişin palatinal bölgesindeki artı dişin sajital kesiti alınmış DVT görüntüsü **f)** 21 numaralı dişin palatinal bölgesindeki artı dişin sajital kesiti alınmış DVT görüntüsü

5.2 Moleküler Değerlendirme

5..2.1 Mikrodizin için Gereçler

Kullanılan Aletler

Yumuşak doku toplama ependorf tüpü (Isolab)

Tükürük örneği toplama kabı 100 ml (Isolab)

Vorteks cihazı (Labnet)

Termal Döngü Cihazı (Agilent)

Porselen havan

Sıvı Nitrojen Taşıma Kabı (Statebourne Cryogenics)

Pipet uçları

Mikrosantrifüj Tüpleri (Isolab)

Mikrodizin vorteks cihazı (IKA Vortexer)

Döndürme Kolonları

Soğutmalı mikrosantrifüj cihazı (Sigma)

Koleksiyon tüpleri (1,5 / 2 ml)

İnsan CGH mikrodizin Kiti 8x180K (Agilent G4450A SurePrint G3)

Mikrodizin Tarayıcısı (Agilent)

Kullanılan Kimyasallar

RNA Later (ThermoFisher Scientific)

Sıvı nitrojen

Kuru buz

DNA izolasyon kiti (Roche High Pure PCR Template Kit)

RNA izolasyon kiti (RNA Easy Microarray Kit, Agilent)

Liziz Ajanı (Agilent, Qiazol)

Kloroform

Etanol (%70 ve %100)

RNAz içermeyen saf su (Milli Q)

Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

GeneSpring Software 13.0 (Agilent)

Feature Extractor Software 1.7.8 (Agilent)

CytoGenomics 1.6 (Agilent)

Microsoft Office Word 2016

5.2.2 DNA ve RNA Mikrodizin Profillemesi

5.2.2.1 RNA Mikrodizin Analizi için Hasta Grubunun Oluşturulması

Çalışma gruplarını oluşturmak için Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniğine Eylül 2011- Nisan 2015 tarihleri arasında başvuran, herhangi bir sistemik veya kalıtımsal hastalığı bulunmayan, fazla diş tanısı kliniğimizde konmuş hastalar dahil edildi.

5.2.2.1.1 Dokuların Toplanması ve Taşınması

Artı diş olguları klinik veya cerrahi müdahalesi sırasında farklı zamanlarda elde edilen dişeti doku örnekleri alındı. Aynı dönemde diş çekim endikasyonu kliniğimizde konmuş ve herhangi bir artı diş ile germ eksiliği bulunmayan; sağlıklı çocuk hastalardan diş çekimi sırasında dişeti dokuları kontrol örnekleri olarak alındı. Çalışmamızın moleküler kısmı için her birine 8 örnek içeren 6 *mikroarray* slaydına yüklenebilen 48 örnek (hasta ve kontrol grupları dahil) kullanılması planlandı.

Klinik müdahaleler öncesi RNA stabilizasyon ve taşıma solüsyonu, artı dişlerin çekimi sonrası alınacak dokuların büyüklüğü öngörülerek 1,5 ml'lik steril ependorf tüplerin içine 70 µl olacak şekilde konuldu. RNA stabilizasyon ve taşıma solüsyonuna (RNA Later, ThermoFisher Scientific) solüsyonu bulunan ependorf tüpler taşıyıcıya dizildi ve kapakları kapalı olarak klinik ortamına taşındı.

Artı dişlerin çekimini takiben diş folikülü, diş soketi çevre dokusu ve rutin soket küretajı sonrası elde edilen dişeti dokusu derhal daha önceden hazırlanan RNA Later steril bistüri yardımı ile dokunun tamamı gömülecek şekilde konuldu. Konulan doku boyutunun 0,5 santimetreye eşit veya daha küçük olmasına dikkat edildi.

Ardından saklama ortam sıcaklıkları için üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda tabloya göre basamaklar aralıksız olarak takip edildi. İkinci basamak sırasında tüm dokular Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Metabolizma Araştırma Laboratuvarına kuru buz bulunan strafor köpük içinde taşındı. Ardından diğer soğutma basamakları takip edildi.

Tablo 4: Dokuların saklama solüsyonu içinde soğutma basamakları

Basamak	**Sıcaklık**	**Süre**
1	Oda sıcaklığı	1 saat
2	4 °C	12-24 saat
3	-20 °C	2-7 gün
4	-80 °C	Deney başlayana kadar



Resim 2: Yumuşak doku saklama solüsyonu

5.2.2.1.2 Dokuların Homojenizasyonu

Çalışmamızda dokuların parçalanmasını sağlamak ve aynı zamanda RNA degradasyonunu önlemek için sıvı azot (-196 °C) kullanıldı. Sıvı azot, RNA izolasyon işlemlerinden bir gün önce Habaş sanayi ürünleri fabrikasından temin edilerek Sıvı azot taşıma kabına (Statebourne Cryogenics) konuldu ve laboratuvara taşındı.



Resim 3: Sıvı azot taşıma kabına sıvı azot doldurulması

Solüsyondan çıkarılacak dokuları parçalamak için porselen havan kullanıldı. Porselen havanlar kullanım öncesi kontaminasyonu önlemek için saf alkol ve ardından saf su (Milli Q) ile yıkandı. Sıvı azotla yapılan bütün işlemler sırasında koruyucu eldiven ve gözlük kullanıldı. Porselen havanı soğutmak için sıvı azot havanın tamamına dikkatlice konuldu. Bu sırada havan, tokmağı ve steril bistüri sıvı azotta bekletildi. Havana ilk dolumdan sonra buharlaşan sıvı azot ikinci defa tamamen doldurudu. Dişeti dokusu steril bistüri ile RNA taşıma solüsyonu içeren ependorf tüpten yavaşça çıkarılıp sıvı azot bulunan porselen havana bırakıldı. Sıvı azot buharlaşana kadar geçen süre içerisinde tokmak ile doku sürekli parçalandı.



Resim 4: Sıvı Azot doldurulan a) havan b) dokuların ezilmesi

5.2.2.1.3 RNA İzolasyonu

Dokudaki RNA elde edilmesinde RNeasy Microarray Doku Kiti (Qiagen) kullanıldı. Doku homojonizasyonu öncesinde RNA izolasyon kitinde bulunan malzemeler hazırlandı ve konsantre olarak gelen RPE Tamponuna etanol eklenerek seyreltildi.



Resim 5: Dokudan RNA İzolasyon Kiti *(RNeasy Microarray Tissue Kit, Qiagen)*

İzlenecek üretici firma kit protokolü, artı diş çevresinden elde edilen dokunun oldukça küçük olmasından dolayı, başlangıç basamakları modifiye edilerek uygulandı.

- Dokunun parçalanması sıvı azot eşliğinde porselen havanda el ile yapıldığından protokolde belirtilen parçalama basamakları atlandı
- Sıvı azotta parçalanmış doku derhal 300 µl QIAzol ajan içeren ependorf tüpe konuldu. Oda sıcaklığında 2 dakika enkübe edildi.

- Homojenize etmek için pipetaj ile iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakikada bekletildi. Böylece nükloprotein kompleksleri parçalandı
- 200 µl kloroform eklendi ve 15 saniye çalkalandı.
- Oda sıcaklığında 2-3 dakika boyunca dinlenmeye bırakıldı.
- 12,000 x g de 4 °C'de 15 dakika boyunca santrfüj edildi.

Bu santrifüj işlemi sonrası örnekler 3 faza ayrıldı: üst kısımda renksiz, RNA içeren aköz faz; beyaz renkte interfaz; altta, kırımızı renkte, organik faz.

- Üst kısımda kalan aköz faz yeni bir tüpe tranfer edildi.
- Aynı miktarda etonol (%70) eklenerek pipetaj ile karıştırıldı.
- Örneklerden 700 µl kadar alınıp 2 ml koleksiyon tüpleri içinde bulunan RNeasy Mini Spin Kolonlarına konuldu.
- 15 saniye boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken biriken sıvı atılıp tekrar yerleştirildi.
- 15 saniye boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken biriken sıvı atılıp tekrar yerleştirildi.
- RW1 Tamponundan 700 µl eklendi ve 15 saniye boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken biriken sıvı atılıp tekrar yerleştirildi.
- RPE Tamponundan 500 µl eklendi ve 15 saniye boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken biriken sıvı atılıp tekrar yerleştirildi.
- RPE Tamponundan 500 µl eklendi ve 2 dakika boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken biriken sıvı atıldı. Bu şekilde uzun bir santrifüj ile etonal artıklarının spin kolonun filtresinde tamamen kuruması sağlandı çünkü etanol artıkları sonraki adımlardaki reaksiyonları etkileyebilir.
- Spin kolonlarına yeni 1,5 ml koleksiyon tüpleri konarak 30-50 µl RNase içermeyen su eklendi. 1 dakika boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi.
- Spin kolonlarına 30-50 µl RNase içermeyen su eklenerek 1 dakika boyunca 8000 x g'de santrifüj edildi.

- Filtreli tüp atılıp RNA içeren sıvı ependorf içinde -20 °C'de soğutucuda saklandı.

5.2.2.1.4 RNA Kalite Kontrol Analizi

Elde edilen RNA örnekleri kuru buz içeren strafor içinde hizmet alımı yapılan SEM laboratuvarına taşınıp -20 °C'de korumaya alındı.

Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonunda yüksek başarı için RNA'nın kalite analizinin doğru biçimde yapılması ve elde edilmiş RNA'nın konsantrasyon ve bütünlüğünün kabul edilebilir değerlerde olması çok önemlidir. Yüksek kaliteli RNA, karbohidratlar, proteinler, organik çözücüler gibi kirlilik yapan bileşenlerden temiz olmalı ve ayrıca minimum degradasyonla olabildiğince bütünlüğü korumalıdır. Bunun için gerekli olan iki basamak takip edildi.

5.2.2.1.5.1 RNA Konsantrasyonunun Nanofotometre İle Ölçümü

Değerlendirme için nanofotometre cihazı kullanıldı. (NanoDrop P330, İmplen). Aşağıdaki adımlar izlendi:

- Cihaz ayar menüsünden Nükleik Asit Ölçümü ve RNA-40 seçildi
- 1.5 µl nükleaz enzimi içermeyen saf su ile cihazın ölçüm ayarı sıfırlandı.
- Cihaza ölçüm yapılacak ürün miktarı girildi (1,5 µl)
- Her örnekten 1,5 µl alınarak RNA konsantrasyon ölçümü yapıldı.
- Ölçüm sırasında elde edilen konsantrasyon değeri (ng/µl), A260/A280 ve A260/A230 oranları kaydedildi.



Resim 6: Nanofotometre cihazı *(NanoDrop P330, Implen)*

5.2.2.1.5.2 Jel Elektroforez Yöntemi ile RNA'lara ait RIN değerlerinin belirlenmesi

Bioanalyzer 2100 cihazı (Agilent) çipler ve uygun ajanların kullanılmasıyla, RNA fragmanlarının analizine olanak sağlar. Her RNA çipi birbiriyle bağlantılı mikro kanallar bulundurur. Bu kanallardan geçen elektrik yüklü nükleik asit parçaları büyüklüklerine göre elektroforez prensibine dayanarak ilerletilirler. Kütle-yük oranları doğrultusunda moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar. Bu moleküller lazer floresans ile tespit edilip, elde edilen veri, yazılım kullanılarak jele benzeyen bant görüntüleri ile tepe yapan elektroferogram çizgilerine dönüştürülürler. Boyut ve değerleri bilinen merdiven *(ladder)* sayesinde kanaldaki ilerleme süresi ile fragman boyutu referans alınarak diğer örneklerinki hesaplanır. Bunun sonucunda incelenmek istenilen RNA'nın bütünlüğünü gösteren *RNA Integrity Number (RIN)* değeri elde edildi.



Resim 7: Jel Elektroforez cihazına **a)** örneklerin yüklenmesi **b)** Örneklerin vortekslenmesi **c)** Biyoanalizatör cihazı

Ölçüm Hazırlıkları

Çip Çalışma İstasyonunun Hazırlanması

- Yeni bir RNA şırıngası çip çalışma istasyonuna yerleştirildi.
- İstasyonunun alt tabanı sabitlendi.
- Şırınganın üst kısmında bulunan seviyeleme butonu en üst seviyeye alındı.

RNA *Ladder*'ın Hazırlanması

- *Ladder* ters çevrilip RNaz içermeyen bir pipet ile çalkalandı.

- *Ladder*'ın denatüre olması için 70 °C'de 2 dakika boyunca ısıtıldı ve ardından derhal buz üstünde soğutuldu.
- 0,5 ml RNaz içermeyen tüplerde alikotlar hazırlandı konuldu.

Jelin Hazırlanması

- 550 µl RNA jel matrksi bir döndürme filtre tüpüne konuldu.
- 1500 x g 'de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- 65 µl filtrelenmiş jel 0,5 ml boyutundaki RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine bölündü.

Jel-Boya Karışımının Hazırlanması

- RNA boya konsantrasyonun oda sıcaklığında 30 dakika boyunca dengelenmesine izin verildi.
- RNA boya konsantrasyonu 10 saniye boyunca vortekslendi ve aşağıya döndürülerek 1 µl boya 65 µl filtreli jel alikota eklendi.

Ölçüm

Jel-Boya Karışımının Yüklenmesi

- Çip çalışma istasyonuna yeni bir RNA 6000 Nano çipi yerleştirildi.
- 9 µl jel-boya karışımı çipin belirtilen noktasına pipetle konuldu.
- Şırınga pistonunun 1ml ayarında getirildi ve çip çalışma istasyonu kilitlendi.
- Pistona kilit noktasına varıncaya kadar bastırıldı.
- 30 saniye beklendikten sonra kilit serbest bırakıldı.
- 5 saniye beklendikten sonra piston 1 ml pozisyonuna geri çekildi.
- Çip yükleme istasyonu açıldı ve 9 µl jel-boya karışımı çipin belirtilen noktasına pipetle konuldu.
- Arta kalan jel-boya karışımı atıldı.

İşaretçinin Yüklenmesi

- 5 µl RNA İşaretçisi pipet ile 12 örnek kuyusuna konuldu.

***Ladder* ve Örneklerin Yüklenmesi**

- Hazırlanmış ladder'dan 1 µl uygun kuyuya pipet ile konuldu.
- 12 örnek kuyusuna 1 µl örnek pipet ile konuldu.
- Çip yatay tutularak vortekslendi.
- Hemen ardından biyoanalizatöre konuldu ve okuma işlemine başlandı.

Ölçüm

Biyoanalizatöre bağlı bilgisayarda "2100 Expert" yazılımı açıldıktan sonra uygun elektroferotik deney seçildi ve çipin okuma işlemi başlatıldı. Çip okuması bittikten sonra her bir örnek için "Elektroforez Sonuç Raporları" kaydedildi.

5.2.2.2 RNA Mikrodizin Örneklerine Göre DNA Mikrodizini için Hasta Grubu Belirlenmesi

Elde edilen referans RNA (Ladder) ve çalışma RNA elektroferogramları yazılım ekranında incelendi. Çıkan sonuçlara göre hasta ve kontrol örneklerinden RIN değerleri 7 ve üzerinde olan örnekler seçilerek RNA mikrodizin deneyinde çalışılmasına karar verildi.

DNA mikrodizin analizi için ise RNA mikrodizin çalışması yapılacak hasta grubundaki aynı çocukların çalışmaya dahil edilmesine ve artı diş çekimi sırasındaki dişeti dokuları kullanıldığından DNA çalışmasında aynı hastalardan tükürük alınmasına karar verildi.

5.2.2.2.1 Tükürüklerin Toplanması ve Taşınması

DNA çalışması yapılacak her hastadan Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniğinde alınan ağıziçi swab ve yaklaşık 20 ml tükürük örnekleri örnek kaplarına toplandı ve kaplar derhal kuru buz bulunan strafor köpük içine konuldu. Her çalışma günü sonunda örnek kapları Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Metabolizma Araştırma

Laboratuvarına getirilerek -20°C dereceye ayarlı soğutucuya konularak korumaya alındı. Bir erkek ve bir kadın gönüllüden aynı yöntemle hasta cinsiyet ve sayısına göre yeterli miktarda tükürük örneği referans olarak (kontrol) alındı.



Resim 8: Tükürük örnekleri

5.2.2.2.2 DNA İzolasyonu

Tükürükten DNA elde edilmesinde *High Pure Template Preparation Kit, Roche* kullanıldı. İzlenecek protokol kit kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde uygulandı.

- Tükürük örneklerinin bulunduğu örnek kapların 200 µl tükürük alınarak 5 ml lik ependorf tüplerine konuldu.
- Tüplere 100 µl izopropanol eklenerek iyice karıştırıldı.
- Kit içinde bulunan filtreli tüp, toplama tüpüne geçirilip ependorf tüpteki karışım filtreli tüpe aktarıldı
- 8000 x G'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüp toplama tüpünden ayrılıp, toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne konuldu.

- Filtreli tüpün üzerinden 500 µl İnhibitör Uzaklaştırıcı Tampon konuldu ve hemen ardından 8000 x G'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüp toplama tüpünden ayrılıp, toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı. Filtreli tüp toplama tüpünden ayrılıp, toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne konuldu
- Filtreli tüpün üzerinden 500 µl Yıkama Tamponu konuldu ve hemen ardından 8000 x G'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüpün üzerinden 500 µl Yıkama Tamponu konuldu ve hemen ardından 8000 x G'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüp, 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- Önceden 70 °C'ye ısıtılmış 200 µl Elüsyon Tamponu eklendi ve hemen ardından 8000 x G'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüp atılıp, ependorf tüp içinde DNA içeren sıvı -20 °C'deki soğutucuya kaldırıldı.



Resim 9: DNA izolasyon kiti (*High Pure Template Preparation Kit, Roche)*

5.2.2.2.3 DNA'nın Kalite Kontrol Analizi

Elde edilen DNA örnekleri kuru buz içeren strafor içinde hizmet alımı yapılan SEM laboratuvarına taşınıp (-20) derecede korumaya alındı.

Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonunda yüksek başarı için DNA'nın (genomik DNA) kalite analizinin doğru biçimde yapılması ve elde edilmiş DNA'nın

konsantrasyon ve bütünlüğünün kabul edilebilir değerlerde olması çok önemlidir. DNA konsantrasyonlarının nanofotometre ile ölçülmesi için nanofotometre cihazı kullanıldı. (NanoDrop P330, İmplen). Aşağıdaki adımlar izlendi:

- Cihaz ayar menüsünden Nükleik Asit Ölçümü ve DNA-50 seçildi
- 1.5 µl saf su ile cihazın ölçüm ayarı sıfırlandı.
- Cihaza ölçüm yapılacak ürün miktarı girildi (1,5 µl)
- Her örnekten 1,5 µl alınarak DNA konsantrasyon ölçümü yapıldı.

Elde edilen ölçümlerle örneklerin DNA mikrodizin deneyine hazırlanmasına karar verildi.

5.2.2.3 RNA Mikrodizin Deneyi

RNA Mikrodizin deneyi için "Tek-Renk Mikrodizin Temelli Gen Ekspresyon Analizi" (Agilent) kullanıldı. Bu yöntemde sadece *cyanine* 3 etiketlenmiş hedefler hem hasta örneklerinde hem de kontrol örneklerinde işaretlenmektedir. Her bir örnek farklı *array'*lere yüklendiği için çift boyama yapılmamaktadır.

Tablo 5: RNA mikrodizin deneyi çalışma akışı

Basamak	**İşlem**
1	RNA *Spike* Karışımının Hazırlanması
2	cDNA sentezi
3	cRNA sentezi ve amplifikasyonu
4	cRNA saflaştırması
5	Örneklerin hibridizasyona hazırlanması
6	Hibridizasyon
7	Yıkama
8	Tarama
9	Analiz

5.2.2.3.1 RNA *Spike* Karışımının Hazırlanması

RNA *Spike* Kiti, Gen Ekspresyon Mikrodizini sırasında örnek amplifikasyonu ve etiketlemeden mikrodizini işlemine kadar olan basamaklarda pozitif kontrol sağlanması için geliştirildi. Agilent Tek Renk RNA Spike-In Kiti 10 adet pozitif kontrol transkriptinden oluşur.

RNA *Spike* Karışımı üretici firmanın önerisi doğrultusunda aşağıdaki basamaklar izlenerek hazırlandı;

- 37 °C, 40 °C, 65 °C, 70 °C ve 80 °C su banyosunu simüle edecek şekilde termal döngü cihazı hazırlandı.
- Spike karışım solüsyonu hızlıca vortekslendi
- 5 dakika boyunca 37 °C'de ısıtıldı ve tekrar vortekslendi
- Tüp açılmadan önce kısaca santrifüj edildi.
- İşleme başlanan kadar -80 °C'de saklamaya alındı.

Tablo 6: *Spike* karışımının *Cyanine* 3 etiketlenmesi için dilüsyonlar

RNA	Birinci Dilüsyon	İkinci Dilüsyon	Üçüncü Dilüsyon	Dördüncü Dilüsyon
50	1:20	1:25	1:20	1:2
100	1:20	1:25	1:20	

5.2.2.3.2 Etiketleme Reaksiyonunun Hazırlanması

- Etiketleme reaksiyonu öncesi bütün örneklerden 10 ile 200 ng RNA içeren 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine konuldu.
- Her bir örneğe bir önceki basamakta hazırlanan 2 µl Spike Karışımı eklendi. Böylece karışım toplamı 3,5 µl' ye ulaştı.
- Bunun üzerine 0,8 µl T7 Primer Karışımı ve 1 µl Nükleaz içermeyen su eklenerek 5,3 µl toplam hacim elde edildi.
- Örnekler 10 dakika boyunca 65 °C'de enkübe edildi.
- Örnekler 5 dakika boyunca 4 °C'de bekletildi.

5.2.2.3.3 cDNA Sentezi

cDNA üretilmesini sağlayacak cDNA ana karışmı aşağıdaki tabloya göre pipetaj hatalarını önlemek için 40 reaksiyonluk hazırlandı.

Tablo 7: cDNA ana karışımı

Bileşim	**1 reaksiyonluk hacim (µl)**	**40 Reaksiyonluk hacim (µl)**
5x Birincil Sarmal Tamponu	2	80
0,1 M DTT (Dithiothreitol)	1	40
10 mM dNTP (deoxyribose Nucleoside triphosphate)	0,5	20
RNaz Bloklama Karışımı	1,2	48
Toplam Hacim	**4,7**	**188**

Karışımdan 4,7 µl alınıp bir önceki basamakta 5,3 µl hacme ulaşan karışıma eklenerek 10 µl'lik karışım elde edildi. Bütün örnekler 2 saat boyunca 40 °C'de, 15 dakika boyunca 70 °C'de, ve ardında 5 dakika boyunca 4 °C'de soğutmaya alındı. Örnekler diğer aşamaya geçilene kadar soğukta saklandı.



Resim 10: Termal döngü cihazı

5.2.2.3.4 cRNA Sentezi ve Amplifikasyonu

Transkripsiyon ana karışımı aşağıdaki tabloya göre pipetaj hatalarını önlemek için 40 reaksiyonluk hazırlandı.

Tablo 8: Transkripsiyon ana karışımı

Bileşen	**1 reaksiyonluk hacim (µl)**	**40 Reaksiyonluk hacim (µl)**
Nükleaz İçermeyen Su	0,75	30
5x Transkripsiyon Tamponu	3,2	128
0,1 M DTT	0,6	24
dNTP Karışımı	1	40
Cyanine 3-CTP	0,24	9,6
T7 RNA Polimeraz Karışımı	0,21	8,4
Toplam Hacim	**6**	**240**

Transkripsiyon ana karışımından her bir örnek için 6 µl alınarak bir önceki karışımda 10 µl olan karışıma eklenerek toplamda 16 µl'lik bir hacim elde edildi. Pipetaj yapılarak hafifçe karıştırıldı. 2 saat boyunca 40 °C'de enkübe edildi. Örnekler bir sonraki adıma geçene kadar -20 °C'de korumaya alındı.

5.2.2.3.5 cRNA Saflaştırılması

Saflaştırman amacı bağlanmayan boyaları uzaklaştırıp, daha sonra mikrodizin deneyi sırasında problara yapışarak yanlış okuma vermesini önlemektir. Üretici firmanın önerisi doğrultusunda konsantrasyon az olan örneklerde kullanılması tavsiye edilen *Absolutely RNA Nanoprep Kit* kulanıldı.

Saflaştırma için aşağıdaki malzemeler hazırlandı:

- %80'lik sülfolan
- Lizis tamponu
- Yüksek tuz yıkama tamponu
- Düşük tuz yıkama tamponu
- Elüsyon Tamponu

RNA saflaştırma için sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlendi:

- 16 µl olan her bir örnek tüpüne 100 µl' lik Lizis Tamponu eklendi
- Vorteks cihazında karıştırılıp, homojenize olana kadar pipetaj yapıldı
- Eşit miktarda (116 µl) %80'lik Sülfolan (oda sıcaklığında) eklendi ve vortekste 5 saniye karıştırıldı.
- 232 µl'lik karışım RNA'yı tutan nano-spin tüplerine konuldu ve altına 2 ml'lik koleksiyon tüpleri eklendi.
- Her bir örnek 60 saniye boyunca 12,000 rpm'de mikrosantrifüj edildi.
- Alta geçen sıvı atılıp aynı koleksiyon tüplerine konuldu.
- Üzerine *High-Salt Wash Buffer* konuldu (300 µl). 12000 rpm de 60 sn santrifüj edildi
- Üzerine *Low-Salt Wash Buffer* konuldu (300 µl). 12000 rpm de 60 sn santrifüj edildi
- Üzerine *Low-Salt Wash Buffer* konuldu (300 µl). 12000 rpm de 60 sn santrifüj edildi
- Üzerine *Low-Salt Wash Buffer* konuldu (300 µl). 12000 rpm de 180 sn santrifüj edildi.
- Eski koleksiyon tüpleri atıldı ve yeni koleksiyon tüpleri takıldı.

- Elüsyon Tamponu RNA'ya bağlanması için 60 °C'ye ısıtıldı ve 20 µl'lik miktarda nano-spin tüpündeki fiber matriksin üzerine eklendi.
- 5 dakika boyunca 12,000 rpm'de santrifüj edildi.
- Bir sonraki aşamaya kadar RNA mikrosantrifüj tüplerine konarak -20 °C'de saklandı.

5.2.2.3.6 RNA Kalite Ölçümü

Saflaştırma sonrası elde edilen üründen 1,5 µl alınarak nanospektrometre ile konsantrasyon ölçümü yapıldı. Ölçüm aşamaları:

- Nanospektrometre cihaz ayarlarından mikrodizin ölçümü ve RNA-40 örnek tipi seçildi.
- 1,5 µl'lik Nükleaz içermeyen su ile cihazın ayarları sıfırlandı.
- Bu ölçümden, cRNA kosantrasyonu (ng/µl), Cyanine 3 boya konsantrasyonu (pmol/µl) ve RNA absorbsiyon oranı (260 nm/280 nm) elde edildi.

Elde edilen veriler ile spesifik aktivite hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Spesifik Aktivite (µg cRNA başına pmol Cy3)} = \frac{\text{Cy3 Konsantrasyonu}}{\text{cRNA Konsantrasyonu}}$$

Üretici firma, spesifik aktivite hesaplaması yapılan örneklerde 6 ve üzeri değerlerin mikrodizin çalışması için uygun olduğunu belirtmektedir. Buna göre uygun olan örneklerle çalışmaya devam edildi.

5.2.2.3.7 RNA Mikrodizin Hibridizasyonu

Hibridizasyon uygulanacak örnekler için slayt yükleme planı oluşturuldu. Hibridizasyon için fragmantasyon karışımı 8'li *array*'e uygun olacak şekilde aşağıdaki tablodaki gibi hazırlandı ve işlem basamakları izlendi;

Tablo 9: 8'li Mikrodizin Yöntemi için Fragmantasyon Karışımı

Bileşen	**Hacim veya Ağırlık**
Cyanine 3 bağlanmış, çizgisel olarak amplifiye cRNA	600 ng
10x Gen Ekspresyon Bloklama Ajanı	5 µl
Nükleaz içermeyen su	24 µl varıncaya kadar eklendi
25x Fragmantasyon Tamponu	1 µl
Toplam Hacim	25 µl

- Fragmantasyon karışımında belirtilen RNA miktarını (600 ng) elde edebilmek için daha önce NanoDrop Cihazı ile konsantrasyon ölçümü yapılmış her bir örnek miktarına bölünerek karışım için alınması gereken RNA içeren sıvı miktarı hesaplandı.
- Her bir örnekten hesaplanan farklı hacimlerden alınarak 32 yeni tüpe yerleştirildi.
- 5 µl hacimde 10 x Gen Bloklama Ajanı eklendi. Ardından her bir örnek hacmi 24 µl' ye varacak şekilde nükleaz içermeyen saf su eklendi.
- 1 µl hacimde eklenen 25 x Fragmantasyon Tamponu ile toplam hacim 25 µl'ye ulaştı.
- Bütün örnekler 30 dakika boyunca 60 °C'de enkübe edildi.
- Hemen ardından 1 dakika boyunca 4 °C'ye soğutuldu.
- Fragmantasyon reaksiyonunu durdurmak için her bir örneğe 25 µl hacimli 2x Hi-RPM Hibridizasyon Tamponu karışım köpürtülmeden dikkatlice eklendi.
- Örnekler *array*'e yüklendi ve yüklenene kadar 4 °C'de bekletildi.

Mikrodizini hibridizasyonu için temiz bir contalı slayt hibridizasyon odasının alt bölümüne, slaydın contalı kısmı yukarı bakacak şekilde ve kenarları tam oturacak şekilde yerleştirildi.

Slaytta bulunan 8 adet *arraye* (8x60K) her bir örnekten 45 µl miktarda "sürükle ve dağıt" yöntemi ile ortasından çevresine doğru olacak şekilde konuldu.



Resim 11: *Array*'lere örneklerin yüklenmesi ve slaytların kapatılması

Bu işlemin ardından mikrodizin Slaytları, contalı slaytların üzerine fakat aktif kısımları örneklere bakacak şekilde kapatıldı. Mikrodizin slaytlarının aktif yönü gösteren "Agilent" yazan kenar kısımları alt tarafa, inaktif yönü gösteren kod numarası bulunan kısımlarının ise üst tarafa bakması sağlandı. Slaytların aktif kısımlarına kesinlikle dokunulmadı. Hibridizasyon odasının kapağı kapatıldı ve mandalı sıkıldı. Oda yan çevrilecek karıştırıldı ve baloncuk oluşumu hafif vurularak dağıtıldı.

Hazırlanan hibridizasyon odaları 65 °C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırına konarak 17 saat boyunca hibridizasyon döndürücüsünde 10 devir/dakika hızda döndürüldü.



Resim 12: Hibridizasyon fırını

5.2.2.3.8 RNA Mikrodizinlerinin Yıkanması

Triton-102 eklenme basamağı zorunlu olmasa da yıkama artifaktlarının azalmasını sağladığı için önerilmektedir. Gen Ekspresyon Yıkama Solüsyonu 1 ve 2'ye 2 ml %10'luk Triton X-102 eklendi. Gen Ekspresyon Yıkma Tamponu 2, 1000 ml'lik steril bir saklama kabına konarak bir gece önceden 37 °C'lik su banyosuna konuldu.

17 saatlik hibridizasyon sonrası, hibridizasyon odaları fırından çıkarıldı. Slaytlar hibridizasyon odalarından çıkarıldı. Contalı slayt ile mikrodizin slaydı Yıkama Tamponu 1'in bulunduğu birinci cam tabak içinde birbirinden ayrıldı. Mikrodizin slaydı hemen ardından içinde manyetik karıştırıcı çubuk bulunan ve Yıkama Tamponu 1'i içeren ikinci yıkama tabağına alındı. Bütün slaytlar alındıktan sonra bir dakika boyunca beklendi. Bu sırada ikinci yıkama tabağı, yıkama banyosundan çıkarıldı. Ardından slaytlar yıkama tamponu 2'ye alınarak 31 °C'de 1 dakika boyunca yıkandı. Süre sonunda hava kabarcıkları kalmaması için slaytlar oldukça yavaş şekilde sudan çıkarıldı ve kurulama mendiline konuldu.

Tablo 10: Yıkama ortamları

Yıkama Tabağı	Yıkama Tamponu	Sıcaklık	Zaman
1- Sökme	Gen Ekspresyon Yıkama Tamponu 1	Oda sıcaklığı	
2- Birinci Yıkama	Gen Ekspresyon Yıkama Tamponu 1	Oda sıcaklığı	1 dakika
3- İkinci Yıkama	Gen Ekspresyon Yıkama Tamponu 2	31 °C	1 dakika

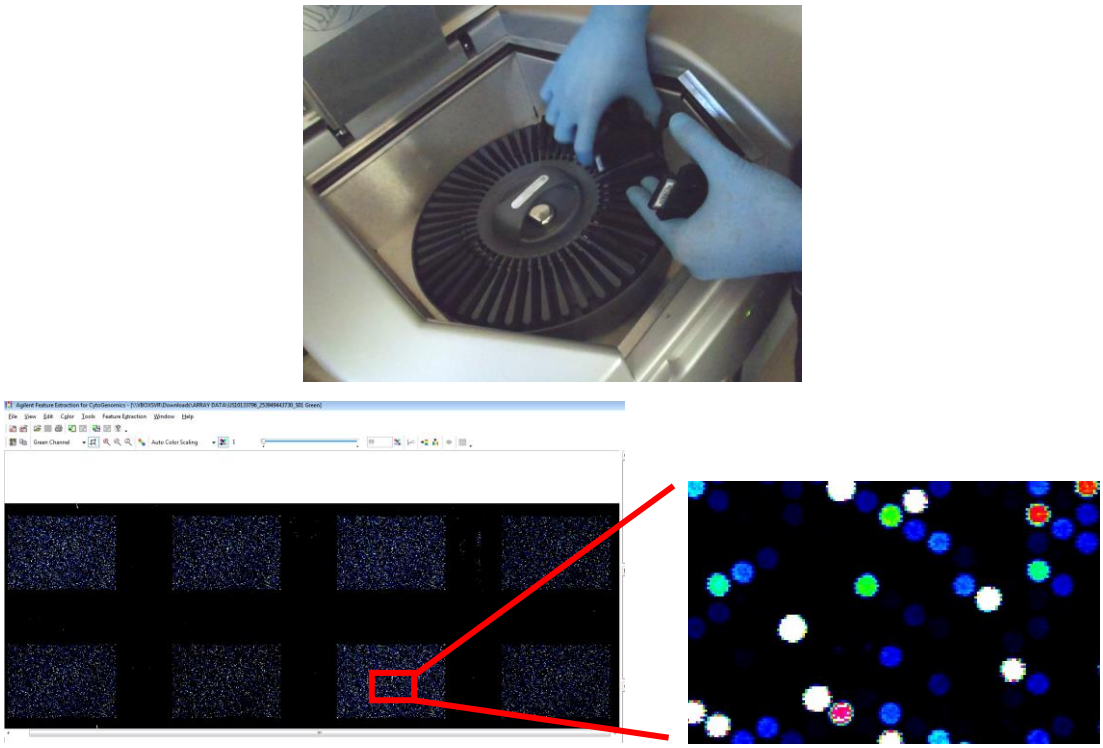


Resim 13: Slayt yıkama ortamları

5.2.2.3.9 RNA mikrodizinlerinin Taranması ve Görüntü Dosyalarının Elde Edilmesi

Yıkamadan çıkarılan slaytların çevresel etkiler ve oksitlenmeden etkilenmemesi için tarayıcıya hemen konması gerekmektedir. Yukarıda belirtilen yıkama süreçleri sonucu slaytlar derhal Slayt Tutucu'ya slayt etiketi kapağa bakacak şekilde yerleştirildi. Slayt tutucu kapağı kapatıldıktan sonra derhal mikrodizin okuyucuya yüklendi.

Okuyucuya yüklenen slaytlar için *AgilentG3_GX_1color* protokolü seçildi. Slaytlar tarayıcının okuyucu kısmına dikkatlice yerleştirildi. Tarayıcının durumu kontrol edildikten sonra tarama işlemine başlandı.



Resim 14: Slaytların a) okuyucuya yerleştirilmesi b) okuma sonrası bilgisayar ekranı görüntüsü

Tarama işlemi sonrası mikrodizin tarayıcıya bağlı olan bilgisayarda *Feature Extaction* yazılımı ile sırasıyla her bir slayt için görüntü dosyaları (.tif) oluştu ve bunlar log oranlarına dönüştürüldü.

Bu aşamada örneklerin kalite kontrolü için Agilent firmasının hazırladığı *Feature Extraction* yazılımı kullanılarak örneklerin görüntü kalite raporları elde edildi. Bu raporlar bir mikrodizin deneyindeki göreceli veri kalitesini değerlendirilmesi için kullanılabilmektedir. Aynı zamanda bazı olgularda, olası işleme hatalarını gösterebilir veya bazı mikrodizinlerden elde edilen veriler dengelenebilir.

Mikrodizin formatında elde edilen verilerin ölçütlerini etkileyecek birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; mikrodizin slaydının sayı formatı (1li, 2li, 4lü veya 8li olması), biyolojik örneğin kaynağı, başlangıç nükleik asit kalitesi, deney süreci, tarayıcı hassasiyeti ve görüntünün işlenmesidir.

5.2.2.3.10 RNA Mikrodizin Verilerinin Analizi

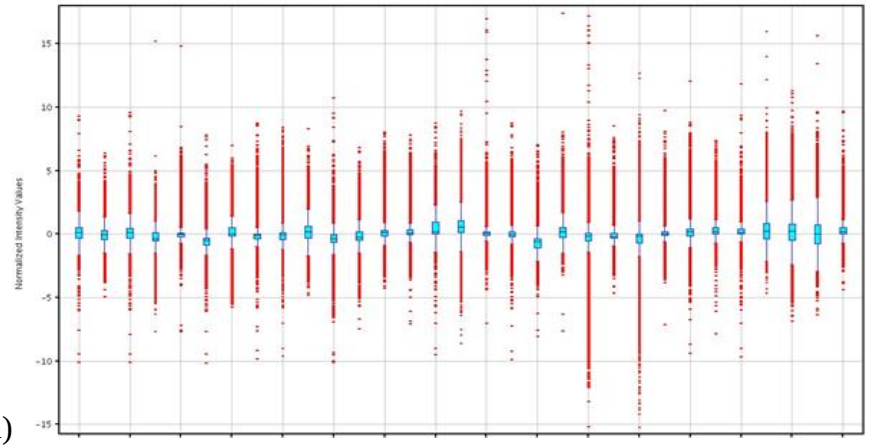
Mikrodizin taraması sonrası elde edilen görüntü dosyaları *GeneSpring 13.0* (Agilent) yazılımı ile incelenmek üzere aşağıdaki adımlar izlendi:

- Her bir mikrodizinden elde edilmiş görüntü dosyası *(Raw Data)* yazılıma tek tek yüklendi
- Yazılım internet veritabanından *Homo Sapiens hg19* kopya sayısı değişikliği karşılaştırma verileri indirildi.

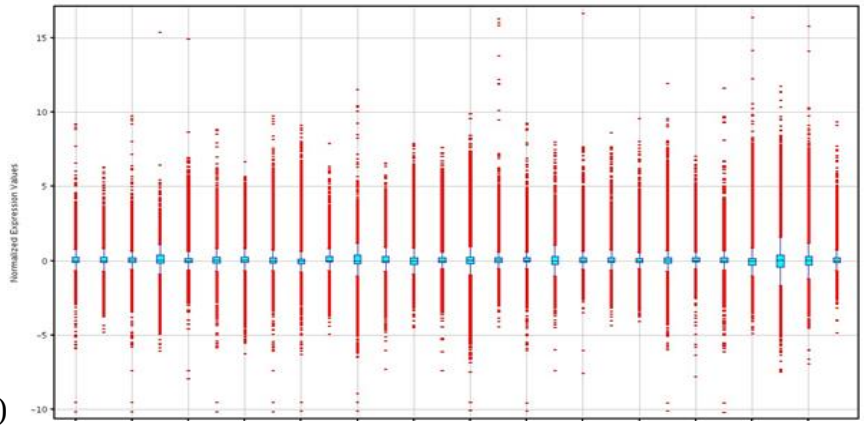
5.2.2.3.11 RNA Mikrodizin Verilerinin Normalizasyonu

RNA örneklerinin normalizasyonu için *GeneSpring* yazılımı üzerinden *Quantile Normalization* yöntemi kullanıldı. *Quantile Normalization* iki dağılımı istatistiksel incelemeye uygun hale getirebilmek için uygulanan bir tekniktir. Birbiriyle karşılaştırılacak iki dağılımın en üst değerleri birbiriyle eşitlenecek şekilde yeni değerler verilerek birbiriyle karşılaştırılır hale getirildi.

a)



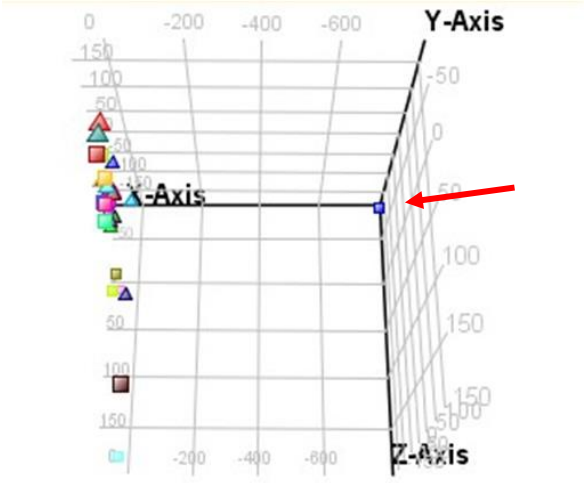
b)



Şekil 4: Verilerin normalizasyon a) öncesi ve b) sonrası yazılım görüntüleri

5.2.2.3.12 RNA Mikrodizin Verilerinin Kalite Kontrolü

RNA örneklerinde kalite kontrolü GeneSpring yazılımında *Quality Control on Samples* seçilerek bütün örneklerin prob sinyallerine göre uzaysal olarak korelasyonlarının analiz edilebildiği üç boyutlu grafik üzerinde yapıldı. Bu incelemede bütün örneklerden en uzak değerleri gösteren ve grafiksel olarak farklı noktada bulunan veri inceleme dışında bırakıldı.



Şekil 5: Analiz dışı bırakılan örneğin diğer örneklerle beraber korelasyon görüntüsü

5.2.2.3.13 RNA mikrodizin Verilerinin İstatistiksel Değerlendirilmesi

- Yazılıma örneklerin tanıtılması için interpretasyonlar *(interpretations)* oluşturuldu. Bu kapsamda üç grup oluşturuldu; "Bütün Hasta ve Bütün Kontrol Verileri", "Erkek Hasta ve Erkek Kontrol Verileri", "Kız Hasta ve Kız Kontrol Verileri"
- Her bir grup için aşağıdaki analiz basamakları takip edildi:
    - Tespit edilmiş prob noktasından bayraklar *(Flags)* oluşturularak tespit edilen problar seçildi
    - Tespit edilen problar içinden istatistiksel olarak anlamlı derecede değişiklik gösterenleri bulmak için ekspresyondaki gen kat değişikliği *(Fold Change)* değeri 2.0 olarak seçildi.

- Elde edilen anlamlı derecede değişiklik göstermiş problara istatistiksel T-Testi *(Benjamini Hochberg FDR)* $p<0,05$ seçilerek uygulandı.

5.2.2.4 DNA Mikrroarray Deneyi

Örnekler, Genomik DNA Analizi için Oligonükletid Bazlı Karşılaştırmalı Genom Hibridizasyonu (KGH) Array analiz protokolüne (Agilent, Sürüm 7.4) uygun olacak şekilde hazırlandı.

Örneklerin mikrodizin işlemine hazırlanması için iki metod vardır. Bunlar Doğrudan Metot ve Amplifikasyon Metotlarıdır. "Amplifikasyon Metodu" tek hücre çalışmalarında kullanılır, "Doğrudan Metot" için ise en az 0,5 ile 1,0 µg DNA gerekmektedir. Biz çalışmamızda doğrudan metodu kullandık.

Tablo 11: Mikrodizin başına gerekli DNA miktarı

Mikrodizin Formatı	**DNA miktarı (µg)**	**Sınırlı Kesilmiş DNA Hacmi (µl)**
4'lü Slayt	0,5-1,0	20,2

Tabloda belirtilen değerleri ve her bir örneğin eşit olmasını sağlamak için 20,2 µl'de 800 nanogram DNA ihtiyacına göre hesaplamalar yapıldı. Bunu sağlamak için her bir ürünün konsantrasyonu ölçüldükten sonra aşağıdaki formüle göre DNA miktarı bulundu.

$$\text{Ürün } (\mu g) = \frac{\text{DNA konsantrasyonu } (ng/\mu L) \text{ x Örnek Hacmi } (\mu L)}{1000 \text{ ng/ } \mu g}$$

Hesaplanan DNA miktarına göre DNA içeren tüplerden konsantrasyona bakarak 800 ng için kaç µl alınacağı hesaplandı. Ardından 20,2 µl tamamlamak için her bir örnekte kalan miktar kadar saf su eklendi.

5.2.2.4.1 DNA Sınırlandırma Kesimi

Protokoldeki bu aşama ile DNA'nın fragmanlara bölünmesinin sağlanmasıdır. Bunun sebebi mikrodizindeki probların belli büyüklükte olmasından dolayı, ancak belli boyuttaki DNA parçalarını daha iyi yakalayabilmesidir.

Ana Kesim Karışımı (AKK) tabloda verildiği miktarlarda sırayla hazırlandı.

Tablo 12: Ana kesim karışımı

Bileşen	**Reaksiyon Başına (µl)**	**32 Reaksiyonluk (Fazlası Dahil) (µl)**
Nükleaz İçermeyen Su	2,0	68
10x Kesim Enzim Tamponu	2,6	88,4
BSA	0,2	6,8
Alu I	0,5	17
Rsa I	0,5	17
Toplam	5,8	197,2

Hazırlanan AKK her bir hasta ve kontrol örneğine eklendi. Daha önce 20,2 µl olan örneklere 5,8 µl AKK eklenmesi sonucu 26 µl karşım elde edildi. Vorteksleme yapılmadan sadece pipetajla iyice karıştırıldı. Hazırlanan karışım termal döngü cihazına konarak aşağıdaki tabloda belirtilen basamaklar uygulandı.

Tablo 13: DNA'nın termal döngü cihazı kullanılarak kesilmesi

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman**
1	37 °C	120 Dakika
2	65 °C	20 Dakika
3	4 °C	Bekleme

5.2.2.4.2 DNA'nın Floresans Etiketlenmesi

Örneklerin termal döngü cihazındaki süreci bittikten sonra 4'lü mikrodizin slaytlarına uygun olacak şekilde 5 µl *Random Primer* eklendi. Toplam karışım hacmi 31 µl' ulaştı.

DNA denatürasyonu ve fragmantasyonu için termal döngü cihazı Tablo 14'te belirtilen şekilde ayarlandı

Tablo 14: Termal döngü cihazı floresans etiketleme programı

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman (kesme ile)**
1	98 °C	3 dakika
2	4 °C	Bekleme

Bu aşama sırasında Etiketleme Ana Karışımı (EAK) hazırlandı.

Tablo 15: Etiketleme ana karışımı (EAK)

Bileşen	**Reaksiyon Başına (µl)**	**16 Reaksiyonluk (fazlası dahil) (µl)**
5x Reaksiyon Tamponu	10	170
10x dNTP	5,0	85
Cyanine 3-dUTP veya Cyanin 5-dUTP	3,0	51
Exo (-) Klenow	1,0	17
Toplam	**19**	**323**

Her bir örneğe 19 µl EAK eklenmesi sonucu toplam karışım 50 µl'ye ulaştı. Karışım vortekslenmeden yavaşça pipetaj yapıldı. EAK eklenirken hasta örnekleri ile kontrol örneklerine farklı *Cyanine* boyası eklendi. Buna göre hasta örneklerine *Cyanine-3* (mavi), kontrol örneklerine *Cyainine-5* (kırmızı) eklendi. Örnekler termal döngü cihazına konarak DNA'nın işaretleme işlemine başlandı. Bu işlem ardından örnekler (-20) derecedeki soğutucuda korumaya alındı.

Tablo 16: Termal döngü cihazı kullanılarak DNA etiketlenmesi

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman**
1	37 °C	120 dakika
2	65 °C	10 dakika
3	4 °C	Bekleme

5.2.2.4.3 Etiketlenmiş DNA'nın Saflaştırılması

Tükürükten elde edilen ve bir önceki basamakta etiketlenmiş DNA protokol dışında bir ilk santrifüj yapılarak büyük ölçüde kirlilik uzaklaştırıldı. Saflaştırma boyunca hasta ve kontrol örnekleri ayrı ayrı işleme alındı ve aşağıdaki basamaklar takip edildi.

- Örnekler 1 dakika boyunca 6000 x g' de santrifüj edildi.
- Her bir örneğe 430 µl 1xTE (Tris-EDTA Tamponu) eklendi.
- Saflaştırılacak her bir DNA örneği, 2 ml'lik koleksiyon tüplerine saflaştırma kolonu konarak numaralandırıldı.
- Kolonlar bir kapak ile kapatıldıktan sonra 10 dakika boyunca 14000 x g'de oda sıcaklığında mikrosantrifüj edildi.
- Her bir örneğe 430 µl 1xTE (Tris-EDTA Tamponu) eklendi.
- Kolonlar bir kapak ile kapatıldıktan sonra 10 dakika boyunca 14000 x g'de oda sıcaklığında mikrosantrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpleri ve içinde biriken sıvılar atıldı. Filtreler ters çevrilip yeni koleksiyon tüplerine konuldu.
- Saflaştırılmış örnekleri toplayabilmek için 1 dakika boyunca oda sıcaklığında 1000 x g de santrifüj edildi.

5.2.2.4.4 DNA Kalite Ölçümü

Saflaştırma sonrası elde edilen üründen 1,5 µl alınarak nanospektrometre ile konsantrasyon ölçümü yapıldı. Ölçüm aşamaları:

- Nanospektrometre cihaz ayarlarından mikrodizin ölçümü ve DNA-50 örnek tipi seçildi.
- Bu ölçümden, boyalı DNA konsantrasyonu ve boya konsantrasyonları (*Cyanine 3* veya *Cyanine 5*) elde edildi.

- Elde edilen veriler ile spesifik aktivite hesaplanmışı için aşağıdaki formül kullanıldı.

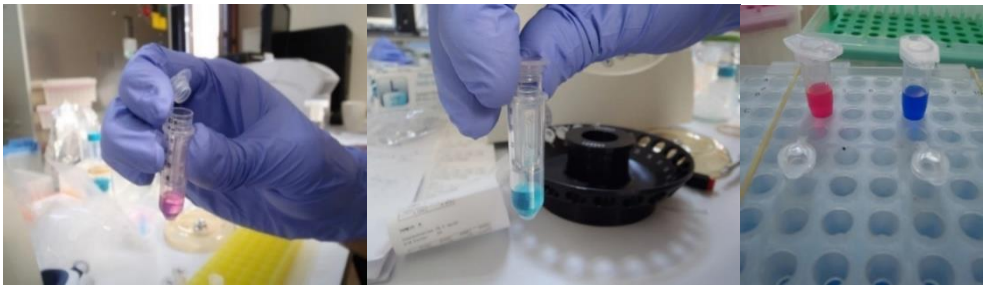
$$\text{Spesifik Aktivite (µg gDNA başına pmol boya)} = \frac{\text{µL boya başına pmol}}{\text{µL gDNA başına µg}}$$

- Ürün miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Ürün miktarı (µL)} = \frac{\text{DNA konsantrasyonu (ng/µL) x Örnek Hacmi (µL)}}{\text{1000 ng/µg}}$$

Hesaplama sonrası spesifik aktivitesi düşük bulunan örnekler mikrodizin deney aşamasına dahil edilmemesine karar verildi.

Hasta ve kontrol tükürüklerinden elde edilmiş, saflaştırılmış, farklı boyama ile etiketlenmiş, spesifik aktivite değerleri hesaplanmış DNA'lar mikrodizin analizi için hasta cinsiyetleri göz önünde bulundurularak ikili şekilde aynı mikrosantrifüj tüplerinde birleştirildi.



Resim 15: Hasta ve kontrol DNA'ları

5.2.2.4.5 DNA Mikrodizin Hibridizasyonu

Hibridizasyonda kullanılmak üzere Hibridizasyon Ana Karışımı (HAK) tablodaki belirtilen değerlere göre hazırlandı.

Tablo 17: 4 *Array*'li mikrodizin Slaydı için Hibridizasyon Ana Karışımı

Bileşen	**Hibridizasyon başına hacim (µl)**	**12 reaksiyonluk (fazlası dahil) (µl)**
Cot-1 DNA (1.0 mg/ml)	5	60
10x aCGH Bloke Edici Ajan	11	132
2x HI-RPM Hibridizasyon Tamponu	55	660
Toplam	71	852

Hibridizasyon Ana Karışımından 71 µl ile hasta ve kontrol örneklerin birleşmesi sonucu elde edilen karışımı (39 µl) birleştirilmesi sonucu 110 µl'lik toplam karışım elde edildi. Son karışım önce pipetajla karıştırıldıktan sonra hızla santrifüj edilerek çökelme sağlandı. Ardından örnekler ısıl döngü cihazında aşağıdaki program uygulandı.

Tablo 18: Isıl döngü cihazı programı

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman**
1	95 °C	3 dakika
2	37 °C	30 dakika

Mikrodizin hibridizasyonu için temiz bir contalı slayt hibridizasyon odasının alt bölümüne, slaydın contalı kısmı yukarı bakacak şekilde ve kenarları tam oturacak şekilde yerleştirildi.

Slaytta bulunan 4 adet örnek koyma kısmına her bir örnekten 100 µl miktarda "sürükle ve dağıt" yöntemi ile ortasından çevresine doğru olacak şekilde konuldu.

Bu işlemin ardından mikrodizin slaytları, contalı slaytların üzerine aktif kısımları örneklere bakacak şekilde kapatıldı. Mikrodizin slaytlarının aktif yönü gösteren "Agilent" yazan kenar kısımları alt tarafa, inaktif yönü gösteren kod numarası bulunan kısımlarının ise üst tarafa bakması sağlandı. Slaytların aktif kısımlarına kesinlikle dokunulmadı. Hibridizasyon odasının kapağı kapatıldı ve mandalı sıkıldı. Hibridizasyon odası yan çevrilerek karıştırıldı ve baloncuk oluşumu hafif vurularak dağıtıldı.

Hazırlanan hibridizasyon odaları 67 °C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırına konarak 24 saat boyunca hibridizasyon döndürücüsünde 20 devir/dakika hızda döndürüldü.

5.2.2.4.6 DNA Mikrodizinlerin Yıkanması

Hibridize edilen mikrodizin Slaytları yeni hazırlanmış *Oligo aCGH/ChIP-on-chip* Yıkama Tamponu 1 ve Yıkama Tamponu 2 (Agilent) ile yıkanmak üzere hazırlandı.

Tablo 19: Yıkama ortamları

Yıkama Tabağı	**Yıkama Tamponu**	**Sıcaklık**	**Zaman**
1- Sökme	*Oligo aCGH/ChIP-on-chip* Yıkama Tamponu 1 (Agilent)	Oda sıcaklığı	
2- Birinci Yıkama	*Oligo aCGH/ChIP-on*-chip Yıkama Tamponu 1 (Agilent)	Oda sıcaklığı	5 dakika
3- İkinci Yıkama	*Oligo aCGH/ChIP-on-chip* Yıkama Tamponu 2 (Agilent)	37 °C	1 dakika

24 saatlik hibridizasyon sonrası, slaytlar hibridizasyon odasından çıkarıldı. Contalı slayt ile mikrodizin slaydı Yıkama Tamponu 1'in bulunduğu birinci cam tabak içinde birbirinden ayrıldı. Mikrodizin Slaydı hemen ardından içinde manyetik karıştırıcı çubuk bulunan ve Yıkama Tamponu 1'i içeren ikinci yıkama tabağına alındı. Manyetik karıştırıcı çubuk 350 rpm ile 5 dakika boyunca döngüde bırakıldı. Ardından slaytlar Yıkama Tamponu 2'ye alınarak 37 °C'de 1 dakika boyunca yıkandı. Süre

sonunda hava kabarcıkları kalmaması için slaytlar oldukça yavaş şekilde sudan çıkarıldı.

5.2.2.4.7 DNA Mikrodizinlerinin Taranması ve Görüntü Dosyalarının Elde Edilmesi

Yıkamadan çıkarılan slaytların çevresel etkiler ve oksitlenmeden etkilenmemesi için tarayıcıya konması gerekmektedir. Yukarıda belirtilen yıkama süreçleri sonucu slaytlar derhal Slayt Tutucu'ya slayt etiketi kapağa bakacak şekilde yerleştirildi. Slayt tutucu kapağı kapatıldıktan sonra derhal mikrodizin okuyucuya yüklendi.

Okuyucuya yüklenen slaytlar için "AgilentG3_CGH" protokolü seçildi. Slaytlar tarayıcının okuyucu kısmına dikkatlice yerleştirildi. Tarayıcının durumu kontrol edildikten sonra tarama işlemine başlandı.



Şekil 6: Slayt ve slayt tutucu

Tarama işlemi sonrası mikrodizin Tarayıcıya bağlı olan bilgisayarda sırasıyla her bir slayt için görüntü dosyaları (.tif) oluştu ve bunlar log oranlarına dönüştürüldü.

Bu aşamada örneklerin kalite kontrolü için Agilent firmasının hazırladığı *Feature Extraction* yazılımı kullanılarak örneklerin görüntü kaliteleri raporları elde edildi. Bu raporlar bir mikrodizin deneyindeki göreceli veri kalitesini değerlendirilmesi için kullanılabilmektedir. Aynı zamanda bazı olgularda, olası işleme hatalarını gösterebilir veya bazı mikrodizinlerden elde edilen veriler dengelenebilir.

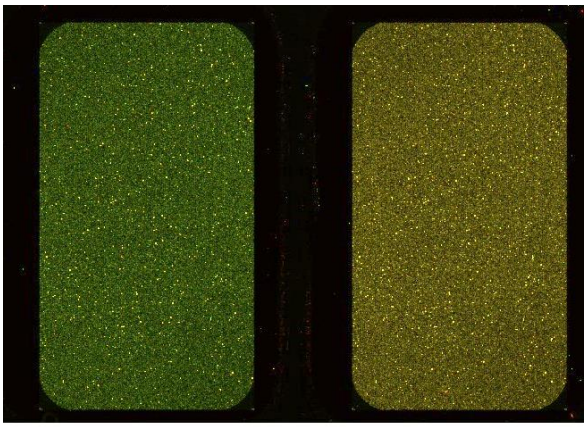
Mikrodizin formatında elde edilen verilerin ölçütlerini etkileyecek birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; mikrodizin slaydının sayı formatı (1li, 2li, 4lü veya 8li

olması), biyolojik örneğin kaynağı, başlangıç DNA kalitesi, deney süreci, tarayıcı hassasiyeti ve görüntünün işlenmesidir.

Aşağıdaki tabloda bu protokole uygun örneklerin incelenmesi sırasında elde edilen eşik değerleri verildi.

Tablo 20: Enzimatik etiketleme için kalite kontrol metrik eşik değerleri

Ölçüt Değer	**Mükemmel**	**İyi**	**Tekrar değerlendir**
Gürültü	< 10	10 ile 20 arası	> 20
Sinyal Yoğunluğu	> 150	50 ile 150 arası	< 50
Sinyal	> 100	30 ile 100 arası	< 30
Tekrarlanabilirlik	< 0.05	0,05 ile 0,2 arası	> 0.2
DLRSD	< 0.2	0,2 ile 0,3 arası	> 0.3

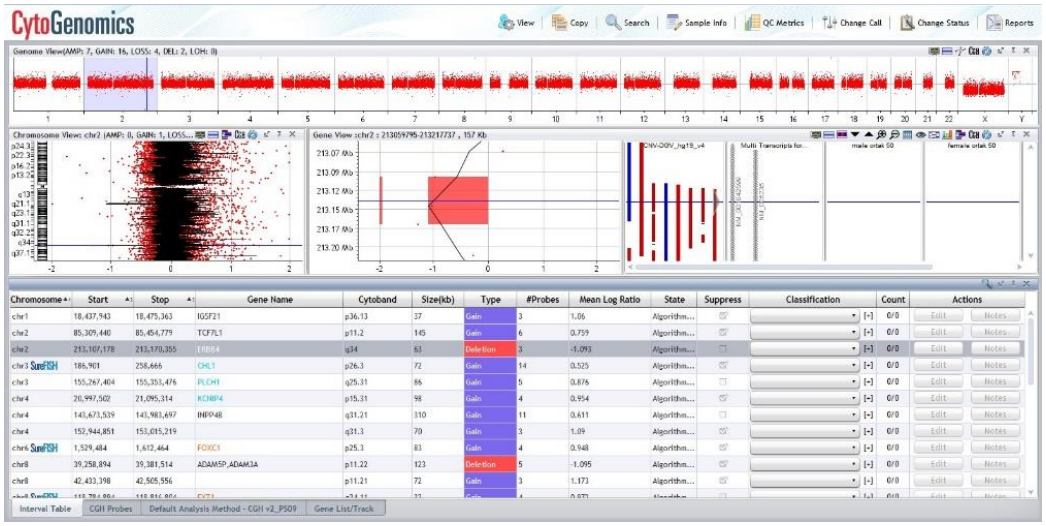


Resim 16: DNA mikrodizini bilgisayar yazılım görüntüsü

5.2.2.4.8 DNA mikrodizin Verilerinin Analizi

Kopya Sayısı Değişikleri (KSD) tespiti için elde edilen görüntü dosyaları CytoGenomics 3.0.6.6 (Agient) yazılımı ile incelenerek aşağıdaki adımlar izlendi:

- Her bir *array*'den elde edilmiş görüntü dosyası *(Raw Data)* yazılıma tek tek yüklendi
- Yazılım internet veritabanından "Homo Sapiens hg19" kopya sayısı değişikliği karşılaştırma verileri indirildi.
- Her bir örnek veritabanıyla eşleştirilerek analiz işlemi başlatıldı.



Resim 17: DNA mikrodizin bulgu analizi

KSD'lerde Analiz Dışı Parametreler

- Prob sayısı 2 ve üstü seçildi
- Her bir örneğin analiz sonuçları incelenerek; bağlanan prob sayısı ikiden az olan, sentromer ve telomer bölgelerde tespit edilmiş gen bölgeleri elendi.

6. BULGULAR

6.1 Klinik Bulgular

Klinik çalışmamız Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Kliniğine Eylül 2011-Nisan 2015 tarihleri arasında artı diş tanısı kliniğimizde konan 210 hasta ile yapıldı.

Tablo 22'de artı diş tanısı konan çocukların yaşa ve cinsiyete göre dağılımları görülmektedir. Çalışmamızda 139 erkek (%66,19), 71 kız (%33,81) olmak üzere toplam 210 çocuk hastada 250 artı diş bulundu.

Çocuk hastaların yaşlara göre dağılımlarının 5 yaş %8, 6 yaş %10, 7 yaş %16, 8 yaş %21, 9 yaş %19, 10 yaş %10, 11 yaş %9, 12 yaş %5, 13 yaş %2 olduğu bulundu (Tablo 21). Artı dişlerin en çok tespit yaş 8, ardından 9, 7, 6, 10, 11, 5, 12, 13 olarak bulundu. Böylece artı dişlerin tanısın en fazla konduğu yaş aralığın erken karışık dişlenme dönemi olduğu tespit edildi.

Artı diş tanısında erkek hastalarda erken karışık dişlenme döneminde tanı yüzdesi %71,94 ve geç karışık dişlenme döneminde ise %28,06'dır. Kız hastalarda erken karışık dişlenme döneminde tanı yüzdesi %77,46 ve geç karışık dişlenme döneminde ise %22,54'tür. Kız ve erkek hastaların yaşlara göre (erken ve geç karışık dişlenme dönemleri açısından) dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,3892).

Artı diş tanısı konan erkek hastaların kız hastalara oranı 1,958:1 olarak tespit edildi.

Tablo 21: Artı diş hastalarının yaşlarına göre dağılımı

	5 yaş	**6 yaş**	**7 yaş**	**8 yaş**	**9 yaş**	**10 yaş**	**11 yaş**	**12 yaş**	**13 yaş**	**Toplam**
Erkek	9	16	23	28	24	17	15	6	1	139
Kız	7	6	11	16	15	5	4	4	3	71
Toplam	16	24	34	44	39	22	19	10	4	210

Tablo 22'de hastalarda tespit edilen artı diş sayılarının cinsiyete göre dağılımı görülmektedir. Tüm hastalara göre bir adet artı dişi olan hastaların dağılımı %60,80 (%37,60 Erkek, %23,20 Kız); iki adet fazla dişi olanların dağılımı %18,57 (%12,80 Erkek, %2,80 Kız); ikiden fazla artı dişi olan hastaların dağılımı %9,04'tür (%5,20 Erkek, %2,40 Kız).

Buna göre artı diş olgularının tanısında en sık görülen artı diş sayısının bir adet olduğu bulundu. Artı diş hastalarının cinsiyetleri ile diş sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,0575).

Tablo 22: Artı dişlerin sayısına ve cinsiyete göre dağılımları

	1 Artı diş	**2 Artı Diş**	**>2 Artı Diş**	**Toplam**
Erkek	94	32	13	139
Kız	58	7	6	71
Toplam	152	39	19	210

Tablo 23'de artı dişlerin şekillerinin ve cinsiyete göre dağılımları görülmektedir. Toplam 250 adet artı dişin cinsiyete göre dağılımları erkeklerde %68,8, kızlarda %31,2 olup birbirlerine oranı 2,205:1 olarak tespit edildi. Artı dişlerin tiplerine göre dağılımları Konik %46,8, Suplemental %26, Tüberküllü %20, Odontoma %5,6, Paramolar %1,6 şeklinde bulundu.

Tablo 23: Artı dişlerin şekil ve cinsiyete göre dağılımları

	Konik	**Suplemental**	**Tüberküllü**	**Odontoma**	**Paramolar**	**Toplam**
Erkek	79	50	31	8	4	172
Kız	38	15	19	6	0	78
Toplam	117	65	50	14	4	250

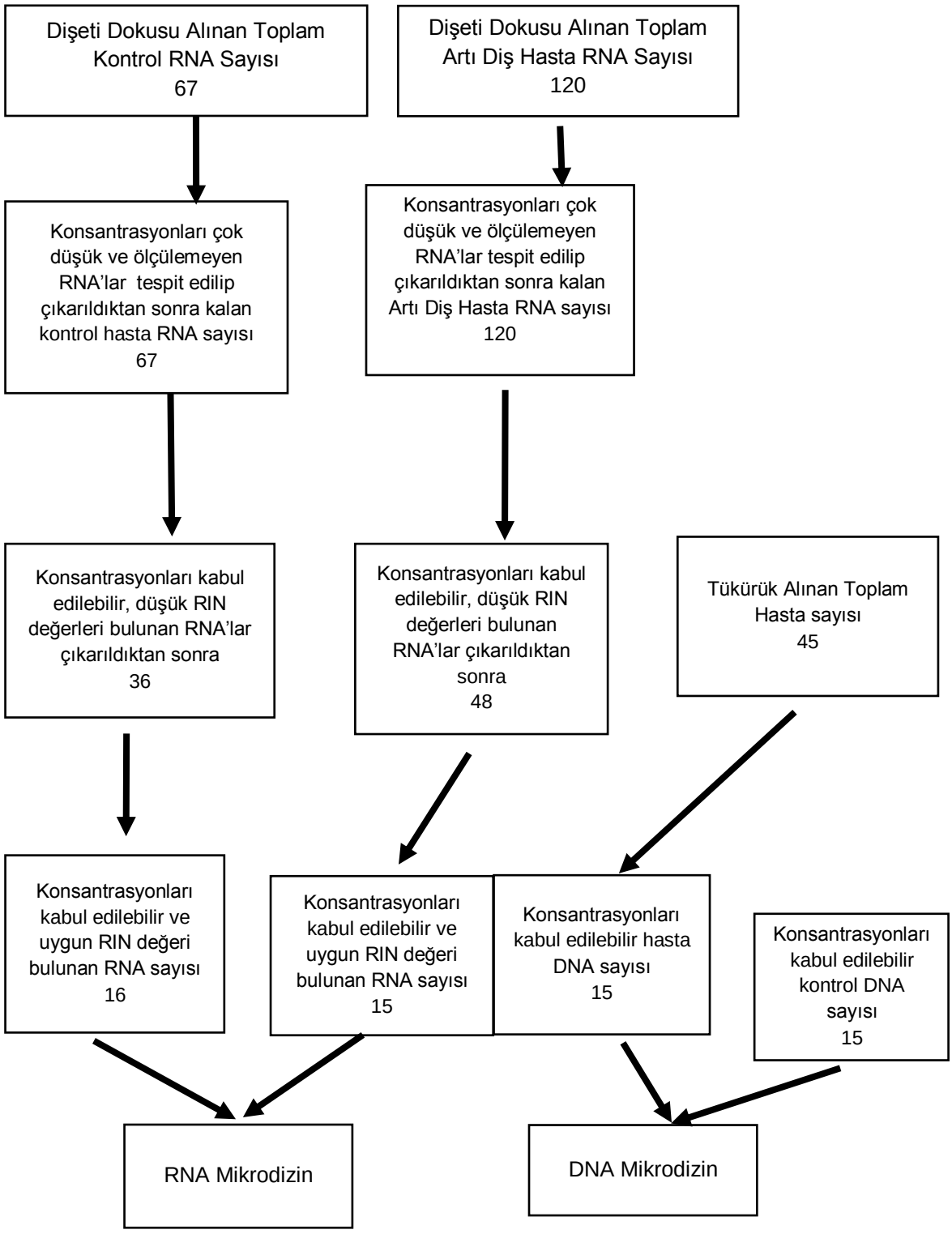
Tablo 24'te artı diş şekillerinin konuma göre dağılımları görülmektedir. Buna göre artı dişlerin %32,40'si kret üzerinde, %32'si palatinalde, %30,80'i ortahatta, %4,80'i ise mandibulada bulundu. Vestibül alanda hiç artı diş olgusu saptanmadı. Artı dişlerin 237 adeti (%94,80) premaksilla bölgesinde bulundu.

Ortahat ve palatinal bölgede en çok konik dişleri tespit edilirken, Kret bölgesinde Tüberküllü ve Suplemental dişlerin daha sık görüldüğü bulundu.

Tablo 24: Artı dişlerin şekillerinin konuma göre dağılımları

	Konik	**Suplemental**	**Tüberküllü**	**Odontoma**	**Paramolar**	**Toplam**
Ortahat	57	14	6	0	0	77
Palatinal	48	16	15	1	0	80
Kret üzeri	12	28	29	11	1	81
Mandibula	0	7	0	2	3	12
Toplam	117	65	50	14	4	250

6.2 DNA ve RNA Mikrodizin Profilleme Bulguları



Şekil 7: RNA ve DNA Mikrodizin Profilleme Yapılan Hasta Sayıları

6.2.1 RNA ve DNA Mikrodizin Bulguları

RNA ve DNA mikrodizin profilleme yapılan hasta sayıları Şekil 7'de görülmektedir.

Artı diş hastalarından odontom ve paramolar tanısı konan ve/veya mandibulada konumlu olgular ile çekim endikasyonu bulunmayan olgular çıkarıldıktan sonra dişeti ve çevre dokusu alınabilen 120 artı diş olgusu moleküler çalışmaya dahil edildi.

Artı diş olgularının doku örnekleri toplanırken aynı sayıda cinsiyet ve yaşları en iyi şekilde örtüşecek, diş çekimi endikasyonu kliniğimizde konmuş, herhangi bir sistemik ve dental hastalığı ve/veya sendromu olmayan, 67 kontrol hastasından dişeti dokuları alınarak moleküler çalışmaya dahil edildi.

120 artı diş ve 67 kontrol hastasından farklı zamanlarda elde edilen toplam 187 dişeti doku örnekleri kademeli olarak RNA mikrodizin izolasyon kitleri kullanılarak RNA izolasyonları yapıldı.

Her izolasyon işlemi sonrası yapılan kalite kontrol ölçümleri sonucu yeterli miktar ve kaliteye sahip Mikrodizin analizine dahil edilebilecek 16 RNA örneği tespit edildi. Kontrol grubu ise aynı cinsiyette ve yaşları yüksek oranda örtüşecek şekilde 16 kontrol hastasından izole edilen RNA'lardan seçildi. Tablo 25'te RNA izolasyon sonuçları görülmektedir.

Mikrodizin taraması öncesi yapılan kalite kontrol ölçümleri sonucu 1 kontrol örneği çalışma dışı bırakılarak toplam 31 olgunun RNA Mikrodizin analizi yapıldı.

Tablo 25: RNA çalışmasına dahil edilen bütün örneklerin dağılımı

RNA	**Kontrol Hastaları**	**Artı Diş Hastaları**
Konsantrasyonları çok düşük veya ölçülemeyen	31	72
Konsantrasyonları kabul edilebilir seviyede, RIN değerleri yetersiz	20	33
Konsantrasyon ve RIN değerleri kabul edilebilir seviyede	16	15
Alınan toplam doku sayısı	67	120

RNA Mikrodizin analizinde değerlendirilen 16 hastanın her birinden ayrıca tükürük örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapıldı. 16 hastada yapılan DNA

izolasyonu sonrası yapılan kalite kontrol ölçümleri sonrası 12 hastanın DNA mikrodizin analizine dahil edilmesine karar verildi. Tablo 26'da RNA ve DNA Mikrodizin Deneyine dahil edilen Artı Diş Hastalarının Klinik Bulguları görülmektedir.

Tablo 26: RNA ve DNA mikrodizin deneyi yapılan örneklere ait hasta listesi

Adı	Cinsiyet	Yaş	Artı Diş Sayısı	Artı Diş Tipi	Artı Diş Konumu	RNA	DNA
İ.D	E	9	1	Suplemental	Ortahat	+	+
E.B.	E	8	2	Suplemental	Ortahat	+	-
C.Ç.	E	9	1	Suplemental	Ortahat	+	+
Y.E.M	E	9	2	Tüberküllü	Kret	+	-
S.K.	E	13	2	Konik	Kret	+	+
E.Ş.	E	9	1	Konik	Kret	+	+
K.D.	E	9	1	Konik	Kret	+	+
B.B.	E	11	1	Konik	Kret	+	+
T.G.	E	9	2	Suplemental	Pale	-	+
E.N.B.	K	13	2	Tüberküllü	Pale	+	+
A.K.	K	12	1	Tüberküllü	Pale	+	+
H.U.	K	13	1	Konik	Ortahat	+	+
N.B.	K	12	1	Konik	Ortahat	+	-
M.K.	K	9	2	Konik	Kret	+	+
Y.A.	K	8	1	Tüberküllü	Pale	+	+
E.O.	K	10	1	Tüberküllü	Pale	+	-
M.A.	E	9	1	Suplemental	Pale	+	-

6.2.2 RNA Mikrodizin Bulguları

6.2.2.1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Kıyaslanması

Mikrodizin taraması sonrası *GeneSpring* yazılımı kullanılarak yapılan analizde 50739 prob noktası bulundu. Bu noktalardan hasta ve kontrol gruplarının oluşturduktan sonra "%100'ü tespit edilmiş" genlerin seçilmesi sonrası 19087 prob elde edildi. Ardından "Kat sayısı değeri" *(Fold Change)* 2,0 ve üzeri olan problar seçildiğinde 239 değerine ulaşıldı. Elde edilen anlamlı derecede değişiklik göstermiş problara *Benjamini-Hochberg* T-Testi ($p<0,05$) uygulanması sonrası 216 anlamlı değişiklik bulundu. Tablo 27'de Tüm artı diş hastalarının kontrol hastalarıyla kıyaslandığında anlamlı derecede farklı anlatıma sahip olmuş genlerin listesi sunulmuştur. Toplamda 89 adet gen istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 27: Tüm artı diş hastalarının kontrol hastalarıyla kıyaslandığında anlamlı derecede farklı bulunmuş problar, değişim katsayıları, p değerleri, ilgili genler

Prob Adı	**Değişim Katsayısı (Fold Change)**	**p Değeri**	**Gen Sembolü**	**Gen Adı**
A_23_P84596	4.265882	0.01145144	MZB1	*marginal zone B and B1 cell-specific protein*
A_23_P214360	4.0400486	0.011976836	IRF4	*interferon regulatory factor 4*
A_24_P239076	3.7777917	0.012638507	IGLL1	*immunoglobulin lambda-like polypeptide 1*
A_24_P95723	3.5587487	0.016042843	KIAA0125	*KIAA0125*
A_33_P3335506	3.5020308	0.015364704	FCRL5	*Fc receptor-like 5*
A_23_P397320	3.499768	0.010808366	JSRP1	*junctional sarcoplasmic reticulum protein 1*
A_23_P52761	3.4895751	0.02759124	MMP7	*matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)*
A_23_P167328	3.478267	0.010808366	CD38	*CD38 molecule*
A_23_P330561	3.45135	0.013979391	MCEMP1	*mast cell-expressed membrane protein 1*
A_33_P3359084	3.2495756	0.011626894	TAS1R3	*taste receptor, type 1, member 3*
A_23_P32279	3.1662211	0.010808366	BARX1	*BARX homeobox 1*
A_33_P3379039	3.1659393	0.015037531	IGLL5	*immunoglobulin lambda-like polypeptide 5*
A_23_P37736	3.1589003	0.015108394	TNFRSF17	*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17*
A_23_P145096	2.9807236	0.011157742	PLA2G7	*phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)*

A_23_P201211	2.8822148	0.019499633	FCRL5	*Fc receptor-like 5*
A_23_P312920	2.8724172	0.011877949	POU2AF1	*POU class 2 associating factor 1*
A_23_P140190	2.8158107	0.013784767	KIAA0125	*KIAA0125*
A_23_P12082	2.7495275	0.017970968	CHI3L2	*chitinase 3-like 2*
A_23_P113572	2.70416	0.011976836	CD19	*CD19 molecule*
A_23_P63209	2.652263	0.010808366	HSD11B1	*hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1*
A_24_P353638	2.6381242	0.010808366	SLAMF7	*SLAM family member 7*
A_24_P109214	2.636792	0.03399653	APOC1	*apolipoprotein C-I*
A_21_P0008056	2.582225	0.013694321	lnc-C13orf15-1	*lnc-C13orf15-1:1*
A_23_P438	2.573884	0.01537943	LAX1	*lymphocyte transmembrane adaptor 1*
A_33_P3267799	2.5563037	0.018489212	LILRB4	*leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4*
A_33_P3335522	2.5212116	0.039842248	FCRL5	*Fc receptor-like 5*
A_21_P0008402	2.517307	0.031412866	lnc-C14orf79-2	*lnc-C14orf79-2:2*
A_33_P3408918	2.5002754	0.049125794	SAA2	*serum amyloid A2*
A_24_P319647	2.4968488	0.017556168	FCRL2	*Fc receptor-like 2*
A_21_P0014695	2.4709089	0.008658715	KATNAL2	*katanin p60 subunit A-like 2*
A_23_P39067	2.462281	0.013979391	SPIB	*Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)*
A_23_P253321	2.4572887	0.018784072	PNOC	*prepronociceptin*
A_23_P357717	2.4048924	0.019499633	TCL1A	*T-cell leukemia/lymphoma 1A*
A_23_P165624	2.390322	0.016042843	TNFAIP6	*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6*
A_23_P4714	2.3656049	0.030395243	MIA	*melanoma inhibitory activity*
A_33_P3328254	2.349334	0.021835804	IL5RA	*interleukin 5 receptor, alpha*
A_24_P944253	2.3467436	0.016318504	KLHL6	*kelch-like family member 6*
A_23_P151046	2.3350601	0.004621146	KLRC1	*killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1*
A_21_P0003604	2.3350377	0.010808366	lnc-DCAF4L1-1	*lnc-DCAF4L1-1:1*
A_23_P211561	2.3140721	0.018908186	MEI1	*meiosis inhibitor 1*
A_33_P3390172	2.311994	0.020229613	ADAMDEC1	*ADAM-like, decysin 1*
A_33_P3419567	2.3058035	0.010808366	RAD21L1	*RAD21-like 1 (S. pombe)*
A_33_P3314176	2.2972214	0.018663479	FAM46C	*family with sequence similarity 46, member C*
A_33_P3379701	2.2955914	0.019499633	TRIM36	*tripartite motif containing 36*
A_33_P3345952	2.2923458	0.010808366	SLC39A12-AS1	*SLC39A12 antisense RNA 1*
A_21_P0012545	2.2877543	0.010808366	LINC00971	*long intergenic non-protein coding RNA 971*
A_33_P3321507	2.28595	0.04660168	TNRC18	*trinucleotide repeat containing 18*
A_33_P3368334	2.2844627	0.02148914	FCRL3	*Fc receptor-like 3*

A_23_P212655	2.2683194	0.012638507	KLHL6	*kelch-like family member 6*
A_23_P152002	2.2606592	0.03575954	BCL2A1	*BCL2-related protein A1*
A_24_P237270	2.2509487	0.017970968	ADORA2A	*adenosine A2a receptor*
A_23_P30983	2.248547	0.013979391	GJB7	*gap junction protein, beta 7, 25kDa*
A_33_P3226080	2.2410145	0.017497616	SCIMP	*SLP adaptor and CSK interacting membrane protein*
A_21_P0014489	2.2393007	0.020622749	lnc-MAT2B-3	*lnc-MAT2B-3:8*
A_23_P63032	2.221936	0.015228956	GUCA2B	*guanylate cyclase activator 2B (uroguanylin)*
A_23_P26024	2.216533	0.011976836	C15orf48	*chromosome 15 open reading frame 48*
A_21_P0012158	2.2162356	0.015364704	lnc-C20orf197-4	*lnc-C20orf197-4:1*
A_23_P83347	2.2025473	0.016504789	RNF183	*ring finger protein 183*
A_23_P87310	2.1992881	0.04064217	LMO1	*LIM domain only 1 (rhombotin 1)*
A_23_P46039	2.1563485	0.013293486	FCRLA	*Fc receptor-like A*
A_23_P426021	2.1531198	0.010808366	SEL1L3	*sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)*
A_24_P870620	2.1519449	0.041923728	PTN	*pleiotrophin*
A_33_P3336720	2.1435246	0.033670448	HAMP	*hepcidin antimicrobial peptide*
A_21_P0010162	2.141227	0.043458045	LINC01436	*long intergenic non-protein coding RNA 1436*
A_23_P56559	2.138229	0.012638507	DHRS9	*dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9*
A_32_P54274	2.1370604	0.022378074	DRD5	*dopamine receptor D5*
A_33_P3400248	2.131248	0.011528648	FGF20	*fibroblast growth factor 20*
A_23_P48088	2.1282158	0.015903763	CD27	*CD27 molecule*
A_33_P3406567	2.1270504	0.027676668	MS4A1	*membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1*
A_19_P00810085	2.1268542	0.018663479	LINC00607	*long intergenic non-protein coding RNA 607*
A_32_P187704	2.1251762	0.03128817	SNTG1	*syntrophin, gamma 1*
A_23_P84118	2.1163352	0.010808366	CDH18	*cadherin 18, type 2*
A_21_P0007252	2.114404	0.033670448	lnc-TMEM135-2	*lnc-TMEM135-2:1*
A_33_P3246598	2.0981228	0.012638507	NUGGC	*nuclear GTPase, germinal center associated*
A_33_P3342056	2.097083	0.034733564	TIGIT	*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*
A_21_P0001264	2.0926147	0.029698107	lnc-PRDM2-1	*lnc-PRDM2-1:1*
A_23_P84219	2.0820808	0.0037175168	LIPH	*lipase, member H*
A_23_P31124	2.0618272	0.018687798	COL21A1	*collagen, type XXI, alpha 1*
A_23_P500271	2.050052	0.017604781	IRF5	*interferon regulatory factor 5*
A_23_P360542	2.047188	0.015228956	LINC00470	*long intergenic non-protein coding RNA 470*
A_23_P121695	2.0322955	0.013979391	CXCL13	*chemokine (C-X-C motif) ligand 13*

A_21_P0004622	2.0312536	0.03128817	lnc-AL035696.1-5	*lnc-AL035696.1-5:1*
A_23_P119835	2.0282917	0.019474935	NLRC4	*NLR family, CARD domain containing 4*
A_21_P0009444	2.019388	0.02759124	lnc-AP001496.1-2	*lnc-AP001496.1-2:1*
A_23_P135226	2.0168295	0.012638507	OR1N2	*olfactory receptor, family 1, subfamily N, member 2*
A_32_P14721	2.009061	0.027564853	DNAH12	*dynein, axonemal, heavy chain 12*
A_21_P0003630	2.0062842	0.011780048	lnc-RAP1GDS1-2	*lnc-RAP1GDS1-2:1*
A_33_P3231414	2.004534	0.027984573	LILRB1	*leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1*
A_23_P142070	2.001321	0.04759238	TSPAN16	*tetraspanin 16*

Genler, anlatımları artan ve azalanlar olmak üzere ayrı ayrı incelendi. Buna göre tüm artı diş hastalarının kontrol hastaları ile kıyaslandığında anlatım seviyelerinin arttığı tespit edildiği genler sitoband numaraları temel alınarak Tablo 28'de sıralanmıştır.

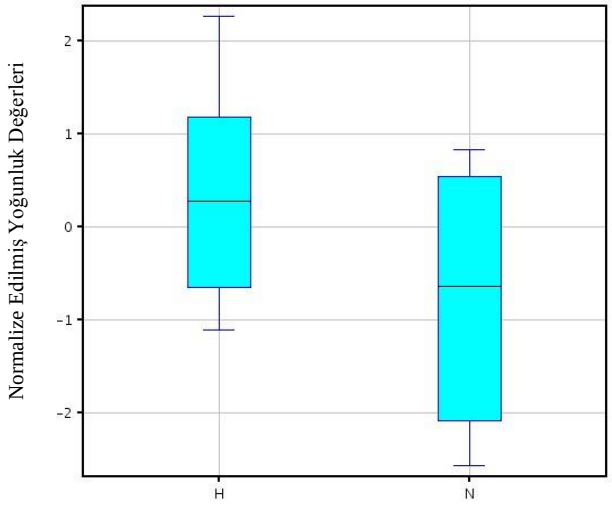
Tablo 28: Tüm artı diş hastalarının kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımı artan sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Sitoband	**Değişim Katsayısı (Fold Change)**	**Gen Sembolü**	**Gen Adı**
1p34.2	2.221936	GUCA2B	*guanylate cyclase activator 2B (uroguanylin)*
6p12.1	2.0618272	COL21A1	*collagen, type XXI, alpha 1*
7q33	2.1519449	PTN	*pleiotrophin*
11p15.4	2.1992881	LMO1	*LIM domain only 1 (rhombotin 1)*
18q21.1	2.4709089	KATNAL2	*katanin p60 subunit A-like 2*
19q13.2	2.3656049	MIA	*melanoma inhibitory activity*

Tüm artı diş hastalarının kontrol hastaları ile kıyaslandığında 6 farklı kromozomda 6 adet genin anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Bu genler *GeneCards* İnsan Gen Veritabanından (http://www.genecards.org) taranarak aşağıdaki şekilde açıklanmıştır.

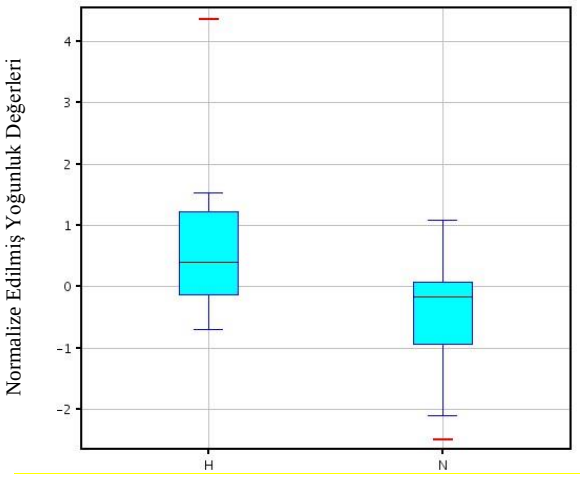
GUCA2B geni, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 2,2 kat artış gösterdiği bulundu (p=0.0152). GUCA2B geni *(Guanilate Cyclase Activator 2B)*

protein kodlayan bir gendir. Literatürde kolonorektal kanser ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir (Li ve ark., 2012).



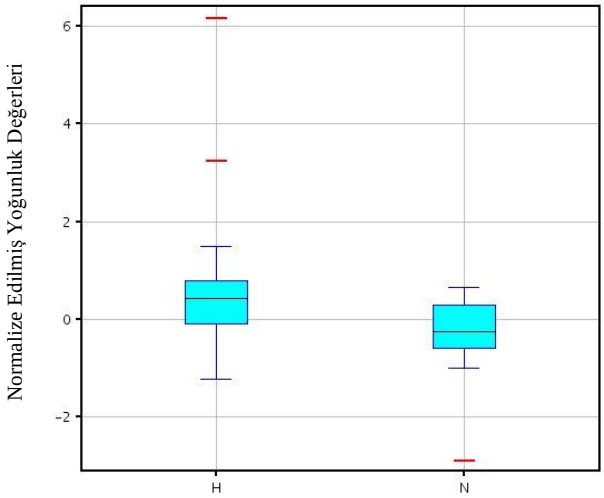
Şekil 8: GUCA2B geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

COL21A1 geni, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 2 kat artış gösterdiği bulundu (p=0.0186). COL21A1 geni kollagen tip XXI geni protein kodlayan bir gendir. Ekstrasellüler matrisin bütünlüğünü sağlayan kollagen genleri içinde sayılmaktadır (Fitzgerald ve Bateman. 2001).



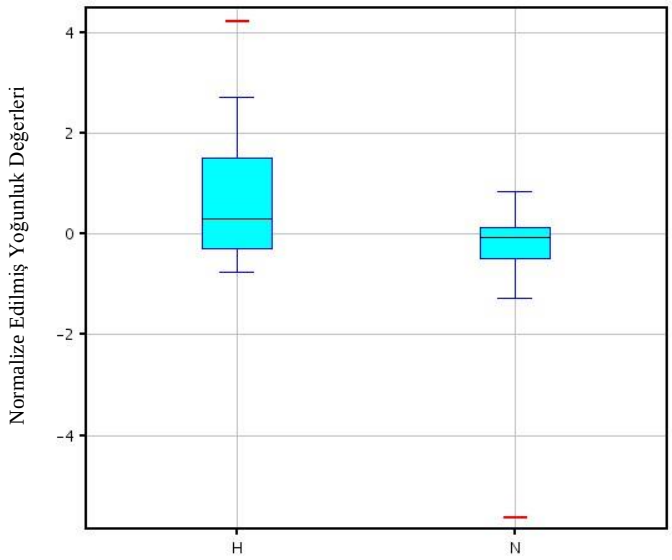
Şekil 9: COL21A1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

PTN geni, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 2,1 kat artış gösterdiği bulundu (p=0.0419). PTN, Pleiotropin protein kodlayan bir gendir. Bronkial ve göğüs kanserleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. (Fu ve ark., 2016) (Du ve ark. 2015)



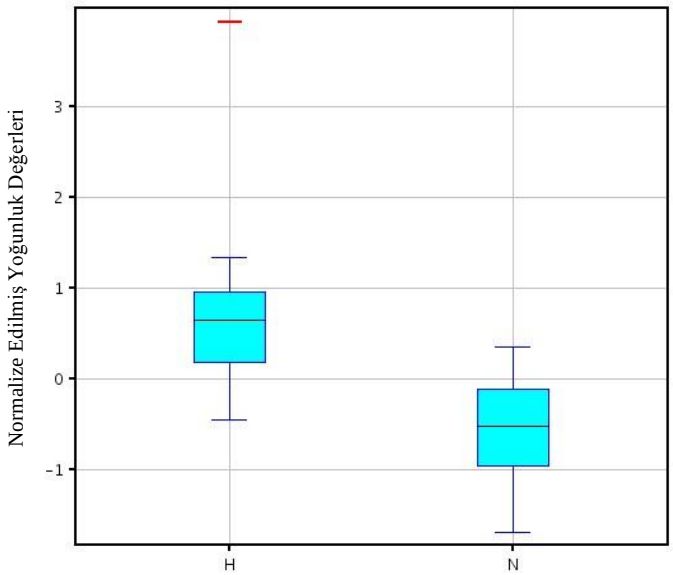
Şekil 10: PTN geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

LIMO1 geni, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 2,1 kat artış gösterdiği bulundu (p=0.0406). LMO1, LIM alan proteinleridir. Sitoiskeletsel organizasyonda, organ gelişiminde ve onkogenezisde rol oynamaktadır. LIMO1 genin akut lemfoblastik T hücre lösemisi ile bağlantılı olduğu varsayılmaktadır (Oldridge ve ark., 2015).



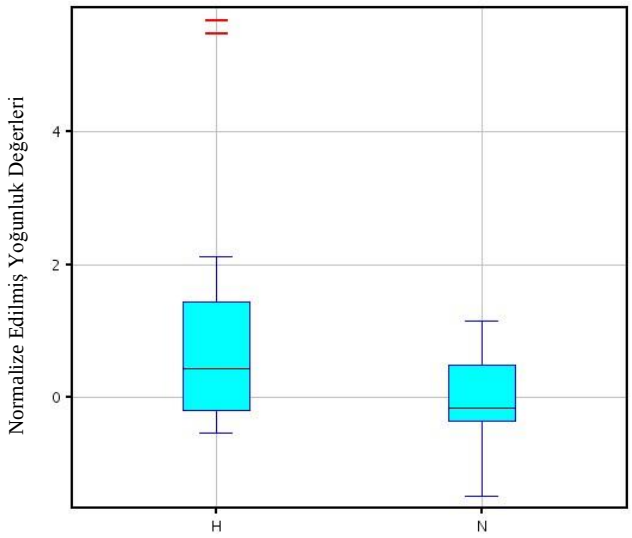
Şekil 11: LIMO1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

KATNAL2 geni, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 2,4 kat artış gösterdiği bulundu (p=0.0086). KATNAL2 geni, protein kodlayan bir gendir. Saçlı deri ile bağlantısı olduğu düşünülmektedir. (Ververis ve ark., 2016).



Şekil 12: KATNAL2 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

MIA geni, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 2,3 kat artış gösterdiği bulundu (p= 0.0245). MIA, melanoma inhibtör aktivite geni protein kodlayan bir gendir. Melanoma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Riechers ve Bosserhoff, 2014).



Şekil 13: MIA geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

Tüm artı diş hastalarının kontrol hastalarıyla kıyaslandığında ekspresyon seviyesine göre down regüle olan 83 gen tespit edilmiştir. Bu genlerden dört gen 1. kromozomda, dört gen 2. kromozomda, yedi gen 3. kromozomda, altı gen 4. kromozomda, dört gen 5. kromozomda, dört gen 6. kromozomda, iki gen 7. kromozomda, beş gen 8. kromozomda, üç gen 9. kromozomda, bir gen 10. kromozomda, beş gen 11. kromozomda, iki gen 12.kromozomda, bir gen 13. kromozomda, dört gen 14. kromozomda, iki gen 15. kromozomda, iki gen 16. kromozomda, bir gen 17. kromozomda. iki gen 18. kromozomda, 8 gen 19. kromozomda, iki gen 20. kromozomda, bir gen 21. kromozomda, dört gen 22. kromozomda bulunmuştur.

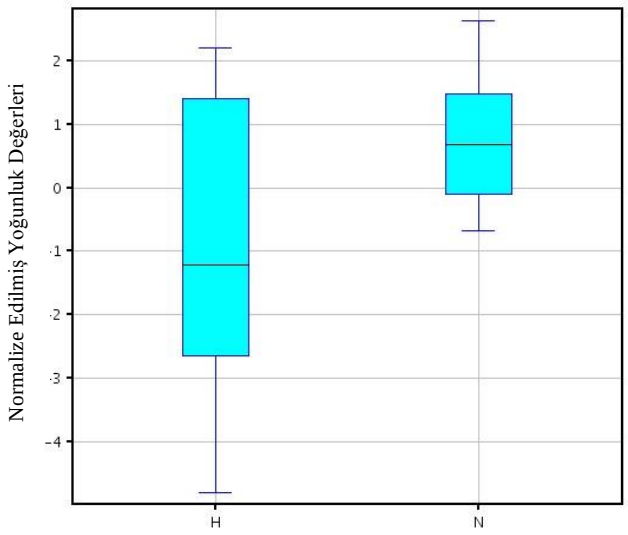
83 genden değişim katsayısı 3 ve üstünde olan 13 gen sitoband numaraları temel alınarak Tablo 29'de sıralanmıştır.

Tablo 29: Tüm artı diş hastalarının kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımı azalan sitobandlar, değişim katsayıları (>3) ve ilgili genler

Sitoband	Değişim Katsayısı (Fold Change)	Gen Sembolü	Gen Adı
1q23.1	3.5020308	FCRL5	*Fc receptor-like 5*
1p36.33	3.2495756	TAS1R3	*taste receptor, type 1, member 3*
4p15.32	3.478267	CD38	*CD38 molecule*
5q31.2	4.265882	MZB1	*marginal zone B and B1 cell-specific protein*
6p25.3	4.0400486	IRF4	*interferon regulatory factor 4*
9q22.32	3.1662211	BARX1	*BARX homeobox 1*
11q22.2	3.4895751	MMP7	*matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)*
14q32.33	3.5587487	KIAA0125	*KIAA0125*
16p13.13	3.1589003	TNFRSF17	*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17*
19p13.2	3.45135	MCEMP1	*mast cell-expressed membrane protein 1*
19p13.3	3.499768	JSRP1	*junctional sarcoplasmic reticulum protein 1*
22q11.22	3.1659393	IGLL5	*immunoglobulin lambda-like polypeptide 5*
22q11.23	3.7777917	IGLL1	*immunoglobulin lambda-like polypeptide 1*

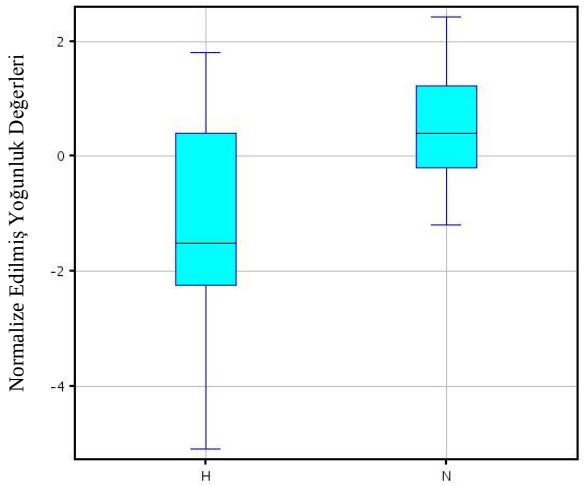
Bu genler GeneCards İnsan Gen Veritabanından (www.genecards.org) taranarak aşağıdaki şekilde açıklanmıştır.

FCRL5 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,5 kat düşüş gösterdiği bulundu (p= 0.0079). FCRL5 geni, Fc reseptör like ailesine dahildir ve immünoglobün reseptörlerini kodlar. (Wilson ve ark., 2012)



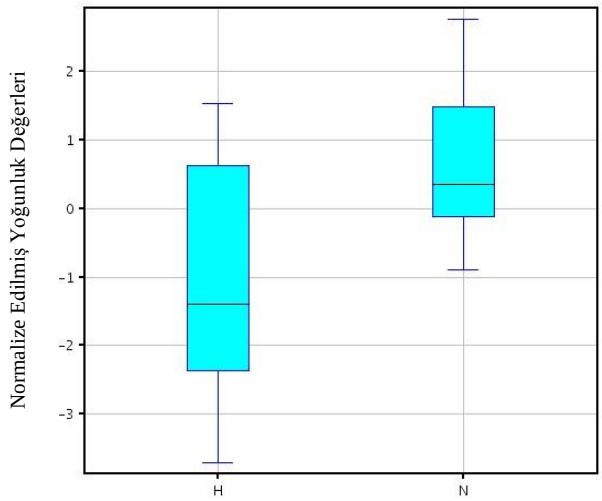
Şekil 14: FCRL5 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

TAS1R3 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,2 kat düşüş gösterdiği bulundu (p= 0.0030). TAS1R3 geni tat algıları ile ilgili proteinlerin kodlanmasını sağlar. Bu sayede birçok doğal ve sentetik tadın algılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. (Kim ve ark., 2016)



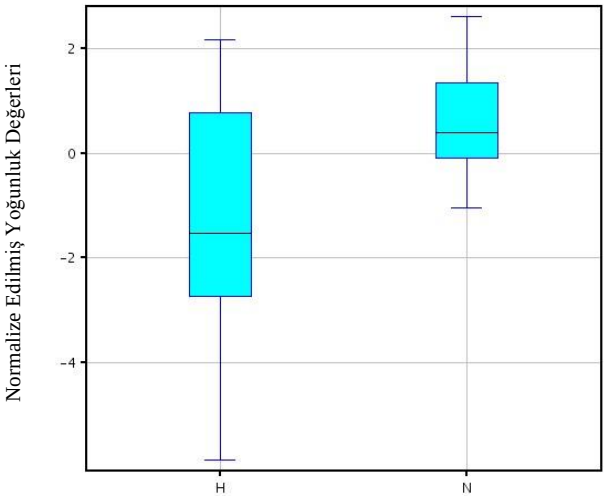
Şekil 15: TAS1R3 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

CD38 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,4 kat düşüş gösterdiği bulundu (p= 0.0010). CD38 molekülü protein kodlayan bir gen olup, transferaz aktivitesinde, hidrolaz aktivitesinde ve glikozil bağlanmasında etkilidir (Nata ve ark., 1997).



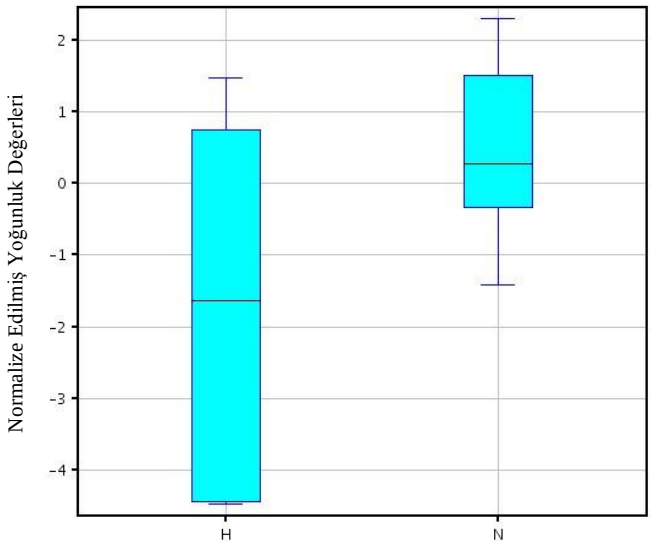
Şekil 16: CD38 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

MZB1 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 4,2 kat düşüş gösterdiği bulundu (p= 0.0027). MZB1 (Marginal Zone B And B1 Cell-Specific Protein) protein kodlayan bir gen olup, immünoglobin M ile ilişkilidir. Ayrıca hormon dengesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Flach ve ark., 2010).



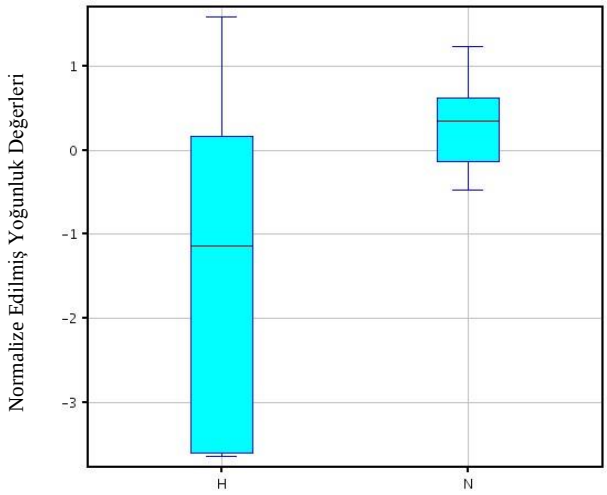
Şekil 17: MZB1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

IRF4 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubunva göre 3,2 kat düşüş gösterdiği bulundu (p= 0.0035). IRF4 geni tarafından kodlanan proteinler virüs enfeksiyonuna cevaben oluşan interferonların düzenlenmesinde etkildir. İmmün sistem ve interlökin reseptör sinyalleşme yollarında rol oynar (Klein ve ark., 2006).



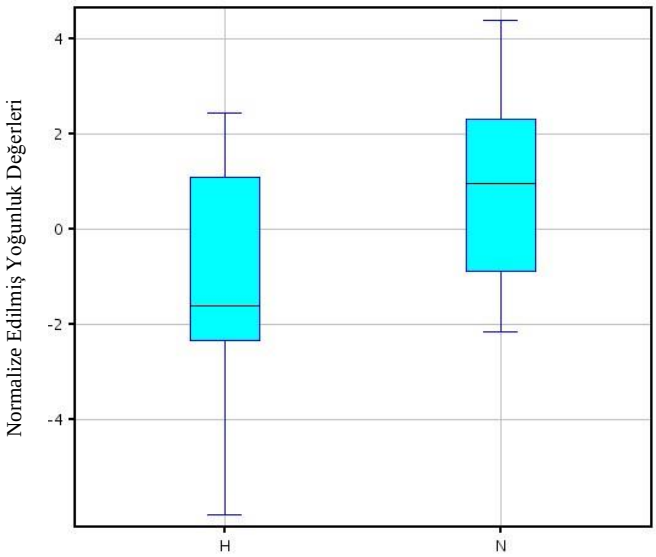
Şekil 18: IRF4 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

BARX1 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,1 kat düşüş gösterdiği bulundu (p=0.0011). BARX1 protein kodlayan bir gen olup homeobox trnaskripsiyon faktörlerinin alt sınıfı olan Bar altsınıfında bulunur. Fare ve tavuk homolog çalışmalarında dişlerin ve nöral krest kaynaklı kraniofasiyal mezenkimin oluşmasında önemli rol oynadığı bulunmuştur. Gastrik mukozal hipertrofi ve sert damak kanserleri ile ilgili hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. (Kim ve ark., 2016)b



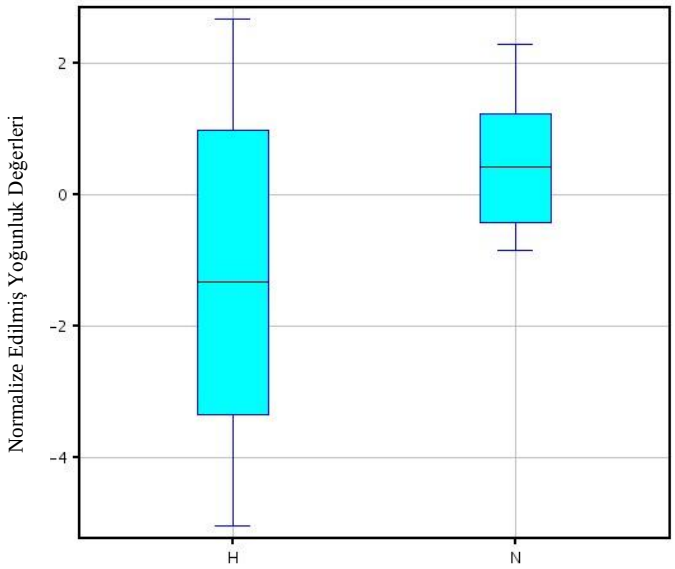
Şekil 19: BARX1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

MMP7 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,4 kat düşüş gösterdiği bulundu (p=0.0215). MMP7 protein kodlayan bir gen olup, normal fizyolojik süreçteki ekstrasellüler matris yıkımı ilişkilendirilip embriyonik gelişim, üreme, doku modellemesi gibi süreçlerde rol oynadığı bulunmuştur (Fukuda ve ark., 2011).



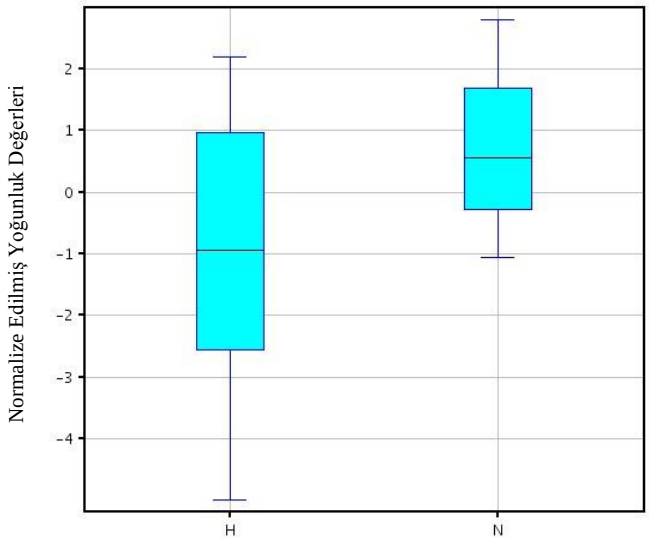
Şekil 20: MMP7 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

KIAA0125 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,5 kat düşüş gösterdiği bulundu (p=0.0087). KIAA0125 bir RNA genidir. KIAA0125 geninin hücre migrasyonunda görev yaptığı bilinmektedir (Lv ve ark., 2015).



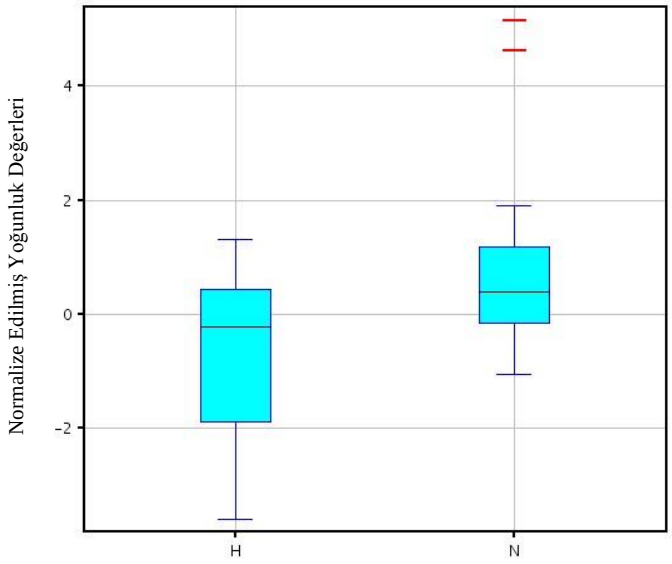
Şekil 21: KIAA0125 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

TNFRSF17 geninin anlatımının, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,1 kat düşüş gösterdiği saptandı (p=0.0074). TNFRSF17, Tümör Nekrozis Faktör Reseptör Süperailesine ait protein kodlayan bir gendir. Bu reseptör tümör nekroz faktörlerine bağlandığı, immün sistem yollarıyla ilişkili olduğu ve gastrointestinal rahatsızlıklar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Chae ve ark., 2010).



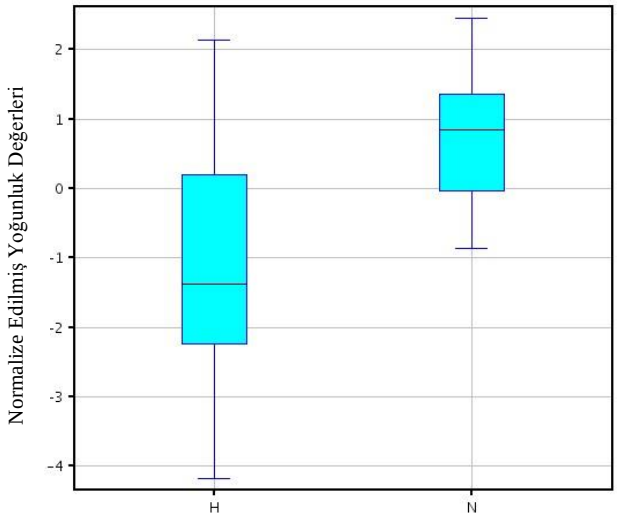
Şekil 22: TNFRSF17 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

MCEMP1 geninin anlatımının, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,4 kat düşüş gösterdiği bulundu (p=0.0063). MCEMP1 transmembran proteini kodlyan bir gendir. Mast hücrelerinin farklılaşması ve immün cevabı ile inme hastalığının işaretçisi olabileceği düşünülmektedir (Raman ve ark., 2016).



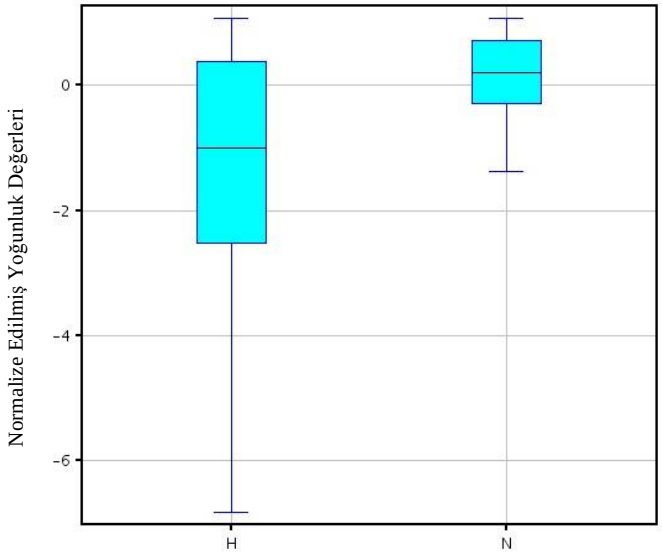
Şekil 23: MCEMP1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

JSRP1 geninin anlatımının, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,4 kat düşüş gösterdiği bulundu (p=0.0108). JSRP1 geni tarafından kodlanan protein sarkoplazmik retikulum kasılması ve gevşemesi ile ilgilidir. İskeletsel kasların kasılması ve gevşemesinde rol oynar (Yasuda ve ark., 2013).



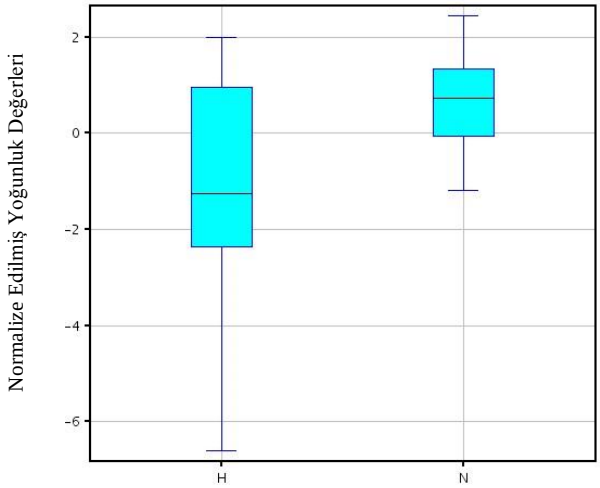
Şekil 24: JSRP1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

IGLL5 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,1 kat düşüş gösterdiği bulundu (p=0.0150). immünoglobin kodlayan bir gendir. İmmün sistem mekanizmasında rol oynamaktadır (Liang ve ark., 2015).



Şekil 25: IGLL5 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

IGLL1 geninin anlatımı, artı diş hastalarında kontrol grubuna göre 3,7 kat düşüş gösterdiği bulundu (p=0.0150). IGLL1 immünoglobin kodlayan bir gendir. Birincil immün yetersizliği mekanizmasında rol oynar.



Şekil 26: IGLL1 geninin hasta ve kontrol gruplarında normalize edilmiş yoğunluk değerlerinin kutu grafiği *(Box Whisher Plot)*

6.2.2.2 Hasta ve Kontrol Gruplarının Cinsiyete Göre Kıyaslanması

Hasta ve kontrol grupları cinsiyetlerine göre ayrılarak yeniden değerlendirilmiş ve erkek ve kız hastalarda anlatımı artan ve azalan genlerin istatistiksel olarak anlamlı ve değişim katsayısı 2 ve üzeri olduğu tespit edilenleri ayrı ayrı değerlendirildi.

Erkek artı diş hastalarının erkek kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımları artan 3 adet gen tespit edilmiş olup, bu genler Tablo 30'da değişim katsayısına göre sıralandı.

Tablo 30: Erkek artı diş hastalarının erkek kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımları arttığı tespit edilen sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Sitoband	**Değişim Katsayısı (*Fold Change*)**	**Gen Sembolü**	**Gen Adı**
2p11.2	2.2266207	RNF103	*ring finger protein 103*
14q32.11	2.177915	RPS6KA5	*ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5*
12q24.11	2.13499	MMAB	*methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type*

Erkek artı diş hastalarının erkek kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımları azalan 17 gen tespit edilmiş olup, bu genler Tablo 31'de değişim katsayısına göre sıralanmıştır. Bu genlerden, BARX1 dahil, dört adet genin anlatımlarının 3 kat azaldığı bulundu.

Tablo 31: Erkek artı diş hastalarının erkek kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımlarının azaldığı tespit edilen sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Sitoband	**Değişim Katsayısı (Fold Change)**	**Gen Sembolü**	**Gen Adı**
19q13.42	3.5787425	NLRP7	*NLR family, pyrin domain containing 7*
22q11.23	3.4903934	GSTT2	*glutathione S-transferase theta 2 (gene/pseudogene)*
2q23.3	3.104437	TNFAIP6	*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6*
9q22.32	3.0768788	BARX1	*BARX homeobox 1*
17p13.1	2.7448983	NTN1	*netrin 1*

1q32.2	2.5914946	HSD11B1	*hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1*
12p13.2	2.3515975	KLRC1	*killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1*
10q11.21	2.3352056	CXCL12	*chemokine (C-X-C motif) ligand 12*
10q24.2	2.3028672	CRTAC1	*cartilage acidic protein 1*
2p25.3	2.1843252	PXDN	*peroxidasin*
7q36.1	2.17563	TMEM176B	*transmembrane protein 176B*
2p25.3	2.1449144	PXDN	*peroxidasin*
1q24.2	2.0791676	SELP	*selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)*
1p35.1	2.0650468	FAM167B	*family with sequence similarity 167, member B*
13q14.11	2.0467567	SMIM2-AS1	*SMIM2 antisense RNA 1*
12q13.12	2.0253787	DHH	*desert hedgehog*
5q31.2	2.0162566	ECSCR	*endothelial cell surface expressed chemotaxis and apoptosis regulator*

Kız artı diş hastalarının kız kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatım seviyeleri artan 34 adet gen tespit edilmiş olup, bu genler Tablo 32'de değişim katsayısına göre sıralanmıştır. Bu genlerden bir adeti (HRCT1) 4 kat, üç adeti (FAM107A, KATNAL2, LOC100507351) 3 kat, diğer genlerin ise gen ekspresyonlarının 2 kat arttığı bulundu.

Tablo 32: Kız artı diş hastalarının kız kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımlarının arttığı tespit edilen sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Sitoband	**Değişim Katsayısı (Fold Change)**	**Gen Sembolü**	**Gen Adı**
9p13.3	4.1992545	HRCT1	*histidine rich carboxyl terminus 1*
3p14.3	3.707049	FAM107A	*family with sequence similarity 107, member A*
18q21.1	3.4522545	KATNAL2	*katanin p60 subunit A-like 2*
17q25.3	3.0242321	LOC100507351	*uncharacterized LOC100507351*
18q21.1	2.8896792	KATNAL2	*katanin p60 subunit A-like 2*
Xq23	2.734529	IL13RA2	*interleukin 13 receptor, alpha 2*
10q25.3	2.7151344	GFRA1	*GDNF family receptor alpha 1*
15q13.1	2.6300328	HERC2	*HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*
3q27.3	2.6128821	SNORA81	*small nucleolar RNA, H/ACA box 81*
12p12.3	2.555977	MGP	*matrix Gla protein*
12q23.1	2.4800897	SNORA53	*small nucleolar RNA, H/ACA box 53*
2p11.2	2.4453776	ATOH8	*atonal homolog 8 (Drosophila)*
2q37.3	2.408241	SNED1	*sushi, nidogen and EGF-like domains 1*
11q13.3	2.4074957	MRGPRF	*MAS-related GPR, member F*
2q11.1	2.332571	GPAT2	*glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitochondrial*

13q14.11	2.305292	SERP2	*stress-associated endoplasmic reticulum protein family member 2*
2p11.2	2.253782	SNORD94	*small nucleolar RNA, C/D box 94*
11q13.3	2.248574	MRGPRF	*MAS-related GPR, member F*
11p15.4	2.2275617	SNORA45B	*small nucleolar RNA, H/ACA box 45B*
17q23.2	2.2143514	TBX2-AS1	*TBX2 antisense RNA 1*
10q23.2	2.1762385	OPN4	*opsin 4*
1p31.1	2.1481142	SNORD45B	*small nucleolar RNA, C/D box 45B*
19q13.12	2.1279616	COX7A1	*cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)*
3p21.31	2.1276762	CLEC3B	*C-type lectin domain family 3, member B*
11q12.1	2.1201239	SERPING1	*serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1*
7p14.3	2.113741	MTURN	*maturin, neural progenitor differentiation regulator homolog (Xenopus)*
2q35	2.0627122	FN1	*fibronectin 1*
8q24.3	2.0528536	SLC45A4	*solute carrier family 45, member 4*
1p31.3	2.0503042	DNAJC6	*DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6*
3p22.1	2.0432622	KRBOX1	*KRAB box domain containing 1*
1q32.2	2.0429611	SERTAD4-AS1	*SERTAD4 antisense RNA 1*
2q33.3	2.0239053	NRP2	*neuropilin 2*
17q12	2.0064151	MLLT6	*myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6*

Kız artı diş hastalarının kız kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımlarının azaldığı 56 gen tespit edilmiş olup, bu genler Tablo 33'de değişim katsayısına göre sıralanmıştır. Bu genlerden bir adeti (LINC01010) 4 kat, on adeti (SULT1C2, SLAMF6, CXCL10, AKAP4, LMOD3, VMO1, MOGAT1, APOOP5, LINC00458, SLC7A11) 3 kat, diğer genlerin ise gen anlatımlarının 2 kat azaldığı görüldü. MMP7 geninin anlatım seviyesinin 7 kat azaldığı tespit edildi.

Tablo 33: Kız artı diş hastalarının kız kontrol hastalarıyla kıyaslandığında gen anlatımlarının azaldığı tespit edilen sitobandlar, değişim katsayıları ve ilgili genler

Sitoband	**Değişim Katsayısı (Fold Change)**	**Gen Sembolü**	**Gen Adı**
11q22.2	7.13041	MMP7	*matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)*
6q23.2	4.0785246	LINC01010	*long intergenic non-protein coding RNA 1010*
2q12.3	3.8044953	SULT1C2	*sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2*
1q23.2	3.6634054	SLAMF6	*SLAM family member 6*
4q21.1	3.662849	CXCL10	*chemokine (C-X-C motif) ligand 10*
Xp11.22	3.6217444	AKAP4	*A kinase (PRKA) anchor protein 4*

3p14.1	3.254481	LMOD3	*leiomodin 3 (fetal)*
17p13.2	3.1821477	VMO1	*vitelline membrane outer layer 1 homolog (chicken)*
2q36.1	3.1430285	MOGAT1	*monoacylglycerol O-acyltransferase 1*
16q21	3.1271682	APOOP5	*apolipoprotein O pseudogene 5*
13q14.3	3.0708556	LINC00458	*long intergenic non-protein coding RNA 458*
4q28.3	3.0324378	SLC7A11	*solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11*
2q36.3	2.9975185	SPHKAP	*SPHK1 interactor, AKAP domain containing*
Xq22.3	2.8488023	GUCY2F	*guanylate cyclase 2F, retinal*
6q14.3	2.767737	GJB7	*gap junction protein, beta 7, 25kDa*
3q27.2	2.7527637	LIPH	*lipase, member H*
3q25.2	2.7478468	FLJ46120	*uncharacterized LOC647008*
20p13	2.727496	NOP56	*NOP56 ribonucleoprotein*
17q25.3	2.7247324	TSPAN10	*tetraspanin 10*
8q24.22	2.644519	NCRNA00250	*non-protein coding RNA 250*
5q13.3	2.6149032	ANKRD31	*ankyrin repeat domain 31*
19p13.2	2.524602	TSPAN16	*tetraspanin 16*
5q22.3	2.517944	TRIM36	*tripartite motif containing 36*
17q12	2.4988446	C17orf78	*chromosome 17 open reading frame 78*
4q35.1	2.4230816	FAM92A1P2	*family with sequence similarity 92, member A3*
20p13	2.408139	RAD21L1	*RAD21-like 1 (S. pombe)*
20p11.22	2.4077141	LINC01432	*long intergenic non-protein coding RNA 1432*
2q35	2.3865364	LINC00607	*long intergenic non-protein coding RNA 607*
1p13.2	2.3445702	BCL2L15	*BCL2-like 15*
8q11.21	2.3299718	SNTG1	*syntrophin, gamma 1*
Xp11.3	2.3124223	LINC01204	*long intergenic non-protein coding RNA 1204*
10q23.33	2.269653	ACSM6	*acyl-CoA synthetase medium-chain family member 6*
10p12.33	2.2430959	SLC39A12-AS1	*SLC39A12 antisense RNA 1*
3q13.33	2.237763	STXBP5L	*syntaxin binding protein 5-like*
2q35	2.2371907	LINC00607	*long intergenic non-protein coding RNA 607*
Xq28	2.235347	OPN1MW	*opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive*
3p13	2.1536932	LINC00877	*long intergenic non-protein coding RNA 877*
19p13.11	2.1466005	TMEM221	*transmembrane protein 221*
1q25.3	2.1402793	GLUL	*glutamate-ammonia ligase*
4p15.2	2.1372895	CCDC149	*coiled-coil domain containing 149*
3q29	2.1275103	SMCO1	*single-pass membrane protein with coiled-coil domains 1*
6q22.31	2.0865164	BRD7P3	*bromodomain containing 7 pseudogene 3*
8q24.12	2.084508	SAMD12-AS1	*SAMD12 antisense RNA 1*
2q36.3	2.071188	SLC19A3	*solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 3*
11q13.4	2.056337	DEFB108B	*defensin, beta 108B*
10q25.2	2.0439537	DUSP5	*dual specificity phosphatase 5*
Xq28	2.0311666	RAB39B	*RAB39B, member RAS oncogene family*
8p11.23	2.0298967	RAB11FIP1	*RAB11 family interacting protein 1 (class I)*
5q31.3	2.0272908	KCTD16	*potassium channel tetramerization domain containing 16*
9q33.2	2.0236008	OR1J1	*olfactory receptor, family 1, subfamily J, member 1*
1q41	2.0183537	LINC01352	*long intergenic non-protein coding RNA 1352*
7q22.1	2.0157988	SLC26A5	*solute carrier family 26 (anion exchanger), member 5*
16p11.2	2.0149782	TP53TG3D	*TP53 target 3D*
11q12.3	2.0096784	SCGB1A1	*secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)*
8p11.22	2.008784	ADAM18	*ADAM metallopeptidase domain 18*

15q15.3	2.0059288	CATSPER2	*cation channel, sperm associated 2*

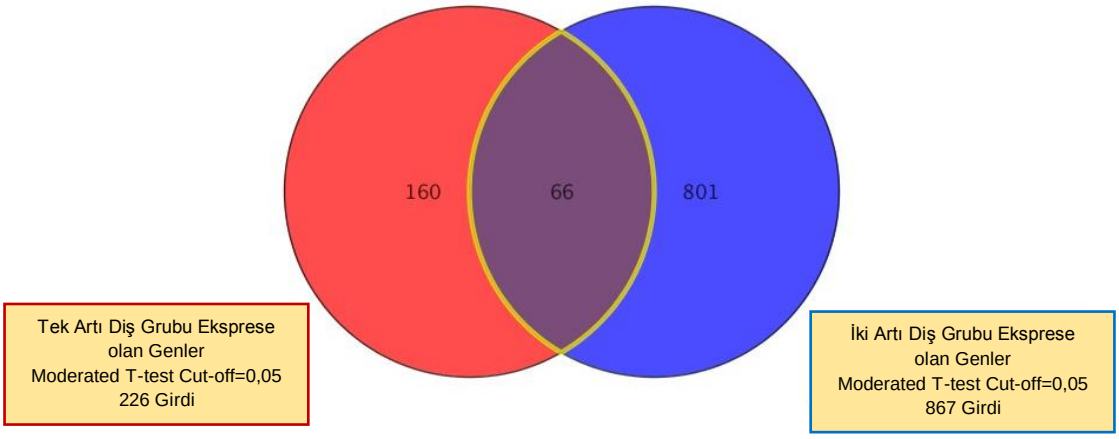
6.2.2.3 Hasta ve Kontrol Gruplarının Artı Diş Sayısına Göre Kıyaslanması

Çalışmamızdaki artı diş hastalarını, tek diş ve iki diş fazlalığı olarak iki gruba ayırarak değerlendirildi.

Tek artı dişi bulunan hastaları kontrol grubu ile kıyaslandığında 226 prob bölgesi bulundu ve burada tespit edilen genlerden değişim katsayısı 2 ve üzeri olan 21 adet gen anlatımının yükseldiği, 10 adet genin ise anlatımının azaldığı olduğu görüldü.

İki artı dişi bulunan hastaları kontrol grubu ile kıyaslandığında 867 prob bölgesi bulundu ve burada tespit edilen genlerden değişim katsayısı 3 ve üzeri olan 138 adet gen anlatımının yükseldiği, 28 adet genin ise anlatımının azaldığı görüldü.

Şekil 27'de her iki grupta ve ortak tespit edilen prob sayıları Venn diagramında görülmektedir. Tablo 34'te her iki grupta ortak tespit edilen 66 prob bölgesinde bulunan 18 adet gen (16 adet gen anlatımının arttığı, 2 adet gen anlatımının azaldığı) sunulmuştur.



Şekil 27: Tek ve iki artı diş gruplarında kontrole göre ortak tespit edilen prob sayılarının Venn diagramı

Tablo 34: Tek ve iki artı dişi olan hastalarda ortak sitobandlar ve ilgili genler

Sitoband	**Tek Diş Hasta KS**	**İki Diş Hasta KS**	**Gen Sembolü**	**Gen Adı**
5q31.2	3,0476747	10,755224	MZB1	*marginal zone B and B1 cell-specific protein*
22q11.22	3,3219988	10,421574	BMS1P20	*BMS1 pseudogene 20*
4p15.32	2,5574646	8,10279	CD38	*CD38 molecule*
19p13.3	2,6038585	7,892226	JSRP1	*junctional sarcoplasmic reticulum protein 1*
22q11.23	2,9091485	7,749728	IGLL1	*immunoglobulin lambda-like polypeptide 1*
1p36.33	2,4308612	7,219538	TAS1R3	*taste receptor, type 1, member 3*
6p12.3	2,34222	5,7840285	PLA2G7	*phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)*
1q23.3	2,0293994	5,427459	SLAMF7	*SLAM family member 7*
11q23.1	2,249384	5,6266966	POU2AF1	*POU class 2 associating factor 1*
16p11.2	2,117246	5,299689	CD19	*CD19 molecule*
4q32.1	2,5603273	5,654841	TDO2	*tryptophan 2,3-dioxygenase*
1q32.2	2,295633	3,9453025	HSD11B1	*hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1*
9q22.32	2,8447397	4,2502356	BARX1	*BARX homeobox 1*
12p13.2	2,1658435	2,8717284	KLRC1	*killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1*
12q22	2,193732	2,6534588	LOC100507616	*uncharacterized LOC100507616*
3q27.2	2,079955	2,0879374	LIPH	*lipase, member H*
Xq21.1	-2,1970356	-3,1456017	UBE2DNL	*ubiquitin-conjugating enzyme E2D N-terminal like (pseudogene)*
18q21.1	-2,0411756	-4,178704	KATNAL2	*katanin p60 subunit A-like 2*

6.2.2.4 Hasta ve Kontrol Gruplarının Artı Diş Tipine Göre Kıyaslanması

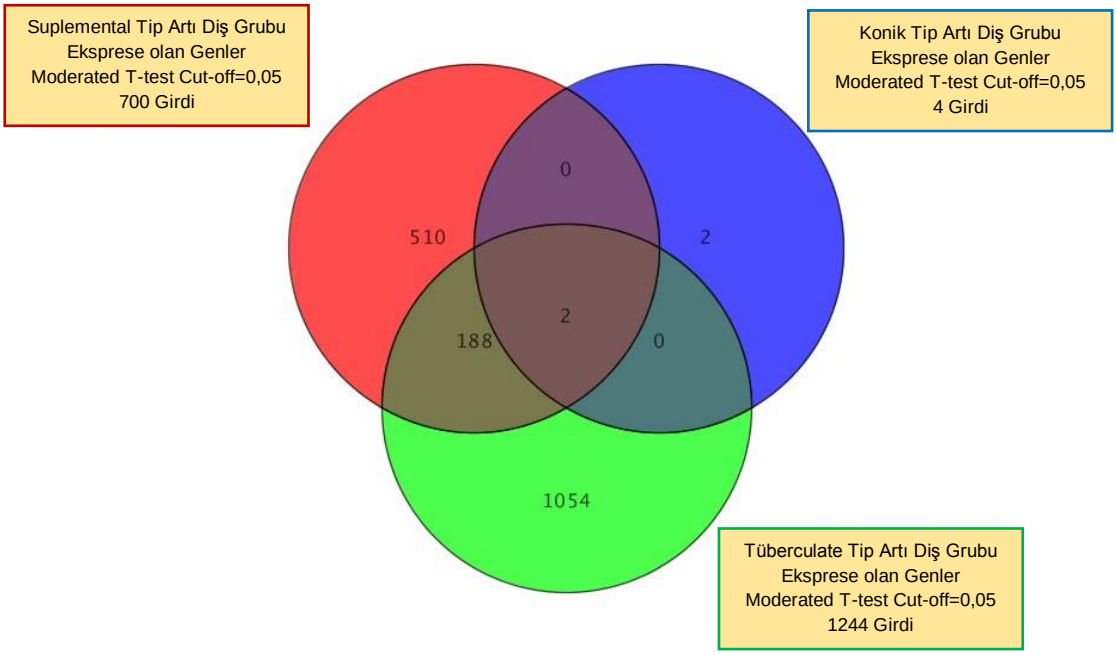
Çalışmamızdaki artı diş hastalarını, konik, suplemental ve tüberküllü olarak üç gruba ayırarak değerlendirdik.

Konik artı dişi bulunan hastaları kontrol grubu ile kıyaslandığında 4 prob bölgesi bulundu. Konik artı dişi bulunan hastalarda tespit edilen gen anlatımlarının değişim katsayısı iki ve üzeri olan 3 adet gende arttığı, 1 adet gende ise azaldığı görüldü.

Suplemental artı dişi bulunan hastaları kontrol grubu ile kıyaslandığında 700 prob bölgesi bulundu. Suplemental artı dişi hastalarda tespit edilen gen anlatımlarının değişim katsayısı iki ve üzeri olan 243 adet gende arttığı, 314 adet gende ise azaldığı görüldü.

Tüberküllü artı dişi bulunan hastaları kontrol grubu ile kıyaslandığında 1244 prob bölgesi bulundu. Tüberküllü artı dişi bulunan hastalarda tespit edilen gen anlatımlarının değişim katsayısı iki ve üzeri olan 546 adet gende arttığı, 545 adet gende ise azaldığı görüldü.

Şekil 28'de her 3 grupta ve ortak tespit edilen prob sayıları Venn diagramında görülmektedir. Tablo 35'te her üç grupta ortak tespit edilen 2 prob bölgesinde bulunan 2 adet gen bulunmaktadır. CCL13 geninin her üç artı diş tipinde anlatımının arttığı; BARX1 geninin ise konik artı diş grubunda anlatımının değişkenlik katsayısı 2,78 kat olacak şekilde azaldığı, suplemental artı diş grubunda anlatımının değişkenlik katsayısı 5,24 kat olacak şekilde arttığı, Tüberküllü artı diş grubunda ise anlatımın değişkenlik katsayısı 2,47 kat olacak şekilde arttığı bulundu.



Şekil 28: Artı diş gruplarında üç farklı tip artı diş gruplarına göre tespit edilen genlerin Venn diagramı

Tablo 35: Üç farklı diş grubunda tespit edilen ortak iki gen

Sitoband	**Konik Artı Diş Grubu**	**Suplemental Artı Diş Grubu**	**Tüberküllü Artı Diş Grubu**	**Gen**
17q12	2.5808105	2.874566	2.758667	CCL13
9q22.32	2.7840822	5.241374	2.4685917	BARX1

6.2.3 DNA Mikrodizin Bulguları

DNA Mikrodizin çalışmamıza, daha önce yaptığımız RNA Mikrodizin çalışmamız için elde edilmiş uygun doku örneklerine ait 16 hasta dahil edildi.

16 hasta örneğinin spesifik aktivitesi hesaplandıktan sonraki değerler Tablo 36'da görülmektedir. Spesifik aktivitesi düşük olan 4 tanesi çalışmadan çıkarıldı. Dolayısıyla, 7 Erkek ve 5 Kız olmak üzere 12 hasta örneği ile DNA çalışmasının Mikrodizin safhasına devam edildi. Çalışmanın bu bölümünde kontrol olarak ise bir erkek ve bir kadın tükürük örnekleri kullanıldı.

Tablo 36: DNA örneklerinin spesifik aktivite değerleri

Spesifik Aktivite	Boyalı DNA Konsantrasyonu	Boya Konsantrasyonu	Hasta
12,19	424	5,17	H.U.
11,71	251	2,94	T.G.
11,04	346	3,82	E.N.B.
10,83	253	2,74	E.Ş.
10,67	209	2,23	K.D.
10,44	274	2,86	Y.A.
10,41	394	4,10	C.Ç.
10,25	241	2,47	A.K.
9,83	287	2,82	İ.D.
9,75	436	4,25	M.K.
9,49	176	1,67	B.B.
9,08	403	3,66	S.K.
9,05	189	1,71	E.O.
8,91	312	2,78	E.B.
8,17	263	2,15	Y.E.M.
3,93	61	0,24	N.B.

6.2.3.1 Hastalarda Saptanan Kopya Sayısı Varyantları

Tablo 37'de hastalardaki Kopya Sayısı Varyant (KSV) sayılarının kazanım veya kayıplara göre dağılımı görülmektedir. 17 kromozomda 34 Kopya Sayısı Varyantları (KSV) kopya kazanım veya kayıp bölgesini bulundu. KSV kazanımı 10

hastada (6 erkek, 4 kız) 1, 2 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 22 ve X kromozomlarında bulundu. KSV kaybı 6 hastada (3 erkek, 3 kız) 2, 3, 6, 8, 11, 17, 19, 22 ve X kromozomlarında bulundu. Artı diş hastalarının KSV'lerindeki kazanımlar kayıplarına oranla daha fazla olduğu görüldü. İki artı dişi olan hastaların KSV'leri bir artı dişi olanlara göre daha fazla olduğu bulundu. Tüberküllü ve suplemental olanların KVS'leri konik olanlara göre daha fazla olduğu tespit edildi.

Tablo 37: Hastaların cinsiyet, yaş, artı diş sayısı, tipi, KVS kazınım ve kayıpları

Hasta	Cinsiyet	Yaş	Artı Diş Sayısı	Artı Diş Tipi	Kayıp	Kazanç
I.D.	M	9	1	Süplemental	1	12
C.Ç.	M	8	1	Süplemental	-	2
S.K.	M	12	2	Konik	4	21
E.Ş.	M	6	1	Konik	-	3
K.D.	M	7	1	Konik	2	-
B.B.	M	8	1	Konik	-	2
T.G.	M	9	2	Süplemental	33	20
E.N.B.	F	11	2	Tüberküllü	2	7
A.K.	F	11	1	Tüberküllü	9	4
H.U.	F	12	1	Konik	1	2
M.K.	F	12	2	Konik	-	2
Y.A.	F	7	1	Tüberküllü	-	-

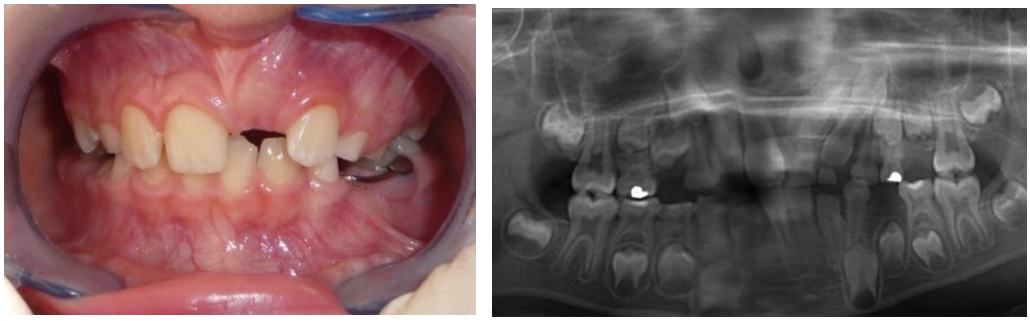
6.2.3.1.1 İ.D. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 38'de İ.D. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 38: İ.D. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p	Gen Anlatımı	Gen
2q34	213107178-213170355	3	1.88E-10	Kayıp	ERBB4
3q25.31	155267404-155353476	5	1.66E-10	Kazanç	PLCH1
4q31.21	143673539-143983697	11	9.60E-12	Kazanç	INPP4B
8q24.11	118784894-118816804	4	6.08E-11	Kazanç	EXT1
17q25.1	71420642-71847896	14	1.35E-10	Kazanç	SDK2 C17orf54

Literatürde hayvan modeller üzerinde ERBB4 geninin diş morfogenezisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Fried ve ark., 2002).



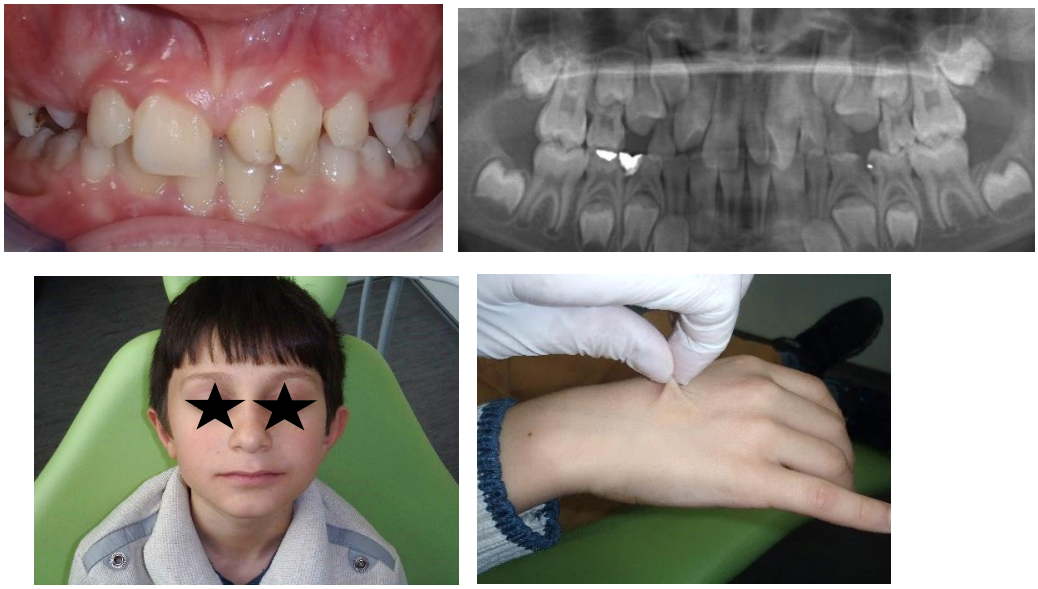
Resim 18: İ.D. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

6.2.3.1.2 C.Ç. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 39'da C.Ç isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 39: C.Ç isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
15q11.1 - q11.2	20505014-21941153	6	5.50E-12	Kazanç	ADAMTS2
17q21.31	44254355-44351152	3	1.54E-10	Kazanç	ZMYM5



Resim 19: E.N.B. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

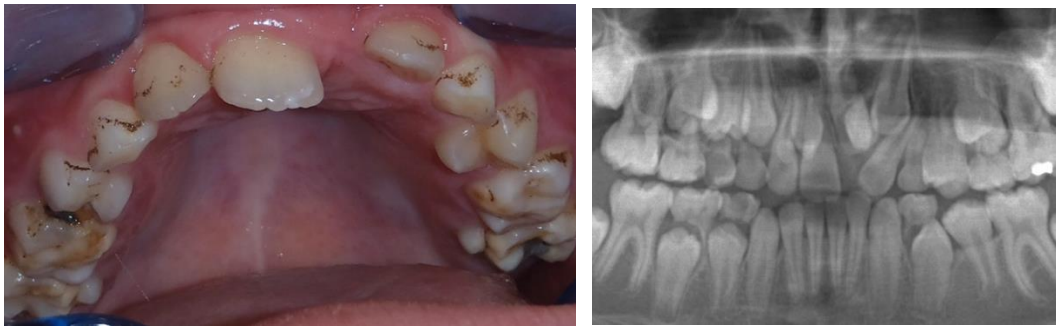
ADAMTS2 geninin yetersiz aktivitesi sonucu Ehlers-Danlors sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Van Damme ve ark., 2016).

6.2.3.1.3 S.K. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 40'da S.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 40: S.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
1p36.13	16208009-17214170	22	1.92E-12	Kazanç	SPEN ZBTB17 C1orf64 HSPB7 CLCNKA CLCNKB ARHGEF19 RSG1 FBXO42 C1orf144 SPATA21 NECAP2 CROCCP3 MIR3675 NBPF1 CROCCP2 MST1P2 ESPNP MST1P9 FAM131C EPHA2
8q12.1	59225988-59425957	8	9.60E-11	Kayıp	UBXN2B CYP7A1
11p15.2	15179898-15406610	8	1.93E-10	Kayıp	INSC
Xp22.2	12080241-12690056	22	7.49E-10	Kayıp	FRMPD4



Resim 20: S.K. isimli hastanın a) klinik ağızıçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

EPHA2 geni ephrin reseptör ailesine aittir. Ephrin'ler hücre membranına bağlı Eph reseptör tirozin kinaz ligandlarıdır ve çeşitli gelişimsel süreçleri yönetirler. Diş oluşumunda rolü olduğu düşünülmektedir (Luuko ve ark. 2005).

6.2.3.1.4 E.Ş. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 41'de E.Ş. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 41: E.Ş. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
22q11.23 - q12.1	25672585-25903543	6	8.14E-12	Kazanç	IGLL3P LRP5L CRYBB2P1



Resim 21: E.Ş. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

LRP5L (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5-like) geni protein kodlayan bir gen olup, Wnt proteini bağlanması ve Wnt reseptör aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Gaudet ve ark. 2009).

6.2.3.1.5 K.D. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 42'de K.D. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 42: K.D. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
3p23	30901065-30974385	4	5.05E-12	Kayıp	GADL1
22q13.31	46275806-46316732	3	9.15E-10	Kayıp	WNT7B

WNT7B geninin oral ektodermde Shh gen ekspresyonunu baskıladığı, böylece oral ve dental ektoderm hücreleri arasında sınır oluşmasını sağladığı düşünülmektedir (Sarkar ve ark. 2000).



Resim 22: K.D. isimli hastanın a) ve b) klinik ağıziçi görüntüsü c) panoromik radyografik görüntüsü

6.2.3.1.6 B.B. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 43'de B.B. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 43: B.B. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
17p13.2	4393779-4442307	3	2.70E-11	Kazanç	SPNS2, MYBBP1A



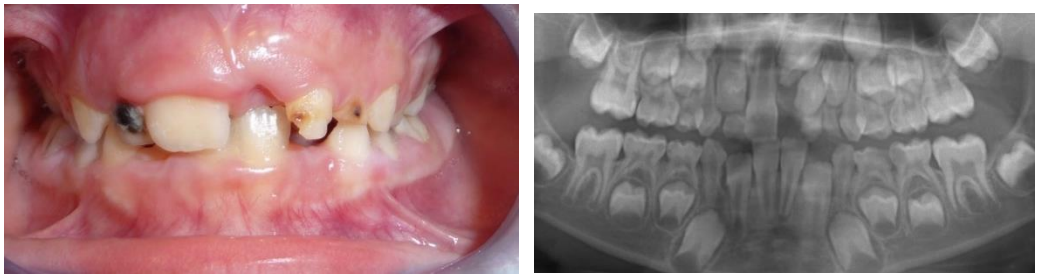
Resim 23: B.B. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

6.2.3.1.7 T.G. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 44'de T.G. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 44: T.G. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
6p21.32	32565005-32744193	7	1.52E-14	Kayıp	DUSP22
6p25.3	259881-362290	12	5.57E-11	Kazanç	HLA-DQA1, HLADQB1 HLA-DQA2, HLA-DQB2
7q11.21	62113000-62547601	23	6.29E-31	Kazanç	GUSB
15q11.1 - q11.2	20505014-22558756	12	4.85E-31	Kazanç	HERC2P3, GOLGA6L6, GOLGA8C, BCL8, POTEB, NF1P1, OR4N3P, LOC646214, CXADRP2, REREP3, LOC727924, OR4M2, OR4N4
16p13.12	12652287-12758203	5	2.08E-10	Kazanç	SNX29 CPPED1
19q13.2	40706885-41366708	23	9.11E-10	Kayıp	MAP3K10, TTC9B, CNTD2, AKT2, MIR641, C19orf47, PLD3, HIPK4, PRX, SERTAD1, SERTAD3, BLVRB, SPTBN4, SHKBP1, LTBP4, NUMBL, ADCK4, ITPKC, C19orf54, SNRPA, MIA, MIARAB4B, RAB4B, RAB4B-EGLN2, EGLN2, CYP2A6
Xq21.1	76808348-77369128	38	3.90E-10	Kayıp	ATRX, MAGT1, COX7B, ATP7A, PGAM4, PGK1



Resim 24: T.G.isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

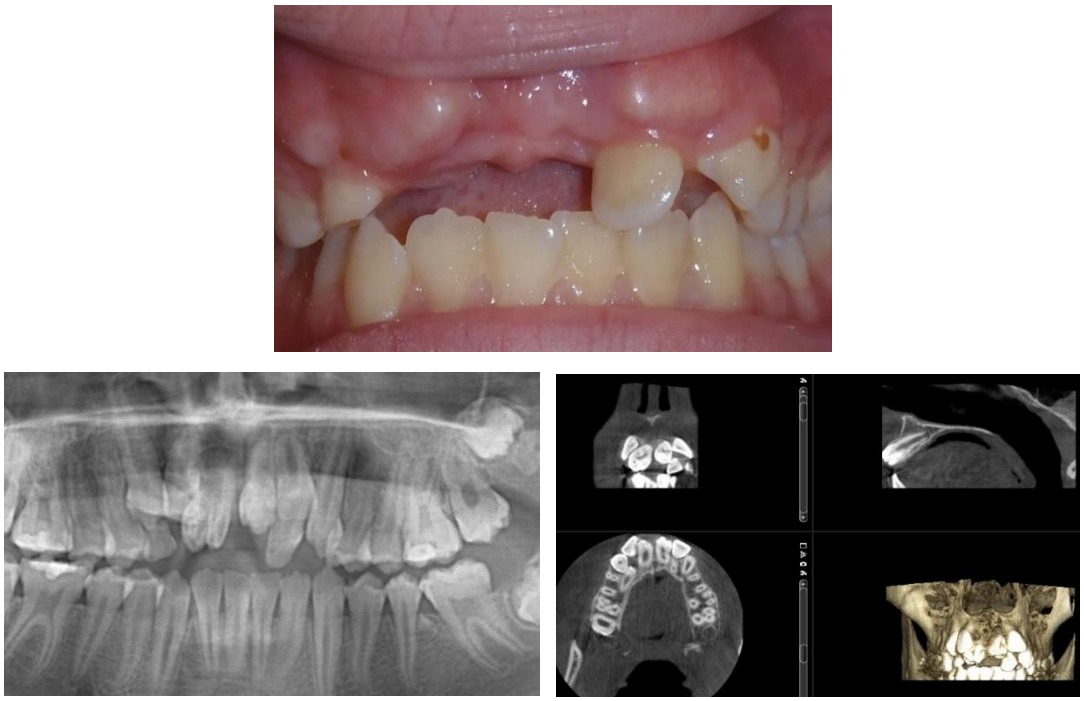
19q13.2 sitobandında MIA, MAP3K10, LTBP4 genleri bulunmaktadır. MIA protein kodlayan bir gen olup, gen ile ilişkili hastalıklar melanoma ve deri melanomasıdır (Hau ve ark. 2002). MAP3K10 geni TGFβ (transforming growth factor beta) ailesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sapkota 2013). LTBP4 (Latent transforming growth factor beta binding protein 4) geninin de TGFβ sinyalleşmesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Tomasovic ve ark., 2016).

6.2.3.1.8 E.N.B. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 45'de E.N.B. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 45: E.N.B. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
15q11.1 - q11.2	20505014-21941153	6	5.50E-12	Kazanç	HERC2P3 GOLGA6L6 GOLGA8C BCL8 POTEB NF1P1 LOC646214
17q21.31	44254355-44351152	3	1.54E-10	Kayıp	KIAA1267 LOC644246



Resim 25: E.N.B. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü c) üç boyutlu dental volümetrik radyografi görüntüsü

KIAA1267 geninin de bulunduğu 17q21.31sitobandında görülen 17q21.31 delesyon sendromu eklemlerde hipermobilite ile saç, deri ve dişlerde ektodermal anomaliler görülmüştür. (Tan ve ark., 2009)

6.2.3.1.9 A.K. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 46'da A.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 46: A.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
2q12.2	107152986-107418593	11	1.25E-10	Kazanç	ST6GAL2
9p24.3	556625-882461	16	3.30E-10	Kazanç	KANK1 DMRT1
10q23.2	88552715-88628736	14	3.44E-10	Kazanç	BMPR1A
11q11	55385617-55450788	3	1.99E-11	Kayıp	OR4P4 OR4S2 OR4C6
19q13.41	52139897-52226930	3	3.72E-11	Kayıp	SIGLEC14 MIR99B MIRLET7E MIR125A NCRNA00085 HAS1



Resim 26: A.K. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

BMP (Bone morphogenetic protein / kemik morfogentik proteini) reseptörleri BMPR1A ve BMPR1B reseptörlerini içeren serin/treonin kinaz transmembran ailesine aittir. BMPR1A reseptörünü epitel yüzeyinde kodlayan gen, diş morfogenezisini durdurmakta ve saç eksikliğine sebep olmaktadır.

6.2.3.1.10 H.U. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 47'da H.U. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 47: H.U. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
2q37.3	242856588-243007359	17	6.67E-49	Kayıp	UGT1A1
Xp22.2	14006882-14454014	15	1.96E-21	Kazanç	GEMIN8



Resim 27: H.U. isimli hastanın a) ve b) klinik ağıziçi görüntüsü c) panoromik radyografik görüntüsü

6.2.3.1.11 M.K. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Tablo 48'de M.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri görülmektedir.

Tablo 48: M.K. isimli olguda KSV'nin saptandığı sitoband ve ilgili genleri

Sitoband	Başlangıç ve Bitiş Noktası	Prob Sayısı	p Değeri	Gen Anlatımı	Gen
4q21.21	79698910-79741096	3	6.15E-17	Kazanç	BMP2K
9p21.1	30634087-30694257	3	2.49E-13	Kazanç	

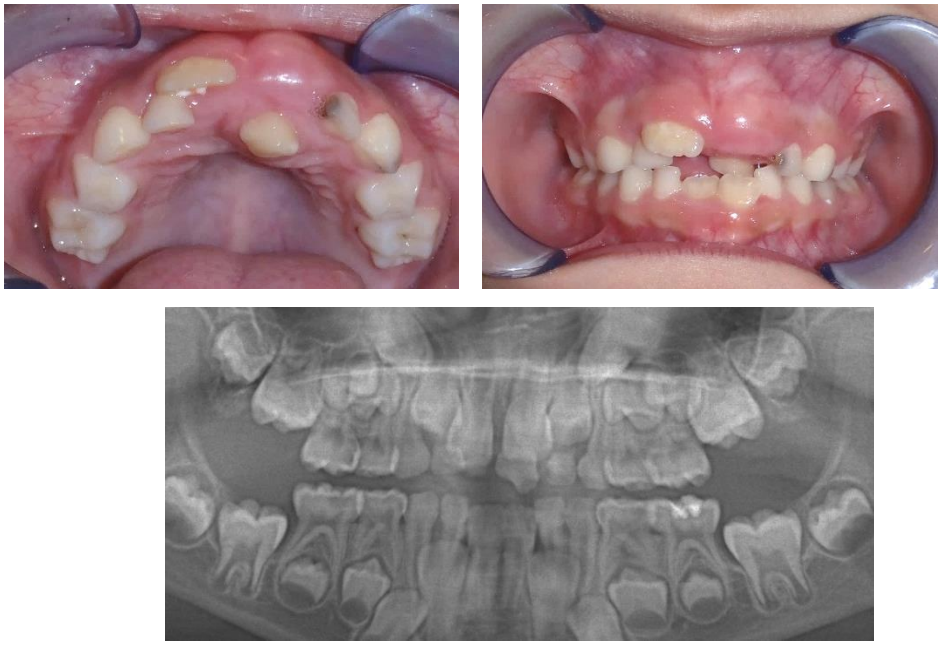


Resim 28: M.K. isimli hastanın a) klinik ağıziçi görüntüsü b) panoromik radyografik görüntüsü

BMP2K geni, farede bulunan BMP-2 kinaz geninin homoloğudur. Osteoblast farklılaşması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Sarkar ve ark. 2000).

6.2.3.1.12 Y.A. İsimli Hastanın Kopya Sayısı Variyantlarının Değerlendirilmesi

Y.A. isimli olguda herhangi anlamlı bir gen tespit edilememiştir.



Resim 29: Y.A.. isimli hastanın a) ve b) klinik ağıziçi görüntüsü c) panoromik radyografik görüntüsü

7. TARTIŞMA

Artı dişler, özellikle çocuk kliniklerinde teşhisi konan, dentofasiyel bozukluklara sebep olan bir diş anomalisidir.

Artı diş ile ilgili ilk bilimsel olgu raporu 1877'de Turner tarafından yayımlandığından beri (Turner, 1877) birçok sayıda artı diş olgusu bildirilmiştir

7.1 Klinik Bulguların Tartışması

Artı süt dişleri hastalarda genelde bir rahatsızlık yaratmasa da, özellikle füzyon olgularında süt dişlerinin zamanında kaybı gecikebilmekte ve sürekli dişlerin ektopik sürmesine sebep olabilmektedir. Artı sürekli dişler ise bulunduğu bölgeye bağlı olarak en sık görülen komplikasyon sürekli dişlerin ektopik sürmesidir. Bunun yanında artı dişlerin sebep olduğu komplikasyonlar arasında; sürekli dişlerin zamanında sürmesine engel olarak gömülü kalması, keser dişler arasında diastemalar, sürekli dişlerde kök dilaserasyonları, dentigeröz kistler ve şiddetli maloklüzyon sayılabilir.

Artı dişlerin cinsiyete göre dağılımları birçok prevalans çalışmasında araştırılmıştır.

Ata-Ali ve arkadaşlarının artı dişlerin görülme prevalansı ve cinsiyet dağılımını derledikleri çalışmalarında erkek kız oranının 1,1:1 ile 4:1 arasında değiştiğini rapor etmiştir (Ata-Ali ve ark., 2014).

Kuzey Hindistan topluluğunda yapılan bir diğer prevalans çalışmasında 4750 hasta muayenesi sonrası 798 artı diş hastası bulunmuştur. 425 erkek, 373 kız olmak üzere; erkek kız oranı 1,13:1 olarak tespit edilmiştir (Patil ve ark., 2014).

1960 İspanyol çocuk hasta üzerinde yapılan artı diş prevalans çalışmasında 46 adet artı diş teşhisi 33 hastada konmuş ve erkek kız oranı ise 2:1 olarak bulunmuştur (Ferrés-Amat ve ark., 2015).

Ülkemizde yapılan bir retrospektif çalışmada ise artı diş teşhisi konan 141 hastanın 83'ü erkek 58'i kız, olmak üzere erkek kız oranı 1,4:1 olarak bulunmuştur (Demiriz ve ark., 2015).

Çalışmamıza artı diş teşhisi konan 139 erkek ve 71 kız hasta dahil edilmiştir. Erkek kız oranı 1,95:1 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda literatüre uyumlu olarak artı dişlerin erkek hastalarda kız hastalara oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Brook, 1984'ten bu yana yaptığı çeşitli çalışmalarda hipodontili hastaların diş boyutlarının normal popülasyona oranla daha küçük olduğunu, buna karşılık artı dişli olguların diş boyutlarında normal popülasyona oranla artış görüldüğünü öne sürmektedir (Brook 1984; Brook ve ark. 2002; 2009; 2014). Bölümümüzde yapılan uzmanlık tezi çalışmasında hipodonti olgularında maksiller kesici diş boyutlarında normal popülasyona göre azalma olduğu bulunmuştur. Bu azalma kızlarda erkeklerden fazladır. Artı diş vakalarında ise, aynı diş grubunda boyut artışı görülmekle beraber bu artış erkeklerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. (Uluakay, 2016)

Artı dişler her bir hastada tek adet olabileceği gibi aynı hastada çok sayıda artı dişler de rapor edilmiştir.

Ferrés-Amat ve arkadaşlarının çalışmasında tespit ettikleri 46 artı dişin %78,79 tek adet, %18,18'i iki adet, %3,03'ünde ise altı adet artı diş tespit edilmiştir (Ferrés-Amat ve ark., 2015).

Patil ve arkadaşlarının tespit ettikleri 798 artı diş hastasının 511'inde bir adet (%64,1), 249'unda iki adet (%31,2), 38'inde (%4,6) ise üç ve daha fazla artı diş bulmuşlardır (Patil ve ark., 2014).

Güney Hindistan'da yapılan ve 12 senelik süreci kapsayan bir retrospektif çalışmada 790 artı diş hastası bulunmuş; %88,61'in tek adet artı diş, %11,14'ünde iki adet artı diş, %0,25'inde üç artı diş tespit edilmiştir (Anegundi ve ark., 2014).

Ülkemizde yapılan bir retrospektif çalışmada artı dişi olduğu tespit edilen 112 hastanın 85 tanesinde bir adet (%75,9), 21 tanesinde iki adet (%18,7), 6 tanesinde üç veya daha fazla (%5,4) artı diş bulunmuştur (Tatlı ve ark., 2014).

Ülkemizde yapılan bir klinik çalışmada beş yıl boyunca pedodonti kliniğine başvuran 141 çocuk hastanın 110 tanesinde bir adet (%62,1), 29 tanesinde iki adet (%32,8), 1 tanesinde üç adet (%1,7), 1 tanesinde altı adet (%3,4) olmak üzere toplam 177 artı diş teşhis edilmiştir (Demiriz ve ark., 2015).

Çalışmaların çoğunda bizim çalışmamızda olduğu gibi (%72,38) tek adet artı dişe sahip hastalar en yüksek teşhis oranına sahiptir. Bir sonraki oran iki adet artı dişi olan hastalardadır. Bizim çalışmamızda da 39 hastada iki adet (%18,57) artı diş tespit edildi. Ardından üç adet veya daha fazla artı dişi bulunan hastalar gelmektedir. Bizim çalışmamızda ise 19 hastada üç adet veya daha fazla (%9,04) artı diş tespit edilmiştir.

Artı dişler herhangi bir sendroma bağlı olmadan oluşabileceği gibi, dentofasyal sendromların parçası olarak da görülebilmektedir. Bu yüzden hekimler özellikle çok sayıda görülen artı diş olgularında ayrıntılı bir anamnez almalıdır (Subasşıoğlu ve ark., 2015). Bizim görüşümüz, bir hastada görülen artı diş sayısının artması sendrom görülme ihtimalini artırmakta ve bu nedenle birden fazla artı dişi olan hastalarda çok daha ayrıntılı anamnez alınmalı, ailenin tıbbi hikayesi sorgulanmalı, radyolojik muayene gerekirse tekrarlı olarak yapılmalıdır.

Artı diş tipleri sınıflandırılırken konik, suplemental, tüberküllü, odontoma ve paramolar dişler dahil edilmiştir.

Garvey ve arkadaşları artı dişleri tek ve çok sayısıda iki ana gruba ayırdıktan sonra; konik, tüberküllü, süplemental ve odontoma olarak sınıflamıştır (Garvey ve ark., 1999).

Anegundi ve arkadaşlarının yaptıkları retrospektif çalışmada bulunan 790 artı diş hastasında; 650 hastada konik (%82,28), 66 hastada suplemental (%8,35), 15 hastada molar formlu (%1,9), 4 hastada Tüberküllü (%0,51), 4 hastada odontoma (%0,51) tespit etmişlerdir (Anegundi ve ark., 2014).

Demiriz ve arkadaşlarının ülkemizde yaptıkları çalışmalarında 141 artı diş hastasında teşhis ettikleri 177 artı dişte; 117 konik, 32 tüberküllü, 22 suplemental, 6 odontoma bulmuşlardır (Demiriz ve ark., 2015).

Çalışmamızda tespit edilen 250 artı dişin; 117 tanesi konik (%46,8), 65 tanesi suplemental (%26), 50 tanesi Tüberküllü (%20), 14 tanesi odontoma (%5,6), 4 tanesi ise paramolar (%1,6) olarak daha önceki raporlara benzer şekilde bulunmuştur.

Odontomalar, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından odontojenik doku kaynaklı karışık odontojenik iyi huylu tümör olarak tanımlanmıştır. Odontomalar

klinik açıdan diğer artı diş tiplerine göre aynı patolojik ilerleme malformasyonu gösterse de; tamamen mineralize olduğunda hacimsel olarak büyümeyi durdurduğundan, daha ileri bir safhaya geçmediğinden ve alındıktan sonra tekrar oluşmadığından vücuttaki diğer tümörlerden farklı olarak, tümörel olmayan lezyonlar gibi klinik davranış gösterir. (Pippi, 2014). Bu yüzden her ne kadar klinik olarak artı diş sınıflaması içinde bulunsa da genetik özelliği farklı olabileceği düşünüldüğünden odontomalar çalışmamızın genetik kısmına dahil edilmemiştir.

Artı dişlerin ağız içinde bulundukları konum süt veya sürekli dentisyonun yerleşimini etkilediği için oldukça önemlidir.

Anthonappa ve arkadaşlarının 283 adet artı diş teşhis ettikleri araştırmalarında; dişlerin 224 tanesi palatinal/lingual bölgede konumlanmış (%79,1), 51 tanesi tam sürmüş ve doğru yerleşmiş olarak (%18,1), 6 tanesi labial/bukkal bölgede konumlanmış, 2 tanesi yatay konumlanmış (%0,7) olarak tespit edilmiştir (Anthonappa ve ark., 2008).

Ferrés-Amat ve arkadaşlarının yaptığı 46 artı dişi içeren çalışmada; olguların %39,39'u üst orta keserler arasında orta hatta, %9,09'u üst keser bölgesinde, %6,06 alt keser bölgesinde bulunmuştur (Ferrés-Amat ve ark., 2015).

Bereket ve arkadaşlarının yaptığı 1100 artı diş hastasını içeren retrospektif çalışmada üst çenede 828 artı diş (%78), alt çenede 242 artı diş (%22) tespit etmişlerdir. Üst çenede bulunan artı dişlerin 284'ü (%34) orta hatta, alt çenedekilerin ise 3 tanesi (%1,2) orta hatta bulunmuştur (Bereket ve ark., 2015).

Tuna ve arkadaşlarının tersine konumlanmış orta hattaki artı dişlerin klinik ve radyolojik olarak değerlendirdikleri çalışmalarında; en fazla buldukları komplikasyon, bölgesel maloklüzyon olmuştur (Tuna ve ark., 2013).

Hong ve arkadaşlarının 431 hastada bulunan 471 adet orta hatta konumlu artı dişler üzerine yaptıkları çalışmalarında, artı dişlerin uzunluk/genişlik oranları ile konum açılarının artı diş sürmesini etkilediğini göstermişlerdir (Hong ve ark., 2009).

Kret üzerinde ve orta hat üzerinde bulunana artı dişler her zaman ortodontik sorunlara neden olurken, palatinalde konumlanmış sürmüş / sürememiş artı dişler ise

bazı durumlarda oklüzyonu etkilememekte ve çapraşıklığa neden olmamaktadır. Dolayısıyla sürmüş dişler sadece çekimle tedavi edilebilirken, palatinalde gömük dişler birçok durumda ağız içinde bırakılabilmektedir.

Çalışmamızda tespit edilen 250 artı dişin; 81 tanesi kret üzerinde (%32,4), 80 tanesi palatinalde (%32), 77 tanesi orta hatta (%30,8), 12 tanesi mandibulada (%4,8) teşhis edilmiştir.

7.2 DNA ve RNA Mikrodizin Profillemesi Bulgularının Tartışması

7.2.1 RNA Mikrodizin Analiz Bulgularının Tartışması

Diş gelişimi ile ilgili genler ve bunların RNA transkriptlerinin incelenmesi 1970'li yıllardan beri farelerin dentisyonunun büyüme ve gelişimini incelenmesi temeline dayanmaktadır. Thesleff 2003 yılında hazırladığı derlemesinde dental dokuların gelişimi ile ilgili sinyalleşme yollarının bütün morfogenez boyunca tekrarlandığını ve birçoklarının ko-ekspresyon olarak görüldüğünü bildirmektedir. Thesleff'e göre diş gelişiminin karakteristik özelliğinin epitelde bulunan değişik sinyalleşme merkezlerinin tekrarlandığı görülmektedir. Bu sinyalleşme merkezleri Shh, Bmp, Fgf, Wnt'lerin dahil olduğu 10'dan fazla farklı sinyalleşme moleküllerini eksprese eder (Thesleff 2003).

Aynı araştırma grubu daha sonra hazırladığı ve en son 2009 yılında güncelledikleri *Gene expression in* tooth veritabanına (http://bite-it.helsinki.fi) göre farede 329, ratlarda 48, insanda 28 gen ekspresyonu yayınlamışlardır.

Harvard Tıp Fakültesi ve Brigham and Women's Hastanesi Genetik Bölümünün Maas laboratuvarı tarafından yürütülen diş rejenarasyon projesi kapsamında oluşturulan ve 1993-2011 yılları arasındaki fare dentisyonu ile ilgili çalışmalarını kapsayan *ToothCODE* (http://compbio.med.harvard.edu/ ToothCODE/index.html) veritabanında 113 regülatör genine hedef olan 268 gen tespit edilmiştir.

Lacruz ve arkadaşları, 2012 yılında yaptıkları bizim çalışmamıza benzer şekilde; tüm genom transkript profillemesi ile farelerde diş minesi mineralizasyonunda etkili olan yeni aday genlerin tespit edilmesi için yaptıkları çalışmalarında 686 adet gen anlatımının arttığını ve 614 gen anlatımının azaldığı, toplamda 1300 genin eksprese olduğunu tespit etmişlerdir. Bunlardan sadece matürasyon safhasında 166 transkriptin anlatımlarının arttığını, 155 transkriptin ise anlatımlarının azaldığını bulmuşlardır (Lacruz ve ark., 2012).

Laugel-Haushalter ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları farelerde hem kesiciler hem azı dişlerinin sadece takke gelişimi safhalarındaki karşılaştırmalı

transkriptomik analiz çalışmalarında kesici ile azı dişi oluşumu arasındaki fark ile ilgili 2 veya daha fazla katsayı değerine sahip 231 gen tespit etmişlerdir. Maksiller ve mandibüler azı dişleri arasında ise 96 gende anlatım (ekspresyon) farklılığı bulunmuştur. Bu genlerden 143 tanesinin inter moleküler bağlantısı bulunan 9 sinyalleşme ağına ait olduğu bulunmuştur (Laugel-Haushalter ve ark., 2013).

İnsanda ise orodental gen transkript profillemesini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Abe ve arkadaşlarının 2011 yılındaki RNA mikrodizin analizi için gingival doku örnekleri aldıkları 14 sağlıklı ve 14 periodontitis teşhisi konmuş hastanın karşılaştırmalı genom analizi çalışmasında 2 veya daha fazla katsayı değerine sahip 15 adet anlatımı artan ve 13 adet anlatımı azalan gen tespit etmişlerdir (Abe ve ark., 2011).

Song ve arkadaşlarının 2013 yılında, insan süt ve sürekli dişlerinin periodontal ligamentlerinin karşılaştırmalı gen anlatım analizini cDNA mikrodizin ile yaptıkları çalışmalarında; sürekli diş periodontal ligamentine göre süt dişi periodontal ligamentinde 21 gen anlatımının arttığını, 30 gen anlatımının ise azaldığını tespit etmişlerdir (Song ve ark., 2013).

Lee ve arkadaşlarının 2013 yılında insan dental folikül ve periodantal ligamentlerinin karşılaştırmalı gen ekspresyon analizini cDNA mikrodizin yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında 2 veya daha fazla katsayı değerine sahip, periodontal ligamente göre dental folikülde 365'i artan ve 125'i azalan olmak üzere 490 gende anlatım farklılıkları olduğunu tespit etmişlerdir (Lee ve ark., 2013).

Huang ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları cerrahi veya medikal nedenlerle sonlandırılmış 11 haftalık 6 insan fetüsünün diş germi ile dudak dokusunu karşılaştırmak için, bizim çalışmamıza benzer şekilde mikrodizin ile tüm genom profilleme analizi yaptıkları çalışmalarında, diş oluşumunun takke safhasında 167 genin fazla miktarda anlatımının yapıldığını tespit etmişlerdir (Huang ve ark., 2014).

Prasad ve arkadaşlarının 2016 yılında, genetik hastalıkların moleküler tanısında kullanılan Hedefe Yönelik Yeni Nesil Dizileme (Targeted Next-Generation

Sequencing, tNGS) mikrodizin yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında orodental dokuları etkileyen mutasyonları ve potansiyel yeni genleri tespit etmeyi amaçlamışlardır. Araştırıcılar bunun için orodental hastalıklarda 585 bilinen ve aday genleri hedefleyen bir gen paneli tasarlamışlardır. Daha önce moleküler tanısı yapılmamış 101 hasta taranmıştır. Bu hastalarda izole ve sendromik amelogenezis imperfekta, izole ve sendromik diş agenezisi, izole ve sendromik dentinogenezis imperfekta, izole dentin displazisi ve birincil diş sürme kusuru gibi genetik hastalıklardan biri klinik olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu hastalarda bilinen genlerin tespit edilmesi 39 hastada olur iken, 21 hastada yeni genler tespit edilmiştir. Sendroma bağlı olmayan hastalıklarda tanı oranı %39 olarak bulunmuştur. Araştırıcıların inceledikleri hasta grubunda artı dişli hastalar bulunmamaktadır (Prasad ve ark., 2016).

Kim ve arkadaşları 2016 yılında insanda koronal ve apikal pulpa dokularının karşılaştırmalı gen anlatım analizini cDNA mikrodizin ile yaptıkları çalışmalarında 2 veya daha fazla katsayı değerine sahip, apikal bölgede 125, koronal bölgede 139 adet genin anlatım yaptığını bulmuşlardır (Kim ve ark., 2016).

Yaptığımız literatür araştırmasında non-sendromik artı dişlerin genetik etiyolojisini mikrodizin yöntemi ile inceleyen çalışmaya rastlamadık. Bizim çalışmamız bu konudaki ilk araştırmadır. Çalışmamızda artı dişi olduğu tespit edilen hastalarda kontrol grubuna göre 2 veya daha fazla katsayı değerine sahip 6 adet gen anlatımının arttığı, 83 adet genin ise anlatımlarının azaldığı toplam 89 adet gen tespit edilmiştir.

Yaptığımız literatür araştırmasında orodental dokuları ilgilendiren mikrodizin çalışmalarında cinsiyeti değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda aynı cinsiyetteki hasta ve kontrol grupları değerlendirildiğinde; erkeklerde toplamda 20 adet, kızlarda ise toplamda 90 adet genin anlatımlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu genlerin anlatımlarının cinsiyetlere göre farklılık göstermesi artı diş olgularının erkeklerde daha fazla görülmesiyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Diş tipi ile ilgili farelerde yapılmış çalışmalarda kesici diş ile azı dişlerinin gen ekspresyon çalışmaları yapılmış ve farklılıklar tespit edilmiştir. Laugel-Haushalter ve arkadaşları fare azı dişlerinde yaptıkları çalışmlarında en fazla Barx1, Six2 ve daha önce tespit edilmemiş 8 gen ekspresyonunda artış; keser dişlerde ise Isl1, Pax3, Hand2 ve daha önce tespit edilmemiş 7 genin anlatımlarında artış bulunmuştur (Laugel-Haushalter ve ark., 2013). Huang ve arkadaşları ise insan fetüsünde yaptıkları çalışmada kesici, kanin ve azı dişlerini gen ekspresyonlarını karşılaştırmış ve ISL1'in kaninde, BARX1'in ise azı dişlerinde kesici dişlere göre daha fazla eksprese olduğunu bulmuştur (Huang ve ark., 2014). Biz de çalışmamızda, artı diş tiplerini kontrol grupları ile karşılaştırdığımız zaman BARX1 ve CCL13 genlerin eksprese olduğunu tespit ettik.

GeneCards veritabanına göre BARX1 (BARX Homeobox 1) geni protein kodlayan bir gendir. BARX1 gastrik mukozal hipertrofisi ve sert damak kanseri ile ilişkilendirilmiştir.

OMIM veritabanına göre BarH-Like Homeobox Gene 1 ismi ile 603260 numarasıyla tespit edilmiştir. Farede Barx1 baş, boyun mezenkiminde ve gelişen mide duvarında kuvvetle eksprese olmaktadır (Tissier-Seta ve ark., 1995).

Mitsiadis ve arkadaşları 1998 yılında fare odontogenezisinde farklı transkripsiyon faktörlerinin gen anlatımlarının inceledikleri çalışmalarında Barx1 geninin azı dişlerinde kesici dişlere göre kuvvetli olarak eksprese olduklarını ilk defa bildirmiştir (Mitsiadis ve ark., 1998).

Gould ve Walter 2000 yılında ilk defa insan genomunda BARX1 geninin konumunu 9q12 sitobandında tespit ederek klonlanmasını, karakterizasyonu ve mutasyonel özelliklerini bildirmişlerdir (Gould ve Walter, 2000).

Miletich ve arkadaşlarının 1998-2003 yılları arasındaki çalışmalarından yaptıkları derlemede Barx1 geninin dentisyon ve sindirim sistemi gelişiminde anahtar genlerden biri olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Barx1'in çok tüberküllü diş gelişimi yolağında etkin olduğunu vurgulamışlardır (Miletich ve ark., 2005).

Miletich ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada Bmp aktivitesinin kritik seviyelerinin belirlenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin Barx1 ve Msx1 olduğunu ve Barx1'in dişlerde tüberkül çeşitliliğinin aktivitesinde rol oynadığını transjenik fareler ile bulmuştur (Miletich ve ark., 2011).

Laugel-Haushalter ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları farelerde hem kesiciler hem azı dişlerinin sadece takke gelişimi safhalarındaki karşılaştırmalı transkriptomik analiz çalışmalarında Barx1 geninin azı dişlerinde insizal kesici dişlere göre 8,6 kat daha fazla eksprese olduğunu bulmuşlardır (Laugel-Haushalter ve ark., 2013).

BARX1 ile ilgili bulduğumuz insanda yapılmış tek çalışma olan Huang ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları cerrahi veya medikal nedenlerle sonlandırılmış 11 haftalık 6 insan fetüsünün diş germi ile dudak dokusunu karşılaştırmak için, bizim çalışmamıza benzer şekilde mikrodizin analizi ile tüm genom gen anlatım profil analizi yaptıkları çalışmalarında, BARX1 geninin azı dişlerinde anlatımının olduğunu, kesici ve kanin diş germlerinde ise tespit edilmediğini bildirmişlerdir (Huang ve ark., 2014).

Bizim çalışmamızda da BARX1 gen anlatımı hem tüm artı diş hastalarını kontrol grubu ile kıyasladığımızda, erkek artı diş hastalarını erkek kontrol grubu hastalarıyla kıyasladığımızda, hem de üç diş tipini kontrol hastalarıyla kıyasladığımızda ortak olarak ifade olan gen olduğunu tespit ettik. Bu nedenle BARX1 geninin artı diş oluşumunda önemli bir gen olduğunu düşünmekteyiz. Bu genle ilgili daha ayrıntılı çalışmayı yapmayı planlamaktayız.

7.2.2 DNA Mikrodizin Analiz Bulgularının Tartışması

Genetik araştırmalar için alternatif genomik DNA kaynağı olarak tükürüğün karşılaştırdıkları Ng ve arkadaşlarının araştırmasına göre, kaba biriktirilerek elde edilen 2 ml tükürük örneğinden, aynı miktarda kandan elde edilen 20 ile 80 μg DNA miktarına yakın şekilde, 35 μg DNA elde etmişlerdir. Bu miktar ağız suları veya swab örneklerinden de fazla bulunmuştur (Ng ve ark., 2006).

Lei ve arkadaşları, maksiller kesici bölgesinde artı dişi bulunan 20 çocuk ve 31 kontrol hastasından topladıkları ağıziçi sürüntü epitel hücre örneklerinden genomik

DNA izolasyonu sonrası PAX6 geninin DNA sekans analizini yapmışlardır. Fakat PAX6 polimorfizmleri ile artı dişi bulunan çalışma grubu arasında bir ilişki bulamamışlardır (Lei ve ark., 2011).

Anthonappa ve arkadaşları, tükürükte bulunan DNA'nın sağlam olarak uzun süreli saklanmasını araştırmışlardır. 50 gönüllü çocuk hastadan topladıkları tükürük örnekleri ile genel anestezi altında diş tedavileri yapılan 10 çocuk hastadan alınan kan örnekleri karşılaştırılmak üzere saklanmıştır. 1, 6, 12 ve 18 ay sürelerle saklanan tükürük örnekleri ile kan örneklerinden tekrar elde edilen DNA örneklerinden elde edilen 8 farklı gene ait 25 SNP karşılaştırmışlardır. Elde edilen sonuçlarda istatistiksel olarak bir fark bulunamamış ve tükürük genomik DNA elde edilip saklanması açısından önerilmiştir (Anthonappa ve ark., 2013).

Bölümümüzde yapılan Erken Çocukluk Çağı Çürük (EÇÇ) teşhisi konan hastaların genetik ve çevresel faktörlerinin araştırıldığı çalışmada, 259 hastanın genomik DNA'sı bukkal hücrelerinden elde edilen sürüntüden izole edilmiştir (Abbasoğlu ve ark., 2015).

Çalışmamızda çocuk hastalar, DNA izolasyonu ve aCGH için gereken tükürük örneklerini saklama kabına tükürerek biriktirilmiştir. Yaptığımız mikrodizin profilleme deneylerinden önce ve aşamalarında DNA kalite ölçümlerinde tükürükten elde edilen DNA'nın çalışma için yeterli olduğunu tespit ettik.

Kromozomal delesyonların, düplikasyonların, ve yer değiştirmelerin tespiti için zamanla farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden tüm genom analizler bütün kromozomun taranmasını sağlarken, hedefe yönelik diğer yöntemler genomun sadece belirli bölgelerini incelenmesini sağlamaktadır. Ayrıca yöntemler çözünürlük seviyesi ve analiz edilebilecek örnek açısından değişkenlik gösterebilir.

Kopya sayısı değişikliği saptama testlerinden; Giemsa-bantlı Kromozom Analizi (GKA) ve bizim kullandığımız Kromozomal Mikrodizin Analizi (KMA) her kromozomun bütünlük içinde incelenebildiği iki yöntemdir. Fakat KMA'nın çözünürlüğü GKA'yı geçerek; önceden sadece GKA ile ölçülebilen genomik

dengesizlikler, şimdi DNA sekans koordinatlarını içeren probların mikrodizine bağlanmasıyla KMA tabanlı analizlerde hassasiyetle ölçülebilmektedir. KMA, pediatrik çalışmalardaki klinik sitogenetik testler için ilk aşama olmuştur.

Klinik KMA için kullanılan birçok tüm genom mikrodizinler kopya sayısı tespiti dışında aynı zamanda tek nükleotid polimorfizm (SNP) probları içerir. SNP problarının eklenmesi bir takım avantajlar sunmaktadır. Örneğin; SNP probları triploid olgularının ve bazı tetraploid olgularının tespitine olanak sağlamaktadır (Lathi ve ark., 2012).

İyi huylu KSD tespiti ile ilgili en büyük zorluklardan biri hastalıklara sebep olan patolojik KSD ile farkı tespit edilebilmektir. Patojenik KSD'ler genellikle gen dozundaki dengesizlik ile oluşan delesyonlar ve/veya anormal kromozomal yapısıyla sonuçlanır. Patojenik KSD'ler; obezite, diabet, gelişimsel bozukluklar, kanser gibi hastalıklar ile otizm, şizofreni, alzeheimer gibi psikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Mishra ve Whetstine, 2016).

Voll ve arkadaşları en yaygın KSD hastalıklarından biri olan 22q11.2 delesyonuna sahip 207 yetişkin hastada, vücut kütle indeksi ölçümleri yaparak obeziteyi 22q11.2 delesyonu ile ilişkilendirmişlerdir (Voll ve ark., 2016).

Otistik Spektrum Bozukluğu bulunan 335 hastada yapılan tüm genom KSD analizi sonrası, 22q13.3 kromozomundaki tekrarlayan kopya sayısı değişikliklerinin otistik spektrum bozukluğu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Chen ve ark., 2016).

Epilepsi hastalarında tüm genom KSD'lerin tespiti ile ilgili ilk çalışma 2010 yılında yayımlanmıştır (Mefford ve ark., 2010). Bu çalışmanın bulguları idiopatik epilepsi teşhisi olan hastaların %8,9'unda bir veya daha fazla kopya sayısı değişimleri olduğu göstermiştir.

Günümüzde genetik çalışmalar ağız diş hastalıkları araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hastalıklar arasında Amelogenezis İmperfekta (Kim ve ark., 2016), Dentinogenezis İmperfekta (McKnight ve ark., 2008), Dentin Displazisi (Xiong ve ark., 2016) bulunmaktadır.

DNA mikrodizin çalışması sonucu kazanç/kayıp olarak tespit edilen tüm genler, iki gen veritabanından taranarak diş ve kraniyofasyal dokularla ilgili genler seçilmiştir.

Bu veritabanlarından ilki "Gene expression in tooth, Helsinki Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından yapılan Gelişimsel Biyoloji Programının Diş ve Kraniyofasiyal Grubu tarafından hazırlanan Dişte Gen ekspresyonu veritabanıdır. (http://bite-it.helsinki.fi). İkinci veritabanı ise ToothCODE (http://compbio.med.harvard.edu/ ToothCODE/index.html) internet sitesi üzerinden Harvard Tıp Fakültesi ve Brigham and Women's Hastanesi Genetik Bölümünün Maas laboratuvarı tarafından yürütülen diş rejenarasyon projesin elde edilen bilgilerin halka açık olarak yayımlanan veritabanı kullanılmıştır.

Bulunan genler daha sonra *GeneCards* veritabanı kullanılarak temel fonksiyonları açısından incelenmiş, OMIM veritabanı kullanılarak hastalıklarla ilişkileri, ardından diş ve kraniyofasyal dokularla ilgili son literaür araştırması yapılmıştır.

ERBB4 (Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 4) insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 4 olarak bilinen bir gendir. Yaptığımız güncel literatür taramasında 1654 yayın bulunmuştur. GeneCard veritanında, ERBB4 geniyle ilişkilendirilen hastalıklar; Amyotrofik Lateral Sklerozis 19 ve ERB4-bağlı Amyotrofik Lateral Sklerozis'dir. OMIM veritabanında 600543 numarasıyla tespit edilmiştir. Silberberg ve arkadaşları 59 hastada yaptıkları çalışmada ERBB4 geni ile şizofreni arasında anlamlı bir ilişki bulmuştur (Silberbeg ve ark., 2006). Prickett ve arkadaşları yaptıkları çalışmada melanomalı kişilerin %19'unda ERBB4 geni mutasyonu tespit etmişlerdir (Prickett ve ark., 2009).

Fried ve arkadaşları, hayvan modeller üzerinde ERBB4 geninin diş morfogenezisinde rol oynadığı gösterilmiştir (Fried ve ark., 2002).

Kim ve arkadaşları ERBB4 geninin diş pulpa dokusunda anlatımının olduğunu tespit etmişlerdir (Kim ve ark., 2016).

Su ve arkadaşları ERBB4 geninin, minyatür domuzların süt dişi germlerinin DNA metilasyon profillerini (DNA metilasyonu gen susturulma mekanizmalarından biridir) inceledikleri tüm genom çalışmalarında diş gelişimindeki anahtar genlerden biri olduğunu belirtmişlerdir (Su ve ark., 2016).

Biz çalışmamızda, bir adet süplemental tipinde artı dişi olan bir hastamızda ERBB4 gen bölgesinin kayıp (delesyon) olduğunu tespit ettik.

ADAMTS2 geni, ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs) protein ailesinin gen kodlayan bir üyesidir. Yaptığımız güncel literatür taramasında 88 yayın bulunmuştur. OMIM veritabanında Ehlers-Danlors sendromu tip VIIC (Dermatosparaksis Tip) 225410 numarasıyla tespit edilmiştir.

De Coster ve arkadaşları, 13 yaşındaki Ehlers-Danlos sendromlu tip VIIC teşhisi konmuş hastada mikrognati, hipodonti, lokalize mikrodonti, pulpa oblitirasyonu, aşırı gingival hiperplazi, ön açık kapanış ve aşırı TME hareket sınırlanması tespit etmiştir (De Coster ve ark., 2003).

Malfait ve arkadaşları çoğu 2 yaş altında olan 7 hastada süt azı dişlerinde anormal morfoloji ve pulpa odası obliterasyonları tespit etmişlerdir (Malfait ve ark., 2004). ADAMTS2 geninin yetersiz aktivitesi sonucu Ehlers-Danlors sendromu tip VIIC (dermatosparaksis tip) ile ilişkilendirilmiştir (Van Damme ve ark., 2016).

Lacruz ve arkadaşları, tüm genom transkript profillmesi metoduyla mine mineraliziasyonu ile ilgili aday genlerin tespit edilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında ADAMTS2 genini, mine oluşumunda yeni aday gen listesi içinde vermişlerdir (Lacruz ve ark., 2012).

Biz çalışmamızda, bir adet süplemental tipinde artı dişi olan bir hastamızda ADAMTS2 gen bölgesinin kazanç olduğunu tespit ettik. Ancak hastamızda Ehlers-Danlos sendromu tip VIIC ile ilgili klinik bulguları görülmemiştir.

EPHA2 geni ephrin reseptör ailesine aittir. Ephrin'ler hücre membranına bağlı Eph reseptör tirozin kinaz ligandlarıdır ve çeşitli gelişimsel süreçleri yönetirler. Yaptığımız güncel literatür taramasında 821 yayın bulunmuştur. GeneCards varitabanına göre EPHA2 geni ile ilişkili hastalıklar; katarakt 6, sübkapsüler katarakt tipleridir. İlişkili olduğu yolaklar ise; gelişimsel slit-robo sinyalleşmesi ve p70S6K sinyalleşmesidir. OMIM veritabanında, Cataract 6 (Mültipl Tip) 116600 numarasıyla tespit edilmiştir (http://www.omim.org).

Luuko ve arkadaşlarının, farelerde EPHA2 ve diğer ephrin ligandların hücresel mRNA ekspresyonunu araştırdıkları çalışmalarında, fare birinci azılarında diş germinin epitel kalınlaşma safhasında EPHA2 ekspresyonunu tespit etmişlerdir (Luuko ve ark. 2005).

Agrawal ve arkadaşları, dudak damak yarıklı farelerde EPHA gen ailesindeki mutasyonların önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (Agrawal ve ark., 2014).

Çalışmamızda iki adet artı dişi bulunan S.K. isimli hastamızda EPHA2 geninin bulunduğu bölgede kazanç tespit edilmiştir.

LRP5L (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5-like) geni protein kodlayan bir gen olup, Wnt proteini bağlanması ve Wnt reseptör aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Gaudet ve ark. 2009).

Li ve arkadaşları, yüksek kemik densitesi ile karakterize sklerostozise sebep olan sklerostinin WNT sinyalleşmesi ile antagonize olduğunu ve LRP5'e bağlandığını tespit etmişlerdir (Li ve ark., 2005).

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak bir adet artı dişi bulunan E.Ş. isimli hastamızda LRP5L gen bölgesinde kazanç tespit edilmiştir.

WNT7B geni, WNT ailesine ait olup; onkonogenezde, gelişim süreçlerinde ve embryogenez süresince hücre patternleşmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca WNT sinyalleşmesinin; postnatal süreçte kraniyofasyal kompleks içinde odontoblast,

sementoblast, ameloblast ve osteoblastların mineralize dokuları oluşturduğu ve bütün hücrelerin aktif bir WNT sinyalleşmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Lim ve ark., 2014). Yaptığımız güncel literatür taramasında 325 yayın bulunmuştur.

OMIM veritabanında Wingless-Type Mmtv Integratıon Site Family, WNT7B adıyla 601967 numarasıyla tespit edilmiştir (http://www.omim.org).

Lacruz ve arkadaşları, tüm genom transkript profillemesi metoduyla mine mineralizasyonu ile ilgili aday genlerin tespit edilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında WNT7B genini, mine oluşumunda yeni aday gen listesi içinde vermişlerdir (Lacruz ve ark., 2012).

WNT7B geni oral ektodermde SHH (Sonic Hedgehog) gen ekspresyonunu baskılayarak, böylece oral ve dental ektoderm hücreleri arasında sınır oluşmasına sebep olmaktadır (Sarkar ve ark. 2000). Hu ve arkadaşlarının SHH sinyalleşme yolları üzerine yaptıkları mikrodizin çalışmalarında, insan embriyosu ile fare diş germini karşılaştırmışlar ve genlerin benzer ekspresyon paternleri olduğunu bulmuşlardır (Hu ve ark., 2013).

Lim ve arkadaşları çalışmalarında WNT sinyalleşmesi baskılanmış farelerde pulpa hacmi ve dentin kalındığında artış; mine ve kemik formasyonunda ise azalış gözlemlemişlerdir (Lim ve ark., 2014).

Çalışmamızda bir adet artı dişi bulunan K.D. isimli hastamızda WNT7B gen bölgesinde kayıp bulunmuştur.

MIA (Melanoma Inhibitör Aktivitesi) protein kodlayan bir gen olup, gen ile ilişkili hastalıklar melanoma ve deri melanomasıdır (Hau ve ark. 2002). Nöral krest farklılaşması ve büyüme faktör aktiviteleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yaptığımız güncel literatür taramasında 745 yayın bulunmuştur. OMIM veritabanında Melanoma İnhibitör Aktivite Proteini, 601340 numarasıyla kayıt edilmiştir (http://www.omim.org).

MAP3K10 geni TGFβ (transforming growth factor beta) ailesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sapkota 2013).

LTBP4 (Latent transforming growth factor beta binding protein 4) geninin de TGFβ sinyalleşmesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Tomasovic ve ark., 2016).

Çalışmamızda iki adet artı dişi bulunan T.G. isimli hastamızda MIA, MAP3K10, LTBP4 genlerinin bulunduğu bölgede kayıp bulunmuştur.

BMP (Bone morphogenetic protein / kemik morfogentik proteini) reseptörleri BMPR1A ve BMPR1B reseptörlerini içeren serin/treonin kinaz transmembran ailesine aittir. BMPR1A reseptörünü epitel yüzeyinde kodlayan gen, diş morfogenezisini durdurmakta ve saç eksikliğine sebep olmaktadır. Yaptığımız güncel literatür taramasında 538 yayın bulunmuştur. OMIM veritabanında Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü ismiyle, 601299 numarasıyla kayıt edilmiştir (http://www.omim.org).

Lacruz ve arkadaşları, tüm genom transkript profillemesi metoduyla mine mineraliziasyonu ile ilgili aday genlerin tespit edilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında BMPR1A genini, mine oluşumunda yeni aday gen listesi içinde vermişlerdir (Lacruz ve ark., 2012).

Li ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, BMPR1A aktivitesini arttırdıkları farelerde damak yarığı oluşumu ve gecikmiş diş farklılaşması gözlemlemişlerdir. BMPR1A sinyalleşmesi normal damak ve diş oluşumu için oldukça önemlidir (Li ve ark., 2013).

Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada BMPR1A ve BMPR1B erken diş gelişiminde, miR-135a aracılığı ile aşırı ekspresyonu diş gelişiminin durduğu görülmüştür (Kim ve ark., 2014).

Çalışmamızda iki adet artı dişi bulunan A.K. isimli hastamızda BMPR1A gen bölgesinde kazanç bulunmuştur.

BMP2K geni, farede bulunan BMP-2 kinaz geninin homoloğudur. BMP (Bone Morphobetic Protein) kemik gelişimi ve paternleşmesinde rol oynar. Kemik gelişimi ve paternleşmesinde rol oynar. OMIM veritabanında Bone Morphogenetic Protein 2; BMP2 ismi ve 112261 numarasıyla kayıt edilmiştir (http://www.omim.org).

Liu ve arkadaşları, yüksek göz miyopisi olan bireylerde BMP2K gen polimorfizmine baktıkları çalışmalarında, BMP2K genindeki 1379 G/A değişkeninin miyopi ile doğrudan bağlantını olduğunu ve buna sahip bireylerin yüksek düzeyde patojenik miyopi oluşturabileceğini belirtmişlerdir (Liu ve ark., 2009).

Chen ve arkadaşları, BMP2K geninin bulunduğu kromozomda 4q12 --> q21.21 arasında delesyon tespit ettikleri bir olgu raporunda 2 yaşındaki kız hastada kısa boy, mental retarde, gelişim geriliği, hiperopi, eksotropi, diş mine defektleri, diş sürme gecikmesi ve geç püberte gözlemlemişlerdir (Chen ve ark., 2011).

Çalışmamızda iki adet artı dişi bulunan M.K. isimli hastamızda BMP2K gen bölgesinde kazanç bulunmuştur.

Çalışmamızda, iki hastamızda 15q11.1-q11.2 Sitoband bölgesinde kazanç tespit edilmiştir. Bu bölgede *CytoGenomics 3.0.6.6* (Agilent) yazılımı ile 13 farklı genin olduğu tespit edilmiştir. Ancak yaptığımız literatür ve veritabanı incelemelerinde bu bölge ile ilgili orodental dokuları ilgilendiren hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Her iki hastada da çift artı diş bulunması bu bölgenin daha önceden tespit edilmemiş bir hiperdonti oluşturma potansiyeli olan bir bölge olduğunu bize düşündürmektedir.

Bu bölgeyle ilgili literatürdeki tek çalışma olan Takahashi ve arkadaşlarının yaptıkları KSD çalışmasında 15q11.1-q11.2 düplikasyonunun şizofreni ile bağlantılı olduğu görülmüştür (Takahashi ve ark., 2015).

Genetik çalışmalardan elde edilen veriler hastalıkların önceden tahmini ve elde edilecek veritabanı ile bu genlerdeki farklılıklar mikroRNA'lar aracılığı ile kontrol edilerek, gen seviyeleri normalin üzerinde veya altında değişim gösterdiği saptanan

genler belirlenerek, bu genlerin anlatımları doğumdan öncesi safhada ilerideki tedaviye gerek kalmadan önlenebileceği öngörülmektedir.

Non-sendromik artı dişlerin genetik etiyolojisinin saptanmasının tedavi seçeneklerine etkisi açısından; germ eksikliği, amelogenezis imperfekta, dentinogenezis imperfekta, füzyon, geminasyon, dentin displazisi, odontodisplaziler, makrodonti, mikrodonti, mine hipoplazileri gibi dental dokuları ilgilendiren diğer anomalilere göre önemli bir farkı bulunmaktadır. Non-sendromik artı dişin genetik etiyolojinin bulunmasının, non-sendromik artı dişin tedavisine etkisi bulunmamaktadır. Çünkü tedavi seçenekleri olarak cerrahi ve/veya ortodontik müdahaleler ile non-sendromik artı dişlerin sebep olduğu genetik arka plan bilinmese de hastada herhangi bir defekt olmadan başarılı tedavi yapılabilmektedir. Üstelik non-sendromik artı dişlerin sayı, tip ve konum olarak her hastada klinik farklılık göstermektedir. DNA çalışmamızdaki sonuçlarında olduğu gibi genetik yolların her hastada farklı olması, sadece fenotipin değil her hastada genotopin de farklı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla her hasta klinik açıdan olduğu gibi genetik açıdan da tek başına değerlendirilmelidir.

Çalışmamızı etik açıdan değerlendirdiğimizde, genetik etiyolojinin tedaviye doğrudan ilişkisinin olmamasından dolayı, genetik çalışma için hasta ailelerinden alınacak onayın doğru anlatılması önemlidir. Diğer taraftan elde edilen genetik çalışma sonuçlarının, aileye açıklanmasının ayrı bir etik tartışma konusu olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü veritabanlarında ilişkilendirilmiş birtakım genlerin tespiti ileriki sendromların göstergesi olabilir. Çalışmamıza benzer genetik çalışmaların yaygınlaşmasıyla artı diş teşhisi konan hastaların ilerdeki çocuklarında artı diş görülme olasılığı ailesel genetik riskin belirlenmesi ile bilimsel olarak açıklanabilecektir.

Non-sendromik artı dişlere sahip çocuklar ve aileleri, diş morfogenezisi ve gelişimi ile ilgili genlerin ve mutasyonlarının tespit edilmesi ve bunun altındaki mekanizmaların çözülmesi için kaynak olacak önemli olgulardır. Artı diş oluşumunun genetik etiyolojisinin özellikle non-sendromik artı dişlerde araştırılması, sendroma bağlı ve genetik yolları daha önce tespit edilmiş artı diş olgularından farklı olarak, diş oluşum mekanizmasındaki gen yolaklarının açıklanabilmesi açısından önemlidir.

Non-sendromik artı diş hastalarının tüm genomlarındaki artı diş oluşumuna neden olan gen anlatım seviyelerindeki değişimle beraber genomik yapıda buna temel hazırlayan nedenler bu tez çalışması sonuçlarıyla ilk kez ortaya çıkarılmıştır.

Non-sendromik artı diş hastalarının genetik açıdan incelenmesi ile elde edilen genetik bulgulardan oluşacak veritabanı kullanılarak dental dokuların yeniden üretilebilmesi, biyouyumlu ürünlerin yapılması ve kaybedilen dişlerin replasman tedavisi mümkün olabileceğinden çocuk dişhekimliğinin bu konuda öncü bir rol oynayacağını düşünmekteyiz.

8. SONUÇLAR

Tez çalışmamızda elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir.

Klinik çalışma bulguları sonucunda;

1. Artı diş tanısı en çok erken karışık dişlenme döneminde olup, en fazla 8 yaş grubunda bulundu. Erkek hastaların kız hastalara oranı yaklaşık 2:1 olarak tespit edildi.
2. Artı dişi olan hastalarda en sık bir adet artı diş (%60,8) olgusu teşhis edilmiş olup; artı diş tipine göre sırasıyla konik (%46,8), suplemental (%26), tüberküllü (%20), odontoma (%5,6), paramolar (%1,6); artı dişlerin konumları sırasıyla kret üzerinde (%32,4), palatinalde (%32), orta hatta (%30,8), mandibulada (%4,8) Vestibül bölgede hiçbir artı diş teşhis edilmedi.

RNA mikrodizin analiz bulguları sonucunda;

3. Artı diş hasta grubu ile kontrol hasta grubu kıyaslandığında 89 genin anlatımı anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Anlatımı artan (kat sayı değişikliği 2 ve üzeri) 6 adet gen (GUCA2B, COL21A1, PTN, LMO1, KATNAL2, MIA), anlatımı azalan (kat sayı değişikliği 3 ve üzeri) 13 gen (FCRL5, TAS1R3, CD38, MZB1, IRF4, BARX1, MMP7, KIAA0125, TNFRSF17, MCEMP1, JSRP1, IGLL5, IGLL1) bulundu.
4. Artı diş hasta grubu ile kontrol hasta grubu cinsiyete göre kıyaslandığında; erkek hastalarda gen anlatımı artan 3 gen (RNF103, RPS6KA5, MMAB), anlatımı azalan 17 gen (NLRP7, GSTT2, TNFAIP6, BARX1, NTN1, HSD11B1, KLRC1, CXCL12, CRTAC1, PXDN, TMEM176B, PXDN, SELP, FAM167B, SMIM2-AS1, DHH, ECSCR) bulundu. Kız hastalarda ise gen anlatımı artan (kat sayı değişikliği 3 ve üzeri) 4 gen (HRCT1, FAM107A, KATNAL2, LOC100507351), gen anlatımı azalan (kat sayı değişikliği 3 ve üzeri) 12 gen (MMP7, LINC01010, SULT1C2, SLAMF6, CXCL10, AKAP4, LMOD3, VMO1, MOGAT1, APOOP5, LINC00458, SLC7A11) bulundu.

5. Hasta ve kontrol grupları artı diş sayısına göre kıyaslandığında, tek artı dişi olan hastalar ile iki artı dişi olan hastalarında ortak olarak tespit edilen anlatımında artış görülen 16 gen (MZB1, BMS1P20, CD38, JSRP1, IGLL1, TAS1R3, PLA2G7, SLAMF7, POU2AF1, CD19, TDO2, HSD11B1, BARX1, KLRC1, LOC100507616, LIPH), anlatımında azalma görülen 2 adet gen (UBE2DNL, KATNAL2) bulunmuştur.
6. Hasta ve kontrol gruplarının artı diş tipine göre kıyaslandığında üç grupta ortak tespit edilen 2 gen bulundu. Bunlardan CCL13 geninin anlatımı tüm gruplarda artmış, BARX1 geninin anlatımı ise konik artı diş grubunda azalmış, suplemental ve tüberküllü artı diş grubunda ise azalmış olduğu bulundu.
7. BARX1 geni hem tüm artı diş gruplarında hem erkek artı diş hastalarında, hem diş sayısında göre kıyaslamada, hem de diş tipine göre kıyaslamada istatistiksel olarak anlamlı derece farklı eksprese olan gen olarak tespit edildi.

DNA mikrodizin çalışma bulguları sonucunda;

8. 17 kromozomda 34 Kopya Sayısı Değişimleri (KSD) kopya kazanç veya kayıp bölgesini bulundu. KSD kazanımı 10 hastada (6 erkek, 4 kız) 1, 2 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 22 ve X kromozomlarında bulundu. KSD kaybı 6 hastada (3 erkek, 3 kız) 2, 3, 6, 8, 11, 17, 19, 22 ve X kromozomlarında bulundu.
9. Artı diş hastalarının KSD'lerindeki kazanımlar kayıplarına oranla daha fazla olduğu görüldü. İki artı dişi olan hastaların KSD'leri bir artı dişi olanlara göre daha fazla; tüberküllü ve suplemental olanların KSD'leri konik olanlara göre daha fazla bulundu.

9. KAYNAKLAR

Abbasoğlu Z, Tanboğa İ, Küchler EC, Deeley K, Weber M, Kaspar C, Korachi M, Vieira AR. Early childhood caries is associated with genetic variants in enamel formation and immune response genes. Caries Res. 2015;49(1):70-7.

Abe D, Kubota T, Morozumi T, Shimizu T, Nakasone N, Itagaki M, Yoshie H. Altered gene expression in leukocyte transendothelial migration and cell communication pathways in periodontitis-affected gingival tissues. J Periodontal Res. 2011 Jun;46(3):345-53.

Aberg T, Wang X, Kim J, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo H, Thesleff I. 2004. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. Dev Biol 270:76–93.

Agrawal P, Wang M, Kim S, Lewis AE, Bush JO. Embryonic expression of EphA receptor genes in mice supports their candidacy for involvement in cleft lip and palate. Dev Dyn. 2014 Nov;243(11):1470-6.

Aioub M, Le´zot F, Molla M, Castaneda B, Robert B, Goubin G, Ne´fussi JR, Berdal A. 2007. Msx2 -/- transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodental osteopetrosis. Bone 41:51–859.

Andreasen JO, Andreasen FM. Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth. Copenhagen: Munksgaard, 1994.

Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST, Croft NJ, Cebra-Thomas JA, Metzger D, Chambon P, Lyons KM, Mishina Y, Seykora JT, Crenshaw 3rd EB, Millar SE. 2004. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. Development 131:2257–2268.

Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. 2002. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. Dev Cell 2:643–653.

Anegundi RT, Tegginmani VS, Battepati P, Tavargeri A, Patil S, Trasad V, Jain G. Prevalence and characteristics of supernumerary teeth in a non-syndromic South Indian pediatric population. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2014 Jan-Mar;32(1):9-12.

Anthonappa RP, King NM, Rabie AB. Evaluation of the long-term storage stability of saliva as a source of human DNA. Clin Oral Investig. 2013 Sep;17(7):1719-25.

Anthonappa RP, King NM, Rabie AB. Prevalence of supernumerary teeth based on panoramic radiographs revisited. Pediatr Dent. 2013 May-Jun;35(3):257-61.

Anthonappa RP, Omer RS, King NM. Characteristics of 283 supernumerary teeth in southern Chinese children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 Jun;105(6):e48-54.

Ata-Ali F, Ata-Ali J, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M. Prevalence, etiology, diagnosis, treatment and complications of supernumerary teeth. J Clin Exp Dent. 2014;6(4):e414-8.

Bahadure RN, Thosar N, Jain ES, Kharabe V, Gaikwad R. Supernumerary teeth in primary dentition and early intervention: a series of case reports. Case Rep Dent. 2012;2012:614652

Batra P, Duggal R, Parkash H. Non-syndromic multiple supernumerary teeth transmitted as an autosomal dominant trait. J Oral Pathol Med 2005;34:621-5.

Beck, CR, Garcia-Perez, JL, Badge, RM, and Moran, JV. LINE-1 elements in structural variation and disease. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2011 12, 187-215.

Bei M, Kratochwil K, Maas RL. 2000. BMP4 rescues a noncell- autonomous function of Msx1 in tooth development. Development 127:4711–4718.

Bereket C, Çakır-Özkan N, Şener İ, Bulut E, Baştan Aİ. Analyses of 1100 supernumerary teeth in a nonsyndromic Turkish population: A retrospective multicenter study. Niger J Clin Pract. 2015 Nov-Dec;18(6):731-8.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. WH Freeman and Company; 2002, p. 118–19, 781–808.

Black GV. Supernumerary teeth. Dent Summary 1909;29:83-110.

Bolk L. Supernumerary teeth in the molar region in man. Dent Cosmos 1914;56:154-167.

Bolk L. The supernumerary upper incisor in man. Deutsche Monatschr P Zahn 1917;35:185.

Brook AH. A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size. Arch Oral Biol 1984;29:373-8.

Brook AH. Dental anomalies of number, form and size: their prevalence in British schoolchildren. J Int Assoc Dent Child 1974;5:37-53.

Brook AH, Jernvall J, Smith RN, Hughes TE, Townsend GC. The dentition: the outcomes of morphogenesis leading to variations of tooth number, size and shape. Aust Dent J. 2014 Jun;59 Suppl 1:131-42.

Bruning LJ, Dunlop L and Mergele ME. A report of supernumerary teeth in Houston, Texas school children. J Dent Child 1957;24:98-105.

Byrd ED. Incidence of supernumerary teeth and congenital missing teeth. J Dent Child 1943;10:84-6.

Cadenat H, Combelles R, Fabert G, Clouet M. Mesiodens and heredity. Rev Stomatol Chir Maxillofac 1977;78:341-6.

Chae SC, Yu JI, Oh GJ, Choi CS, Choi SC, Yang YS, Yun KJ. Identification of single nucleotide polymorphisms in the TNFRSF17 gene and their association with gastrointestinal disorders. Mol Cells. 2010 Jan;29(1):21-8.

Chaushu S, Becker T, Becker A. Impacted central incisors: factors affecting prognosis and treatment duration. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2015 Mar;147(3):355-62.

Chen CH, Chen HI, Liao HM, Chen YJ, Fang JS, Lee KF, Gau SS. Clinical and molecular characterization of three genomic rearrangements at chromosome 22q13.3 associated with autism spectrum disorder. Psychiatr Genet. 2016 Nov 11. [Epub ahead of print]

Chen CP, Lin SP, Su YN, Chern SR, Tsai FJ, Wu PC, Chen LF, Wang W. A 24.2-Mb deletion of 4q12 --> q21.21 characterized by array CGH in a 131/2-year-old girl with short stature, mental retardation, developmental delay, hyperopia, exotropia, enamel defects, delayed tooth eruption and delayed puberty. Genet Couns. 2011;22(3):255-61.

Conrad DF, Bird C, Blackburne B, Lindsay S, Mamanova L, Lee C, Turner DJ, Hurles ME. Mutation spectrum revealed by breakpoint sequencing of human germline CNVs. Nat Genet 2010 42, 385-391.

Cooper GC, Hausman RE. In: The Cell: A Molecular Approach. 3rd edition. Sinauer; 2004, p. 261–76, 297, 339–44.

D'Souza RN, Klein OD. Unraveling the molecular mechanisms that lead to supernumerary teeth in mice and men: current concepts and novel approaches. Cells Tissues Organs. 2007;186(1):60-9.

De Coster PJ, Malfait F, Martens LC, De Paepe A. Unusual oral findings in dermatosparaxis (Ehlers-Danlos syndrome type VIIC). J Oral Pathol Med. 2003 Oct;32(9):568-70.

De Oliveira Gomes C, Drummond SN, Jham BC, Abdo EN, Mesquita RA. A survey of 460 supernumerary teeth in Brazilian children and adolescents. Int J Paediatr Dent. 2008 Mar;18(2):98-106.

Demiriz L, Durmuşlar MC, Mısır AF. Prevalence and characteristics of supernumerary teeth: A survey on 7348 people. J Int Soc Prev Community Dent. 2015 May;5(Suppl 1):S39-43.

Demiriz L, Mısır AF, Durmuşlar MC. The Prevalence and the Characteristics of Supernumerary Teeth of Children and Young Adolescents from North-Western Region of Turkey. Br J Med Med Res 2015; 7(5): 369-377.

Du ZY, Shi MH, Ji CH, Yu Y. Serum pleiotrophin could be an early indicator for diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(4):1421-5.

Duncan, CE, Chetcuti AF, Schofield PR. Coregulation of genes in the mouse brain following treatment with clozapine, haloperidol, or olanzapine implicates altered potassium channel subunit expression in the mechanism of antipsychotic drug action. Psychiatr Genet. 2008; 18(5): p. 226–239.

Fernández Montenegro P, Valmaseda Castellón E, Berini Aytés L, Gay Escoda C. Retrospective study of 145 supernumerary teeth. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:e339-44.

Ferrés-Amat E, Maura-Solivellas I, Prats-Armengol J, Ferrés-Amat E, Mareque-Bueno J, Ferrés-Padró E. Study of the frequency, localisation and morphology of supernumerary teeth in 1960 Spanish non-syndromic paediatric patients. Eur J Paediatr Dent. 2015 Mar;16(1):19-23.

Fitzgerald J, Bateman JF. A new FACIT of the collagen family: COL21A1. FEBS Lett. 2001 Sep 14;505(2):275-80.

Flach H, Rosenbaum M, Duchniewicz M, Kim S, Zhang SL, Cahalan MD, Mittler G, Grosschedl R. Mzb1 protein regulates calcium homeostasis, antibody secretion, and integrin activation in innate-like B cells. Immunity. 2010 Nov 24;33(5):723-35.

Fraser GJ, Berkovitz BK, Graham A, Smith MM. 2006. Gene deployment for tooth replacement in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): a developmental model for evolution of the osteichthyan dentition. Evol Dev 8:446–457.

Fried K, Risling M, Tidcombe H, Gassmann M, Lillesaar C. Expression of ErbB3, ErbB4, and neuregulin-1 mRNA during tooth development. Dev Dyn. 2002 Jul;224(3):356-60.

Fu F, Xiao XI, Zhang T, Zou Q, Chen Z, Pei L, Su J, Yi W. Expression of receptor protein tyrosine phosphatase ζ is a risk factor for triple negative breast cancer relapse. Biomed Rep. 2016 Feb;4(2):167-172. Epub 2016 Jan 8.

Fujiwara N, Tabata MJ, Endoh M, Ishizeki K, Nawa T. 2005. Insulin-like growth factor-I stimulates cell proliferation in the outer layer of Hertwig's epithelial root

sheath and elongation of the tooth root in mouse molars in vitro. Cell Tissue Res 320:69–75.

Fukuda A, Wang SC, Morris JP, Folias AE, Liou A, Kim GE, Akira S, Boucher KM, Firpo MA, Mulvihill SJ, Hebrok M. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. Cancer Cell. 2011 Apr 12;19(4):441-55.

Gábris K, Fábián G, Kaán M, Rózsa N, Tarján I. Prevalence of hypodontia and hyperdontia in paedodontic and orthodontic patients in Budapest. Community Dent Health 2006;23:80-2.

Galluccio G, Castellano M, La Monaca C. Genetic basis of non-syndromic anomalies of human tooth number. Arch Oral Biol. 2012 Jul;57(7):918-30

Garvey MT, Barry HJ, Blake M. Supernumerary teeth-an overview of classification, diagnosis and management. J Can Dent Assoc 1999;65:612-6.

Gaudet P, Chisholm R, Berardini T, Dimmer E, Engel SR, Fey P, Hill DP, Howe D, Hu JC, Huntley R, Khodiyar VK, Kishore R, Li D, Lovering RC, McCarthy F, Ni L, Petri V, Siegele DA, Tweedie S, Van Auken K, Wood V, Basu S, Carbon S, Dolan M, Mungall CJ, Dolinski K, Thomas P, Ashburner M, Blake JA, Cherry JM, Lewis SE, Balakrishnan R, Christie KR, Costanzo MC, Deegan J, Diehl AD, Drabkin H, Fisk DG, Harris M, Hirschman JE, Hong EL, Ireland A, Lomax J, Nash RS, Park J, Sitnikov D, Skrzypek MS, Apweiler R, Bult C, Eppig J, Jacob H, Parkhill J, Rhee S, Ringwald M, Sternberg P, Talmud P, Twigger S, Westerfield M. The Gene Ontology's Reference Genome Project: a unified framework for functional annotation across species. PLoS Comput Biol. 2009 Jul;5(7)

Gould DB, Walter MA. Cloning, characterization, localization, and mutational screening of the human BARX1 gene. Genomics. 2000 Sep 15;68(3):336-42.

Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. Pathogenetics 2008 (1); 4.

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. 1999. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signalling. J Cell Biol 147:105–120.

Harada H, Toyono T, Toyoshima K, Yamasaki M, Itoh N, Kato S, Sekine K, Ohuchi H. 2002. FGF10 maintains stemcell compartment in developing mouse incisors. Development 129:1533–1541.

Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. 1998. The Shh signalling pathway in tooth development—defects in Gli2 and Gli3 mutants. Development 125:2803–2811.

Hau P, Apfel R, Wiese P, Tschertner I, Blesch A, Bogdahn U. Melanoma-inhibiting activity (MIA/CD-RAP) is expressed in a variety of malignant tumors of mainly neuroectodermal origin. Anticancer Res. 2002 Mar-Apr;22(2A):577-83.

Higgs PG. RNA secondary structure: physical and computational aspects.Q Rev Biophys. 2000 Aug;33(3):199-253.

Hong J, Lee DG, Park K. Retrospective analysis of the factors influencing mesiodentes eruption. Int J Paediatr Dent. 2009 Sep;19(5):343-8.

Högström A, Andersson L. Complications related to surgical removal of anterior supernumerary teeth in children. J Dent Child. 1987;54:341-3.

Hu X, Zhang S, Chen G, Lin C, Huang Z, Chen Y, Zhang Y. Expression of SHH signaling molecules in the developing human primary dentition. BMC Dev Biol. 2013 Apr 8;13:11.

Huang WH, Tsai TP, Su HL. Mesiodens in the primary dentition stage: a radiographic study. J Dent Child 1992;59:186-9.

Huang Z, Hu X, Lin C, Chen S, Huang F, Zhang Y. Genome-wide analysis of gene expression in human embryonic tooth germ. J Mol Histol. 2014 Dec;45(6):609-17.

Hunt AM. 1958. A description of the molar teeth and investing tissues of normal guinea pigs. J Dent Res 38:216–231.

Huysseune A, Sire JY. 1998. Evolution of patterns and processes in teeth and tooth-related tissues in non-mammalian vertebrates. Eur J Oral Sci 106:437–481.

Huysseune A, Thesleff I. 2004. Continuous tooth replacement: the possible involvement of epithelial stem cells. BioEssays 26:665–671.

Ingervall B. Prevalence of dental and occlusal anomalies in Swedish conscripts. Acta Odontol Scand 1974;32:83-92.

Işıl Orhan A, Özer L, Orhan K. Familial occurrence of non syndromal multiple supernumerary teeth. Angle Orthod 2006;76:891–7.

Jarvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J, Thesleff I. 2006. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. Proc Natl Acad Sci USA 103:18627–18632.

Jarvinen E, Tummers M, Thesleff I. 2009. The role of the dental lamina in mammalian tooth replacement. J Exp Zool (Mol Dev Evol) 312B:281–291.

Jernvall J, Kera¨nen SVE, Thesleff I. 2000. Evolutionary modification of development in mammalian teeth: quantifying gene expression patterns and topography. Proc Nat Acad Sci USA 97:14444–14448.

Jernvall J, Thesleff I. 2000. Reiterative signalling and patterning in mammalian tooth morphogenesis. Mech Dev 92:19–29.

Kangas AT, Evans AR, Thesleff I, Jernvall J. 2004. Nonindependence of mammalian dental characters. Nature 432:211–214.

Kassai Y, Munne P, Hotta Y, Penttila¨ E, Kavanagh K, Ohbayashi N, Takada S, Thesleff I, Jernvall J, Itoh N. 2005. Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin. Science 309:2067–2070.

Kawashima A, Nomura Y, Aoyagi Y, Asada Y. Hereditary may be one of the etiologies of supernumerary teeth. Ped Dent J 2006;16:115-7

Keranen SV, Aberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. Dev Genes Evol 1998; 208: 477–486.

Kere J, Srivastava AK, Montonen O, Zonana J, Thomas N, Ferguson B, Munoz F, Morgan D, Clarke A, Baybayan P, Chen EY, Ezer S, Saarialho-Kere U, de la Chapelle A, Schlessinger D.. X-linked inhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. Nat Genet 1996; 13:409–416.

Kettunen P, Laurikkala J, Ita¨ranta P, Vainio S, Itoh N, Thesleff I. 2000. Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. Dev Dyn 219:322–332.

Kim EJ, Lee MJ, Li L, Yoon KS, Kim KS, Jung HS. Failure of Tooth Formation Mediated by miR-135a Overexpression via BMP Signaling. J Dent Res. 2014 Jun;93(6):571-5.

Kim JM, Ren D, Reverter A, Roura E. A regulatory gene network related to the porcine umami taste receptor (TAS1R1/TAS1R3). Anim Genet. 2016 Feb;47(1):114-9.

Kim SH, Kim S, Shin Y, Lee HS, Jeon M, Kim SO, Cho SW, Ruparel NB, Song JS. Comparative Gene Expression Analysis of the Coronal Pulp and Apical Pulp Complex in Human Immature Teeth. J Endod. 2016 May;42(5):752-9.

Kim YJ, Seymen F, Koruyucu M, Kasimoglu Y, Gencay K, Shin TJ, Hyun HK, Lee ZH, Kim JW. Unexpected identification of a recurrent mutation in the DLX3 gene causing amelogenesis imperfecta. Oral Dis. 2016 May;22(4):297-302.

Klein OD, Lyons DB, Balooch G, Marshall GW, Basson MA, Peterka M, Boran T, Peterkova R, Martin GR. An FGF signaling loop sustains the generation of differentiated progeny from stem cells in mouse incisors. Development 2008; 135:377–385.

Klein, U, Casola, S, Cattoretti, G, Shen, Q, Lia, M, Mo, T, Ludwig, T, Rajewsky, K, Dalla-Favera, R. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. Nat Immunol. 2006 Jul;7(7):773-82.

Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R.. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1(/) mice. Genes Dev 2002; 16:3173–3185.

Kuraguchi M, Wang XP, Bronson RT, Rothenberg R, Ohene-Baah NY, Lund JJ, Kucherlapati M, Maas RL, Kucherlapati R.. Adenomatous polyposis coli (APC) is required for normal development of skin and thymus. PLoS Genet 2006 2:e146.

Kural Dıraz D. Çocuk istismarı ve ihmaline yönelik diş hekimlerinin farkındalık düzeyleri. Marmara Üniversitesi, Pedodonti Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2014, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. İ. Tanboğa).

Küchler EC, Costa AG, Costa Mde C, Vieira AR, Granjeiro JM. Supernumerary teeth vary depending on gender. Braz Oral Res. 2011 Jan-Feb; 25(1):76-9.

Kruglyak L ve Nickerson DA. Variation is the spice of life. Nat Genet. 2001 27; 234-236.

Lacruz RS, Smith CE, Bringas P Jr, Chen YB, Smith SM, Snead ML, Kurtz I, Hacia JG, Hubbard MJ, Paine ML. Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. J Cell Physiol. 2012 May;227(5):2264-75.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409, 860-921.

Lathi RB, Massie JA, Loring M, Demko ZP, Johnson D, Sigurjonsson S, Gemelos G, Rabinowitz M. Informatics enhanced SNP microarray analysis of 30 miscarriage samples compared to routine cytogenetics.PLoS One. 2012;7(3):e31282.

Laugel-Haushalter V, Paschaki M, Thibault-Carpentier C, Dembelé D, Dollé P, Bloch-Zupan A. Molars and incisors: show your microarray IDs. BMC Res Notes. 2013 Mar 26;6:113.

Lee HS, Lee J, Kim SO, Song JS, Lee JH, Lee SI, Jung HS, Choi BJ. Comparative gene-expression analysis of the dental follicle and periodontal ligament in humans. PLoS One. 2013 Dec 23;8(12)

Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. Cell 2007;131, 1235-1247.

Lei HH, Liu H, Ge LH. PAX6 polymorphisms in 20 Chinese children with supernumerary teeth in the maxillary incisor area. Int J Paediatr Dent. 2011 Jul;21(4):271-7.

Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. J Biol Chem. 2008; 283, 1-5.

Li BQ, Huang T, Liu L, Cai YD, Chou KC. Identification of Colorectal Cancer Related Genes with mRMR and Shortest Path in Protein-Protein Interaction Network. PLoS ONE. 2012 7(4): e33393.

Li L, Wang Y, Lin M, Yuan G, Yang G, Zheng Y, Chen Y. Augmented BMPRIA-mediated BMP signaling in cranial neural crest lineage leads to cleft palate formation and delayed tooth differentiation. PLoS One. 2013 Jun 12;8(6):e66107.

Li, X.a, Zhang, Y.a, Kang, H.a, Liu, W.a, Liu, P.a, Zhang, J.b, Harris, S.E.c, Wu, D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. J Biol Chem. 2005 May 20;280(20):19883-7.

Liang F, Qu H, Lin Q, Yang Y, Ruan X, Zhang B, Liu Y, Yu C, Zhang H, Fang X, Hao X. Molecular biomarkers screened by next-generation RNA sequencing for non-sentinel lymph node status prediction in breast cancer patients with metastatic sentinel lymph nodes. World J Surg Oncol. 2015 Aug 28;13:258.

Lim WH, Liu B, Cheng D, Hunter DJ, Zhong Z, Ramos DM, Williams BO, Sharpe PT, Bardet C, Mah SJ, Helms JA. Wnt signaling regulates pulp volume and dentin thickness. J Bone Miner Res. 2014 Apr;29(4):892-901.

Liu HP, Lin YJ, Lin WY, Wan L, Sheu JJ, Lin HJ, Tsai Y, Tsai CH, Tsai FJ. A novel genetic variant of BMP2K contributes to high myopia. J Clin Lab Anal. 2009;23(6):362-7.

Lubinsky M, Kantaputra PN. Syndromes with supernumerary teeth. Am J Med Genet A. 2016 Oct;170(10):2611-6.

Luukko K, Løes S, Kvinnsland IH, Kettunen P. Expression of ephrin-A ligands and EphA receptors in the developing mouse tooth and its supporting tissues. Cell Tissue Res. 2005 Jan;319(1):143-52.

Lv W, Wang L, Lu J, Mu J, Liu Y, Dong P. Long Noncoding RNA KIAA0125 Potentiates Cell Migration and Invasion in Gallbladder Cancer. Biomed Res Int. 2015;2015:108458.

MacFadden BJ. 2000. Cenozoic mammalian herbivores from the Americas: reconstructing ancient diets and terrestrial communities. Annu Rev Ecol Syst 31:33–59.

Malfait F, De Coster P, Hausser I, van Essen AJ, Franck P, Colige A, Nusgens B, Martens L, De Paepe A. The natural history, including orofacial features of three patients with Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type (EDS type VIIC). Am J Med Genet A. 2004 Nov 15;131(1):18-28.

McKnight DA, Suzanne Hart P, Hart TC, Hartsfield JK, Wilson A, Wright JT, Fisher LW. A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human DSPP gene. Hum Mutat. 2008 Dec;29(12):1392-404.

McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis ER, Wilson RK. A physical map of the human genome. Nature 2001; 409, 934-941.

Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, von Spiczak S, Buysse K, Baker C, Franke A, Malafosse A, Genton P, Thomas P, Gurnett CA, Schreiber S, Bassuk AG, Guipponi M Stephani U, Helbig I, Eichler EE. Genome-wide copy number variation in epilepsy:

novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. PLoS Genet. 2010 May 20;6(5)

Miletich I, Buchner G, Sharpe PT. Barx1 and evolutionary changes in feeding. J Anat. 2005 Nov;207(5):619-22.

Miletich I, Yu WY, Zhang R, Yang K, Caixeta de Andrade S, Pereira SF, Ohazama A, Mock OB, Buchner G, Sealby J, Webster Z, Zhao M, Bei M, Sharpe PT. Developmental stalling and organ-autonomous regulation of morphogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Nov 29;108(48):19270-5.

Mishra S, Whetstine JR. Different Facets of Copy Number Changes: Permanent, Transient, and Adaptive. Mol Cell Biol. 2016 Jan 11;36(7):1050-63.

Mitchell L. Supernumerary teeth. Dent Update. 1989;16:65-9.

Mitchell L, Bennett TG. Supernumerary teeth causing delayed eruption– a retrospective study. Br J Orthod 1992; 19: 41–46.

Mitsiadis TA, Caton J, De Bari C, Bluteau G. 2008. The large functional spectrum of the heparin-binding cytokines MK and HB-GAM in continuously growing organs: the rodent incisor as a model. Dev Biol 320:256–266.

Mitsiadis TA, Che´raud Y, Sharpe P, Fontaine-Pe´rus J. 2003. Development of teeth in chick embryos after mouse neural crest transplantations. Proc Natl Acad Sci USA 100:6541–6545.

Mitsiadis TA, Mucchielli ML, Raffo S, Proust JP, Koopman P, Goridis C. Expression of the transcription factors Otlx2, Barx1 and Sox9 during mouse odontogenesis. Eur J Oral Sci. 1998 Jan;106 Suppl 1:112-6.

Mittermeier RA, Tattersall I, Konstant WR, Meyers DM, Mast RB. 1994. Lemurs of Madagascar. Conservation International: Washington, DC.

Miyoshi S, Tanaka S, Kunimatsu H, Murakami Y, Fukami M, Fujisawa S. An epidemiological study of supernumerary primary teeth in Japanese children: a review of racial differences in the prevalence. Oral Dis 2000;6:99-102.

Moore KA, Lemischka IR. 2006. Stem cells and their niches. Science 311:1880–1885.

Mustonen T, Ilmonen M, Pummila M, Kangas AT, Laurikkala J, Jaatinen R, Pispa J, Gaide O, Schneider P, Thesleff I, Mikkola M. 2004. Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages. Development 131:4907–4919

Nakatomi M, Morita I, Eto K, Ota MS. 2006. Sonic hedgehog signaling is important in tooth root development. J Dent Res 85:427–431.

Nata K, Takamura T, Karasawa T, Kumagai T, Hashioka W, Tohgo A, Yonekura H, Takasawa S, Nakamura S, Okamoto H. Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing. Gene. 1997 Feb 28;186(2):285-92.

Nazif MM, Ruffalo RC, Zullo T. Impacted supernumerary teeth: a survey of 50 cases. J Am Dent Assoc 1983;106:201-4.

Ng DP, Koh D, Choo S, Chia KS. Saliva as a viable alternative source of human genomic DNA in genetic epidemiology. Clin Chim Acta. 2006 May;367(1-2):81-5.

Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. Science. 2000 Aug 11;289(5481):920-30.

Niswander JD, Sujaku C. Congenital anomalies of teeth in the Japanese children. Am J Phys Anthropol 1963;21:569-74.

Nudler E, Gottesman ME. Transcription termination and anti-termination in E. coli. Genes Cells. 2002 Aug;7(8):755-68.

Oldridge DA, Wood AC, Weichert-Leahey N, Crimmins I, Sussman R, Winter C, McDaniel LD, Diamond M, Hart LS, Zhu S, Durbin AD, Abraham BJ, Anders L, Tian L, Zhang S, Wei JS, Khan J, Bramlett K, Rahman N, Capasso M, Iolascon A, Gerhard DS, Guidry Auvil JM, Young RA, Hakonarson H, Diskin SJ, Look AT, Maris JM. Genetic predisposition to neuroblastoma mediated by a LMO1 super-enhancer polymorphism. Nature. 2015 Dec 17;528(7582):418-21

Olley RC, Xavier GM, Seppala M, Volponi AA, Geoghegan F, Sharpe PT, Cobourne MT. Expression analysis of candidate genes regulating successional tooth formation in the human embryo. Front Physiol. 2014 Nov 21;5:445.

Omer RS, Anthonappa RP, King NM. Determination of the optimum time for surgical removal of unerupted anterior supernumerary teeth. Pediatr Dent 2010;32:14-20.

Osborn JW. 1971. The ontogeny of tooth succession in Lacertia vivipara Jacquin (1787). Proc R Soc Lond B 179:261–289.

Patil S, Maheshwari S. Prevalence of impacted and supernumerary teeth in the North Indian population. J Clin Exp Dent. 2014 Apr 1;6(2):e116-20.

Peterkova´ R, Peterka M, Viriot L, Lesot H. 2002. Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. Connect Tissue Res 43:120–128.

Pippi R. Odontomas and supernumerary teeth: is there a common origin? Int J Med Sci. 2014 Nov 12;11(12):1282-97.

Pispa J, Jung HS, Jernvall J, Kettunen P, Mustonen T, Tabata MJ, Kere J, Thesleff I. 1999. Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. Dev Biol 216:521–534.

Plikus MV, Zeichner-David M, Mayer JA, Reyna J, Bringas P, Thewissen JG, Snead ML, Chai Y, Chuong CM. 2005. Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. Evol Dev 7:440–457.

Prasad MK, Geoffroy V, Vicaire S, Jost B, Dumas M, Le Gras S, Switala M, Gasse B4, Laugel-Haushalter V, Paschaki M, Leheup B, Droz D, Dalstein A, Loing A, Grollemund B, Muller-Bolla M, Lopez-Cazaux S, Minoux M, Jung S, Obry F, Vogt V, Davideau JL, Davit-Beal T13, Kaiser AS, Moog U, Richard B, Morrier JJ, Duprez JP, Odent S, Bailleul-Forestier I, Rousset MM, Merametdijan L, Toutain A, Joseph C, Giuliano F, Dahlet JC, Courval A, El Alloussi M, Laouina S, Soskin S, Guffon N, Dieux A, Doray B, Feierabend S, Ginglinger E, Fournier B, de la Dure Molla M, Alembik Y, Tardieu C, Clauss F, Berdal A, Stoetzel C, Manière MC, Dollfus H, Bloch-

Zupan A. A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement. J Med Genet. 2016 Feb;53(2):98-110.

Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, Yates KE, Lin JC, Wunderlich JR, Cronin JC, Cruz P, Rosenberg SA, Samuels Y. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. Nat Genet. 2009 Oct;41(10):1127-32.

Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML. 2007. Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction Of Shh expression. Development 134:117–125.

Raman K, O'Donnell MJ, Czlonkowska A, Duarte YC, Lopez-Jaramillo P, Peñaherrera E, Sharma M, Shoamanesh A, Skowronska M, Yusuf S, Paré G. Peripheral Blood MCEMP1 Gene Expression as a Biomarker for Stroke Prognosis. Stroke. 2016 Mar;47(3):652-8.

Ravn JJ. Aplasia, Supernumerary teeth and fused teeth in the primary dentition. An epidemiologic study. Scand J Dent Res 1971;79:1-6.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W. Global variation in copy number in the human genome. Nature 2006; 444, 444-454.

Reversade B, De Robertis EM. 2005. Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a selfregulating morphogenetic field. Cell 123:1147–1160.

Riechers A, Bosserhoff AK.Melanoma inhibitory activity in melanoma diagnostics and therapy - a small protein is looming large. Exp Dermatol. 2014 Jan;23(1):12-4.

Salazar-Ciudad I, Jernvall J. 2002. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. Proc Natl Acad Sci USA 99:8116–8120.

Sapkota GP. The TGFβ-induced phosphorylation and activation of p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by MAP3K4 and MAP3K10 but not TAK1. Open Biol. 2013 Jun 12;3(6):130067

Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T, Sharpe PT. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 25;97(9):4520-4.

Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyma M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. 2000. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in one growth and ectodermal organ formation. Nat Genet 24:391–395.

Scheiner MA, Sampson WJ. Supernumerary teeth: a review of the literature and four case reports. Aust Dent J 1997;42:160-5.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. 1995; 270(5235): p. 467–470.

Schröder HE. Orale Strukturbiologie, Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hartund Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2000:p.170.

Schulze C. Developmental abnormalities of the teeth and the jaws.In: Gorlin O, Goldman H, eds. Thoma's Oral Pathology. St. Louis, USA: Mosby, 1970:112-6.

Sedano HO, Gorlin R. Familial occurrence of mesiodens. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1969;27:360-2.

Sedano HO, Gorlin RJ. Familial occurrence of mesiodens. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1969;27:360–1.

Shaw CJ ve Lupski JR. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. Hum Genet. 2005; 116, 1-7.

Silberberg G, Darvasi A, Pinkas-Kramarski R, Navon R. The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Mar 5;141B(2):142-8.

Song JS, Hwang DH, Kim SO, Jeon M, Choi BJ, Jung HS, Moon SJ, Park W, Choi HJ. Comparative gene expression analysis of the human periodontal ligament in deciduous and permanent teeth. PLoS One. 2013 Apr 8;8(4):e61231.

Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, Zeichner-David M, Kim HJ, Cho MI, Gronostajski RM. 2003. Essential role for NFI-C/CTF transcription—replication factor in tooth root development. Mol Cell Biol 23:1075–1084.

Su Y, Fan Z, Wu X, Li Y, Wang F, Zhang C, Wang J, Du J, Wang S. Genome-wide DNA methylation profile of developing deciduous tooth germ in miniature pigs. BMC Genomics. 2016 Feb 24;17:134.

Subasioglu A, Savas S, Kucukyilmaz E, Kesim S, Yagci A, Dundar M. Genetic background of supernumerary teeth. Eur J Dent. 2015;9:153-8.

Takahashi S, Suzuki T, Nakamura-Tomizuka S, Osaki K, Sotome Y, Sagawa T, Uchiyama M. Case history and genome-wide scans for copy number variants in a family with patient having 15q11.1-q11.2 duplication and 22q11.2 deletion, and schizophrenia. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2015 Jun;168B(4):229-35.

Tan, T. Y., Aftimos, S., Worgan, L., Susman, R., Wilson, M., Ghedia, S., Kirk, E. P., Love, D., Ronan, A., Darmanian, A., Slavotinek, A., Hogue, J., Moeschler, J. B., Ozmore, J., Widmer, R., Bruno, D., Savarirayan, R., Peters, G. Phenotypic expansion and further characterisation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. J. Med. Genet. 46: 480-489, 2009. Note: Erratum: J. Med. Genet. 46: 576, 2009

Tatlı U, Evlice B, Damlar İ, Arslanoğlu Z, Altan A. Çukurova bölgesinin süpernümerer diş karakteristikleri: çok merkezli retrospektif bir çalışma. Acta Odontol Turc 2014;31(2):84-8

Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. J Cell Sci 2003; 116:1647–1648.

Tissier-Seta JP, Mucchielli ML, Mark M, Mattei MG, Goridis C, Brunet JF. Barx1, a new mouse homeodomain transcription factor expressed in cranio-facial ectomesenchyme and the stomach. Mech Dev. 1995 May;51(1):3-15.

Tomasovic A, Kurrle N, Wempe F, De-Zolt S, Scheibe S, Koli K, Serchinger M, Schnütgen F, Sürün D, Sterner-Kock A, Weissmann N, von Melchner H. Ltbp4 regulates Pdgfrβ expression via TGFβ-dependent modulation of Nrf2 transcription factor function. Matrix Biol. 2016 Sep 17. pii: S0945-053X(16)30173-1.

Trumpp A, Depew MJ, Rubenstein JL, Bishop JM, Martin GR. 1999. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. Genes Dev 13:3136–3148.

Tsai TY, Choi YS, Ma W, Pomerening JR, Tang C, Ferrell Jr. JE 2008. Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops. Science 321:126–129.

Tummers M, Thesleff I. 2003. Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. Development 130:1049–1057.

Tummers M, Thesleff I. 2008. Observations on continuously growing roots of the sloth and the K14-Eda transgenic mice indicate that epithelial stem cells can give rise to both the ameloblast and root epithelium cell lineage creating distinct tooth patterns. Evol Dev 10:187–195.

Tummers M, Thesleff I. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2009 Jun 15;312B(4):309-19.

Tuna EB, Kurklu E, Gencay K, Ak G. Clinical and radiological evaluation of inverse impaction of supernumerary teeth. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013 Jul 1;18(4):e613-8.

Tureckova J, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Peterkova R, Ruch JV. 1996. Apoptosis is involved in the disappearance of the diastemal dental primordia in mouse embryo. Int J Dev Biol 40:483–489.

Tureckova´ J, Sahlberg C, Aberg T, Ruch JV, Thesleff I, Peterkova R. 1995. Comparison of expression of the msx-1, msx-2, BMP-2 and BMP-4 genes in the mouse upper diastemal and molar tooth primordia. Int J Dev Biol 39:459–468.

Turner. Case of Supernumerary Upper Incisor Tooth. J Anat Physiol. 1877 Oct;12(Pt 1):142-3.

Uluakay M. Karışık Dişlenme Dönemindeki Hiperdonti ve Hipodontili Çocukların Modellerinde Maksiller Keser Diş Boyutlarının İncelenmesi. Marmara Üniversitesi, Çocuk Dişhekimliği Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2016, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. A. Menteş).

Umweni AA, Osunbor GE. Non-syndrome multiple supernumerary teeth in Nigerians. Odontostomatol Trop 2002;25:43–8.

Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. 1993. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. Cell 75:45–58.

Van Damme T, Colige A, Syx D, Giunta C, Lindert U, Rohrbach M, Aryani O, Alanay Y, Simsek-Kiper PÖ, Kroes HY, Devriendt K, Thiry M, Symoens S, De Paepe A, Malfait F. Expanding the clinical and mutational spectrum of the Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type. Genet Med. 2016 Jan 14. doi: 10.1038/gim.2015.188. [Epub ahead of print]

Van der Merwe AE, Steyn M. A report on the high incidence of supernumerary teeth in skeletal remains from a 19th century mining community from Kimberley, South Africa. SADJ 2009; 64:162-166.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA. The sequence of the human genome. Science 2001; 291, 1304-1351.

Ververis A, Christodoulou A, Christoforou M, Kamilari C, Lederer CW, Santama N. A novel family of katanin-like 2 protein isoforms (KATNAL2), interacting with nucleotide-binding proteins Nubp1 and Nubp2, are key regulators of different MT-based processes in mammalian cells. Cell Mol Life Sci. 2016 Jan;73(1):163-84.

Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. Hum Mol Genet. 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:R215-23.

Vissers LE, Bhatt SS, Janssen IM, Xia Z, Lalani SR, Pfundt R, Derwinska K, de Vries BB, Gilissen C, Hoischen A. Rare pathogenic microdeletions and tandem duplications are microhomology-mediated and stimulated by local genomic architecture. Hum Mol Genet. 2009; 18, 3579-3593.

Voll SL, Boot E, Butcher NJ, Cooper S, Heung T, Chow EW, Silversides CK, Bassett AS. Obesity in adults with 22q11.2 deletion syndrome. Genet Med. 2016 Aug 18. [Epub ahead of print]

Wang XP, Fan J. Molecular genetics of supernumerary tooth formation. Genesis. 2011 Apr;49(4):261-77.

Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV, Maas RL, Chuong CM, Schimmang T, Thesleff I. 2007. An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. PLoS Biol 5:e159.

Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Wankell M, Werner S, Thesleff I. 2004a. Modulation of activin/bone morphogenetic protein signalling by follistatin is required for the morphogenesis of mouse molar teeth. Dev Dyn 231:98–108.

Wang XX, Zhang J, Wei FC. Autosomal dominant inherence of multiple supernumerary teeth. Int J Oral Maxillofac Surg 2007;36:756-8.

Wilson TJ, Fuchs A, Colonna M. Cutting edge: human FcRL4 and FcRL5 are receptors for IgA and IgG. J Immunol. 2012 May 15;188(10):4741-5.

Witsenberg B, Boering G. Eruption of impacted permanent upper incisor teeth after removal of supernumerary teeth. J Oral Surg 1981; 10: 423–431.

Xiong F, Ji Z, Liu Y, Zhang Y, Hu L, Yang Q, Qiu Q, Zhao L, Chen D, Tian Z, Shang X, Zhang L, Wei X, Liu C, Yu Q, Zhang M, Cheng J, Xiong J, Li D, Wu X, Yuan H, Zhang W, Xu X. Mutation in SSUH2 Causes Autosomal-Dominant Dentin Dysplasia Type I. Hum Mutat. 2016 Sep 29.

Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I. 2003. Expression of bone morphogenetic proteins and Msx genes during root formation. J Dent Res 82:172–176.

Yasuda T, Delbono O, Wang ZM, Messi ML, Girard T, Urwyler A, Treves S, Zorzato F. JP-45/JSRP1 variants affect skeletal muscle excitation-contraction coupling by decreasing the sensitivity of the dihydropyridine receptor. Hum Mutat. 2013 Jan;34(1):184-90.

Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. Annu Rev Genomics Hum Genet 2009;10, 451-481.

Zhang Q, Murcia NS, Chittenden LR, Richards WG, Michaud EJ, Woychik RP, Yoder BK. 2003. Loss of the Tg737 protein results in skeletal patterning defects. Dev Dyn 227:78–90.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA

Sayı :B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/13000178 9
Konu :

03.01.2013

Sayın : Prof.Dr. Ali MENTEŞ

09.2012.0193 protokol nolu " Tüm genom transkript profillenmesiyle non-sendromik premaksiler artı diş olgularında yeni aday genlerin araştırılması" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr Haner DİRESKENELİ
Girişimsel olmayan Klinik
Araştırma Kurul Başkanı

TÜM GENOM TRANSKRİPT PROFİLLEMESİYLE NON-SENDROMİK PREMAKSİLER ARTI DİŞ OLGULARINDA YENİ ADAY GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Ali MENTEŞ

KONTROL GÖNÜLLÜLERİN VELİ BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalında yürütülmesi planlanan **"Tüm genom transkript profillemesiyle non-sendromik premaksiler artı diş olgularında yeni aday genlerin araştırılması"** başlıklı klinik çalışmaya çocuğunuzun gönüllü olarak katılması için aşağıdaki bilgiler değerlendirmenize sunulmaktadır. Bu çalışmaya katılmak için, karar vermeden önce bu bilgileri incelemeniz önemlidir. Yine de konuya ilişkin sorunuz olduğu takdirde lütfen doktorunuzla görüşmekten çekinmeyiniz.

Kliniğimizdeki bazı çocuğunuzun ağzının ön bölgesindeki dişler, artı diş veya oluşumlar nedeniyle süremekte veya yamuk bir şekilde çıkmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız, artı dişi bulunan ve bulunmayan çocukları karşılaştırarak tüm genomlarındaki gen transkripsiyon farklılıklarının belirlenmesi ve artı diş oluşumunda rolü olabilecek muhtemel genlerin saptanmasıdır. Ayrıca bu genlerin birbirleriyle olan etkileşimlerini inceleyeceğiz. Böylece artı dişlerin moleküler düzeyde nedenlerini saptamaya çalışacağız.

Bu çalışmanın başlangıcında çocuğunuzun gerekli ağıziçi muayene ve tetkikleri yapılacak, sorular sorularak formlara işlenecektir. Çocuğunuzun ağıziçinden **bir tahta çubuğa bağlı steril pamuk ile dişetinden epitel doku sürüntüsü alınacaktır**. Bu işlemin çocuğunuzun sağlığına herhangi bir riski bulunmamaktadır.

Eğer bu çalışmada yer almak istemiyorsanız bunu belirtmeniz yeterlidir. Çalışmaya katılmaya karar verirseniz, araştırmadan istediğiniz zaman çekilmeye hakkınız vardır. Ancak bu kararınızı doktorunuza yazılı bildirmeniz gerekmektedir. Tedavilerin yürütülmesi sırasında herhangi bir konu hakkında sorununuz olduğu takdirde lütfen doktorunuza başvurmaktan çekinmeyiniz. **Doktorunuzun adı ve soyadı "Prof. Dr. Ali Menteş" telefon numarası ise "0212-2319120 dahili 106" dır.**

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi İEGM Etik Kurulu araştırmaya katılmakla çocuklarınızın genel sağlığı konusunda bir sorunla karşılaşılabileceğini beklememektedir. Çalışmaya katılmaya karar verirseniz kimliğinizin gizli kalması koşuluyla elde edilen bilgi ve bulguların ilgili makamlara verilebileceğini ve yayınlanabileceğini önceden kabul etmiş olacaksınız.

Yukarıda araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Çocuğumun genel sağlığıyla ilgili tüm bilgileri doktorumla paylaştım. Araştırma ile ilgili herhangi bir ödeme almayacağımı biliyorum ve kabul ediyorum.

Bu koşullarda söz konusu klinik çalışmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ……..isimli **çocuğumun** katılmasını kabul ediyorum. **Üç nüsha** halinde düzenlenmiş olan bu metnin bir nüshasını aldım.

Velinin	**Anne Adı-Soyadı :**	**Baba Adı-Soyadı :**
	Adresi :	**Adresi :**
	Telefonu :	**Telefonu :**
	Tarih :	**Tarih :**
	İmzası:	**İmzası:**

Açıklamaları yapan **Dr Adı-Soyadı :**

İmzası :

TÜM GENOM TRANSKRİPT PROFİLLEMESİYLE NON-SENDROMİK PREMAKSİLER ARTI DİŞ OLGULARINDA YENİ ADAY GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Ali MENTEŞ

KONTROL GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalında yürütülmesi planlanan **"Tüm genom transkript profillemesiyle non-sendromik premaksiler artı diş olgularında yeni aday genlerin araştırılması"** başlıklı klinik çalışmaya gönüllü olarak katılman için aşağıdaki bilgiler verilmiştir. Bu çalışmaya katılmak için, karar vermeden önce bu bilgileri incelemen önemlidir. Yine de konuya ilişkin sorunuz olduğu takdirde lütfen doktorunla görüşmekten çekinme.

Kliniğimizdeki bazı çocukların dişleri, artı diş veya oluşumlar nedeniyle süreememekte veya yamuk bir şekilde çıkmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız, artı dişi bulunan ve bulunmayan çocukları karşılaştırmak ve bunun sebebini anlamaya çalışmaktır.

Bu çalışmanın başlangıcında ağzına ve dişlerine bakıp muayene edeceğiz. Ayrıca ağzının içinden **ucunda pamuk olan bir tahta çubuğu dişetine sürecez ve doku sürüntüsü alacağız**. Bunun sana hiçbir zararı yoktur.

Eğer bu çalışmada yer almak istemiyorsan bunu belirtmen yeterlidir. Çalışmaya katılmaya karar verirsen, araştırmadan istediğin zaman çekilmeye hakkın var. Ancak bu kararını doktoruna yazılı bildirmen gerekmektedir. Tedavilerin yürütülmesi sırasında herhangi bir konu hakkında sorunun olduğu takdirde lütfen doktoruna başvurmaktan çekinme. **Doktorunun adı ve soyadı "Prof. Dr. Ali Menteş" telefon numarası ise "0212-2319120 dahili 106" dır.**

Çalışmaya katılmaya karar verirsen kimliğin gizli kalması koşuluyla elde edilen bilgi ve bulguların ilgili makamlara verilebileceğini ve yayınlanabileceğini önceden kabul etmiş olacaksın.

Yukarıda araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Genel sağlığımla ilgili tüm bilgileri doktorumla paylaştım. Araştırma ile ilgili herhangi bir ödeme almayacağımı biliyorum ve kabul ediyorum. Bu koşullarda söz konusu klinik çalışmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum. **Üç nüsha** halinde düzenlenmiş olan bu metnin bir nüshasını aldım.

Hasta **Adı-Soyadı :**
Doğum Tarihi:
Adresi :
Telefonu :
Tarih :
İmzası:

Açıklamaları yapan **Dr Adı-Soyadı :**
İmzası :

TÜM GENOM TRANSKRİPT PROFİLLEMESİYLE NON-SENDROMİK PREMAKSİLER ARTI DİŞ OLGULARINDA YENİ ADAY GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Ali MENTEŞ

ARTI DİŞLİ GÖNÜLLÜLERİN VELİ BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalında yürütülmesi planlanan **"Tüm genom transkript profillemesiyle non-sendromik premaksiler artı diş olgularında yeni aday genlerin araştırılması"** başlıklı klinik çalışmaya çocuğunuzun gönüllü olarak katılması için aşağıdaki bilgiler değerlendirmenize sunulmaktadır. Bu çalışmaya katılmak için, karar vermeden önce bu bilgileri incelemeniz önemlidir. Yine de konuya ilişkin sorunuz olduğu takdirde lütfen doktorunuzla görüşmekten çekinmeyiniz.

Bildiğiniz gibi çocuğunuzun ağzının ön bölgesindeki dişler, artı diş veya oluşumlar nedeniyle süremekte veya yamuk bir şekilde çıkmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız, artı dişi bulunan ve bulunmayan çocukları karşılaştırarak tüm genomlarındaki gen transkripsiyon farklılıklarının belirlenmesi ve artı diş oluşumunda rolü olabilecek muhtemel genlerin saptanmasıdır. Ayrıca bu genlerin birbirleriyle olan etkileşimlerini inceleyeceğiz. Böylece çocuğunuzda gördüğümüz artı dişlerin moleküler düzeyde nedenlerini saptamaya çalışacağız.

Bu çalışmanın başlangıcında çocuğunuzun gerekli ağıziçi muayene ve tetkikleri yapılacak, sorular sorularak formlara işlenecektir. Çocuğunuzun artı dişleri alınmamış ise bunlar alındıktan sonra tarafımızdan saklanacak ayrıca ağızıçinden **bir tahta çubuğa bağlı steril pamuk ile dişetinden epitel doku sürüntüsü alınacaktır**. Bu işlemin çocuğunuzun sağlığına herhangi bir riski bulunmamaktadır. Çocuğunuzun bu konudaki tüm tedavileri tarafımızdan gerçekleştirilecektir.

Eğer bu çalışmada yer almak istemiyorsanız bunu belirtmeniz yeterlidir. Çalışmaya katılmaya karar verirseniz, araştırmadan istediğiniz zaman çekilmeye hakkınız vardır. Ancak bu kararınızı doktorunuza yazılı bildirmeniz gerekmektedir. Tedavilerin yürütülmesi sırasında herhangi bir konu hakkında sorununuz olduğu takdirde lütfen doktorunuza başvurmaktan çekinmeyiniz. **Doktorunuzun adı ve soyadı "Prof. Dr. Ali Menteş" telefon numarası ise "0212-2319120 dahili 106" dır.**

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi İEGM Etik Kurulu araştırmaya katılmakla çocuklarınızın genel sağlığı konusunda bir sorunla karşılaşılabileceğini beklememektedir. Çalışmaya katılmaya karar verirseniz kimliğinizin gizli kalması koşuluyla elde edilen bilgi ve bulguların ilgili makamlara verilebileceğini ve yayınlanabileceğini önceden kabul etmiş olacaksınız.

Yukarıda araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Çocuğumun genel sağlığıyla ilgili tüm bilgileri doktorumla paylaştım. Araştırma ile ilgili herhangi bir ödeme almayacağımı biliyorum ve kabul ediyorum. Bu koşullarda söz konusu klinik çalışmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ……..isimli **çocuğumun** katılmasını kabul ediyorum. **Üç nüsha** halinde düzenlenmiş olan bu metnin bir nüshasını aldım.

Velinin	**Anne Adı-Soyadı :**	**Baba Adı-Soyadı :**
	Adresi :	**Adresi :**
	Telefonu :	**Telefonu :**
	Tarih :	**Tarih :**
	İmzası:	**İmzası:**

Açıklamaları yapan **Dr Adı-Soyadı :**

İmzası :

TÜM GENOM TRANSKRİPT PROFİLLEMESİYLE NON-SENDROMİK PREMAKSİLER ARTI DİŞ OLGULARINDA YENİ ADAY GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Ali MENTEŞ

ARTI DİŞLİ GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalında yürütülmesi planlanan **"Tüm genom transkript profillemesiyle non-sendromik premaksiler artı diş olgularında yeni aday genlerin araştırılması"** başlıklı klinik çalışmaya senin gönüllü olarak katılman için aşağıda bilgiler sunulmuştur. Bu çalışmaya katılmak için, karar vermeden önce bu bilgileri incelemen önemlidir. Yine de konuya ilişkin sorun olduğu takdirde lütfen doktorunla görüşmekten çekinme.

Bildiğin gibi ağzındaki bazı dişler, artı diş veya oluşumlar nedeniyle süremekte veya yamuk bir şekilde çıkmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız, artı dişi bulunan ve bulunmayan çocukları karşılaştırmak ve bunun sebebini anlamaya çalışmaktır.

Bu çalışmanın başlangıcında ağzına ve dişlerine bakıp muayene edeceğiz. Eğer artı dişlerin alınmamış ise bunlar alındıktan sonra saklayacağız. Ayrıca ağzının içinden **ucunda pamuk olan bir tahta çubuğu dişetine sürecez ve doku sürüntüsü alacağız.** Bunun sana hiçbir zararı yoktur.

Eğer bu çalışmada yer almak istemiyorsan bunu belirtmen yeterlidir. Çalışmaya katılmaya karar verirsen, araştırmadan istediğin zaman çekilmeye hakkın var. Ancak bu kararını doktoruna yazılı bildirmen gerekmektedir. Tedavilerin yürütülmesi sırasında herhangi bir konu hakkında sorunun olduğu takdirde lütfen doktoruna başvurmaktan çekinme. **Doktorunun adı ve soyadı "Prof. Dr. Ali Menteş" telefon numarası ise "0212-2319120 dahili 106" dır.**

Çalışmaya katılmaya karar verirsen kimliğin gizli kalması koşuluyla elde edilen bilgi ve bulguların ilgili makamlara verilebileceğini ve yayınlanabileceğini önceden kabul etmiş olacaksın.

Yukarıda araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Genel sağlığımla ilgili tüm bilgileri doktorumla paylaştım. Araştırma ile ilgili herhangi bir ödeme almayacağımı biliyorum ve kabul ediyorum. Bu koşullarda söz konusu klinik çalışmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum. **Üç nüsha** halinde düzenlenmiş olan bu metnin bir nüshasını aldım.

Hasta **Adı-Soyadı :**

Doğum Tarihi:

Adresi :

Telefonu :

Tarih :

İmzası:

Açıklamaları yapan **Dr Adı-Soyadı :**

İmzası :

ÖZGEÇMİŞ

Adı	BARHAN	**Soyadı**	PEKEL
Doğum Yeri	İSTANBUL	**Doğum Tarihi**	1983
Uyruğu	T.C.	**Tel**	
E-mail	barhan@pekel.info		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Yeditepe Üniversitesi	2008
Lisans	Yeditepe Üniversitesi	2008
Lise	Saint-Benoit Fransız Lisesi	2002

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
Dişhekimi	Özel Klinik	2008 -

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İnglizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Fransızca	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	74	73	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.