

**DR. FIRDEVS DİNÇSOY**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**2015**

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**LİPOİD PROTEİNOZİS OLGULARINDA  
GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. FİRDEVS DİNÇSOY  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. BİRSEN KARAMAN**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İSTANBUL-2015**

**TEZ DEĞERLENDİRME TUTANAĞI**

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri, Tıbbi Genetik Anabilim Dalında gerekli uzmanlık süresini ve rotasyonlarını tamamlayan uzmanlık öğrencisi ;

**Dr. Firdevs DİNÇSOY'un**

“Lipoid Proteinozis Olgularında Genotip Fenotip İlişkisinin Araştırılması” konulu tezi 21/08/2015 tarihinde jürimiz tarafından değerlendirilmiş ve “ Bilime katkı sağlayan orjinal bir çalışma olduğu, tez yazım kurallarına uygun yazıldığı ve aday tarafından başarılı bir şekilde yazıldığı ve aday tarafından başarılı bir şekilde savunulduğu ” için **başarılı** bulunmuştur.

Uzmanlık Eğitimi Bitirme Sınavına girmesi uygun görülmüş olup, bu tutanak düzenlenerek imza altına alınmıştır. 21.08.2015

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Seher BAŞARAN

Üye

Prof. Dr. Hülya KAYSERİLİ

Üye

Doç. Dr. Birsen KARAMAN

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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.

**Firdevs DİNÇSOY**

III

**İTHAF**

*Sevgili AİLEME;*

## TEŞEKKÜR

Çalışma disiplinini örnek aldığım, hafızasına hayran olduğum değerli hocam sayın Prof. Dr. Hülya KAYSERİLİ KARABEY'e,

Engin bilgi ve tecrübesinden yararlandığım hocam sayın Prof. Dr. Seher BAŞARAN'a

Bilgi ve desteğiyle hep yanımda olan, sevgili danışman hocam sayın Doç. Dr. Birsen KARAMAN'a,

Anlayışlı, yol gösterici, her zaman desteğini hissettiğim sevgili hocam sayın Prof. Dr. Oya UYGUNER'e,

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın Prof. Dr. Şükrü PALANDÜZ, Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK ve Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE'ye,

Olgularını bölümümüze ileri incelemeler ve tez kapsamında değerlendirilmesi için gönderen sayın Prof. Dr. Can BAYKAL başta olmak üzere, Prof. Dr. Nesimi BÜYÜKBABANI, Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ, Doç. Dr. Bülent KARA, Uzm. Dr. Bülent UYANIK, Uzm. Dr. Asuman GEDİKBAŞI'na,

Berber çalışma fırsatı yakaladığım Uzm. Dr Umut ALTUNOĞLU'na,

Asistanlık eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen ve bana destek olan tüm asistan ve biyolog arkadaşlarıma ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezime katılmayı kabul eden tüm ailelere,

Tezimin her aşamasında yanımda olan ve bana destek veren sevgili nişanlıma,

Beni bugünlere getiren, karamsarlığa düştüğüm her an yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim...

[Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 52427]

## İÇİNDEKİLER

BEYAN .....	II
İTHAF .....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TABLolar LİSTESİ .....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	XI
ÖZET.....	1
ABSTRACT .....	2
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
II. GENEL BİLGİLER.....	5
A. LİPOİD PROTEİNOZİS .....	5
1. KLİNİK BULGULAR.....	5
a. LP: Deri ve mukoza bulguları.....	5
b. LP: Nöropsikiyatrik bulgular.....	7
c. LP: Histopatolojik ve Biyokimyasal Anomaliler.....	9
2. MOLEKÜLER TEMELİ.....	10
a. Ekstraselüler Matriks Protein 1 (ECM1) .....	10
b. <i>ECM1</i> Geninin Tanımlanması .....	12
c. <i>ECM1</i> : Gen Yapısı ve Ekspresyonu .....	12
3. ECM1 İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR.....	14
III. GEREÇ VE YÖNTEM .....	15
A. ÇALIŞMA GRUBU .....	15
B. YÖNTEMLER.....	15
1. KLİNİK DEĞERLENDİRME .....	15
2. MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....	15
a. DNA Eldesi.....	15
b. DNA Ölçümleri .....	16
c. DNA'nın Saflaştırılması .....	16
d. Primer Tasarlanması .....	16
e. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	17

f. PZR Saflaştırması.....	17
g. Dizi PZR Reaksiyonu .....	17
h. Dizi PZR Ürününün Saflaştırılması.....	18
ı. Kapiler Elektroferez Cihazına Yükleme .....	18
i. Elektroferogram Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	19
IV. BULGULAR.....	20
1. Aile LP01 .....	20
a. Aile Öyküsü.....	20
b. Fizik muayene bulguları .....	21
c. Moleküler analizsonuçları .....	22
2. Aile LP02 .....	23
a. Aile Öyküsü.....	23
b. Fizik Muayene Bulguları.....	25
c. Moleküler AnalizSonuçları.....	25
3. Aile LP03 .....	26
a. Aile Öyküsü.....	26
b. Fizik Muayene Bulguları.....	28
c. Moleküler AnalizSonuçları.....	29
4. Aile LP04 .....	30
a. Aile Öyküsü.....	30
b. Fizik Muayene Bulguları.....	31
c. Moleküler Analiz Sonuçları.....	31
5. Aile LP05 .....	32
a. Aile Öyküsü.....	32
b. Fizik Muayene Bulguları.....	34
c. Moleküler AnalizSonuçları.....	34
6. Aile LP06 .....	36
a. Aile Öyküsü.....	36
b. Fizik Muayene Bulguları.....	39
c. Moleküler AnalizSonuçları.....	40
7. Aile LP07 .....	41
a. Aile Öyküsü.....	41
b. Fizik Muayene Bulguları.....	42

## VII

c. Moleküler Analiz Sonuçları.....	43
8. Aile LP08 .....	49
a. Aile Öyküsü.....	49
b. Fizik Muayene Bulguları.....	50
c. Moleküler Analiz Sonuçları.....	51
9. Aile LP09 .....	52
a. Aile Öyküsü.....	52
b. Fizik Muayene Bulguları.....	53
c. Moleküler Analiz Sonuçları.....	53
10. Aile LP10 .....	54
a. Aile Öyküsü.....	54
b. Fizik Muayene Bulguları.....	56
c. Moleküler Analiz Sonuçları.....	56
V. SONUÇ .....	58
VI. TARTIŞMA .....	60
VI. KAYNAKLAR .....	66
VII. MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAMFORMU .	73
VIII. EKLER .....	76
A. <i>ECMI</i> geninin genomik DNA primerleri .....	76
B. LP05 ailesinin STR analizi .....	77
IX. ETİK KURUL KARARI .....	78
X. ÖZGEÇMİŞ.....	81

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 1. Olguların klinik bulguları ve moleküler analiz sonuçlarının özeti .....	59
Tablo 2. <i>ECMI</i> geninin genomik DNA primerleri .....	76
Tablo 3. LP05 ailesinin STR analizi .....	77

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Lipoid proteinozisin klinik bulguları .....	6
Şekil 2. Limbik sistem.....	8
Şekil 3. LP tanılı olgunun BT görüntüsü.....	9
Şekil 4. LP'li olgunun alt dudak mukoza biyopsisi .....	9
Şekil 5. Dermal-epidermal bileşkede ECM1'e bağlanan moleküllerin şematik görünümü.....	11
Şekil 6. ECM1 proteininin üç boyutlu yapısı .....	12
Şekil 7. <i>ECM1</i> geninin 1. kromozomdaki lokalizasyonu.....	13
Şekil 8. <i>ECM1</i> genini kodlayan transkript varyantları.....	13
Şekil 9. LP01'in aile ağacı .....	20
Şekil 10. Aile LP01'deki etkilenmiş olgu .....	22
Şekil 11. Aile LP01'deki etkilenmiş olgunun <i>ECM1</i> elektroferogramı.....	23
Şekil 12. LP02'nin aile ağacı .....	24
Şekil 13. Aile LP02'deki etkilenmiş olgu .....	25
Şekil 14. Aile LP02'de etkilenmiş olgunun <i>ECM1</i> elektroferogramı .....	26
Şekil 15. LP03'ün aile ağacı .....	27
Şekil 16. Aile LP03'deki etkilenmiş olgu .....	29
Şekil 17. Aile LP03'de etkilenmiş olgunun <i>ECM1</i> geni parsiyel elektroferogramı .....	29
Şekil 18. LP04'ün aile ağacı. ....	30
Şekil 19. Aile LP04'deki etkilenmiş olgu .....	31
Şekil 20. Aile LP04'de etkilenmiş olgunun <i>ECM1</i> geni parsiyel elektroferogramı .....	32
Şekil 21. Aile LP05'in aile ağacı .....	33
Şekil 22. Aile LP05'de etkilenmiş olgu .....	34
Şekil 23. Aile LP05'de etkilenmiş olgunun <i>ECM1</i> geni parsiyel elektroferogramları .....	35
Şekil 24. LP06'un aile ağacı .....	36
Şekil 25. Olgu (IV,10)'un kranial BT görüntülemesi .....	38
Şekil 26. Aile LP06'da etkilenmiş olgular .....	39
Şekil 27. Aile LP06'da olguların <i>ECM1</i> geni parsiyel elektroferogramı.....	40
Şekil 28. LP07'nin aile ağacı. ....	41
Şekil 29. Aile LP07'de etkilenmiş olgular .....	43
Şekil 30. Aile LP07'de F3-1/R5 primerleri kullanılarak yapılan PCR görüntüleri .....	44
Şekil 31. F6/R6 primer çifti ile elde edilen PCR görüntüsü.....	45

Şekil 32. <i>ECM1</i> geni ve array-CGH problemleri .....	46
Şekil 33. V:7 ve IV:10 örneklerinin F3/R5 amplikonları.....	46
Şekil 34. IV:10, V:7 örneklerinde F6/R6 ve F3/R5 amplikonlarının elektroferogram .....	47
Şekil 35. V:7'nin F3/R5 amplikonunda F6 dizi reaksiyonu ham ve analiz edilmiş.....	48
Şekil 36. LP08'in aile ağacı .....	49
Şekil 37. Aile LP08'deki etkilenmiş olgu .....	50
Şekil 38. Aile LP08'de <i>ECM1</i> geni parsiyel elektroferogramları.....	51
Şekil 39. LP09'un aile ağacı .....	52
Şekil 40. Aile LP09'da <i>ECM1</i> parsiyel elektroferogram görüntüsü .....	54
Şekil 41. LP10'un aile ağacı .....	55
Şekil 42. Aile LP10'da etkilenmiş olgu .....	56
Şekil 43. Aile LP10 <i>ECM1</i> geni parsiyel elektroferogramı .....	57
Şekil 44. Olgularımızda saptanan mutasyonların <i>ECM1</i> genindeki lokalizasyonları.....	62
Şekil 45. <i>ECM1</i> proteininin domainleri .....	62
Şekil 46. Olgularımızda saptanan mutasyonların Türkiye'de il bazında dağılımı.....	63

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

Aa	: aminoasit
aCGH	: <i>Array comparative genomic hybridisation</i> (dizin karşılaştırmalı genomik hibridizasyon)
Bç	: baz çifti
BÇ	: Baş çevresi
BT	: Bilgisayarlı tomografi
Cm	: santimetre
CNV	: <i>Copy-number variation</i> (kopya sayı değişkenliği)
CSA	: <i>Chondroitin sulfate A</i>
Dk	: dakika
DM	: Diabetes Mellitus
dH <sub>2</sub> O	: Distile su
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
E	: Erkek
ECM1	: Ekstaselüler Matriks Protein 1
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asid
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
EEG	: Elektroensefalografi
EKO	: Ekokardiyografi
EMR	: Erken membran rüptürü
FN	: Fibronektin
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
GH	: Gebelik haftası
HGMD	: İnsan Genomu Mutasyon Veri Bankası (Human Gene Mutation Database)
HA	: Hiyalüronik asit
IVS	: İntron (Intervening Sequence)
K	: Dişi
KBB	: Kulak burun boğaz
kDa	: kiloDalton
Kg	: kilogram
K <sub>3</sub> EDTA	: Tripotasyum etilendiamin tetraasetik asit

## XII

kV	: kilovolt
LP	: Lipoid Proteinozis
LS	: Liken sklerozus
LN	: Laminin
mm	: milimetre
MR	: Manyetik rezonans
MSS	: Merkezi sinir sistemi
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz-9
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyon klorür
ng/μl	: nanogram/mikrolitre
NSD	: Normal spontan doğum
NCBI	: <i>The National Center for Biotechnology Information</i>
NH <sub>2</sub>	: Amino
OR	: Otozomal resesif
P	: persantil
PAS	: Periyodik asit –Schiff
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PolyPhen-2	: <i>Prediction of functional effects of human ns SNPs</i>
RNA	: Ribonükleik asit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RPM	: Santrifüjün dakikadaki dönüş sayısı ( <i>Round per minute</i> )
Sn	: saniye
SNP	: Tek nükleotidlik polimorfizm ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
STR	: <i>Short tandem repeat analysis</i>
TE	: Tris-EDTA
Tm	: Bağlanma ısısı ( <i>Melting temperature</i> )
UCSC	: University of California, Santa Cruz Genome Browser
U.V.	: Ultraviyole
USG	: Ultrasonografi
UTR	: <i>Untranslated Region</i> (translasyona uğramayan transkript bölgesi)

## ÖZET

### LİPOİD PROTEİNOZİS OLGULARINDA GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Lipoid proteinozis (LP), deri, müköz membranlar ve iç organlarda hiyalin birikimi ile karakterize, otozomal resesif kalıtmımlı nadir görülen bir sendromdur. Yenidoğan döneminde ilk olarak ses kısıklığı dikkat çeker. Kirpik diplerine dizilmiş papüller, akneiform skarlar, balmumsu papül ve nodüller gibi çeşitli deri belirtileri çocukluk döneminde ortaya çıkar. Olguların bir kısmında temporal lob, amigdala, hipokampusta kalsifikasyon ve konvülsiyon, absans benzeri dalma, hafıza kaybı gibi nörolojik, problem çözme ve planlama gibi yönetsel fonksiyonlarda bozulma, agresif davranış, paranoya, halüsinasyon, korku kaybı gibi nöropsikiyatrik bulgular görülmektedir. Histolojik incelemede, dermal-epidermal bileşkede, damar ve adneksiyal epiteli çevreleyen bazal membranda hiyalin (glikoprotein) birikimi görülür. Hastalıkla ilişkisi tanımlanmış tek gen 1q21.2’de lokalize *ECMI* (NM\_022664) geni olup ekstrasellüler bir matriks proteinini (NP\_073155) kodlamaktadır. 10 ekzonu olan bu transkriptte mutasyonlar genelde ekzon 6 ve ekzon 7’de saptanmaktadır. Ekzon 7 dışındaki mutasyonların daha ağır bir fenotip (mukokutanöz LP) ile ilişkili olduğu düşünülmüş ancak daha sonra böyle bir ilişkili olmadığı bildirmiştir. Nörolojik bulgularla özgün bir mutasyon ilişkisi gösterilememiştir. Genotip-fenotip ilişkisinin araştırılması, etkilenmiş olgulara ve prenatal tanı isteyen ailelere özgün genetik danışma verilebilmesi açısından önemlidir ve Türkiye’de LP’de bu ilişkiyi araştıran bir çalışma bildiğimiz kadarıyla henüz yayınlanmamıştır.

Bu çalışmada, LP tanımlı 10 aileden 15 olgu, aile ağacı, klinik/radyolojik incelemeler, ve *ECMI* geninde moleküler analizler ile değerlendirildi. Tüm olgularda cilt ve mukoza bulguları mevcuttu. 15 olgunun 5’inde nörolojik bulgular ve bunların 4’ünde nöropsikiyatrik bulgular da olduğu belirlendi. Olgularda saptanan sekiz mutasyondan üçü (c.709-2A>G, c.1305-2A ve c.1411\_1412insAT) daha önce literatürde tanımlanmamış mutasyonlardı. Aynı mutasyonu taşıyan olgularda fenotiplerin farklı olduğu görüldü ve mutasyonun tipi veya lokalizasyonu ile fenotip arasında bir ilişki kurulamadı.

Dinçsoy, Firdevs (2015). Lipoid proteinozis olgularında genotip-fenotip ilişkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD Uzmanlık Tezi

Anahtar Kelimeler: lipoid proteinozis, *ECMI*, boğuk ses, cilt

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:52427

**ABSTRACT**  
**GENOTYPE PHENOTYPE CORRELATION**  
**IN LIPOID PROTEINOSIS**

Lipoid proteinosis (LP) is a rare, autosomal recessive disorder typified by generalized thickening of skin, mucosae, and certain viscera. The disorder usually presents in early infancy with hoarseness. Skin lesions like beaded eyelid papules, acneiform scars, wavy, yellow papul and nodules usually develop during the first few years of life. In some cases neurologic abnormalities such as calcification in the temporal lobes or hippocampi-amigdala complex and epilepsy and neuropsychiatric abnormalities such as memory impairment, executive dysfunction, aggressive behavior, paranoia, hallucination and absence of fear are observed. Histologically, there is a widespread deposition of hyaline (glycoprotein) material and basement membran thickening at the dermal-epidermal junction, surrounding blood vessels and adnexal epitelia. *ECM1* (NM\_022664), located at 1q21.2, encoding extracellular matrix protein (NP\_073155) is the only gene known to be associated with LP, that have 10 exons and mutations frequently diagnosed in exon 6 and 7. Some reports concluded that, mutations outside exon 7 are usually associated with a slightly more severe phenotype (mucocutaneous LP) while some others do not support this anticipation. There is no specific genotype-phenotype correlation established for neurologic features. Further research on the genotype-phenotype correlation in LP is an important issue since genetic consultation is to be offered to the affecteds and families for reproductive options. To our knowledge, there is no study of genotype-phenotype correlation in LP cases from Turkey, as of yet.

In this study, we here report 15 affecteds with LP from 10 unrelated Turkish families along with clinical/radiological findings, family data and molecular analysis results to establish genotype-phenotype correlation. All affecteds have skin and mucosae lesions, in five out of 15 affecteds neurological findings and in four neuropsychiatric findings were present. We identified three novel *ECM1* mutations (IVS6-2A>G; c.1305-2A; c.1411\_1412insAT). Inter and intra- familial clinical variability was observed among the cases even carrying the very same mutation. No correlation could be established between the genotype and the phenotype in our series of LP patients.

Dinçsoy, Firdevs (2015). Genotype phenotype correlation in lipoid proteinosis. Istanbul University, Istanbul Medical Faculty Medical Genetics Department. Istanbul. 2015.

Key words: lipoid proteinosis, *ECM1*, hoarseness, skin

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 52427

## I. GİRİŞ VE AMAÇ

Lipoid proteinozis (LP), deri, müköz membranlar ve iç organlarda hiyalin birikimi ile karakterize, otozomal çekinik kalıtılan, nadir bir genodermatozdur (1-3). LP, histolojik olarak periyodik asit-Schiff (PAS)-pozitif fakat diyastaza dirençli, dermal-epidermal bileşkede, damar ve adneksiyal epiteli çevreleyen bazal membranda kalınlaşma ve dermisde hiyalin birikimi ile karakterizedir (3). Vokal kordlardaki hiyalin birikimi boğuk sese, cilttekiler ise balmumsu, sarı papül ve nodüllere, mekanik sürtünmeye maruz kalan eller, dirsekler, dizler, kalçalar ve aksillalarda hiperkeratozise, verrüköz lezyonlara ve ciltte kalınlaşmayaneden olur (3). Olguların bir kısmında temporal lob veya hipokampus-amigdala kompleksinde kalsifikasyon, epilepsi ve hafıza kaybı, yönetsel fonksiyonlarda bozulma, agresif davranış, paranoya, halüsinasyon, korku kaybı gibi nöropsikiyatrik bulgular görülmektedir (4). LP'li tüm olgularda kraniyal görüntüleme yapılmadığı için intrakranial kalsifikasyon insidansı bilinmemektedir. Hipokampus ve amigdalayıda içeren temporal lob kalsifikasyonları genellikle bilateral ve simetriktir (5). LP olgularının %25'inde görülen epilepsinin beyinde kalsifikasyon varlığı ya da yokluğu ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (6). LP, üst solunum yolunda hiyalin birikimine enfeksiyon eklenmesiyle solunum güçlüğü gelişerek kaybedilen olgular dışında, yaşam süresini etkileyen bir sendrom değildir (2). Sendromla ilişkilendirilen tek gen, ekstraselüler matriks protein 1'i kodlayan *ECM1* genidir (3). Bu genin kodladığı ECM1 proteini spesifik bağlanma bölgeleri ile dermal-epidermal bileşkede farklı hemidesmozom ve ekstraselüler matriks moleküllerine bağlanmaktadır (7). *ECM1* geni, 10 ekzon içerir ve mutasyonlar çoğunlukla ekzon 6 ve ekzon 7'de saptanmaktadır (6). Bu gende ekzon 7 dışındaki mutasyonların daha ağır mukokutanöz LP fenotipine neden olduğunu bildirilmiş ise de bu görüşü desteklemeyen yayınlar da mevcuttur (3,6). LP'li tüm olgularda beyin görüntülemesi yapılmadığı için herhangi bir *ECM1* mutasyonu ile serebral kalsifikasyon arasında ilişki de kesinlik kazanmamıştır (6). Nörolojik, nöropsikiyatrik bulguların da özgün bir genotip ile ilişkili olduğu gösterilmemiştir (8). Özetle *ECM1* mutasyonlarının tipi ve lokasyonu, olguların mukokutanöz bulgularının, nörolojik ve nöropsikiyatrik bulgularının ağırlığı açısından herhangi bir ilişki gözlenmemiştir (8). *ECM1* geninde aynı mutasyonu taşıyan olgularda, klinik bulguların zamanla ortaya çıkması ve bireylerin farklı yaşlarda olması nedeniyle değerlendirmenin zor olduğu, intrafamilial varyabilitenin gözleendiği

bildirilmiştir (8). Günümüze kadar 300'den fazla olgu yayınlanmıştır, Türkiye gibi akraba evliliğinin sık olduğu toplumlarda daha sık görülmesi beklenmektedir.

Bu çalışma ile LP tanılı 10 bağımsız aileden 15 olguda olası genotip-fenotip ilişkisi varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamına alınan aileler, klinik, radyolojik bulgular, derinin histopatolojik incelemesi, aile ağacı ve moleküler çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Bu sendromdan etkilenmiş bireylerde, mukokutanöz bulguların ağırlığı ve nörolojik, nöropsikiyatrik bulguların varlığı değişkenlik gösterdiğinden, ailelere bu sendroma yönelik özgün genetik danışma vermek zordur. LP'ye neden olan mutasyonun bilindiği taşıyıcı çiftlerin prenatal tanı istemesi durumunda, fetusun sendromdan etkilendiği saptansa dahi, genotip-fenotip ilişkisi kurulamadığında, doğacak bebeğin fenotipi hakkında net bir bilgi vermek mümkün olamayacaktır. Bilgilerimize göre ülkemizde daha önce LP olgularında moleküler çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma kapsamında kendi olgu grubumuzdaki mutasyonları saptamayı, olası yeni mutasyonları tanımlamayı ve genotip-fenotip ilişkisi varlığını araştırmayı, hücre, protein veya gen düzeyinde ilişkilerin ortaya çıkarılması ile tedavi metotlarının geliştirilmesine katkı sağlamayı ve böylece literatüre katkı sağlamayı amaçladık.

## II. GENEL BİLGİLER

### A. LIPOİD PROTEİNOZİS

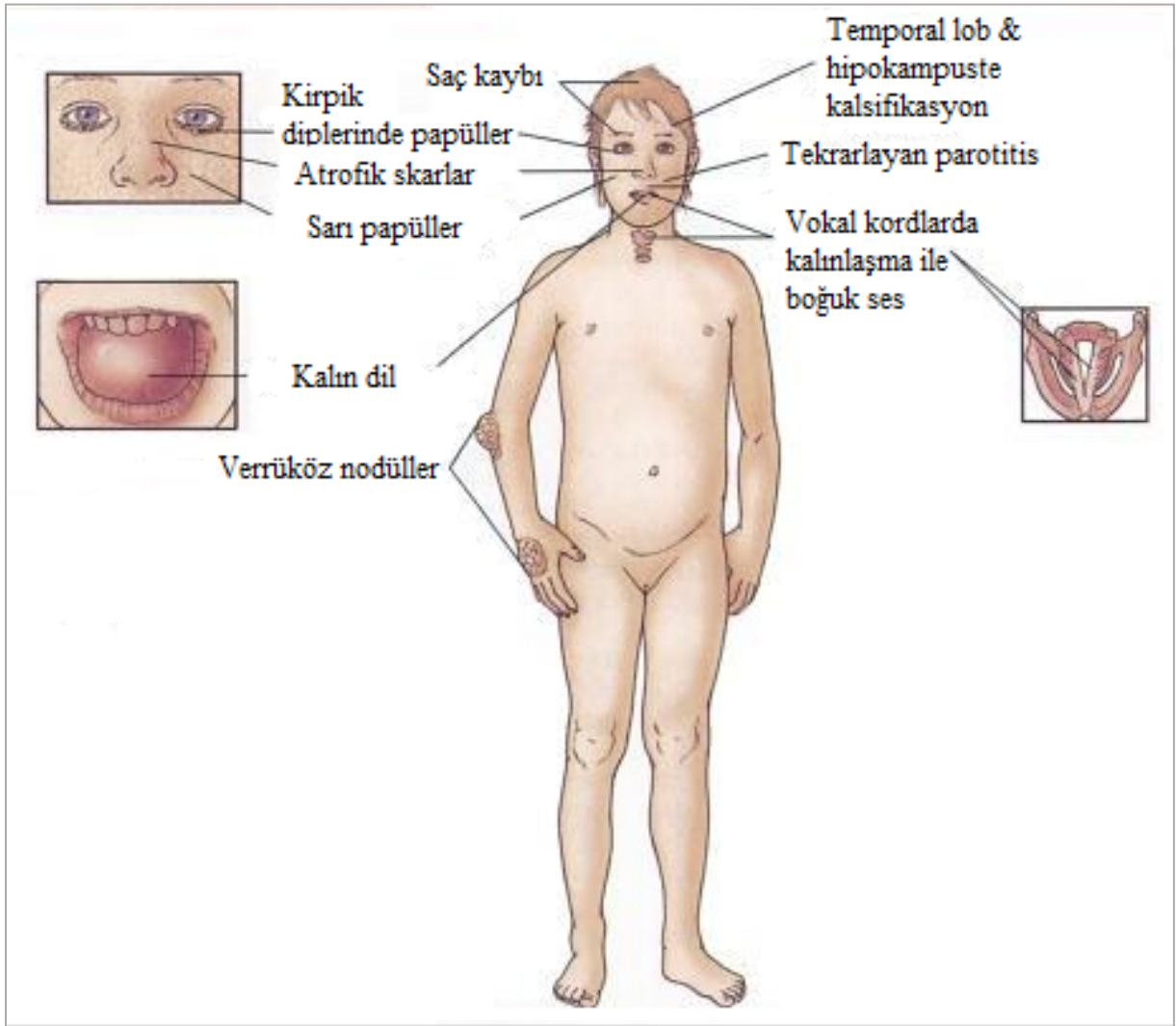
LP, ilk kez 1929'da Avusturyalı bir dermatolog olan Erich Urbach ile KBB uzmanı olan Camillo Wiethe tarafından 'lipoidosis cutis and mucosa' olarak tanımlanmıştır (1). Erken çocukluk döneminde boğuk ses ve bül gibi cilt lezyonları ile seyreden, otozomal çekinik kalıtılan bir sendromdur. Daha sonra, cilt ve muköz membranlarda infiltrasyon ve kalınlaşma bildirilmiştir (2). Histolojik olarak çeşitli dokularda anormal lipid ve protein birikiminin gösterilmesiyle 1930'ların sonlarında Urbach, sendromun adını 'lipoid proteinosis cutis et mucosae' olarak değiştirmiştir. Cilt biyopsi bulgularına göre 'lipid proteinosis', 'lipoglycoproteinosis' veya dermisin cam benzeri (hiyalin) görünümü nedeniyle 'hyalinosis cutis et mucosae' olarak da adlandırılmıştır (2,9). Bazal membranda biriken materyalin hiyalin (glikoprotein) olduğu anlaşılmış olmasına rağmen, sendromun ismi Lipoid Proteinozis olarak kalmıştır.

### 1. KLİNİK BULGULAR

#### a. LP: Deri ve mukoza bulguları

Lipoid proteinozisin genellikle en erken fark edilen bulgusu boğuk sestir (3). Vokal kordlarda infiltrasyon sonucu oluşan boğuk ses, doğumdan hemen sonra veya yaşamın ilk yılında görülür. Bu bulgu, nadiren ilk birkaç yıl belirgin olmayabilir. Cilt lezyonları ise yaşamın ilk birkaç yılında ortaya çıkar ve zamanla belirginleşir. Sendromun en karakteristik bulgusu, kirpik diplerinde dizilmiş papüller "moniliazis blefarozis" olmasına rağmen, bazı olgularda belirgin olmayabilir. Nadiren, üveit, konjonktiva, kornea, trabeküla ve Bruch membranında hiyalin birikimi gözlenebilir (10). Cilt bulguları, ciltte kalınlaşma, balmumsu sarı papül ve nodüller, mekanik sürtünmeye maruz kalan eller, dirsekler, dizler, kalçalar ve aksillada hiperkeratozistir. Ciltteki infiltrasyon verrüköz lezyonlara neden olabilir. Olguların cildi çocuklukta küçük travma veya sürtünme ile kolayca zedelenabilir ve zedelenme, bül ve skar oluşumuna yol açar. Olguların özellikle yüz ve ekstremitelerinde çiçek hastalığından kalma izler gibi (pock-benzeri) veya akne izleri gibi lezyonlar görülebilir (Şekil 1). Bazı olgularda saçlı derideki infiltrasyon saç kaybına neden olabilmektedir (3) Farinks, dil, yumuşak damak, tonsiller ve dudak mukozasının infiltrasyonu, solunum güçlüğüne neden olabilir. Mukozal infiltrasyona üst solunum yolu enfeksiyonunun eklenmesi, bazen

trakeostomi gerektirebilir (11). Gingival hipertrofi görülebilir (12). Parotis ve submandibular bezlerin tekrarlayan inflamasyonları görülebilir. Sendromun tanı koydurucu bulguları, boğuk ses ve sublingual frenulumun kalınlaşması ile dilin tam olarak dışarı çıkarılamamasıdır. LP'nin etkili bir tedavisi yoktur. Oral dimetil sülfoksitin tedavideki faydası tartışmalıdır (13). Bazı olgularda D-penisilaminin faydalı olduğu bildirilmiştir (14) fakat bu konuda yeterli bilgi birikimi yoktur. LP, olguların yaşam süresini etkilemez ancak solunum yolu obstrüksiyonuna bağlı mortalite riski göz ardı edilmemelidir (15).



**Şekil 1.** Lipoid proteinozisin klinik bulguları

(16)'dan modifiye edilmiştir

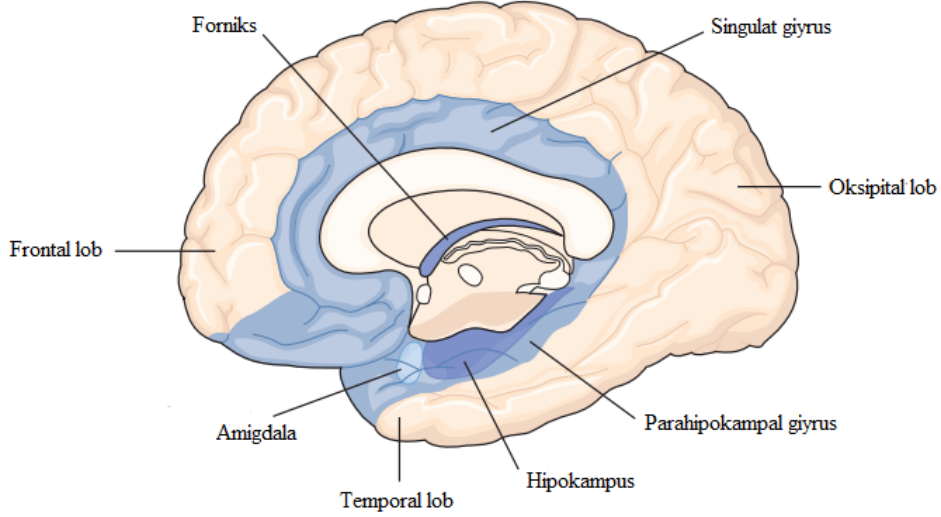
Bugüne kadar 300'den fazla olgu bildirilmiştir. Güney Afrika'da daha sık gözlenmesi 17. yüzyılın ortalarında Güney Afrika'ya göç eden Alman kökenli toplulukta mutasyonun

varlığı (*founder etkisi*) ile açıklanmaktadır (8). Güney Afrikalı LP tanılı 24 olgunun klinikopatolojik bulgularının bildirildiği yayında, bazı olgularda cilt bulgularının 10 yaşına kadar belirginleşmediği, ciltteki infiltrasyon ve skar oluşumunun travma ile provoke olduğu fakat ciltte cerrahi sonrası yara iyileşmesinde gecikme, keloid veya hipertrofik skar oluşmadığı belirtilmiştir (8). LP'li olgularda kaşıntı gibi, fotosensitivite sıklığında da artış bildirilmiştir. Olgularda tırnak anomalilerine rastlanmamıştır. Klinik açıdan, üst solunum yolu semptomlarının cilt bulgularından daha önemli olduğu belirtilmiştir. Aynı yayında, tüm olguların sesinin boğuk olduğu ve olgularda üst solunum yolu enfeksiyonu ile tetiklenen solunum güçlüğü bildirilmiştir. Solunum güçlüğü olan iki olguda stridor mevcutken, üç olguda trakeostomi gerekmiştir. Üst solunum yolu enfeksiyonu ile submandibular veya parotis bezinde epizodik şişme bildirilmiştir. Tüm olgularda sublingual frenulumda kalınlaşma ve dil hareketlerinde azalma tespit edilmiştir (8).

#### **b. LP: Nöropsikiyatrik bulgular**

LP'nin ekstrakütanöz bulguları, medial temporal loblarda, hipokampusta, amigdalada kalsifikasyonlar, epilepsi ve bazı nöropsikiyatrik bulgulardır. Medial temporal loblara yerleşik amigdala ve hipokampus limbik sistemin parçalarıdır. Limbik sistem, bir uyarıya karşı gösterilen duygusal cevabı kontrol etme, beslenme davranışları, cinsel davranışlar, koku algılanması, korku ve hiddet duyguları, motivasyon, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında rol oynar (17). Limbik sistem, limbik lob ve derinindeki yapıları içerir. Beyine medialden bakıldığında prefrontal limbik korteks ve limbik lob görülmektedir (Şekil 2). Limbik lob, kortikal yapıların altında singulat girus, hipokampus, amigdalayı kapsayan temporal lobun iç yüzeyidir (18). Amigdala özellikle korku oluşumunda önemlidir. Amigdaladaki hasar korku durumunu engeller. Hipokampus, hafıza oluşumunda çok önemli role sahiptir. Epilepsi tedavisi amacı ile her iki hipokampusu cerrahi olarak çıkarılan olgularda ileriye dönük bellek yitimi (anterograd amnezi) geliştiği gözlenmiştir. Hipokampus zedelenmesi olan bazı kişilerde, ileriye dönük bellek yitimi ile birlikte, bir miktar geriye dönük bellek yitimi de ortaya çıkar ve bu durum, iki ayrı tipteki bellek yitiminin en azından kısmen ilişkili olduğunu ve hipokampus zedelenmelerinin her ikisine de yol açabileceğini gösterir. Hipokampusları zedelenmiş kişiler, sözel veya simgesel tipte zekâ gerektirmeyen fiziksel (motor) becerileri öğrenmede çoğu kez güçlük çekmezler. Çünkü motor beceri öğrenmenin temeli, zihindeki

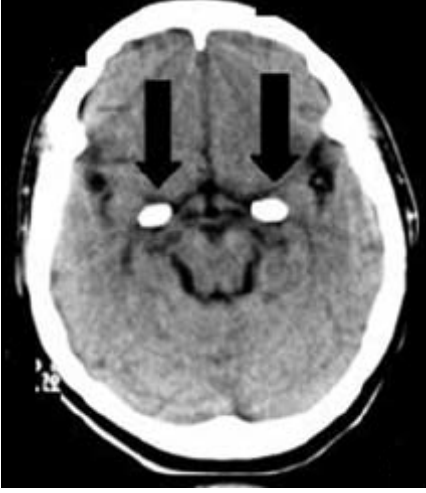
simgesel yineleme veya pekiştirme yerine, gereken ödevleri fiziksel olarak tekrar tekrar yinelemeye dayanır (19).



**Şekil 2.** Limbik sistem

(18)'den

LP'li tüm olgularda kranial görüntüleme yapılmadığından, intrakranial kalsifikasyon insidansını belirlemek zordur ancak kalsifikasyon varlığında nörolojik, nöropsikiyatrik bulguların görülebileceği bildirilmiştir (20). Teive ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada, hipokampus ve amigdalayı da içeren temporal lob kalsifikasyonlarının genellikle bilateral ve simetrik olduğu (Şekil 3) ve olguların %75'inde kalsifikasyon görüldüğü bildirilmiştir (5). Chan ve arkadaşları (2007) LP olgularının %25'inde epilepsi görüldüğünü, epilepsinin beyindeki kalsifikasyon varlığı ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (6). LP olgusunun otopsi materyalinde yoğun amorf kalsiyum kitlesi, bitişik gliotik doku ve kalsifiye duvarlı küçük kan damarları gözlenmiştir. Bitişik kortekste, küçük perivasküler infarkt, demiyelinizasyon alanları, fibrinle tıkalı kan damarları ve kalsifikasyon varlığı tespit edilmiştir (5,21). Tespit edilen multipl kalsifiye damarlar, kranial görüntülemeye belirgin kalsifikasyon görünümüne neden olabilir (21).

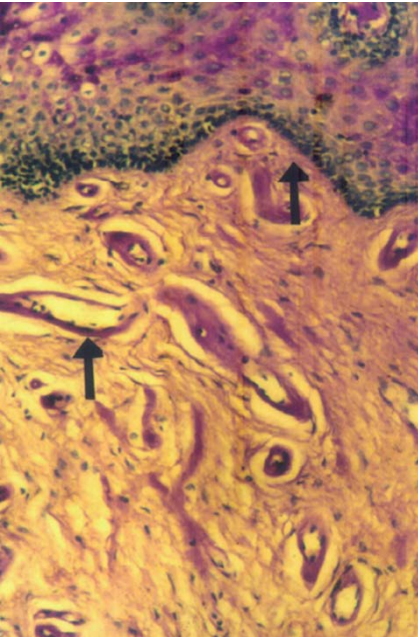


**Şekil 3.** LP tanılı olgunun BT görüntüsü  
Bilateral amigdala kalsifikasyonu. (20)'den

Olgulardaki diğer nöropsikiyatrik bulgular, hafıza kaybı, episodik absans benzeri dalmalar, paranoya, halüsinasyon, agresif davranış, korku hissinin kaybı olarak karşımıza çıkmaktadır (4).

#### **c. LP: Histopatolojik ve Biyokimyasal Anomaliler**

LP, histolojik olarak periyodik asit-Schiff (PAS)-pozitif fakat diyastaza dirençli, dermal-epidermal bileşkede, damar ve adneksiyal epiteli çevreleyen bazal membranda kalınlaşma ve dermiste hiyalin birikimi (Şekil 4) ile karakterizedir (3).



**Şekil 4.** LP'li olgunun alt dudak mukoza biyopsisi  
Subepitelyal bağ doku ve kan damarlarının çevrelerinde  
PAS(+) hiyalin birikimi (oklar). (22)'den

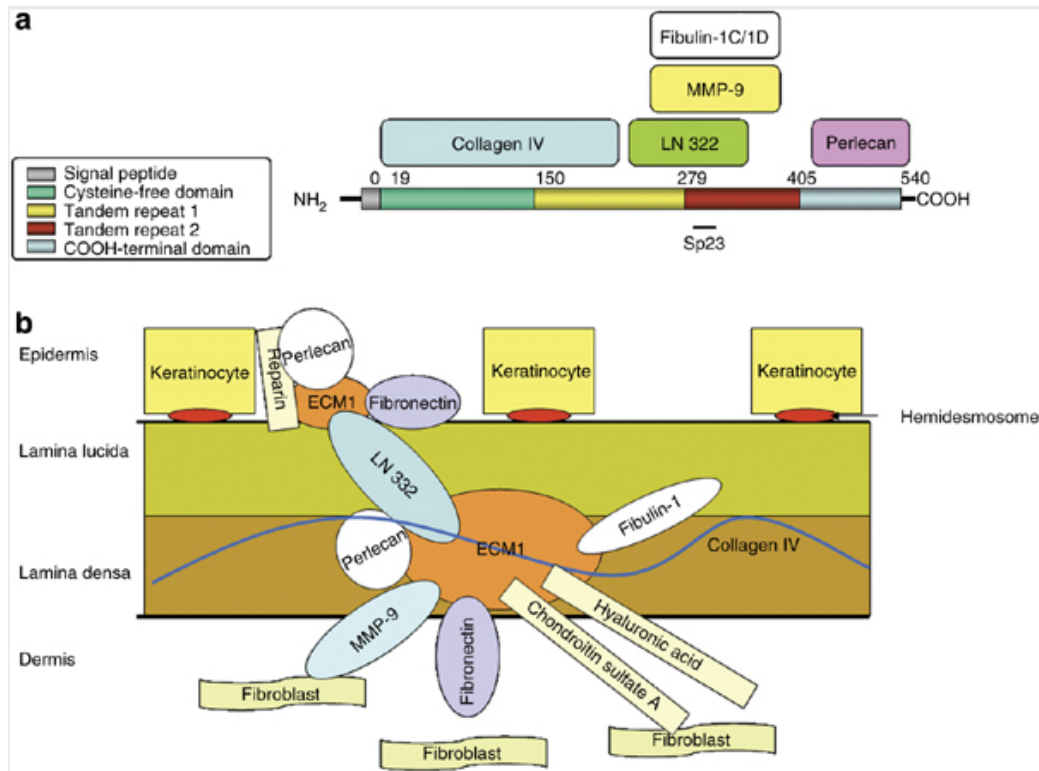
LP'de intraepidermal adezyon anomalileri de bildirilmiştir (23). Anti-tip IV kollajen antikoru ile dermal-epidermal bileşkede ve kan damarlarının çevresinde bazal membranda kalınlaşmanın parlak, kalın bantlar şeklinde görüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca, defektif cilt lenfatikleri ve diğer mikrovasküler anomaliler görülmüştür (24-26). Dermal fibroblastlar karakteristik sitoplazmik vakuol formasyonu gösterirler. Dermal ekrin bezlerde ve histiyositlerde anormal lizozomlar, glikolipit ve sfingolipit yolağındaki bozulma ile oluşan Farber hastalığındaki lizozomlara benzemektedir. Cildin ve fibroblast kültürlerinin biyokimyasal analizlerinin yapıldığı çalışmalar mevcuttur (27-28). Özellikle Bauer ve arkadaşları tarafından yapılan fibroblast kültürlerinde heksuronik asit miktarında artış olduğu bildirilmiştir (29). Fibroblast kültüründe tip-1 prokollajen mRNA'sında azalma gözlenirken, tip-4 kollajen alfa polipeptit mRNA'sında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (30-31). Fibröz kollajen üretiminde azalma görülürken, bazal membran kollajeni üretiminde artış gözlenmiştir.

## 2. MOLEKÜLER TEMELİ

### a. Ekstraselüler Matriks Protein 1 (ECM1)

ECM1 1994'te tanımlanmış bir glikoproteindir. Kemik matriks biyolojisinin incelendiği bir çalışmada, Mathieu ve ark., fare kemik iliğinden köken alan klonal osteogenik stromal hücrelerden salgılanan proteinleri iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezinde, Western blot ve mikrosekanslama ile analiz etmiştir (32). Protein çalışmalarında 84-kDa glikozile protein izole edilmiş, bu protein başlangıçta boyutu nedeniyle 'p85' olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra tip 1 kollajen, osteonektin, katepsin ve sialo kemik proteini gibi çeşitli diğer bağ doku proteinleri ile ilişkisi nedeniyle ECM1 olarak isimlendirilmiştir (33). 1997'de bu proteinin insan homoloğu tanımlanmıştır (34,35). ECM1'in ciltten başka kemik, kırık dokular, anjiogenezis, bazı malignansiler gibi farklı dokularda fonksiyonu mevcuttur. Endokondral kemik oluşumunda, alkalik fosfatase aktivitesini ve mineralizasyonunu inhibe ederek negatif düzenleyici etki yaptığı gösterilmiştir (36,37). Ayrıca, kan damarı endotel hücre proliferasyonunu stimüle ettiği (kültürde), anjiogenezisi uyardığı (tavuk embriyosunda) gösterilmiştir (38). ECM1, iki insan meme kanseri stromal hücre serisinde, kırık dokular oluşumunda, dendritik hücre diferansiyasyon ve matürasyonunda ve grade I, II ve IV glioblastoma multiforme de gösterilmiştir (39,40).

Dermal-epidermal bileşkede ECM1 proteininin spesifik bağlanma bölgeleri, farklı hemidesmozom ve ekstraselüler matriks moleküllerine bağlanmaktadır (Şekil 5). ECM1 proteininin karboksil ucu (424-540 aa) ile perlekan (41), tandem repeat bölgesi (236-361 aa) ile fibulin-1C/1D ve MMP-9 etkileşim halindedir (42,43). Proteinin 207-340 aa'leri LN332 (laminin332) ile ve NH<sub>2</sub> ucu (14-207 aa) kollajen IV ve LN332 ile etkileşim halindedir. İnsanda epidermisin bazal tabakasında keratinositler bazal membrana hemidesmozom şeklindeki monomerik veya polimerik proteinlerle tutunurlar. Bu proteinler keratinositlerden ve fibroblastlardan (heparin, perlekan, fibronektin) salgılanırlar ve doğrudan ECM1 ile bağlantılıdır. Diğer yapısal proteinler özellikle bazal membranın lamina lucida (LN 332 ve fibulin-1) veya lamina densa (LN 332 ve kollajen IV) tabakasına yerleşirler. Major interstisyel dermal protein/polisakkaridler (fibronektin [FN], kondriotin sulfat [CSA] ve hyaluronan [HA]) farklı afinitelerle ECM1'e bağlanırlar. Kollajen IV için proteolitik aktivite gösteren MMP-9, ECM1'e bağlanabilir ve bu bağlanma enzimatik aktiviteyi azaltır (44). ECM1 insan cildinde 'biyolojik tutkal' görevi görür (7). ECM1'in üç boyutlu yapısı Şekil 6'te gösterilmektedir.



**Şekil 5.** Dermal-epidermal bileşkede ECM1'e bağlanan moleküllerin şematik görünümü

(a) ECM1a proteininin spesifik bağlanma bölgelerinin, farklı hemidesmosal ve ekstraselüler matriks moleküllerine bağlanması. (b) Dermal-epidermal bileşkede ECM1'e *in vivo* bağlananların şematik görünümü. (7)'den



**Şekil 6.** ECM1 proteininin üç boyutlu yapısı (45)'ten

### **b. *ECM1* Geninin Tanımlanması**

LP için aday gen belirlenmesinde yardımcı olabilecek herhangi bir özgün fonksiyonel ipucu bulunmadığı için, sendromun patogenezi fonksiyonel klonlama ile değil genom boyu bağlantı analizi ile aydınlatılmıştır. Hamada ve ark. (2002), akrabalık ilişkisi bulunan ailelerde sendromdan etkilenmiş ve etkilenmemiş bireylerin genomik DNA'sı ile homozigosite haritalaması yaparak, etkilenmiş bireylerdeki homozigot mikrosatellit DNA markerlarının belirlenmesini amaçlamıştır. Elde edilen bulgular ile gen, 1q21.2 bölgesine lokalize edilmiştir (46). Bir sonraki aşamada, bu bölge için daha fazla marker kullanılarak bölgeyi küçültmek yerine, pozisyonel aday gen yaklaşımı yapılmaya çalışılmıştır. Bu bölgede 68 aday gen mevcuttur. LP ile ilişkilendirilecek genin dermal fibroblastlarda eksprese edilmesi gerektiği ve gen ekspresyonunun normal kontrol fibroblastlarına göre azalmış olması gerektiği hipotezlerinden yola çıkılarak aday gen sayısı azaltılmıştır (46). Akraba evliliği bulunan 6 ailede *ECM1* geni dizilenmiş ve tüm olgularda homozigot fonksiyon kaybı mutasyonları (anlamsız (nonsense), çerçeve kayması (frameshift) veya gen içi (intragenik) delesyonlar) saptanarak *ECM1* mutasyonları ile LP ilişkisi kurulmuştur (46). Ardışık çalışmalarda da LP'li olgularda *ECM1* gen mutasyonları bildirilmiş ve farklı bir gen ile ilişki gösterilmemiştir (47,48).

### **c. *ECM1*: Gen Yapısı ve Ekspresyonu**

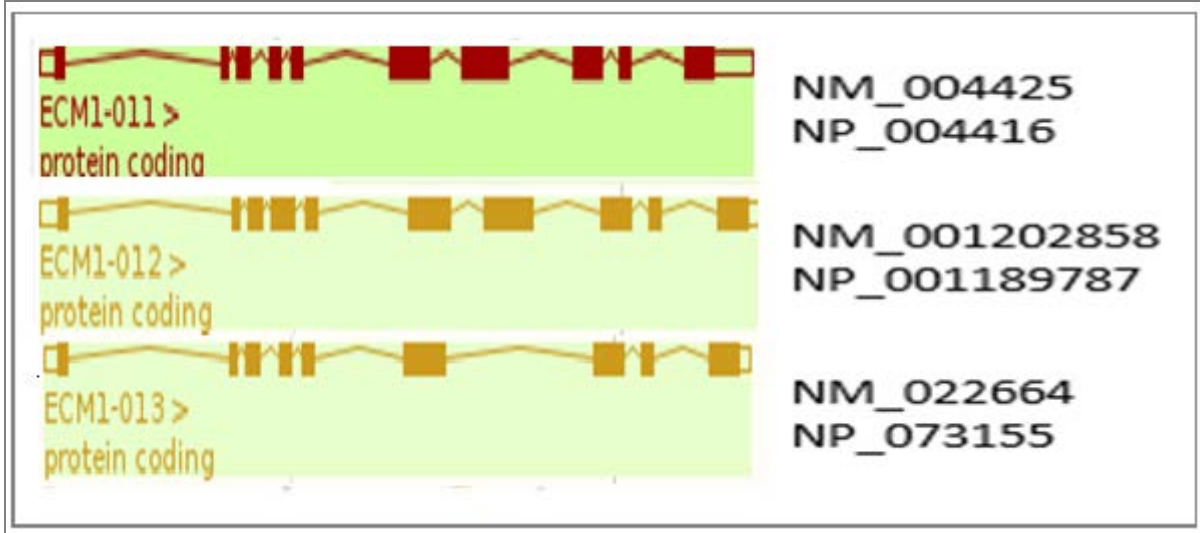
*ECM1* geni (MIM \*602201) 1q21.2'de lokalize (Şekil 7), kromozomda 150,508,011-150,513,789 (GRCh38/hg38) baz çiftleri arasında yerleşik, 5,778 baz çifti uzunluğunda, 10

ekzonlu, bilinen 3 transkriptinden en uzununu 2070 baz çiftten (NM\_04425) oluşan ve 540 aminoasitlik ECM1 proteinini (NP\_004416) kodlayan bir genidir.



**Şekil 7.** *ECM1* geninin 1. kromozomdaki lokalizasyonu (49)'dan

Ensemble veri tabanında, iki transkript varyantı daha mevcuttur (NM\_022664 ve NM\_001202858) (Şekil 8).



**Şekil 8.** *ECM1* genini kodlayan transkript varyantları (50)'den

*ECM1*'in protein kodlayan üç transkripti vardır. Splice varyantları, *ECM1a*, *ECM1b* ve *ECM1c*'dir. *ECM1a* tüm ekzonları içerirken *ECM1b*'de ekzon 7 yoktur, *ECM1c* ise intron 5'de ekzon 5a içermektedir *ECM1a* en fazla eksprese olan splice varyantıdır, ve cilt, karaciğer, ince barsak, akciğer, over, prostat, testis, iskelet kası, pankreas, böbrek gibi çeşitli dokularda en fazla da plasenta ve kalpte eksprese olmaktadır (34). *ECM1b*'nin ekspresyonu daha sınırlıdır, sadece tonsillerde ve keratinositlerde ekspresyonu gösterilmiştir. *ECM1c* ise derideki *ECM1* RNA'sının yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır (34).

Human mutation database veritabanında(HGMD Professional/Ağustos 2015), *ECM1* geninde 51 mutasyon yer almaktadır. Bunların 26'sı anlamsız ve yanlış anlamlı, 6'sı kırılma, 11'i küçük delesyon, üçü küçük insersiyon, üçü küçük indel, biri büyük delesyon, biri büyük insersiyon tipi mutasyondur (51).

### 3. ECM1 İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR

LP olgularında, cildin özellikle güneş ışınlarına maruz kalan bölgeleri gevşek, skarlı ve kırışiktır ve erken yaşlanmış görünüme sahiptir (8). ECM1'in yokluğu, güneş ışınlarının cildin yaşlanmasına olan etkisini arttırabilir. Matriks metalloproteinaz (MMP9) biyoaktivitesindeki değişim, hastalığın patofizyolojisindeki aday mekanizma olabilir. ECM1 normalde MMP9'a bağlanarak biyoaktivitesini kısıtlar (52). ECM1 fonksiyonu/ekspresyonu azaldığında, MMP9 aktivasyonu artarak interstisyel ve bazal membran kollajen yıkımının artmasına ve cilt yaşlanmasına neden olmaktadır. Normal cilt yaşlanması da ECM1 ekspresyonunun azalmasından veya proteindeki olası post-translasyonel değişimlerden kaynaklanabilmektedir. Yaş ilerledikçe ve ultraviyole maruziyeti arttıkça insan cildinde ECM1 ekspresyonunun azaldığı, immünohistokimyasal metodlarla gösterilmiştir (53).

ECM1'in kanser biyolojisinde yer aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Memenin invaziv duktal karsinomu, özofagus skuamöz hücreli karsinoma, gastrik ve kolorektal kanser gibi bazı malign epitelyal tümörlerde fazla eksprese edildiği gösterilmiştir (54). Malign tiroid neoplazmalarında da ECM1 mRNA'sının ve protein miktarının arttığı gösterilmiştir (55,56). ECM1'in, laringeal karsinomanın büyüme, metastaz ve anjiojenik stromal cevabında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (57). ECM1'in, bazı tümörler ve mikroçevresi arasında tümör davranışını belirleyen önemli etkileşimlerin içerisinde yer aldığı düşünülmektedir. İnsan tümör metastaz modelinde ECM1'in fazla eksprese edildiğinin gösterilmesi, ECM1'in epitelyal-stromal etkileşimlerde anahtar role sahip olduğuna dikkat çekmektedir (58).

Kazanılmış otoimmün bir hastalık olan liken skleroz (LS), sıklıkla kadınlarda postmenapozal dönemde, özellikle anogenital bölgede, porselen beyazı sklerotik plaklar ile karakterizedir. Progresif, inflamatuvar bir dermatoz olan LS'de, ekstraselüler matriks proteini 1'e karşı otoantikor varlığı bildirilmiştir (59).

ECM'nin fazla miktarda birikerek, stromaya yayılımı ile pankreatik dokunun yerini almasıyla karakterize pankreatik fibroz, pankreatik kanser, kronik pankreatit ve tip 2 DM gibi endokrinolojik hastalıkların etyolojisinde de yer aldığı bildirilmiştir (60). Moleküler mekanizmaların detayı henüz bilinmese de, ECM-bağımlı EGFR sinyal yolağının *in vivo* pankreatik fibrozisi düzenlediği düşünülmektedir (60). Pankreas adacık hücreleri ile ECM arasındaki etkileşimlerin, normal adacık fizyolojisi için gerekli olduğu bilinmektedir. Kollajen 1 ve IV, FN ve laminin gibi farklı ECM bileşenlerinin insan adacık hücrelerinin adezyonunda, yaşamını sürdürmesinde ve fonksiyonunda farklı etkileri olabileceği bilinmektedir (61).

### III. GEREÇ VE YÖNTEM

#### A. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma grubumuzu, farklı kliniklerde Lipoid Proteinozis klinik tanısı alan İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na yönlendirilen, Tıbbi Genetik ABD polikliniğinde klinik, histopatolojik, radyolojik bulguları ile değerlendirilen ve çalışma için uygun görülen 10 aileden 15 etkilenmiş olgu oluşturdu.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Dosya no: 2014/1974). Çalışmaya katılan olgu ve ailelerine çalışmanın amacı, riskleri ve yararları anlatıldı, olgular ve örneklem yapılan diğer aile bireylerinden bilgilendirilmiş imzalı onamları alındı.

#### B. YÖNTEMLER

##### 1. KLİNİK DEĞERLENDİRME

Klinik değerlendirmede ilk olarak, olgulardan öykü alındı, olguların fizik muayeneleri yapılarak elde edilen bulgular ve laboratuvar sonuçları derlendi ve etkilenmiş bireylerin fotoğrafları arşivlendi. Çalışma grubunun aile ağaçları çizilerek, sendromun kalıtım modeli ile uyumlu ve moleküler tetkik yapılması uygun olan bireylere ait bilgiler edinildi.

##### 2. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

İlk aşamada etkilenmiş bireylerden periferik kan örneği alınarak *ECM1* geninde tüm ekzonların Sanger dizileme ile araştırılması gerçekleştirildi.

###### a. DNA Eldesi

Olgulardan alınan steril 2 ml K<sub>3</sub> EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden DNA izolasyonları, kitler (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood Roche11667327001/ manyetik boncuk bazlı sistem Magnapure Large Volume KIT, Roche03730972001) kullanılarak, firma protokollerine uygun olarak yapıldı.

## b. DNA Ölçümleri

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin konsantrasyonları (ng/ $\mu$ l) ve kalite değerleri ( $A_{260/280}$ ) (1,80 - 1,89) spektrofotometrede ölçülerek kaydedildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmasında kullanılacak DNA miktarı reaksiyon başına 200 ng/ $\mu$ l'ye ayarlandı. Bazı olguların DNA'ları, konsantrasyonların istenilen aralıkta olmaması, PZR reaksiyonunda çalışmaması veya kirlilik bulunması gibi nedenlerden dolayı alkol çöktürme işlemi yapılarak DNA tekrar saflaştırıldı. DNA kalite değerleri spektrofotometrede ölçüldü ve elde edilen değerler kayıt altına alındı.

## c. DNA'nın Saflaştırılması

Alkol çöktürmesi uygulanacak DNA'nın, 50  $\mu$ l'sinin, 0,5  $\mu$ l'lik tüplere (Axygen) alınması sonrasında üzerine 160  $\mu$ l saf Etanol (Sigma; Reiedel-de Haen 32221), 5,5  $\mu$ l Sodyum Asetat (1/10 oranında 3M, pH 5,2) ve 1,5  $\mu$ l glikojen ilave edildi. Tüp içindeki karışım 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, 13000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı atılarak 300  $\mu$ l%70'lik etanol eklendi ve 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı tekrar atılarak alkol tamamen uzaklaşana kadar beklendi. Tüpe 50  $\mu$ l TE tamponu / dH<sub>2</sub>O eklendi (62) ve kalite değerleri spektrofotometrede ölçülerek kaydedildi.

## d. Primer Tasarlanması

Primerlerin tasarlanması aşamasında, İnsan Genomu Mutasyon Veri Bankası'ndan (HGMD) referans alınan *ECMI* geni NM\_004425 transkriptinin genomik dizisi, varyasyonları, ekzon, intron, STR (*Short tandem repeats*) ve diğer polimorfik bilgileri, UTR (untranslated recent) bölgeleri NCBI Home Page (63), Ensembl Genome Browser (64), UCSC Genome Browser (65) veritabanlarında araştırıldı. Bu genlerin tanımlanmış mutasyonlarının değerlendirilmesi için, Biological Database (BIOBASE) (66), HGMD (67) ve farklı ek kaynaklardan yararlanıldı.

Genomik DNA için primer tasarlanırken, seçilen oligonükleotidlerin herhangi bir SNP (*Single nucleotide polymorphism*) üzerine gelmemesine, tekrarlayan diziler üzerinde bulunmamasına, ileri geri nükleotidlerin bağlanma ısılarının ( $T_m$ ; *melting temperature*) birbiri ile aynı ya da en fazla  $\pm 2$  °C farkı olmasına, içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin mümkün olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18-22 nükleotid içermesine ve gen bölgesi için özgün

olmasına özen gösterildi (68). Özgülük, *UCSC Genome Browser*'dan “*in silico* PCR” interaktif sistemi ile test edildi.

*ECMI* geninin tüm ekzonlarını dizileyebilecek ve genomik DNA'nın intron-ekzon bağlantı bölgelerinden en az 100 baz çifti introna girecek şekilde primerler tasarlandı. *ECMI* geninin primerleri Ekler bölümünde, Tablo 2'de sunulmaktadır.

#### **e. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Her bir PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (Thermo Scientific), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific), %0-10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler, 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ile 200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH<sub>2</sub>O) ile 25 µl'ye tamamlanarak hazırlandı ve enzimlerin aktivitesinin korunması için çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Amplifiye edilen her bir bölge, DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol) ile birlikte çalışıldı.

PZR yöntemi; 95°C de 10 dakika denatürasyon, ardından 95°C de 30 saniye denatürasyon, primerlerin T<sub>m</sub>'ye göre değişen 64°C den 52°C ye kadar ve 30 saniyelik bağlanma ısılarında ve 70°C de 45-90 saniye (1 kb / 1 dk) uzama basamaklarından oluşan toplam 40 döngü ve son olarak 70°C de 10 dk lık uzama ile, termal döngü cihazlarında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PZR örneklerinden 5 µl alınarak, 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 V da, 20 dk yürütülerek beklenen bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Ultraviyole ışık altında, elde edilen bantlar görüntülendi ve kayıt edildi.

#### **f. PZR Saflaştırması**

Saflaştırma işlemi için, Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkalen Fosfat (04898133001-Roche) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında PZR protokolü 37 °C de 15 dakika, 85°C de 15 dakika, ardından 4°C olarak ayarlandı. Saflaştırılan ürünler cihazdan alınarak bir sonraki işlem için +4°C'de karanlıkta saklandı.

#### **g. Dizi PZR Reaksiyonu**

Dizi analizi reaksiyonu, saflaştırılan PZR ürünleri ile termal döngü cihazında yapıldı, çalışmaların tümü buz üzerinde gerçekleştirildi.

5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer (PZR için gerekli kimyasalları içerir), BigDye v3.1 (ddNTP leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), Primer (PZR'de kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti ayrı yönlü olarak (dizi okuma kalitesi için) saflaştırılmış PZR ürünü ve dH<sub>2</sub>O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plak (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazında yürütüldü. Protokol toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn ile denatürasyon, 50°C de 5 sn ile bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

#### **h. Dizi PZR Ürününün Saflaştırılması**

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin temizliği için plak içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol eklendi. Plak alüminyum koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika bekletildi. 3810 rpm'de 45 dk santrifüj yapıldı. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plak ters çevrilerek 1100 rpm'de 30 sn kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik etanol eklendi. Plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plak ters çevrilerek 1170 rpm'de 60 sn kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon buffer'ı [(dH<sub>2</sub>O ya da HiDi formamid (Highly Deionized Formamid)] eklendi. Örnekler 95 °C de 5 dk denatüre edildi ve 2 dk buz üzerinde bekletildi ve ABI3500'de yürütüldü.

#### **1. Kapiler Elektroforez Cihazına Yükleme**

Saflaştırılan örnekler ABI3500 cihazı için uygun olan plak (USA Scientific-800-522-8477) her bir kuyuya bir örnek gelecek şekilde yerleştirildi. Plak santrifüjünde (BIOSAN LMC300) 1200 RPM de 2 dakika çevrildi. Santrifüj bitince, plak ABI3500 cihazına yerleştirilip yürütme işlemine geçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dyeset seçildi.

Yürütme voltajı: 13,4 kV, ön yürütme voltajı: 15 kV, injeksiyon voltajı:1,6 kV, yürütme süresi:2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı:8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

## i. Elektroferogram Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kapiller elektroforezi sonucunda alınan piklerin rengine göre değerlendirme yapıldı. Elektroferogramdaki pik renkleri, Adenin için yeşil, Guanin için siyah, Sitozin için mavi ve Timin için kırmızı seçildi.

Pikler ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v2.7 (ABI) programlarında bilgisayar ortamında analiz edildi ve değerlendirildi.

SeqScape v2.7 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra Fasta formatına alınan ham veri programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işlemden sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği olup olmadığı kontrol edilerek değerlendirildi. Belirtilen kontrollerden sonra, herhangi birinde farklılık var ise çalışma PZR aşaması veya yeterli örnek mevcut olması halinde, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. SeqScape v2.7 programında analiz aşamasında, elde edilen olgu dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak, tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP (63), ENSEMBL GeneSNPView (64) ve HGMD (67) gibi veritabanları kullanılarak programda işaretlendi. Daha önce tanımlanmamış olan değişimlerin *in silico* olarak patolojik olup olmadığı, Mutation Taster (69) ve Prediction of functional effects of human nsSNPs (PolyPhen-2) (70) veritabanları kullanılarak değerlendirildi. SeqScape v2.7 programında, olguda çalışılan ilgili gen bölgesinin değişimlerinin gösterimini yapan analiz genel dökümü alındı.

## IV. BULGULAR

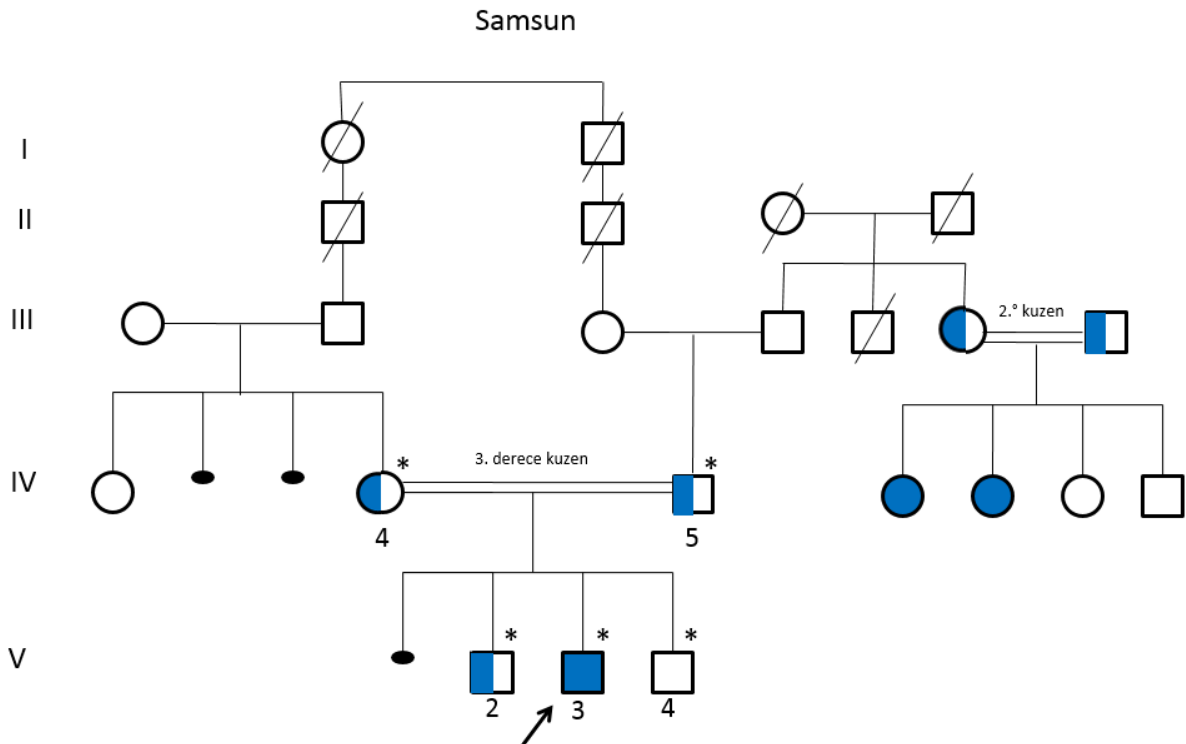
Bu çalışma grubuna alınan Lipoid proteinozis klinik tanılı 10 aileden 15 etkilenmiş bireye ait klinik bulgular ve moleküler analiz sonuçları aile bazında değerlendirildi.

### 1. Aile LP01

#### a. Aile Öyküsü

Aralarında 3. derece kuzen evliliği olan sağlıklı anne ve babanın üçüncü gebeliğinden doğan 7 yaşında erkek olgunun ailesi, genetik danışma istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Annenin ilk gebeliği hiperprolaktinemi nedeniyle spontan abortusla, ikinci ve dördüncü gebelikleri sağlıklı erkek çocuklar ile sonlanmıştı (G4P3Ab1). Olgumuzun babasının halasının 2 çocuğunda da benzer bulgular tarifleniyordu (Şekil 9).



Şekil 9. LP01'in aile ağacı

\* DNA örneği için kan alınan bireyler

Olgumuzun antenatal öyküsünde özellik yoktu. 38. GH'de EMR nedeniyle sezaryen ile, 4000 g ağırlığında doğmuştu. Doğum boyu ve baş çevresi bilinmiyordu. Perinatal adaptasyon sorunu olmamıştı. Tartı alımı, büyüme gelişmesi yaşlıları ile uyumlu olan olgu, 8-9 aylıkken desteksiz oturmuş, 11 aylıkken sıralamış, 1 yaşında yürümüş ve tek kelime söylemiş, 1.5 yaşında iki kelimeli cümle kurmuş, 2 yaşında tuvalet eğitimi almış. İlkokul 1. sınıfı bitiren olgu, başarılı bir öğrenciymiş.

Doğduğundan beri ağlarken sesi boğuk çıkıyormuş. 8 aylıktan sonra sesindeki boğukluk artmış, bilateral antekubital bölgede ve aksiller bölgeden omuza uzanan lineer yarıklanmalar fark edilmiş. Omuzlarından başlayıp, yüz haricinde bütün vücuduna yayılan büller oluşmaya başlamış. Alt dudağında kalınlaşma ve sertleşme fark edilmiş. Atopik dermatit tanısıyla 1-5 yaşları arasında çeşitli kremler kullanmış, fayda görmemiş. Lipoid proteinozis tanısıyla 5-6 yaşları arasında çeşitli kremler ve asitretinkullanmış, fayda görmemiş. Son 1-1.5 yıldır yalnızca hodan yağı kullanıyormuş.

Alt dudak mukozal lezyonun histopatolojik incelemesinde, yer yer hiperplazik çok katlı yassı epitel ile örtülü yumuşak doku örneklerinde epitelyum altında az sayıda mononükleer iltihabi hücrelerin yanı sıra dilate vasküler yapılar izlenmiş. Dermal kollajen ve vasküler yapı çevrelerinde homojenizasyona neden olan PAS ile pozitif boyanan madde birikimi gözlenmiş, lipoid proteinozis ile uyumlu bulunmuş (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi /2009).

Göz muayenesinde, kirpik diplerinde yüzeyden hafif kabarık, papüllomatöz beyaz renkte lezyonlar, fundusta papilla hafif kabarık, sınırları silik, maküla doğal, koroid damarları belirgin saptanmış.

Nörolojik muayenesi normal olan olgunun 7 yaşında beyin difüzyon MR incelemesi ve EEG'de patolojik bulgu saptanmamış.

Direkt laringoskopide, sağ vokal kord serbest kenarında dolgunluk, sol vokal kord 2/3 arka kısmında serbest kenarda, korda göre daha hipodens görünümde kabarıklık izlenmiş.

### **b. Fizik muayene bulguları**

7 yaşında erkek olgunun, boyu 114 cm (10 p), kilosu 20 kg (10-25 p) ve baş çevresi 51 cm (10-25 p) idi. Sesi boğuktu. Bilateral kirpik diplerinde sağda daha belirgin olmak üzere moniliform papüller, kuru ve çatlak dudaklar, alt dudak mukozasında sertleşme ve kalınlaşma, dil üzerinde ve frenulumda papüler infiltrasyonlar mevcuttu. Vücutta yaygın krutlar, yüzünde alında daha fazla olmak üzere tüm vücutta yuvarlak, çapı 3 ila 10 mm arasında değişen,

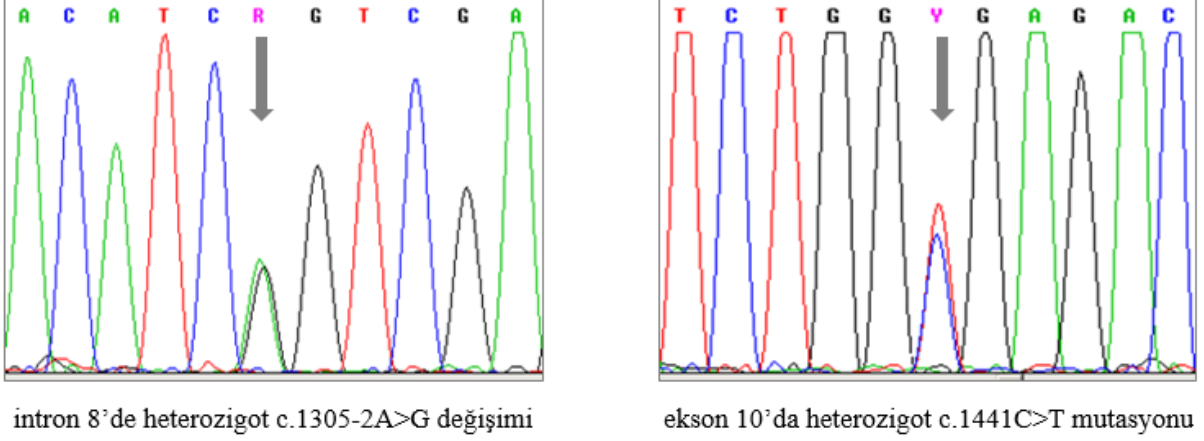
atrofiye, açık kahverengi atrofik lezyonlar (akneiform skarlar) mevcuttu (Şekil 10). Bilateral antekubital bölgede ve aksilla posteriorundan omuza uzanan lineer yapıda atrofiye cilt lezyonları, sol omuzunda 1-2 mm'lik 3-4 adet bül mevcuttu. El içi ve ayak tabanı hiperkeratotikti. Diğer sistem muayenelerinde özellik yoktu.



Şekil 10. Aile LP01'deki etkilenmiş olgu (7 yaş)

### c. Moleküler analiz sonuçları

Lipoid proteinozis tanılı olgudan sağlıklı anne, baba ve iki kardeşinden periferik kan örnekleri alındı (Şekil 9, sırasıyla V:3, IV:4, IV:5, V:2 ve V:4). Olgunun DNA materyalinde, *ECM1* geninde yapılan dizi analizinde, intron 8'de heterozigot c.1305-2A>G (IVS8-2A>G) ve ekzon 10'da heterozigot c.1441C>T (p.Arg481Ter, p.R481\*) mutasyonları saptandı (Şekil 11).



**şekil 11.** Aile LP01'deki etkilenmiş olgunun *ECM1* elektroferogramı

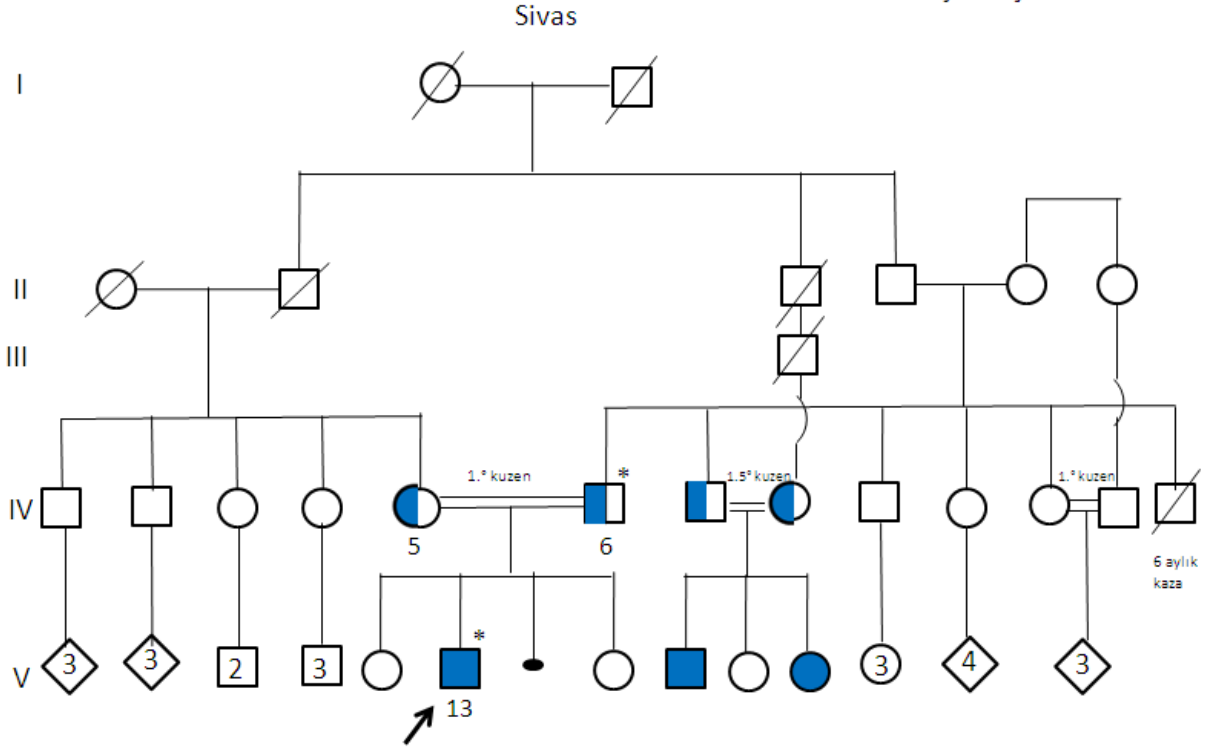
c.1441C>T mutasyonu daha önce literatürde tanımlanmış (6) bir mutasyon olmasına rağmen, c.1305-2Adeęiřimi daha önce literatürde tanımlanmamış idi. Bu değişim, 8. intronda 'splice acceptor' olarak nitelenen, genin kırılma fonksiyonunda çok önemli olan bir bölgede yer almaktadır. Kırılma bölgeleri evrimce çok korunmuş olup, nükleotidinde oluşan değişikliklerin genin kırılma fonksiyonunu bozarak ekzon atlamasına ya da introna ait bir parçanın transkripsiyona uğrayarak, polipeptid zincire yansımaya yol açması beklenmektedir. Bu nedenlerle, olgudaki c.1305-2A>G'nin protein fonksiyonunu bozması ya da ortadan kaldırması ile sonuçlanacağı beklendiğinden, patolojik olarak nitelendirildi. İlgili mutasyon bölgelerinde anne ve babadan yapılan analizlerde, c.1305-2A>G mutasyonunun anneden, c.1441C>T mutasyonunun babadan kalıtıldığı belirlendi ve bu sonuçlarla olgumuzun iki farklı mutasyonu birleşik heterozigot formda taşıdığı kesinlik kazandı ([c.1305-2A>G] + [c.1441C>T]). Sağlıklı kardeş V:2'de ekson 10'da heterozigot c.1441C>T mutasyonu saptanırken, V:4'ün her iki mutasyonu da taşımadığı gösterildi.

## 2. Aile LP02

### a. Aile Öyküsü

Aralarında 1. derece kuzen evliliği olan anne babanın ikinci çocukları, 24 yaşındaki erkek olgu, genetik danışma istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Olgumuzun sağlıklı iki kardeşi olduğu (G4P3Ab1) ve amcasının iki çocuğunda da benzer bulguların varlığı tanımlandı (Şekil 12).



Şekil 12. LP02'nin aile ağacı

\* DNA örneği için kan alınan bireyler

Olgumuzun antenatal ve natal öyküsünde özellik yoktu. Olgumuz doğduğunda boğuk sesli ağlıyormuş. 6 aylıkken saçlı deride ve özellikle ensede eritemli cilt lezyonları, bül farkedilmiş. Vücudunda özellikle eklem yerlerinde sarı-kahverengi verrüköz lezyonlar oluşmuş. Ufak darbeler ile ciltte yara oluşuyormuş ve kaşınıyormuş. 6-8 aylıkken Dowling-Meara tipi Epidermolizis Bülloza tanısı almış, tedaviden fayda görmemiş. Olgumuzun yanak mukozasından kist (parotitis?) alınma öyküsü mevcut.

22 yaşında dermatolojik muayenesinde, kirpik diplerinde inci tanesi görünümünde, şeffaf papüller izlenmiş. Gövde ön yüz, omuzlar, pretibial alanlar, sırtta ve saçlı deride bazıları deri renginde bazıları hipopigmente, atrofik skarlar izlenmiş. Her iki dirsekte koyu kahverengi, hiperkeratotik verrüköz plaklar saptanmış. Alt ve üst dudak mukozasında mukoza renginde plaklar, frenulum sklerozu gözlenmiş. Alında, malar bölgede ve aksillalarda sarı, çenede deri renginde papüller ve bunların birleşmesiyle oluşan plaklar saptanmış.

Sol kol dorsalinden alınan deri materyalinin patolojik incelemesinde, yüzeysel dermiste PAS pozitif proteinöz materyal birikimi izlenmiş, lipoid proteinozis ile uyumlu bulunmuş (GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi/2011).

KBB muayenesinde bilateral vokal kord hareketli ve düzensiz görünümde ve bilateral vokal kord üzerinde nodüler depozitler izlenmiş.

Gözlerinde kuruluk olduğu, cilt lezyonlarına deniz suyunun iyi geldiği ifade edildi. Olgumuzda hafıza sorunu, öfke atakları, paranoya, konvülziyon tariflenmiyordu.

### **b. Fizik Muayene Bulguları**

24 yaşında erkek olguda, özellikle alında ve çenede yoğunlaşan sarı papüler lezyonlar, kirpik diplerinde dizilmiş papüller, alt dudak mukozasında kalınlaşma, alt dudakta kuruluk ve ragatlar, tüm vücutta yaygın hipopigmente skarlar, dirseklerde sarı-kahverengi hiperkeratotik, kuru, verrüköz lezyonlar ve küçük kanama alanları mevcuttu (Şekil 13). Dizlerde ciltte kalınlaşma, antetibial bölgelerde 0,5-1 cm hipopigmente skarlar mevcuttu.



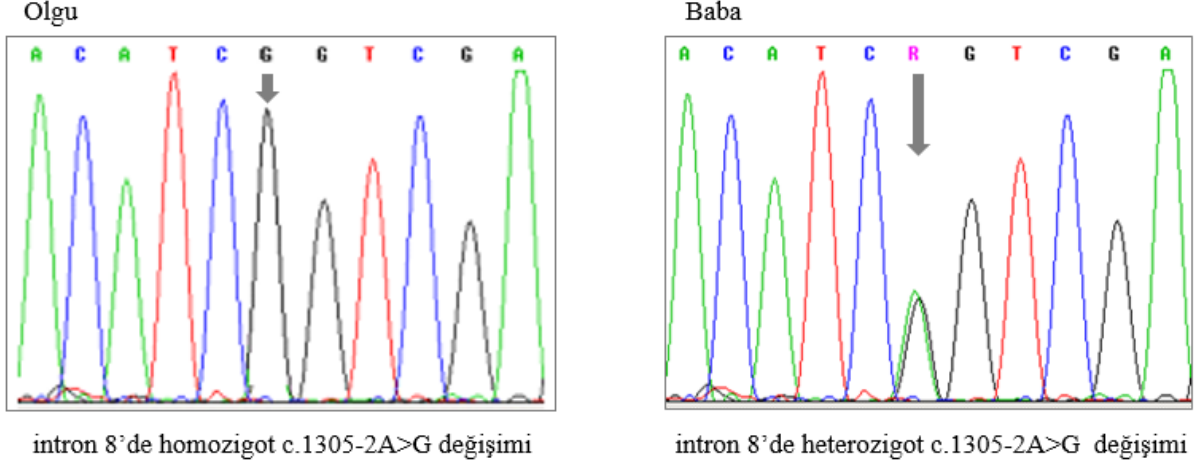
**Şekil 13.** Aile LP02'deki etkilenmiş olgu

(24 yaş)

### **c. Moleküler Analiz Sonuçları**

Cilt ve mukoza bulguları, deri biyopsi incelemesi Lipoid Proteinozis ile uyumlu olan olgudan ve sağlıklı babadan *ECM1* geni dizi analizi için kan örneği alındı (Şekil 12, sırasıyla V:13 ve IV:6).

Olgunun DNA materyalinde, *ECM1* geni intron 8’de homozigot c.1305-2A>G (IVS 8-2A>G) değişimi saptandı. Babasının bu değişimi heterozigot olarak taşıdığı gösterildi (Şekil 14).



**Şekil 14.** Aile LP02’de etkilenmiş olgunun *ECM1* elektroferogramı

*ECM1* geni intron 8’de daha önce literatürde tanımlanmamış, homozigot c.1305-2A>G değişimi, ekzonik RNA segmentlerinin kırılmasında önemli olan ve evrimde korunmuş ‘*splice acceptor*’ dizimini bozduğu için gende kırılma hatasına yol açması beklendiğinden patolojik olarak değerlendirildi.

Olgunun kardeşlerinde LP taşıyıcılığını araştırmak için ve ailedeki diğer etkilenmiş bireylerde moleküler analiz önerildi.

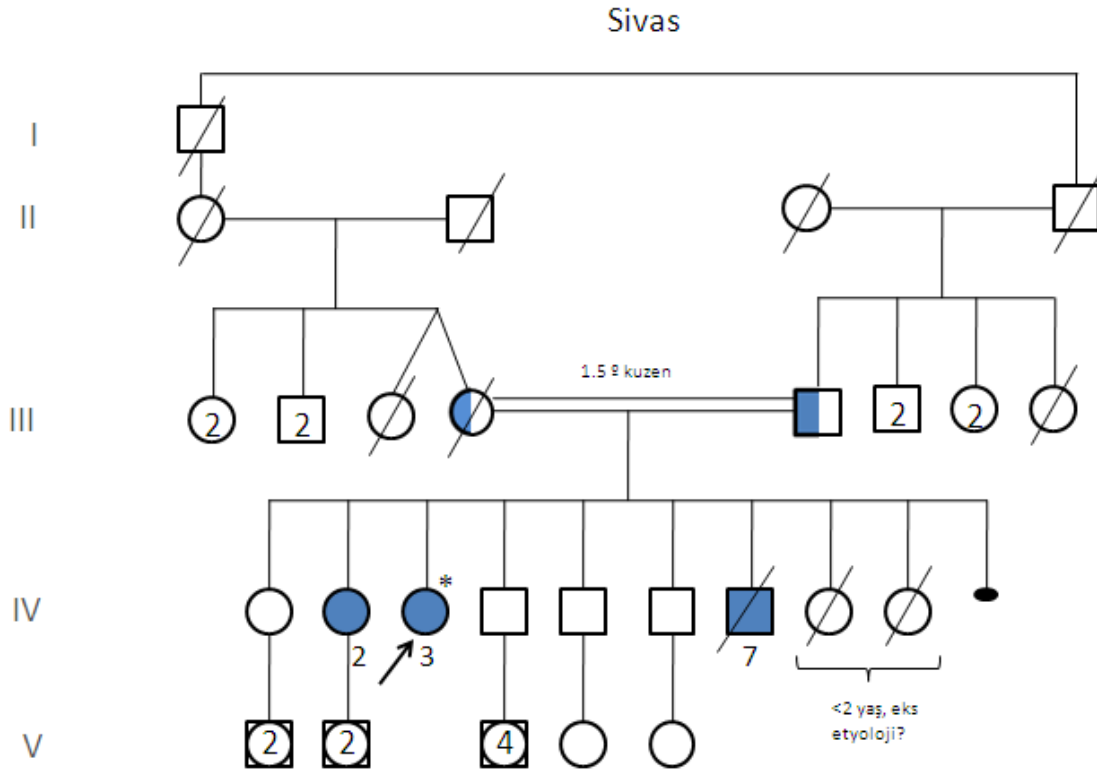
### 3. Aile LP03

#### a. Aile Öyküsü

Aralarında 1.5 derece kuzen evliliği olan anne babanın lipoid proteinozis tanılı üçüncü çocukları 39 yaşındaki dişi olgu (Şekil 15, IV:3), genetik danışma istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Olgumuzun aile öyküsünde (G10P9Ab1) kardeşlerinden (Şekil 15 ) IV:2’de nefrolitiazis ve olgumuza benzer mukokutanöz bulgular mevcutmuş. Benzer bulguları olan

bir erkek kardeşi (IV:7) nefrolitiazis ameliyatında 5 yaşında kaybedilmiş. 2 yaştan önce kaybedilen kardeşlerin ölüm nedenleri bilinmiyor.



**Şekil 15.** LP03'ün aile ağacı

\* DNA örneği için kan alınan bireyler

Olgumuzda 2-3 yaşında ses kısıklığı mevcutmuş ve aynı yıllarda ağız içinde, dudak kenarlarında, koltuk altları ve kalçalarda yaralar oluşmaya başlamış. 18 yaşındaki dermatolojik muayenesinde, yaşlı deri görünümü, yüzde, alt dudakta sarımsı, pürüklü kabarıklıklar olduğu, vücutta yuvarlak, düzgün skatrisler olduğu belirtilmiş.

Cilt biyopsisinde kesitlerde yüzeysel ince keratinizasyon görülen genellikle atrofik epidermis tabakası, birkaç alanda retelerde uzama, yüzeysel dermiste özellikle damarlar ve adneksler çevresinde soluk pembe boyanan bant şeklinde hiyalin birikimi izlendi, lipoid proteinozisle uyumlu bulunmuş (İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi/1990).

KBB muayenesinde, dilde hareket azalması, hipofarenkste arka duvar boyunca pürüklü görünüm, larenkste arka komissürde pürüklü görünüm, vokal kordlar hiperplazik, sol arytenoidde hareket azalması saptanmış. Larenks biyopsisinin patolojik incelemesi, fibroepitelyal selim oluşum ile uyumlu bulunmuş.

17 yaşından beri ayda 2-6 kez tekrarlayan 3-5 sn kadar süren kalbinde hızlı atma, mideden yükselen sıcaklık hissi, o sırada ne olacağını önceden bilme ve konuşulanları daha önceden yaşamışlık hissine kapılıyormuş. 18 yaşında temporal lob epilepsisi tanısı almış, antiepileptik başlanmış. Kranial BT’de anteromedial temporal kalsifikasyonlar saptanmış. EEG normal sonuçlanmış. 21 yaşındayken temporal lob nöbetleri nedeniyle çekilen kranial BT görüntülemesinde sağda daha büyük olmak üzere iki yanlı temporal kalsifikasyonlar saptanmış. Lise mezunu olan olgumuzun zeka katsayısı 72 imiş. Nöropsikolojik testinde görsel bellekte “*recall*” fazında belirgin bozukluk, hafif sözel bellekte bozulma tespit edilmiş. Panik bozukluğu ve konversiyon bozukluğu saptanmış. İkili antiepileptik alırken günde 4-5 kez nöbet geçiren olgu, bir süre antiepileptik tedavi almadan izlenmiş, nöbetlerinin devam etmesi üzerine tekrar antiepileptik tedavi başlanmış. EEG çekimi sırasında iki kez klinik ve elektrofizyolojik olarak sağ frontotemporal başlangıçlı nöbet geçirmiş. Gözlerinde yanma ve batma şikâyeti nedeniyle istenen göz konsültasyonunda görmenin tam olduğu, gözyaşı kuruma zamanının azalmış olduğu belirtilmiş. Olgumuz cilt lezyonları için 21 yaşından itibaren 3 yıl dimetil sülfoksit kullanmış ve 2 yıldır da diosilin merhem kullanıyormuş. Boyun USG’de sağ parotiste 7.5 mm ebadında sialoadenit izlenmiş. 38 yaşında anjionörotik ödem tanısı almış ve bu nedenle 2 kez acile başvurmuş. 38 yaşında DM tanısı almış, glifor önerilmiş, yan etkisi nedeniyle kullanmamış. Ötiroid multinodüler guatr nedeniyle takipliymiş. Aile öyküsünde nefrolitiazisli bireyler olan olgumuz, 7 yaşında nefrolitiazis nedeniyle ameliyat olmuş, amonyum urat kristalleri atılımı devam ediyormuş.

### **b. Fizik Muayene Bulguları**

39 yaşında dişi olguda, dilaltı frenulum kısa, gözlerde kirpik diplerinde incimsi papüller, ağız kenarlarında ragadlar, yüz, göğüs, boyun, omuzlar, ense ve her iki gluteal bölgede atrofik akneiform skatrisler mevcuttu. Her iki aksillada sarı renk değişimi ve dirseklerde kahverengimsi likenifiye plaklar mevcuttu. Deri kaba görümlü ve kuruydu (Şekil 16).

Olgumuz, cilt ve mukozada hiyalin birikimi, moniliform blefarozis, dil, frenulum ve larinkste papüler infiltrasyonlar, ses kısıklığı, hafıza sorunları, paranoya, frontotemporal başlangıçlı nöbet öyküsü, bağırma isteği, bilateral intrakranial kalsifikasyonlar ve OR kalıtımla uyumlu aile öyküsü ile lipoid proteinozisle uyumlu bulundu.

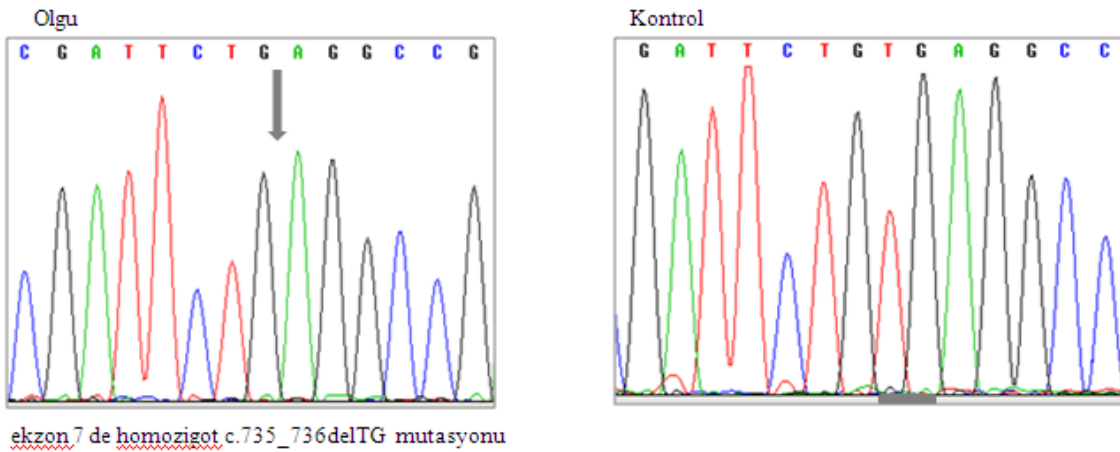


Şekil 16. Aile LP03'deki etkilenmiş olgu (39 yaş)

### c. Moleküler Analiz Sonuçları

Olgumuzda *ECM1* geninde yapılan dizi analizinde, literatürde daha önce tanımlanmış (47) ekzon 7'de homozigot c.735\_736delTG mutasyonu saptandı (Şekil 17).

Olgunun kardeşlerine LP taşıyıcılığını araştırmak için moleküler analiz önerildi.



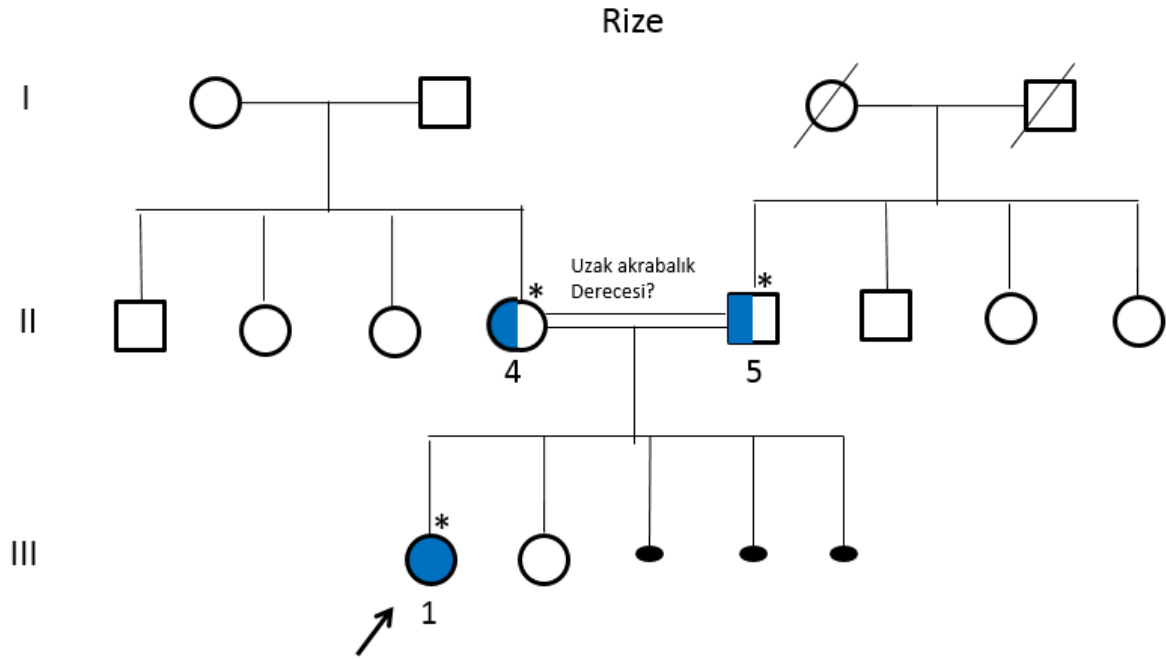
Şekil 17. Aile LP03'de etkilenmiş olgunun *ECM1* geni parsiyel elektroferogramı

#### 4. Aile LP04

##### a. Aile Öyküsü

Aralarında uzaktan akrabalık (derecesi bilinmiyor) olan anne babanın ilk çocukları olan lipoid proteinozis tanılı 21 yaşındaki dişi olgu, genetik danışma istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Ailede benzer olgu tariflenmiyor (Şekil 18).



Şekil 18. LP04'ün aile ağacı.

\* DNA örneği için kan alınan bireyler

Olgumuzun antenatal ve natal öyküsünde özellik yoktu. Doğduğundan beri boğuk sesli ağladığı ifade edilen olgunun, sesinde zamanla değişiklik olmamış. 2<sup>6/12</sup> yaşından sonra yüzünde ve saçlı deride eritem, büller ve kirpik diplerinde papüller oluşmuş. Daha sonra ön kollarda ve umblikulus çevresinde cilt renginde papüller oluşmuş. 2.5 yaşından sonra kaşıntılı lezyonlar nedeniyle saçları dökülmüş ve saç kökü olmadığı için farklı tedavilerden fayda görmemiş. İlk zamanlarda cilt enfeksiyonu tanısıyla takip edilen olgu, 9 yaşında lipoid proteinozis tanısı almış. Kranial BT tetkiki (2000 ve 2005) normal sonuçlanmış. 10 yaşında ses tellerindeki nodüller alındıktan sonra sesindeki boğukluk azalmış ve orofarenks, larinks

muayenesi normal bulunmuş. Göz muayenesinde kirpik diplerinde papüller haricinde patoloji saptanmamış. Yüzüne peeling, yüz ve kirpik diplerine CO<sub>2</sub> lazer uygulanmış. Olgumuz üniversite eğitimine devam ediyor ve nörolojik veya nöropsikiyatrik bulgu tariflemiyordu.

### **b. Fizik Muayene Bulguları**

21 yaşındaki dişi olguda (157 cm boyunda, 52 kg ağırlığında) boğuk ses, seyrek saçlar, kirpik diplerinde moniliform papüller, yüzde hiperkeratozis ve kuruluk, tedavi sonrası oluşan atrofik cilt lezyonları, alt dudak mukozasında kalınlaşma ve papüller mevcuttu. Tüm vücutta 1-2 mmlık cilt renginde papüller, ensede, kulak arkasında sarımsı hiperkeratotik plaklar, diz ve dirseklerde hiperkeratozis ve kuruluk mevcuttu (Şekil 19).

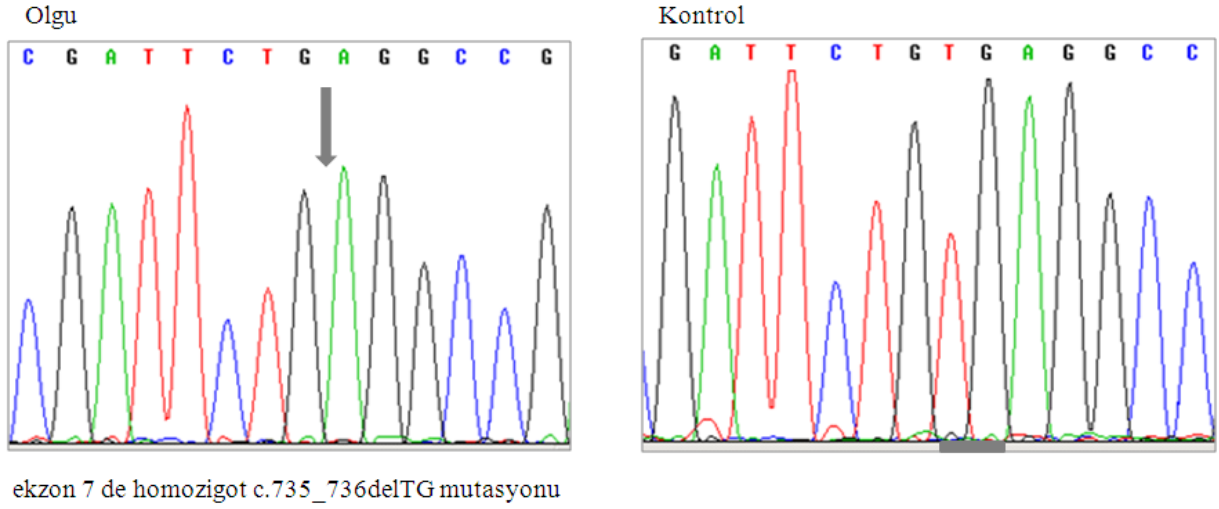


**Şekil 19.** Aile LP04'deki etkilenmiş olgu (21 yaş)

### **c. Moleküler Analiz Sonuçları**

Olgudan ve sağlıklı anne ile babasından, DNA izolasyonu için periferik kan örnekleri alındı (Şekil 18, sırasıyla III:1, II:4 ve II:5)

Olgumuzda lipoid proteinozisle ilişkilendirilen *ECM1* geni dizi analizinde, literatürde daha önce tanımlanmış (47) ekzon 7'de homozigot c.735\_736delTG mutasyonu saptandı (Şekil 20). Anne ve babasının aynı mutasyonu heterozigot taşıdıkları belirlendi. Olgunun kardeşine LP taşıyıcılığını araştırmak için moleküler analiz önerildi.



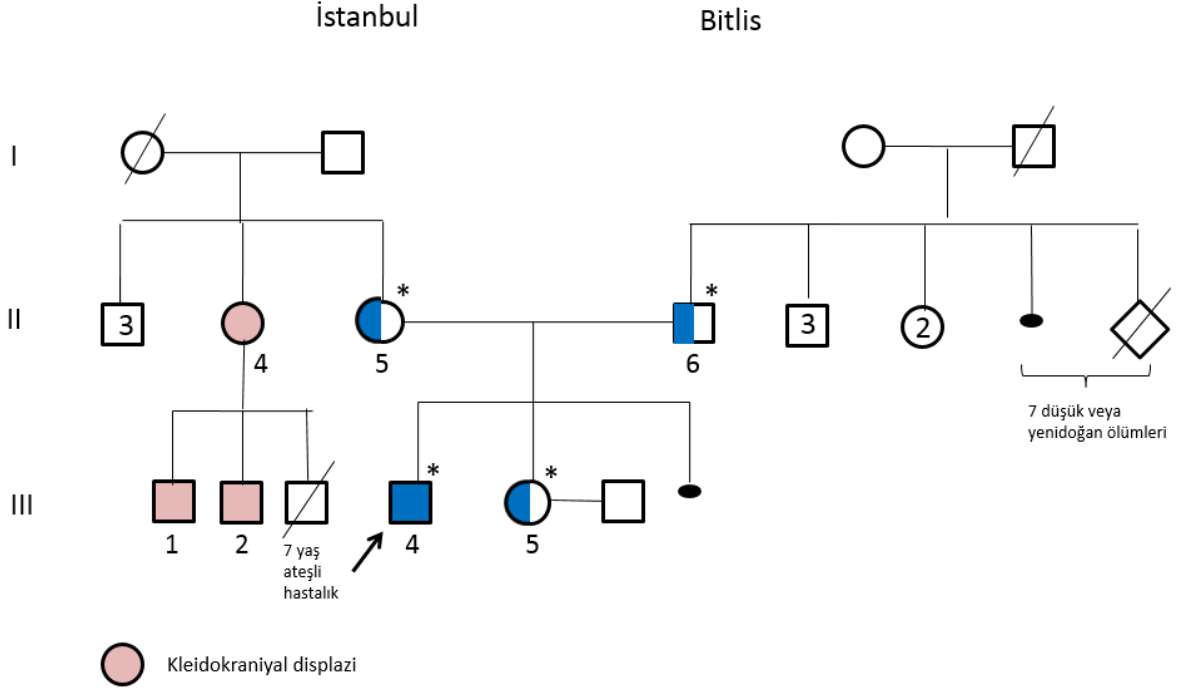
**Şekil 20.** Aile LP04’de etkilenmiş olgunun *ECM1* geni parsiyel elektroferogramı

## 5. Aile LP05

### a. Aile Öyküsü

Aralarında akrabalık olmayan sağlıklı anne ve babanın ilk çocukları olan 31 yaşında erkek olgu, lipoid proteinozis tanısıyla takipli iken moleküler genetik tanı istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Aile öyküsünde olgunun teyzesi ve iki oğlunun kleidokraniyal displazi tanısı ile izlendikleri öğrenildi (İTF Tıbbi Genetik AD izlemi). Ailede benzer olgu tariflenmiyordu(Şekil 21).



**Şekil 21.** Aile LP05'in aile ağacı

\* DNA eldesi için kan örneği alınan bireyler

Olgumuzun antenatal öyküsünde özellik yoktu. Hastanede term, NSD ile 3500 g ağırlığında, 54 cm boyunda doğmuş. 6. aydan sonra ensesinde sivilce benzeri lezyonlar çıkmış. 1 yaşındaykendermatolog cilt lezyonlarının tedavisinin olmadığını belirtmiş. 6 yaşında halsizlik, mideden tuhaf bir koku gelmesi, bulunduğu ortamda eşyaların altından bir şey çıkacakmış gibi hissetme ve korku şeklinde ortalama 3 dk süren havaleleri başlamış. 22 yaşında havalelerin şiddeti artmış, tüm vücutta tonik klonik kasılmalar başlamış, kasılma 1-2 dk sürüyormuş, ağızdan köpük gelme veya idrar kaçırma olmuyormuş. Vücudun direnci düştüğünde havale geçiriyormuş, sıklığı değişiyormuş. 14 yaşındayken sinirlilik ve iletişim sorunu nedeniyle psikiyatriste gitmiş, ilaç tedavisi başlanmış. 18 yaşındayken epilepsi tanısı almış, kullandığı antiepileptiklerden fayda görmüş, vücut direnci düştüğünde hafif nöbetleri oluyormuş. Önlisans mezunuymuş. 28 yaşındayken dermatolojide lipoid proteinozis tanısı almış, cilt biyopsisi yapılmamış. Hiçbir şeyden korkmuyormuş ve acıya çok dayanıklıymış. Kraniyal BT'de her iki medial temporal lobda kalsifikasyonlar gözlenmiş. Psikiyatrik değerlendirme ile delüzyonel bozukluk tanısı almış. KBB muayenesinde vokal kordlarda genişleme (infiltrasyon) görülmüş.

### b. Fizik Muayene Bulguları

31 yaşındaki erkek olguda(boy:180 cm, ağırlık: 85 kg, BÇ:57,5 cm) boğuk ses, yüzde akneiform lezyonlar, kirpik diplerinde dizilmiş papüller, alında, çenede papüller, ensede hiperpigmente maküller, omuzda atrofik yuvarlak lezyonlar, dirseklerde ve dizlerde hiperkeratotik plaklar, aksillalarda plaklar mevcuttu (Şekil 22).



Şekil 22. Aile LP05’de etkilenmiş olgu

(31 yaş)

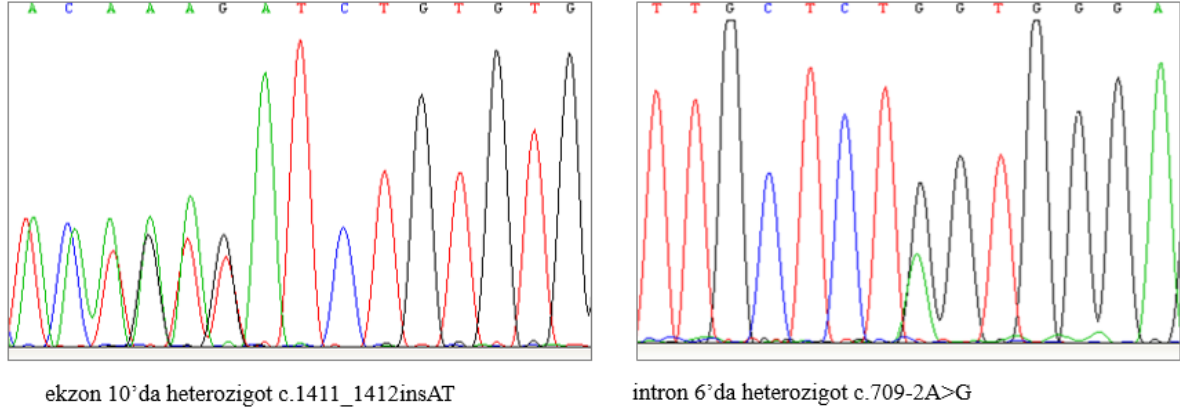
Olgunun cilt, mukoza bulguları, intrakraniyal kalsifikasyon varlığı, epilepsi öyküsü, agresif davranış, halüsinasyon, korkusuzluk gibi nöropsikiyatrik bulguları LP ile uyumlu bulundu.

### c. Moleküler Analiz Sonuçları

Olgu, sağlıklı kız kardeşi anne ile babasından, DNA izolasyonu için periferik kan örnekleri alındı (Şekil 21, sırasıyla III:4, III:5, II:5 ve II:6).

Olgunun *ECM1* geni dizi analizinde, ekzon 10’da heterozigot c.1411\_1412insAT (p.L472Ifs\*19) değişimi saptandı, ekzon 7 dizilenemedi, diğer ekzonların dizi analizi normal sonuçlandı. Annede ekzon 10’da homozigot c.1411\_1412insAT değişimi gözlemlendi. Babada da ekzon 6 dizilenemedi, ekzon 10 dizi analizi normal sonuçlandı. Olgu ve annenin materyal karışma ihtimalini dışlamak için STR analizi yapıldı, 16 STR lokusundan 10’unda informatiflik sağlanarak materyal karışma ihtimali dışlandı (Ekler, Tablo 3). Annenin F5/R5 primerleri ile yapılan PCR ürünüde mutasyonlu tek allelin dizilenmiş olabileceği, bu nedenle heterozigot mutasyonun görülemediği düşünüldü. F5 primerinin bağlanma bölgesindeki polimorfik bir değişimin buna neden olabileceği düşünüldü, daha geniş bir bölgeyi kapsayan F4/R5 primerleri ile yapılan PCR ürünü dizilendiğinde annede ekzon 10’da heterozigot c.1411\_1412insAT değişimi gösterildi. Olgu ve babanın dizilenemeyen ekzon 7 bölgesinde

primerin bağlanma bölgesi civarında polimorfik bir değişimin buna neden olabileceği düşünüldü, F3-1 primeri tasarlandı ve bu primer ile dizi analizinde ikisinde de intron 6'da heterozigot c.709-2A>G (IVS6-2A>G) saptandı (Şekil 23).



**Şekil 23.** Aile LP05'de etkilenmiş olgunun *ECM1* geni parsiyel elektroferogramları

Olgudaki c.709-2A>G ve c.1411\_1412insAT (p.L4721fs\*19) değişimleridaha önce literatürde tanımlanmamıştır. c.709-2A>G, 6. intronda 'splice acceptor' olarak nitelenen, genin kırılma fonksiyonunda evrimde korunmuş bir bölgede yer almaktadır. Bu nedenle genin kırılma fonksiyonunu bozarak ekzon atlamasına ya da introna ait bir parçanın transkripsiyona uğramasına yol açması beklendiğinden, patolojik bir mutasyon olarak değerlendirildi. c.1411\_1412insAT değişimi ise transkriptte çerçeve kaymasına ve translasyonda protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden, patolojik olarak değerlendirildi. Anne-baba dizi analizi ile olgudaki mutasyonların birleşik heterozigot olduğu ve trans pozisyonda oldukları kesinleşmiş oldu ([c.709-2A>G] + [c.1411\_1412insAT]).

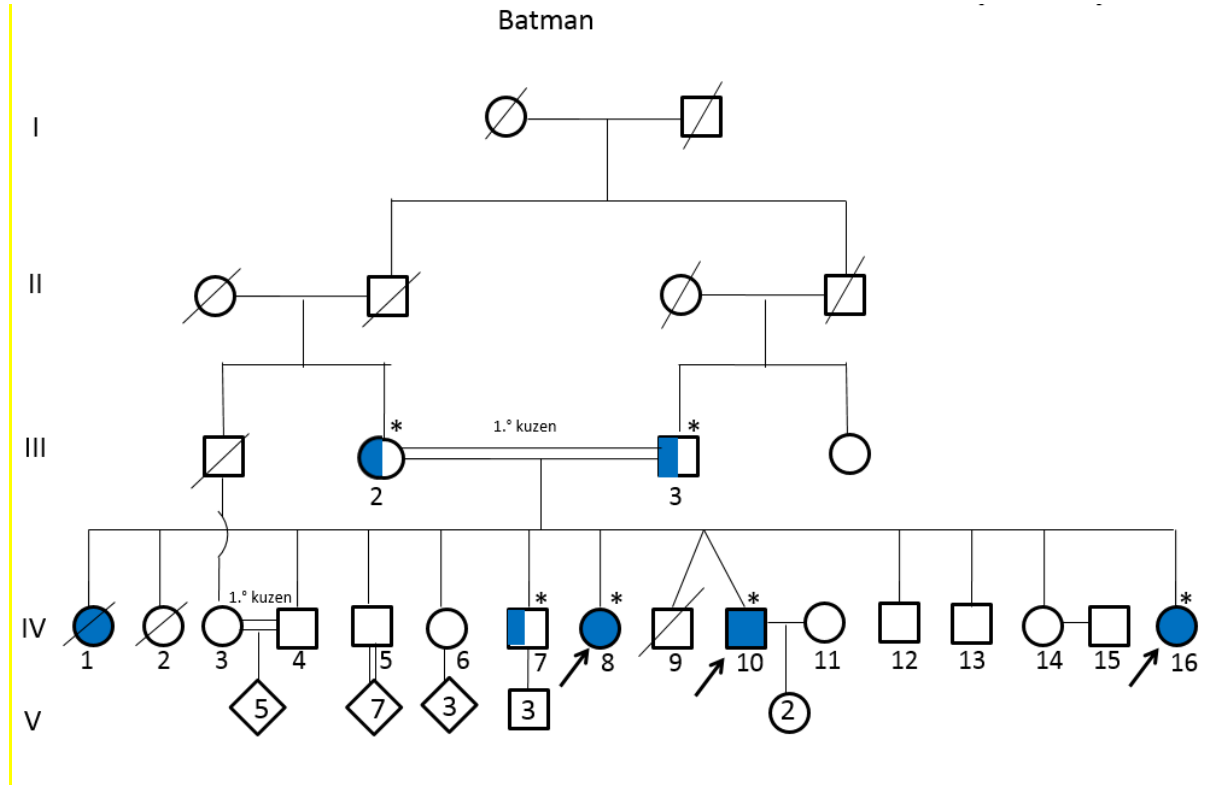
Olgunun kardeşinin heterozigot c.1411\_1412insAT değişimini taşıdığı saptandı ve eşine de *ECM1* geni dizi analizi önerildi.

## 6. Aile LP06

### a. Aile Öyküsü

Aralarında 1. derece kuzen evliliği olan anne babanın LP tanılı üç çocuğu, 22 yaşında ve 34 yaşında dişi olgular ile 33 yaşında erkek olgu, genetik danışma istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Aile öyküsünde, ses kısıklığı ve cildinde lezyonlar olan ailenin ilk çocuğu (IV:1) 1-2 yaşında suçıçeği (yanlış tanı almış olabileceği, bül şeklindeki cilt lezyonlarının suçıçeği lezyonlarına benzetilebileceği düşünöldü) nedeniyle kaybedilmiş. Ailenin ikinci çocuğu (IV:2) 5 aylıkken kaybedilmiş, ölüm nedeni bilinmiyor, LP bulgusu tariflenmiyor. IV:9 ölüdoğmuş. İki kardeşde, IV:6, IV:7 tip 1 DM tanısı mevcut. Olgulardan IV:8 34 yaşında, LP tanılı, IV:10 33 yaşında, LP, tip 1 DM, epilepsi tanılı, IV:16 22 yaşında, LP, tip 1 DM, epilepsi tanılı (Şekil 24).



Şekil 24. LP06'un aile ağacı

\* DNA örneği için kan alınan bireyler

**IV:8**, 34 yaşında dişi olgunun tıbbi öyküsünde doğduğundan beri boğuk sesli olduğu, 6 ay-1 yaşta cildinde lezyonların çıkmaya başladığı bilgilerine ulaşıldı. 30 yaşında

dermatolojiye bacaklarındaki varis nedeniyle başvurduğu, boynundan cilt biyopsisi yapıldığı (Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi/2010), lipoid proteinozis tanısı aldığı ve ilaç kullandığı raporlanmıştı. Olguda nörolojik muayene yapılmamış ve kranial MR çekilmemişti. İlkokul mezunu olan olguda nörolojik ve nöropsikiyatrik bulgu tariflenmiyordu.

**IV:10**, 33 yaşında erkek olgunun öyküsünde de doğduğundan beri boğuk sesli olduğu ve cilt bulgularının ise hiçbir zaman belirgin olmadığı bildirildi. Olgu 15-16 yaşında epilepsi tanısı almıştı. Tüm vücutta kasılma, bağırma, ağızdan köpük gelme, idrar kaçırma tarzında 3-5 dk süren nöbetleri olduğu, bu nöbetlerin ayda 5 kez tekrarladığı, ikili antiepileptik ilacı düzenli kullanınca, nöbet sıklığının azaldığı bilgisi verildi. 20 yaşında tip 1 DM tanısı aldığı ve insülin kullandığı öğrenildi. Olgu, DM nedeniyle oluşan yaraların geç iyileştiğini ve ozon tedavisinden fayda gördüğünü belirtti. 26 yaşında dermatolojide LP tanısı almış, ilaç önerilmemiş. İlkokul mezunu, 2-3 yıldır hafızası iyi değilmiş ve çabuk unutuyormuş. 32 yaşında sol tarafta güçsüzlük, uyuşukluk şikayetiyle nörolojiye başvurmuş, sağ orta serebral arter sulama alanında akut iskemi saptanmış. 24 yaşında EEG'de sol fronto-sentro-temporal bölgede hafif organizasyon bozukluğu ile hipersenkroni eğiliminin varlığı ve hiperventilasyon ile her iki hemisferde yaygın organizasyon bozukluğu saptanmış. 27 yaşında psikiyatri muayenesinde, anksiyöz uyum bozukluğu, dikkate sekonder unutkanlık ve anksiyeteye bağlı unutkanlık saptanmış. Nöropsikolojik testinde basit dikkat normal, karmaşık dikkat becerilerinde bozulma saptanmış. Dikkat açısından iki hemisfer arasında fark bulunmamış. Yürütücü işlevlerden sözel akıcılık normal sınırlarda, cevap inhibisyonu, soyutlama ve planlama becerilerinin hafif bozulduğu saptanmış. Hafıza sorunu, agresyon, yürütücü işlevlerde bozulma mevcutmuş. Kranial MR ve BT'de bilateral amigdala ve hipokampusta kalsifikasyon, hafif serebral atrofi, yaygın kronik laküner, subakut ve akut enfarktler izlenmiş (Şekil 25).



Şekil 25. Olgu (IV,10)'un kraniyal BT görüntülemesi

**IV:16**, 22 yaşındaki dişi olgu, antenatal dönemde takip edilmemiş, evde doğmuş. Boğuk ses doğduğundan beri mevcutmuş. Vücudun değişik bölgelerinde 6 ay-1 yaş arasında cilt lezyonları çıkmış. 6-7 yaşında cilt bulguları nedeniyle Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi dermatoloji polikliniğinde LP tanısı almış. 6-7 yaşında yürürken durma bazen düşme tarzında nöbetleri başlamış. Epizodik absans benzeri nöbetler yaygın tonik-klonik nöbetlere dönüşmüş. 15 yaşından beri tüm vücutta tonik-klonik kasılma tarzında 30 sn-30 dk arasında süren, bazen etrafı duyduğu ama görmediği, bazen ağızdan köpük geldiği, idrar kaçırmanın olmadığı nöbetleri başlamış, haftada 3 veya ayda 3 kez nöbeti oluyormuş. Epilepsi nedeniyle 7-8 yıldır antiepileptik kullanıyormuş, nöbet sayısı azalmış. 15 yaşından beri, tip 1 DM tanısı ile insülin kullanıyormuş. Eğitim durumu lise 2 terk olan olgunun, 22 yaşında EEG'si normal sonuçlanmış. Kranial MR'da intrakraniyal kalsifikasyon saptanmış. Olgumuzda hafıza sorunu, öfke atakları, paranoya tariflenmiyor. Saç dökülmesinin fazla olduğunu belirtti. Cilt lezyonları için krem, göz kuruluğu için damla kullanmaktaydı.

### b. Fizik Muayene Bulguları

**IV:8**, 34 yaşında dişi olguda (boy: 143 cm, ağırlık: 41.5 kg, BÇ: 50.3 cm) kirpik diplerinde moniliform papüller, boğuk ses, alt dudak mukozasında sarı-papüler lezyonlar, dilde kalınlaşma, aksillalarda papüler lezyonlar, dirseklerde hiperkeratozis, vücutta yuvarlak, atrofik lezyonlar mevcuttu.

**IV:10**, 33 yaşında erkek olguda (boy: 148 cm, ağırlık: 40 kg, BÇ: 55.5 cm) boğuk ses, alt dudak mukozasında sarı-papüler lezyonlar, dil altı frenulumda kalınlaşma, aksillalarda hafif papüller lezyonlar, dirseklerde kalınlaşma mevcuttu.

**IV:16**, 22 yaşındaki dişi olguda (boy: 147 cm, ağırlık: 41.5 kg, BÇ: 51.3 cm) yüzde akne benzeri lezyonlar, kirpik diplerinde moniliform papüller, hiperkeratozis, sarı plaklar, kalın-kaba cilt, dudaklarda çatlak, alt dudak mukozasında, dilde, dil-altı frenulumda kalınlaşma, boğuk ses, aksillalarda atrofik-sarı cilt, dirseklerde ve dizlerde ciltte verrüköz kalınlaşma, tüm vücutta farklı boyutlarda yuvarlak atrofik-hipopigmente cilt lezyonları mevcuttu (Şekil 26).



**Şekil 26.** Aile LP06'da etkilenmiş olgular

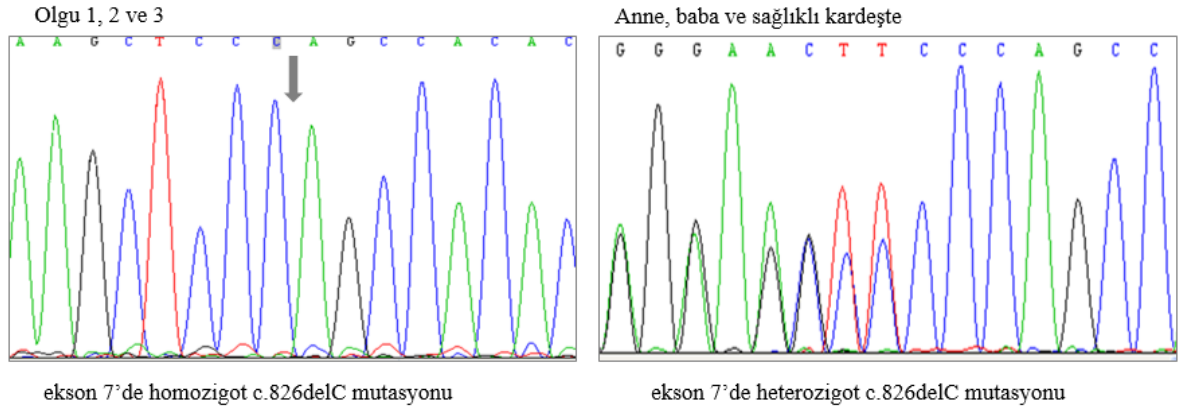
a ve d, olgu IV:8'in yüz ve dirsek görünümü, b ve e olgu IV:10'nun yüz ve dirsek görünümü, c, f ve g olgu IV:16'nın yüz, dirsek ve aksilla görünümü

IV:8'de LP'nin cilt ve mukoza bulguları, IV:10'da hafif cilt ve mukoza bulguları ve intrakranial kalsifikasyon, epilepsi, anksiyöz uyum bozukluğu, dikkate sekonder ve anksiyeteye bağlı unutkanlık, karmaşık dikkat becerilerinde bozulma, agresyon, yürütücü işlevlerde bozulma gibi LP'in nöropsikiyatrik bulguları ve tip 1 DM ile serebral iskemi atağı öyküsü mevcuttu. IV,16'da ise kardeşlerine kıyasla daha ağır cilt ve mukoza bulguları, ayrıca intrakraniyal kalsifikasyon ve epilepsi gibi sendromun nöropsikiyatrik bulguları ve tip 1 DM mevcuttu fakat hafıza sorunu, öfke atakları, paranoya tariflenmiyordu.

### c. Moleküler Analiz Sonuçları

Etkilenmiş üç kardeşten, sağlıklı bir kardeşten ve anne babadan, DNA izolasyonu için periferik kan örnekleri alındı (Şekil 24'te sırasıyla, IV:8, IV:10, IV:16, IV:7, III:2 ve III:3)

LP sendromundan etkilenmiş olguların *ECM1* geni dizi analizinde, ekzon 7'de homozigot c.826delC (p.Gln276Serfs\*40) mutasyonu saptandı (Şekil 27).



Şekil 27. Aile LP06'da olguların *ECM1* geni parsiyel elektroferogramı

Daha önce literatürde tanımlanmış (371) c.826delC (p.Gln276Serfs\*40) anlamsız mutasyonu, 276. kodonda 'C' delesyonuna neden olmaktadır. Mutasyonun, bu kodonda şifrelenen 'glutamin' yerine 'serin'in geçmesine ve translasyonda çerçeve kayması sonucu devamındaki 40. kodonun 'dur' şifresine dönüşmesi ve protein trunkasyonuna yol açması beklenmektedir. Mutasyonun, asemptomatik kardeşte, anne ve babada heterozigot, etkilenmiş kardeşlerde homozigot olması otozomal resesif kalıtım modeli ile uyumlu idi.

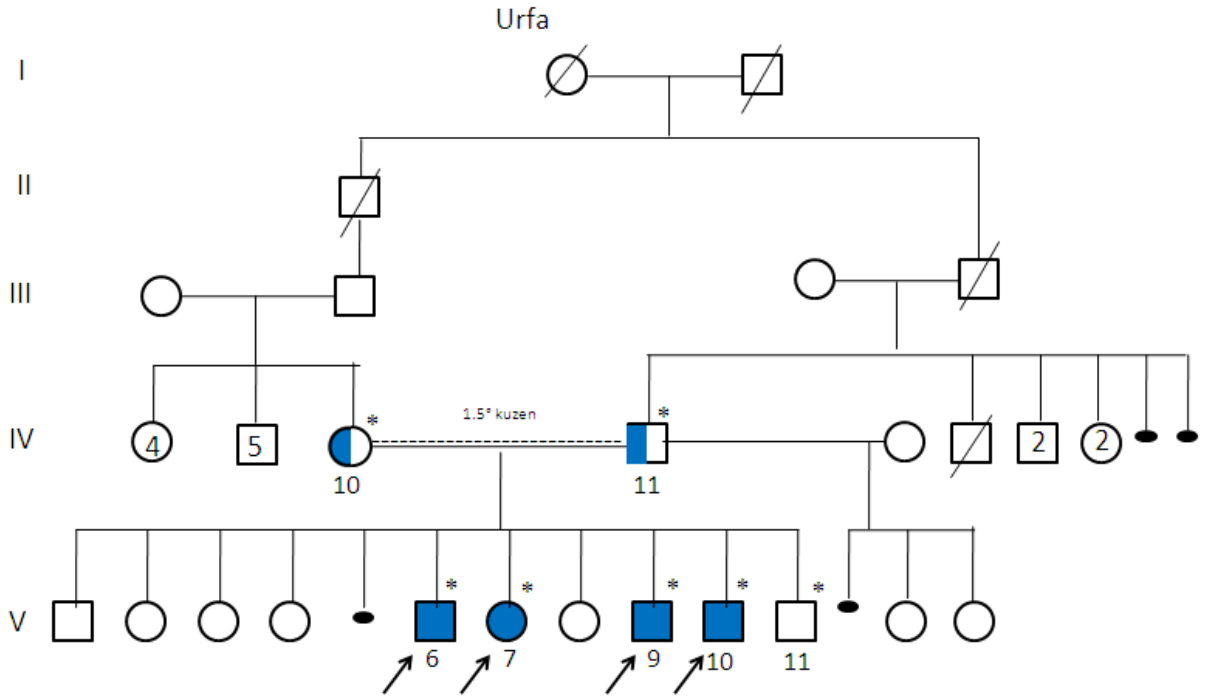
Olguların kardeşlerine olası LP taşıyıcılığını belirlemek için moleküler analiz önerildi. Sağlıklı kardeşlerin birinde, IV:7, LP taşıyıcılığı gösterildi, eşine de taşıyıcılık için *ECMI* geni dizi analizi önerildi.

## 7. Aile LP07

### a. Aile Öyküsü

Aralarında 1.5 derece kuzen evliliği olan anne baba yaşayan 10 çocuğundan dördünün lipoid proteinozis tanısı alması nedeniyle genetik danışma istemiyle polikliniğimize yönlendirildi.

Aile öyküsünde (G11P10Ab1) annenin beşinci gebeliği 3 aylık abortusla sonlanmış (Şekil 28).



Şekil 28. LP07'nin aile ağacı.

(\* DNA örneği için kan alınan bireyler)

**V:6**, 12 yaşındaki erkek olgunun antenatal öyküsünde özellik yoktu. Hastanede term, NSD ile doğmuş (boy ve kilo bilinmiyor). Bir yaşında ağız içinde yara, dudaklarda çatlama, dilde sertleşme fark edilmiş, sesi boğuklaşmış. 11 yaşındayken ağız ve ellerde sulu yaralar nedeniyle immünoloji servisinde yatarak tetkik edilen olguda C1 esteraz inhibitör, C3, C4 ve

immünglobulinler normal saptanmış. Ses kısıklığı, ağızda yara nedeniyle KBB polikliniğinde muayene edilen olguda dilde masere görünüm, orofarenks doğal denmiş. KBB’de endoskopik muayenede bilateral vokal kordlar hareketli, arytenoid ve vokal kordlar ödemli izlenmiş. Dermatolojide cilt biyopsisi yapılmış, papiller dermiste birçok odakta perivasküler geniş alanlar halinde eozinofilik, amorf görünümlü hiyalini madde birikimi, PAS boyasında bu birikimlerin pozitif reaksiyon gösterdiği saptanmış ve lipoid proteinoz ile uyumlu bulunmuş (İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi/2014). İlköğretim okulu 5. sınıfa gidiyormuş, dersleri çok iyiymiş. 10 yaşındayken kranial MR normal olarak değerlendirilmiş.

**V:7**, 8 yaşında dişi olgu, 5 yaşındayken KBB’ye horladığı ve gece nefes almakta zorlandığı için götürülmüş, vokal kordlardan parça alınmış ancak fayda sağlamamış.

**V:10**,3.5 yaşındaki olgunun kranial BT görüntülemesi normal izlenmiş.

#### **b. Fizik Muayene Bulguları**

**V:6**, 12 yaşındaki erkek olguda (boy: 138 cm, ağırlık: 28.5 kg, baş çevresi: 51 cm), boğuk ses, yüzde akne benzeri lezyonlar, kirpik diplerinde moniliform papüller, dilde dilaltı frenulumda kalınlaşma, kurududaklar, tüm vücutta atrofik lezyonlar, dirsek ve dizlerde hiperkeratozis (Şekil 29) gözlemlendi.

**V:7**, 8 yaşında dişi olguda (boy: 121 cm, ağırlık: 21 kg, baş çevresi: 50.2 cm), boğuk ses, yüzde akne benzeri lezyonlar, kirpik diplerinde moniliform papüller, alt dudak mukozasında, dilaltı frenulumda kalınlaşma, tüm vücutta değişik boyutlarda atrofik lezyonlar, dirsek ve dizlerde kalınlaşma mevcut olup ciltte kuruluk mevcuttu.

**V:9**, 5 yaşında erkek olguda, (boy: 113 cm, ağırlık: 18 kg, baş çevresi: 50 cm) yüzde akne benzeri lezyonlar, kirpik diplerinde moniliform papüller, alt dudak mukozasında, dilaltı frenulumda kalınlaşma, kuru dudaklar, tüm vücutta değişik boyutlarda hiperpigmente-atrofik lezyonlar gözlemlendi.

**V:10**,3.5 yaşında erkek olgunun (boy: 96 cm, ağırlık: 15.5 kg, baş çevresi: 49 cm) sesi boğuktu, kirpik diplerinde moniliform papüller mevcuttu. Bilateral aksesuar meme başı mevcuttu.



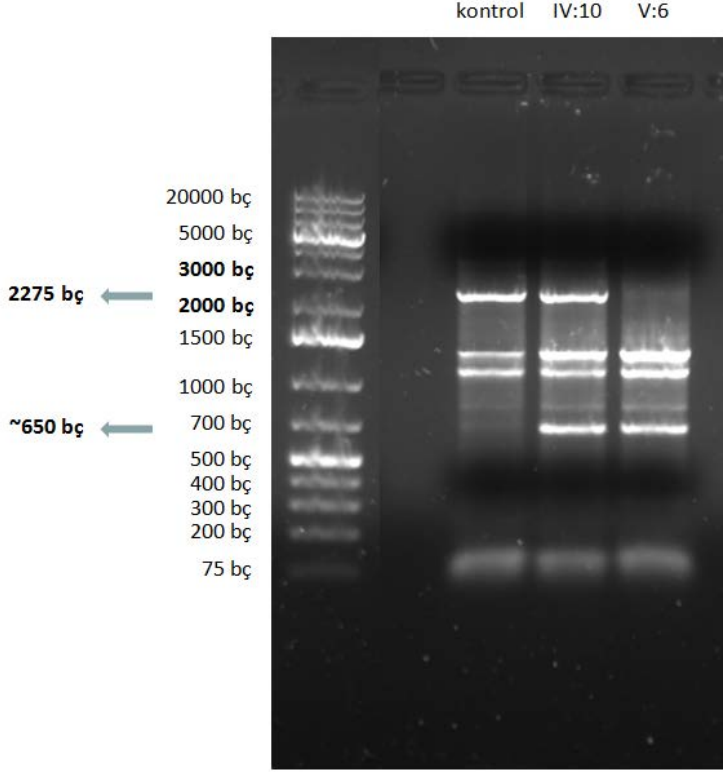
**Şekil 29.** Aile LP07’de etkilenmiş olgular

a olgu V:6’nın yüz ve kol görünümü, b olgu V:7’nin yüz, kol, diz ve el görünümü, c olgu V:9’un yüz ve el görünümü ve d olgu V:10’un yüz, aksilla, dirsek, el görünümü

### c. Moleküler Analiz Sonuçları

LP’ten etkilenmiş dört kardeşten, sağlıklı kardeşten ve anne babadan DNA eldesi için kan örnekleri alındı (Şekil 28, sırasıyla V:6, V:7, V:9, V:10, V:11, IV:10, IV:11) Etkilenmiş olgulardan V:6’da ekzon 8 ve 9 için herhangi bir amplifikasyon ürünü elde edilemedi, amplifiye edilebilen ekzon 1-7 ve ekzon 10 da dizi analizinde mutasyon saptanmadı. Sağlıklı kontrol, anne (IV:10) ve etkilenmiş olgu (V:6) DNA’ları ve F3-1/R5 primerleri ile, 2275 bp büyüklüğündeki ekzon 7-10’u kapsayan ampikon oluşturmak üzere PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR ürünleri % 1.2’lik agaroz jelde görüntülendi. Sağlıklı kontrolde 2275 bp büyüklüğünde bir ampikon, taşıyıcı olan annede 2275 bp ve yaklaşık 650 bp büyüklüğünde iki ampikon ve etkilenmiş olguda (V:6) yaklaşık 650 bp büyüklüğünde bir ampikon elde

edildi. Anne ve olguda her iki örnekte de özgün olmayan ek farklı bantlar olduğu gözlemlendi (Şekil 30). Multipl bantların varlığı nedeniyle dizi analizi aşamasına geçilmedi ancak bu bant paterni klinik ile uyumlu gözükmekteydi. Birçok farklı PZR koşulu denenmesine karşın, hiçbir çalışmada temiz arka planı olan bir bant tablosu elde edilemedi.

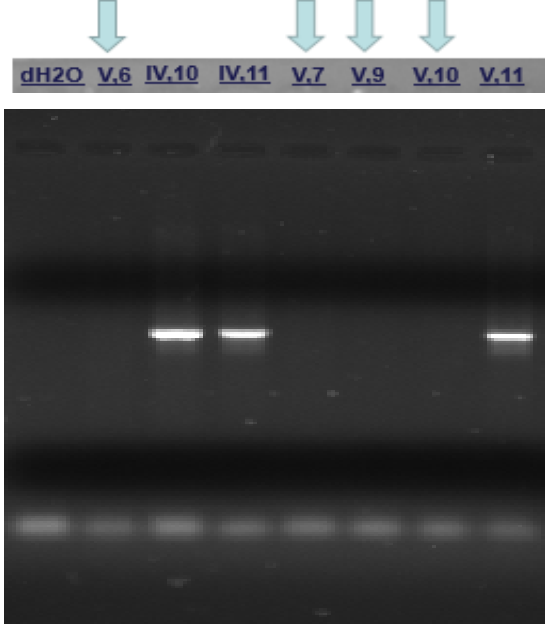


Şekil 30. Aile LP07’de F3-1/R5 primerleri kullanılarak yapılan PCR görüntüleri

Ekzon 8-10’u kapsayan F4/R5 primerleriyle yapılan incelemelerde sağlıklı bireylerde ürün elde edilebilirken, etkilenmiş olgulara ait DNA örneklerinden ürün elde edilemedi.

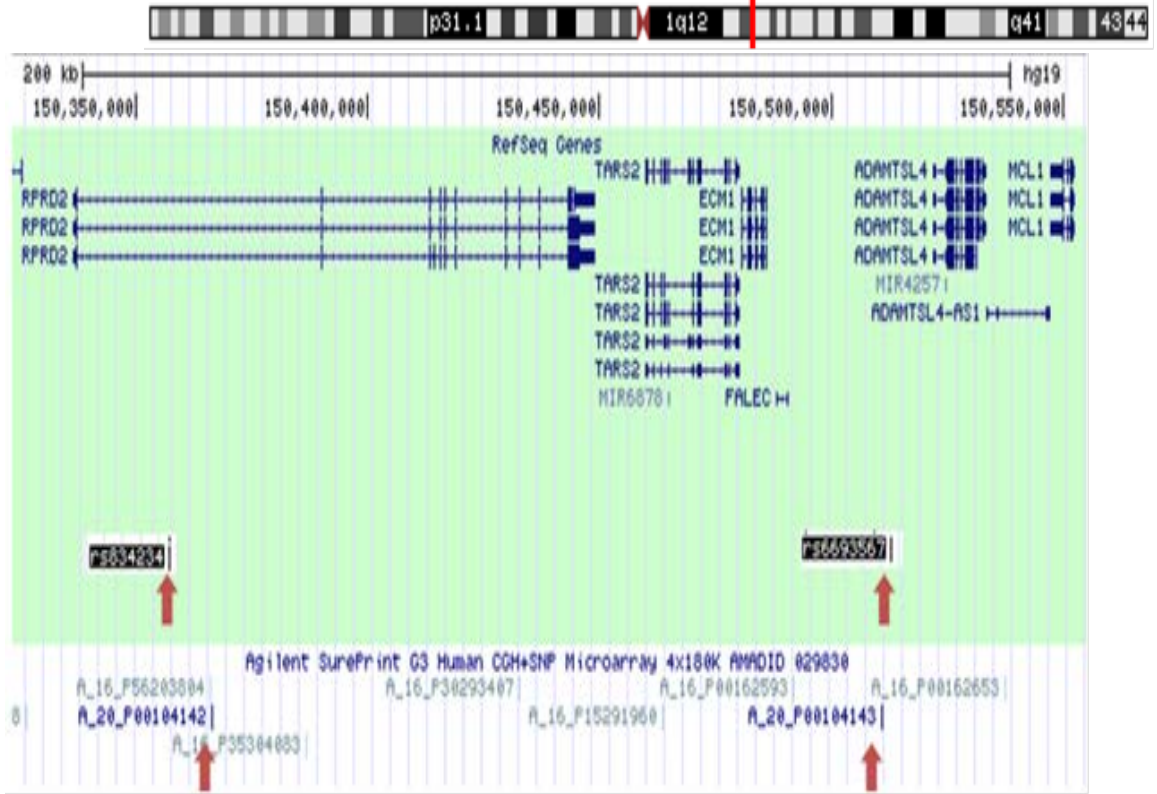
İndeksin babasında (IV:11) yapılan PCR ve dizi analizinde mutasyon saptanmadı. Etkilenmiş olgularda ekzon 8-9’un çoğaltılamaması, ebeveynlerde mutasyonlu allelin çoğaltılamadığını (allel drop) lehine yorumlandı. Bölgeyi daha detaylı incelemek için intron 7-intron 9 bölgesini kapsayan yeni bir çift primer tasarlandı (F6/R6). F6 primeri R3’ün 5’ bölgesine, R6 primeri F5’ün 3’ bölgesine konuşturularak, daha önce ürün sağlanabilen ve dizi analizi ile okunabilen bölgelerde olmasına dikkat edildi. Bu primerlerle anne (IV:10), baba (IV:11), etkilenmiş olgular (V:6), (V:7), (V:9), (V:10) ve sağlıklı kardeş (V:11) DNA örnekleri ile PZR gerçekleştirildi. PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi, etkilenmiş dört olguda da ürün elde edilemezken, anne, baba ve sağlıklı kardeş (V:11)’de

amplikon elde edildi (Şekil 31). Amplikon oluşan ürünlerden birinde, gerçekleştirilen dizi analizinde (IV:10) mutasyon saptanmadı ve bu örnekte yalnızca normal allelin ürün verdiği ve dizilendiği düşünüldü.



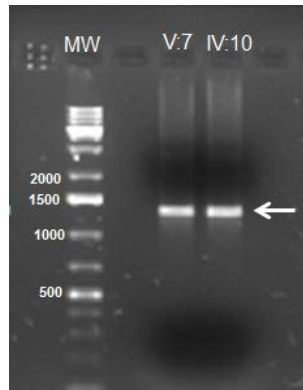
Şekil 31. F6/R6 primer çifti ile elde edilen PCR görüntüsü

Olgularda ekzon 8 ve ekzon 9'u kapsayan olası bir delesyon varlığı düşünülerek *array*-CGH ile inceleme yapılması planlandı ancak İTF, Tıbbi Genetik AD'nın Genetik Laboratuvarında kullanılan Agilent SurePrint G3 Human CGH+SNP Microarray 4X180 K kitinde bölgeye en yakın CNV ve SNP'lerin 150,366,469'da yer alan ve 5' gen dışı bölgede bulunan A\_20\_P00104142 ve rs834234 ile 150,510,660'da yer alan, 3' gen dışı bölgede yer alan A\_20\_P00104143 ve rs6693567 olduğu saptanarak, *ECMI* geninde ekzon 8-9 bölgesinde olası bir delesyonun varlığını gösteremeyeceği için, bu tekniğin uygulanmasından uzaklaşıldı (Şekil 32).



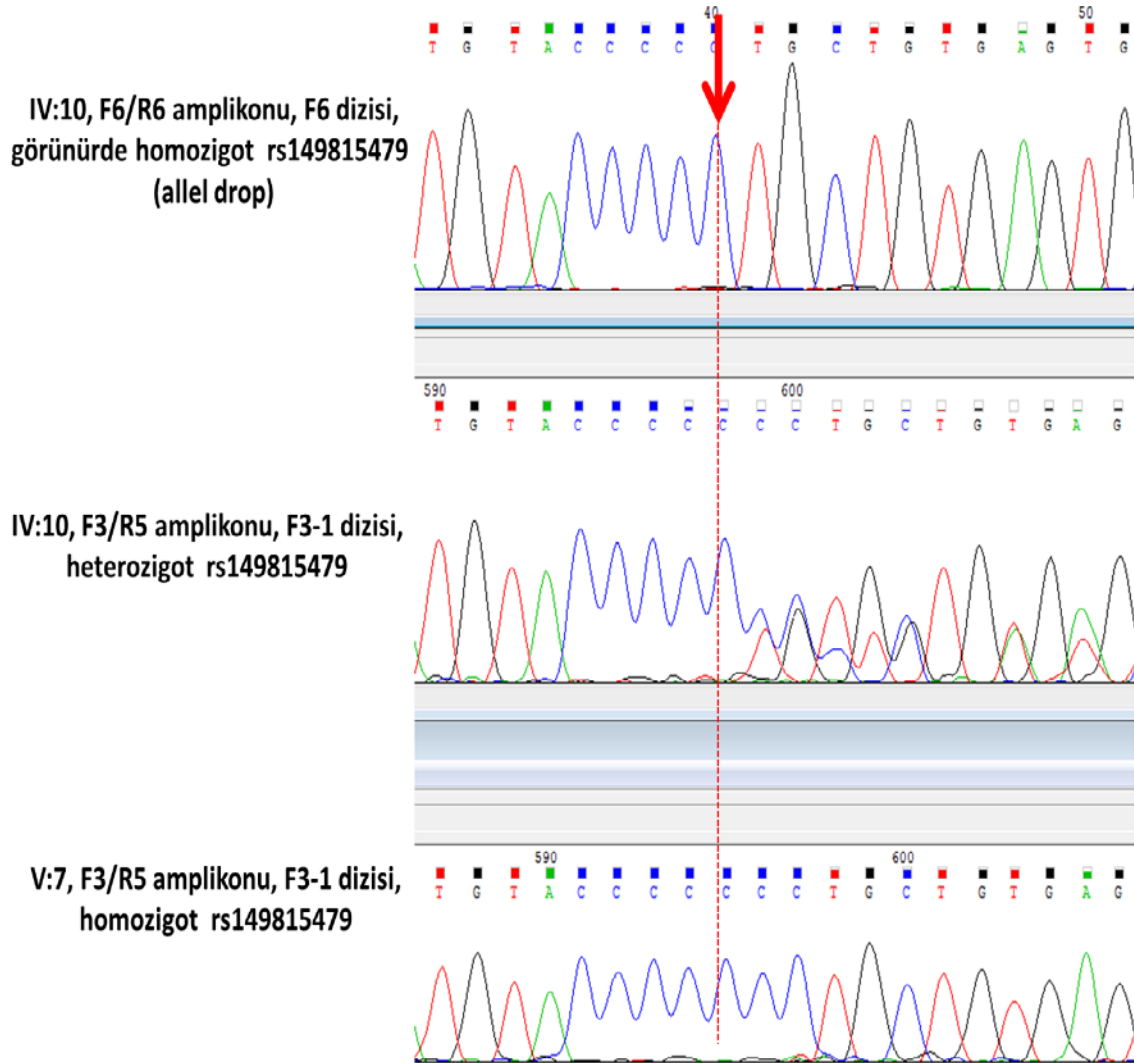
Şekil 32. *ECM1* geni ve array-CGH problemleri

Bölgeyi daha geniş bir biçimde kaplayacak yeni bir PZR tasarlandı. Bu reaksiyonda F3 (intron 5) ve R5 (3'UTR) primer çifti kullanılarak, anne (IV:10) ve bir etkilenmiş olguda (V:7) PZR yapıldı. *In silico* PZR analizine göre bu bölgeden 2908 bp'lik bir ürün elde edilmesi öngörüldü. Agaroz jel elektroforezinde 1kb'lik merdiven (Fermentas) eşliğinde koşturulan örneklerden ~1350 bp'lik bir ürün elde edildiği gözlemlendi (Şekil 33).



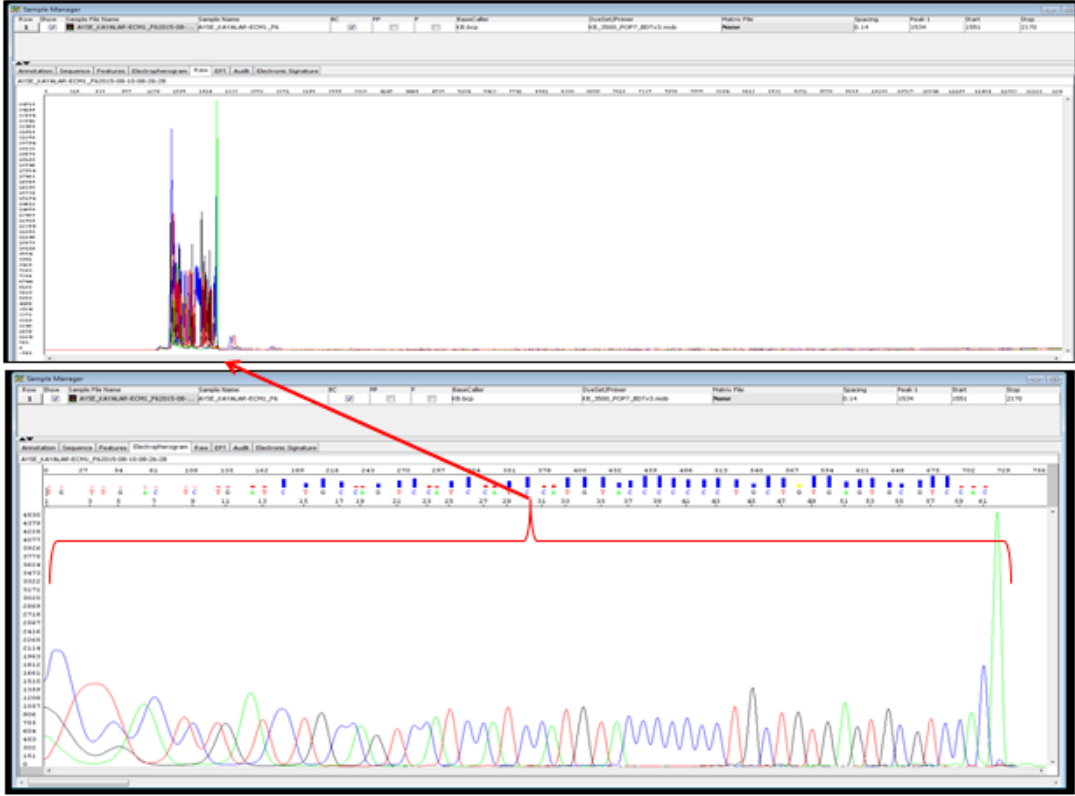
Şekil 33. V:7 ve IV:10 örneklerinin F3/R5 amplikonları (agaroz jel elektroforezinde merdiven eşliğinde gösterilmektedir)

Bu ürün her iki örnekte F3-1 (intron 6) primeri ile dizilendi. IV:10 örneğinde intron 7'de heterozigot, V:7'de homozigot bir *indel* polimorfizmi (rs149815479, c.1083+89\_1083+90delCC)bulunduğu saptandı.Bu polimorfizm, daha önce IV:10'da F6/R6 primer çifti ile yapılan amplikon ürününde yapılan dizide gösterilememişti. Bu durum, anne-babada yapılan ekzon 8-9 PZR'lerinde sadece normal allelin çoğaltıldığını ve dizilendiğini kanıtlamış oldu (Şekil 34).



**Şekil 34.** IV:10, V:7 örneklerinde F6/R6 ve F3/R5 amplikonlarının elektroferogram görüntüleri

F3/R5 ampliconlarından elde edilen ürünler, F3-1 dizisinden sonra, dizilenen bölgede ilerleyerek sorunlu bölgeye ulaşılmaya çalışıldı. Ancak her iki örnekte de (IV:10, V:7) dizi reaksiyonunun kesildiği ve ilerleyemediği görüldü (Şekil 35).



**Şekil 35.** V:7'nin F3/R5 ampliconunda F6 dizi reaksiyonu ham ve analiz edilmiş elektroferogramı

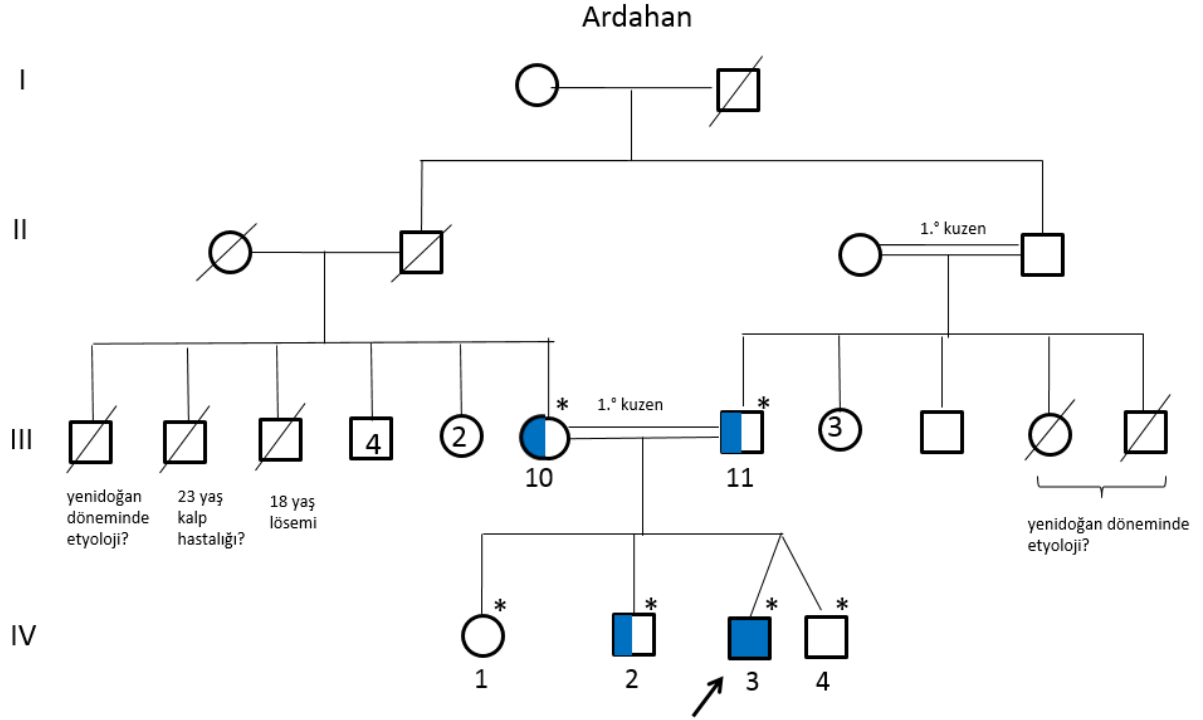
Bu durum, etkilenmiş olgularımızda olası bir inversiyon, duplikasyon, delesyon, indel ya da palindromik bir oluşum nedeniyle saç tokası gibi (*hair pin*) güçlü bir sekonder yapının dizileme reaksiyonuna engel teşkil ettiğini düşündürdü. Bu ampliconda reverse yerleşimli primerlerden (R5, R4 ve R6) herhangi bir başarılı dizi reaksiyonu da elde edilemedi. İlk aşamada V:7 ve IV:10'de istenen bant boylarından (2908 bç) daha küçük bant boylarında (~1350 bç) ürün elde edildiği de gözönünde tutularak, bir sonraki aşamada, F3/R5 ampliconunu kalıp (template) olarak kullanarak, bu bölgedeki farklı diğer primerler ile yeni PZR reaksiyonları yapılması ve dizilenmesi planlandı.

## 8. Aile LP08

### a. Aile Öyküsü

Aralarında 1. derece kuzen evliliği olan anne ve babanın üçüncü gebelikten ikiz eşi 8 yaş 10 aylık erkek olgu, lipoid proteinozis tanısıyla takip edilirken moleküler analiz istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Aile öyküsünde (G3P4) olgumuzun iki kardeşi ve ikiz eşi sağlıklı (çift yumurta ikizi). Ailede benzer olgu tariflenmiyor (Şekil 36).



Şekil 36. LP08'in aile ağacı

\* DNA örneği için kan alınan bireyler

Olgunun antenatal öyküsünde özellik yoktu ve 36 GH'nda sezaryen ile 2750 g ağırlığında doğmuştu. İkiz eşinin de 2750 g ağırlığında olduğu bilgisi alındı. Doğum boyu ve baş çevresi bilinmiyordu. Solunum sıkıntısı nedeniyle, ikizlerin bir hafta küvözde takip edildiği ve ikiz eşinin durumunun yenidoğan döneminde daha iyi olduğu bilgisi alındı. Olgu beş aylıkken desteksiz oturmuş, 9 aylıkken sıralanmış, 1 yaşında yürümüş, 2 yaşında tuvalet eğitimi almış, nöromotor gelişimi ikiziyle benzer imiş. Olgunun ilkokul 3. sınıfa gittiği ve ders başarısının iyi olduğu bildirildi.

Bir aylıkken sesi tamamen kısalmış, çok sayıda doktora başvurmuşlar, zamanla geçeceği söylenmiş. Bir yaşından sonra kollarında, sırtında oluşan büller yapılar, kabuklu lezyonlara dönüşmüş. İki yaşında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi çocuk onkolojisinde çene altı lenf bezinde büyüme nedeniyle araştırılırken cilt biyopsisi yapılmış ve LP tanısı almış. Deltacortril 1-2 ay kullanmış, fayda görmemiş. Yılda bir, iki yılda bir dilde şişlik, yüksek ateş şikayeti oluyormuş, hastanede yatarak antibiyotik tedavisi alıyormuş.

Altı yaşında ayakları şişmiş hastaneye başvurmuşlar, oligüri, hiper tansiyon saptanmış, nefrolojik değerlendirmede böbreküstü bezinde kalsifikasyon saptanmış ve endokrinolojiye yönlendirilmiş. Bir yıldır ses terapisi alıyormuş. Dermatoloji ve KBB Neostigmin kapsül başlamış, 2 aydır kullanıyormuş. Göğüs hastalıkları Singulair tb başlamış, 4-5 aydır kullanıyormuş. Nörolojik ve psikiyatrik sorun tariflenmiyor.

### **b. Fizik Muayene Bulguları**

Olguda tüm vücutta çoğu hipopigmente atrofik skarlar, birkaç eritemli-kabuklu lezyon, saçlı deride lezyon yerlerinde alopesi alanları, kirpik diplerinde papüller (hafif), dilde, dilaltı frenulumda, alt dudak mukozasında kalınlaşma-sarımsı lezyonlar, kuru ve çatlak dudaklar, diz ve dirseklerde hiperkeratozis, parmak dorsallerinde deride kalınlaşma mevcuttu (Şekil 37). Olgunun sesi belirgin olarak boğuktu.



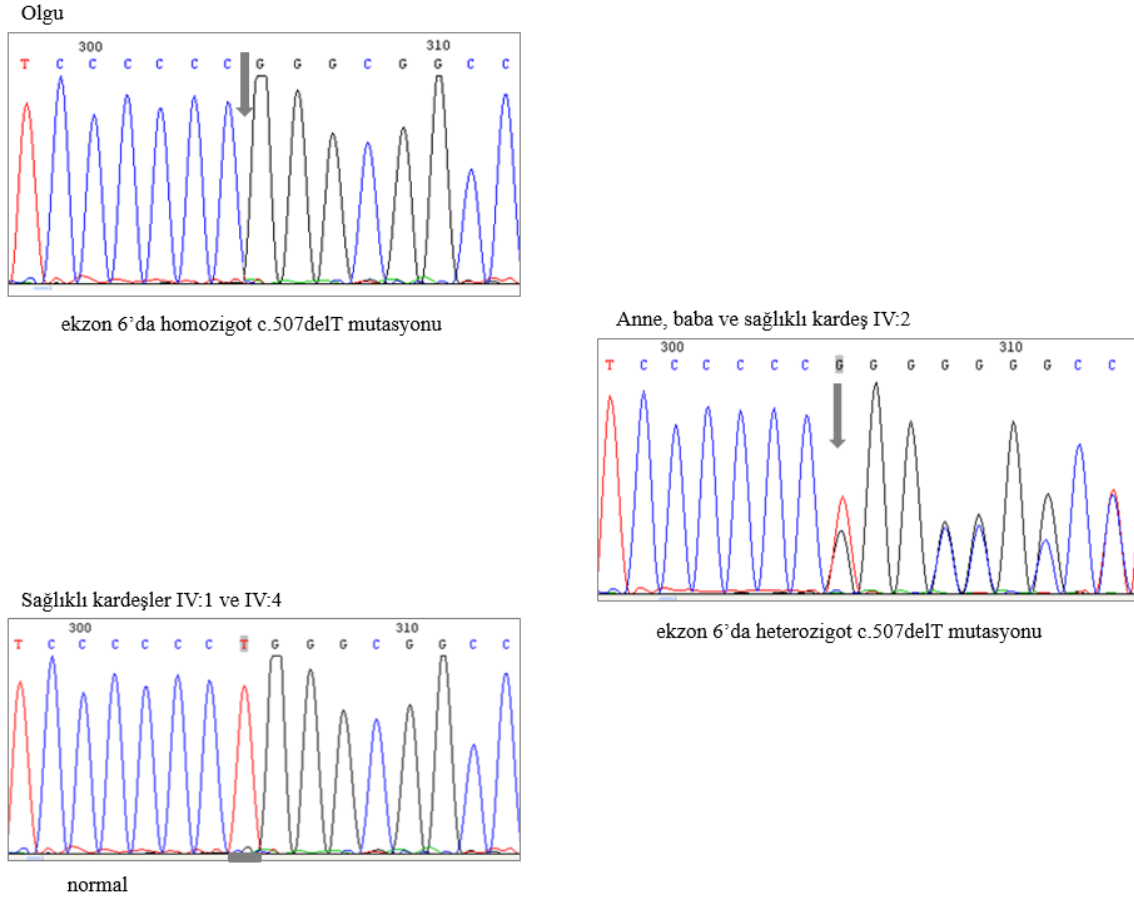
**Şekil 37.** Aile LP08'deki etkilenmiş olgu (9 yaş)

### c. Moleküler Analiz Sonuçları

Cilt ve mukoza bulguları LP ile uyumlu olan olgudan, sağlıklı ikizinden, sağlıklı kardeşlerinden, anne ve babadan DNA eldesi için kan örnekleri alındı (Şekil 36'da sırasıyla IV:3, IV:4, IV:1, IV:2, KIII:10 ve III:11)

Olguda *ECM1* geni dizi analizi ile literatürde tanımlanmış (47) ekzon 6'da homozigot c.507delT saptandı (Şekil 38).

Anne, baba ve sağlıklı kardeşlerden IV:2'nin bu mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı, sağlıklı kardeşlerden IV:1 ve ikiz kardeşinin IV:4 ise bu mutasyonu taşımadığı gösterildi.



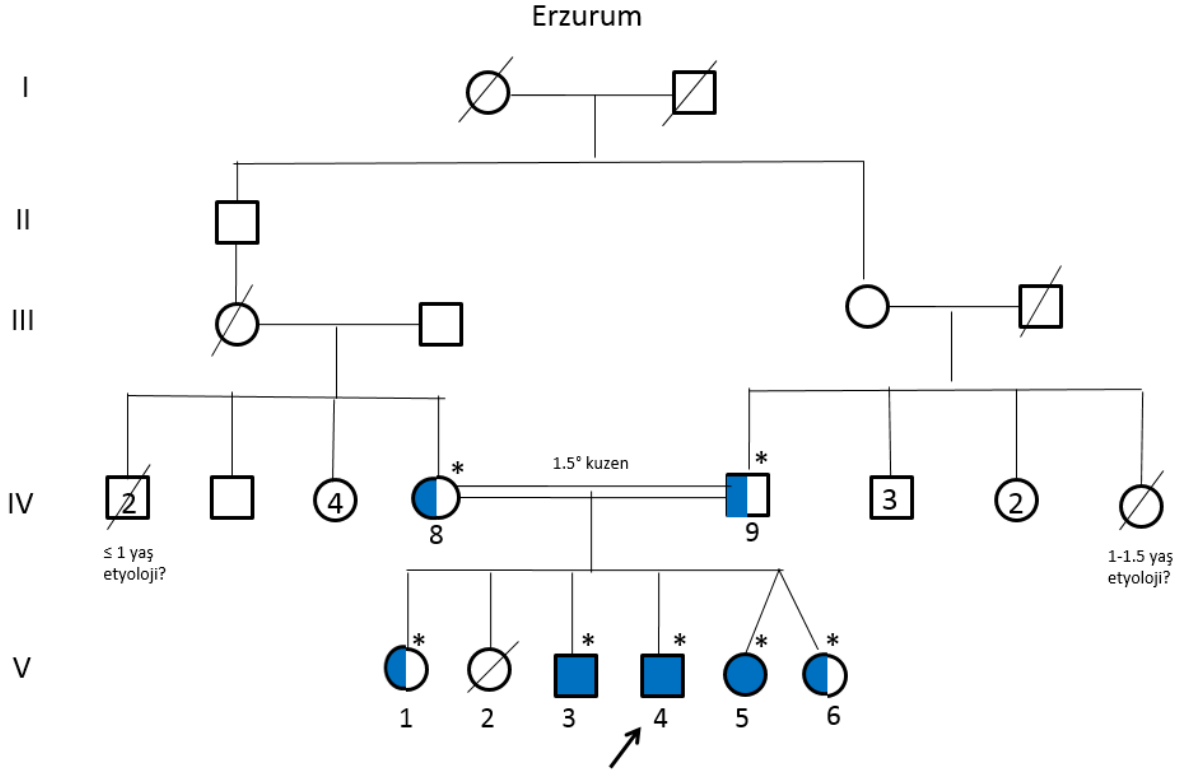
Şekil 38. Aile LP08'de *ECM1* geni parsiyel elektroferogramları

## 9. Aile LP09

### a. Aile Öyküsü

LP tanılı üç çocuğu olan, aralarında 1.5 derece kuzen evliliği olan anne-baba genetik danışma istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Ailenin (G5P6, canlı 5) ikinci çocuğu 6 aylıkken kaybedilmiş, ölüm nedeni bilinmiyor. 17<sup>6/12</sup> yaşındaki olgunun (V:4) cilt bulguları daha hafif ve nörolojik bulguları olmayan 19 yaşında bir abisi (V:3) ve 12 yaşında bir kız kardeşi (V:5) mevcuttu (Şekil 39).



Şekil 39. LP09'un aile ağacı

\* DNA eldesi için kan örneği alınan bireyler

17<sup>6/12</sup> yaşındaki olgunun antenatal ve natal öyküsünde özellik yoktu. 1.5 yaşında ağızda, yüzünde yaralar oluşmaya başlamış, sesinde boğukluk fark edilmiş. 2 yaşında yürümüş (LP'li diğer kardeşleri ise daha erken yürümüş, onların dersleri daha iyiymiş). Konuşmasının beklenen zamanda olduğu ifade ediliyor. 1. sınıfta okuma-yazma öğrenmiş. Lise 3'e gidiyormuş, açık lisede okuyormuş. Lise 1'de sınıfta kalmış.

13 yaşında deri biyopsisinin patolojik incelemesinde epidermiste incelme, üst dermisi band tarzında dolduran eozinofilik materyal izlenmiş. Histokimyasal incelemede eozinofilik materyal PAS ile pozitif, diyastaza rezistan boyanmış, LP ile uyumlu bulunmuş(Haseki EAH/2010). Kranial BT’de bilateral amigdala lokalizasyonunda simetrik kalsifikasyon izlenmiş. Kranial MR’da bilateral amigdala lokalizasyonunda T1A hiperintens sinyal değişiklikleri izlenmiş. EKO normal bulunmuş. KBB muayenesinde vokal kordlar normal, epiglot mukozasında tutulum izlenmiş. Göz muayenesinde kirpik diplerinde papüller, fundusta papilla hafif kabarık saptanmış, görme bilateral tammış. Olgunun agresif ve hiçbir şeyden korkmayan bir kişilik yapısında olduğu, yalnız kaldığında kendi kendine güldüğü, yanına birinin geldiğini fark edince gülmeyi kestiği belirtildi. Absans benzeri dalmaları oluyormuş. Cilt lezyonları nedeniyle toplum içine fazla girmiyormuş. Bazı günler kimseyle konuşmuyormuş. Etkilenmiş diğer iki kardeşte nörolojik bulgu ve davranış problemi tariflenmedi.

#### **b. Fizik Muayene Bulguları**

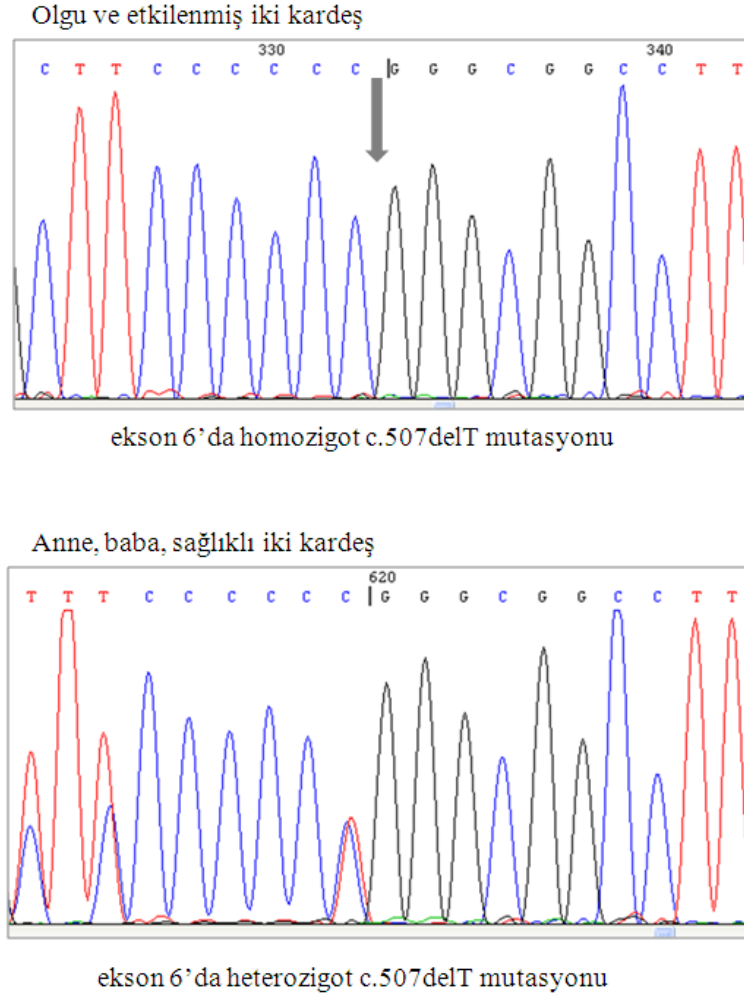
17 yaş 6 aylık erkek olguda, yüzde boyunda yer yer retiküler, yer yer birleşip plak yapısı oluşturan, sarı papül ve plaklar, gövde ve ekstremitelerde lineer ve oval şekilli atrofik görünümlü lezyonlar, bilateral dirseklerde verrüköz lezyonlar, kirpik diplerinde dizilmiş papüller, seyrek saçlar mevcuttu.

Cilt, mukoza bulguları, bilateral amigdala kalsifikasyonu ve nöropsikiyatrik bulgular ile olgumuz LP ile uyumlu bulundu.

#### **c. Moleküler Analiz Sonuçları**

Olgudan, iki etkilenmiş kardeşinden, etkilenmemiş kardeşlerinden, anne ve babasından kan örnekleri alındı (Şekil 39, sırasıyla V:4, V:3, V:5, V:1, V:6, IV:8 ve IV:9).

Ailedeki etkilenmiş olguların hepsinde *ECMI* geni ekzon 6’da literatürde tanımlanmış (47) homozigot c.507delT (p.R171Gfs\*7) mutasyonu (Şekil 40) saptandı. Anne, baba ve sağlıklı iki kardeşin bu mutasyonu heterozigot olarak taşıdıkları gösterildi.



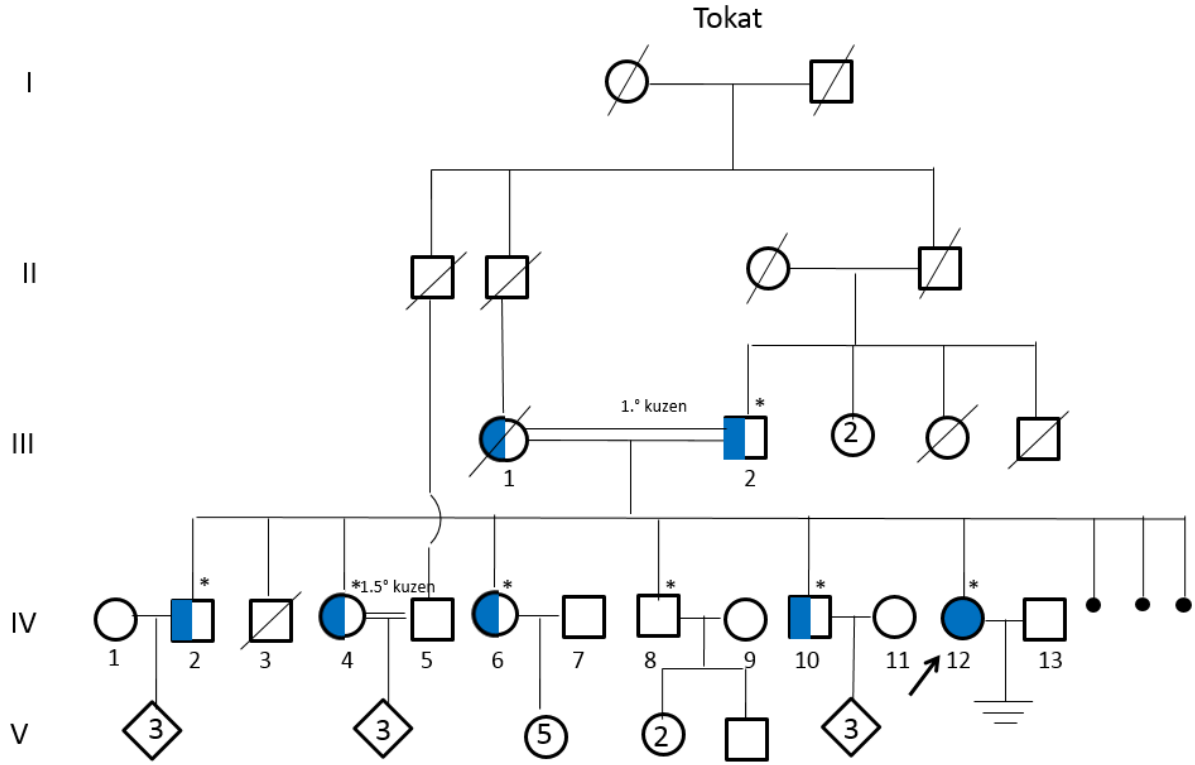
Şekil 40. Aile LP09'da *ECM1* parsiyel elektroferogram görüntüsü

## 10. Aile LP10

### a. Aile Öyküsü

Aralarında 1. derece kuzen evliliği olan anne babanın yaşayan 6. çocukları olan lipoid proteinozis tanılı 35 yaşındaki dişi olgu, genetik danışma istemiyle polikliniğimize başvurdu.

Aile öyküsünde (G10P7Ab3) LP'den etkilenmiş başka olgu tariflenmiyordu(Şekil 41).



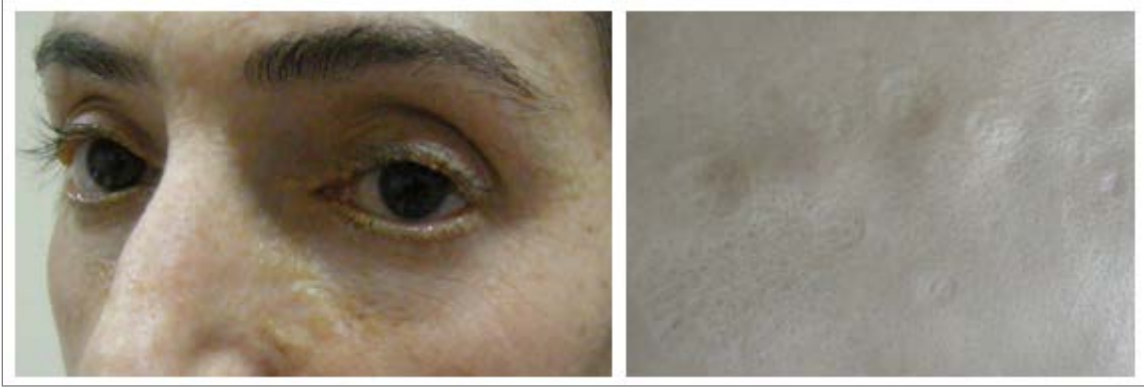
Şekil 41. LP10'un aile ağacı

\* DNA eldesi için kan örneği alınan bireyler

Olgumuzun antenatal ve natal öyküsünde özellik yoktu. 3 yaşından beri yüzde kabarıklıklar, dilde yaralar, ses kısıklığı şikayetiyle farklı merkezlerde araştırılmış, tanı konulamamıştı. 35 yaşında LP ön tanısıyla deri biyopsisinde, üst retiküler dermiste amorf eozinofilik proteinöz madde birikimleri, yer yer alt retiküler dermiste küçük damar duvarlarının ve ekrin glandların bazalinde eozinofilik proteinöz kalınlaşma alanları görülmüş. Bu birikimler PAS+, diyastaz rezistan boyanmış. Histopatolojik ve histokimyasal bulgular LP ile uyumlu saptanmış(Haydarpaşa Numune EAH/2014). 3 yaşından sonra her iki kulak zarı perfore olmuş, kulaklarda kısmi işitme kaybı mevcutmuş, sağ kulakta işitme cihazı kullanıyormuş. Kabızlık şikayeti nedeniyle pankreas enzimlerini içeren Pankreoflat ve barsakların fizyolojik hareketliliğini düzenleyen Debridat kullanıyormuş. 35 yaşında nörolojik muayenesi normal olan olgunun, kraniyal MR ve kraniyum grafisi normal sonuçlanmış. İlkokul 5. sınıf terk olgu, okuma-yazmayı ilk sene öğrenmiş. Temizlik işinde çalışıyormuş. KBB muayenesi sonucunda antireflü tedavi verilmiş, ses terapisi önerilmiş.

### b. Fizik Muayene Bulguları

35 yaşındaki (160 cm boyunda, 45 kg ağırlığında) dişi olguda, boğuk ses, yüzde sarı papüller, ciltte kabalaşma, alında ve perioral bölgede kırışıklıklarda artış, kirpik diplerinde tesbih tanesi gibi dizilmiş papüller, dilde kalınlaşma ve çok sayıda fissür mevcuttu. Vücutta atrofik skarlar, sol omuz posteriorda yaklaşık 2-3 cm hiperpigmente leke, dirseklerde hiperkeratozis mevcuttu. (Şekil 42)



**Şekil 42.** Aile LP10'da etkilenmiş olgu

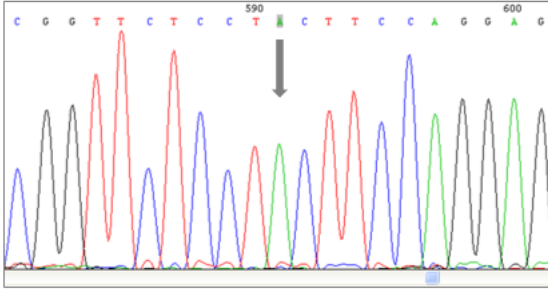
(35 yaş) yüzde ve kirpik diplerinde dizilmiş sarı papüller, sırtta atrofik skarlar

### c. Moleküler Analiz Sonuçları

Olgudan, sağlıklı dört kardeşinden ve babasından *ECMI* geni moleküler analizi için kan örnekleri alındı. (Şekil 41'de sırasıya, IV:12, IV:2, IV:4, IV:6, IV, IV:8, IV:10, ve III:2) Olguda *ECMI* geni ekzon 7'de daha önce tanımlanmış (74) homozigot c.806G>A (p.C269Y) mutasyonu saptandı (Şekil 43). Babanın, sağlıklı kardeşlerden IV:2, IV:4, IV:6, IV:10'un mutasyonu heterozigot olarak taşıdıkları, IV:8'in ise mutasyonu taşımadığı belirlendi.

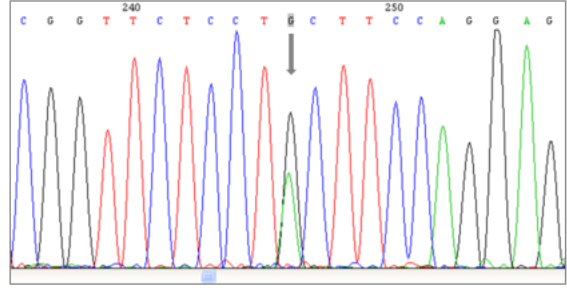
LP için taşıyıcı olduğu belirlenen IV:4, akraba evliliği yapmış olduğu eşinin taşıyıcılık ön riski 1/8 idi ve eşine moleküler analiz önerildi.

Olgu IV:12



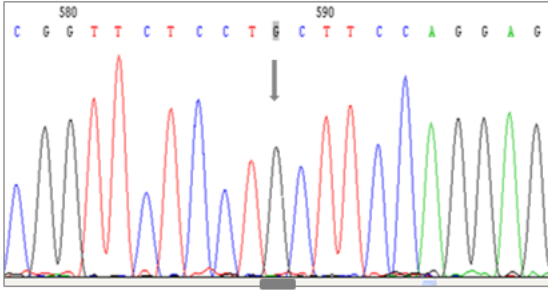
ekzon 7'de homozigot c.806G>A mutasyonu

Baba, sağlıklı kardeşlerden III:2, IV:2, IV:4, IV:6, IV:10



ekzon 7'de heterozigot c.806G>A mutasyonu

Sağlıklı kardeş IV:8



Şekil 43. Aile LP10 *ECM1* geni parsiyel elektroferogramı

## V. SONUÇ

LP tanılı 10 aileden 15 olgunun, klinik bulguları, cildin histopatolojik bulguları, nöroradyolojik bulguları ve moleküler analiz sonuçları değerlendirildi ve olası genotip fenotip ilişkisinin varlığı araştırıldı. Tüm olgularda cilt ve mukoza tutulumu bulguları; akneiform ve/veya atrofik lezyonlar, kirpik diplerinde papüller, dilde, dudak mukozasında kalınlaşma, laringeal infiltrasyon nedeniyle oluşan boğuk ses, diz ve dirsek cildinde kalınlaşma görüldü. Aksilla, dirsek veya dizlerde verrüköz lezyonlar 15 olgunun 11'inde (%73) mevcuttu. Sekiz aileden etkilenmiş sekiz olguya cilt biyopsisi yapılmış ve histopatolojik bulgular LP ile uyumlu bulunmuştu. Saç diplerindeki lezyonlar iki olguda yamalı alopesiye neden olmuştu. Nörolojik ve/veya nöropsikiyatrik bulgular 15 olgunun beşinde (%33) gözlendi. Nörolojik ve/veya nöropsikiyatrik bulguları olan beş olguda beyin BT/MR görüntülemelerinde kalsifikasyon gözlenirken, bulgu gözlenmeyen 10 olgunun altısının beyin BT veya MR görüntülemelerinde intrakraniyal kalsifikasyon lehine bulgu yoktu. İntrakraniyal kalsifikasyonu olan olguların tümünde konvülziyon ve/veya episodik absans benzeri dalma mevcutken, problem çözme ve planlama gibi yönetsel fonksiyonlarda bozulma, hafıza kaybı, agresif davranış beş olgunun dördünde, paranoya/halüsinasyon ve korku kaybı beş olgunun üçünde mevcuttu (Tablo 1).

Çalışmaya alınan 10 ailenin dokuzunda LP ile ilişkili bir yanlış anlamlı mutasyon, bir anlamsız mutasyon, iki RNA splicing mutasyonu, üçü delesyon biri insersiyon olmak üzere dört çerçeve kayması mutasyonu toplam 8 farklı mutasyon saptandı. Bu mutasyonların üçü (c.709-2A>G, c.1305-2G>A, c.1411\_1412insAT) daha önce literatürde bildirilmemişti. Bir ailede (LP07) ekzon 8 ve ekzon 9 bölgesinde PCR ürünü eldesi aşamasında sorun yaşandı. Yeni primerler tasarlanarak bu bölgenin amplifikasyonunun sağlanması planlandı.

Tüm ailelere LP'nin otozomal çekinik geçişli bir sendrom olduğu, homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyon taşıyanların sendromdan etkilendiği, sağlıklı anne ve babanın heterozigot olarak mutasyon taşıdığı belirtildi. Taşıyıcı çiftlerin her gebelikte sendromdan etkilenmiş çocuk doğurma riskinin %25 olduğu bildirildi. LP'ye neden olan mutasyonun saptandığı ailelerde prenatal tanının olası olduğu anlatıldı.

**Tablo 1.** Olguların klinik bulguları ve moleküler analiz sonuçlarının özeti

	Aile	LP01	LP02	LP03	LP04	LP05	LP06			LP07				LP08	LP09	LP10	%
							6	7	8	9	10	11	12				
	Olgu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
	Akrabalık	+	+	+	+	-	+			+				+	+	+	9/10
	Yaş (fizik muayene)	7	24	39	21	31	34	33	22	12	8	5	3	9	17	35	
	Cinsiyet	E	E	K	K	E	K	E	K	E	K	E	E	E	E	K	6K/9E
Cilt ve mukozal bulguları	Akneiform /atrofik lezyonlar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15/15
	Kirpik diplerinde papüller	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15/15
	Dilde / dudak mukozasında kalınlaşma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15/15
	Boğuk ses	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15/15
	Dirseklerde /dizlerde kalınlaşmış cilt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15/15
	Verrüköz lezyonlar	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	11/15
	Yamalı alopesi	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	Cilt biyopsi materyalinde hiyalin birikimi	+	+	+	?	?	+	?	?	+	?	?	?	+	+	+	8/8
Nörolojik, nöropsikiyatrik bulgular	İntrakranial kalsifikasyon	-	-	+	-	+	?	+	+	-	?	?	-	?	+	-	5/11
	Konvülsiyon	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	5/15
	Hafıza kaybı	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	4/15
	Yönetmel fonksiyonlarda bozulma	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	4/15
	Paranoya/halüsinasyon	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3/15
	Agresif davranış	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	4/15
	Korku kaybı	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3/15
	<i>ECMI</i> mutasyonu	2G>Ac.1441C>T c.1305-	c.1305-2G>A c.1305-2G>A	c.735_736delTTG c.735_736delTTG c.735_736delTTG	c.735_736delTTG c.735_736delTTG	c.709-2A>G c.1411_1412msAT	c.826delC c.826delC							c.507delT c.507delT	c.507delT c.507delT	c.806G>A c.806G>A	

?:bilinmiyor

## VI. TARTIŞMA

Lipoid proteinozis, deri ve mukoza lezyonları, intraserebral kalsifikasyonlar, nörolojik ve nöropsikiyatrik bulgularla karakterize, OR kalıtılan nadir bir sendromdur (1-4). Laringeal infiltrasyon nedeniyle boğuk ses ve kirpik diplerinde sıralanmış papüller, sendromun karakteristik bulgularıdır (3,10). Klinik bulguları değişken olmakla birlikte, genellikle yenidoğan döneminde ses kısıklığı ile başlar (3). Göz kapakları kenarında yerleşen papüller, akneiform skarlar ve siğil benzeri papül ve plaklar gibi çeşitli deri belirtileri çocukluk döneminde ortaya çıkar (3).

Hamada ve ark. (2002) LP ile ilişkilendirilen tek gen olan *ECMI* genini tanımlamışlardır (46). Kromozom 1q21.2'de lokalize olan *ECMI* geni 10 ekzonludur. LP'li olgularda, *ECMI*'deki mutasyonların genelde ekzon 6 ve ekzon 7'de olduğu ve ekzon 7 dışındaki mutasyonların daha ağır mukokutanöz LP fenotipine neden olabileceği ileri sürülmüştür (47). Genin *ECM1b* transkriptinde ekzon 7'nin olmaması, bu ekzonda mutasyonu olan olgularda farklı, belki daha hafif klinik bulgular görülebileceğini düşündürmüştür. Hamada'nın yayınında, *ECMI* geninde, dördü ekzon 7'de olmak üzere altı farklı mutasyon bildirilmiş ve ekzon 7'de mutasyon olan olgularda *ECM1b* transkripti etkilenmediği halde, diğer ekzonlarda mutasyonu olan olgularla belirgin bir fenotipik farklılık gözlenmediği belirtilmiştir. Bu durum, *ECM1a* transkriptinin *ECM1b*'ye kıyasla daha fazla biyolojik önemi olduğunu düşündürmüştür (3). Chan ve ark. (2007), farklı *ECMI* mutasyonları olan 60 olguların seri çalışması sonuçlarına dayanarak, ekzon 7'de mutasyon saptanan olguların fenotipinin cilt ve mukoza tutulumu, nörolojik, nöropsikiyatrik bulgular açısından diğer olgulardan daha hafif olmadığı sonucuna varmışlardır (6). *ECMI* geninde *founder etkisi* ile aynı mutasyonu (p.Q276X) taşıyan Alman kökenli Güney Afrikalılarda genotip-fenotip ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, intrafamilial değişkenlik gözlendiği, patojenik mutasyonun tipi ve pozisyonuyla, fenotip arasında ilişki kurulamadığı bildirilmiştir. LP'nin klinik bulgularının zamanla ortaya çıkmasının ve başlangıç yaşının bireyler arasında farklılık göstermesi nedeniyle, fenotipi değerlendirmenin zor olduğu belirtilmiştir (8). LP'li tüm olgularda beyin görüntülemesi yapılmamış olmasına rağmen herhangi bir *ECMI* mutasyonu ile serebral kalsifikasyon varlığı arasında ilişki de gözlenmemiştir (6).

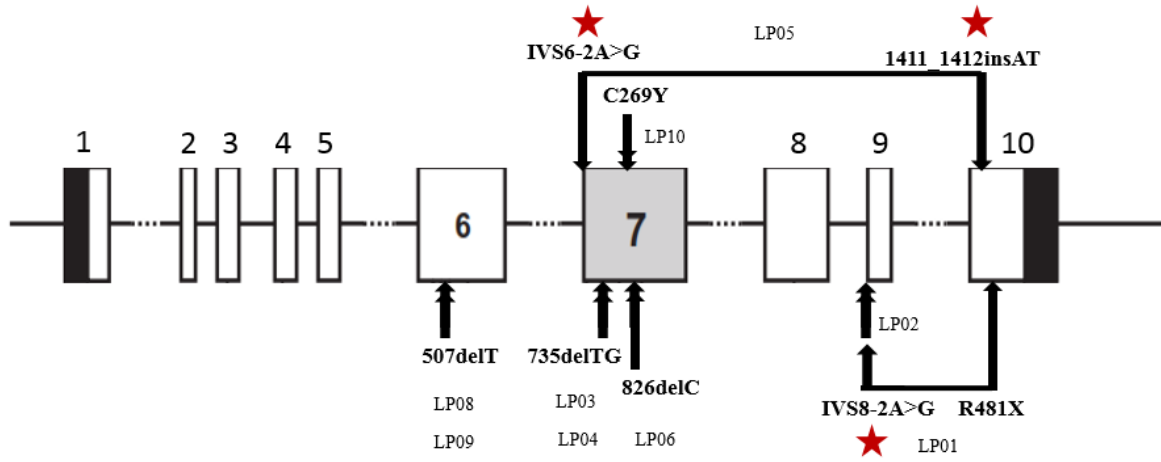
Bugüne kadar literatürde *ECMI* geninde toplam 51 mutasyon bildirilmiştir (HGMD, Ağustos 2015). Bu mutasyonların ekzonlara (veya bitişiğindeki '*splice acceptor*' bölgesine)

dağılımı; ekzon 1, ekzon 2’de ve ekzon 4’te üçer, ekzon 3’te iki, ekzon 5’te bir, ekzon 6’da onüç, ekzon 7’de onüç, ekzon 8’de yedi, ekzon 9’da bir, ekzon 10’dadört mutasyon şeklindedir. Bir de ekzon 9 ve 10’u kapsayan büyük delesyon bildirilmiştir. Çalışmamıza katılan olgularda ekzon 7, ekzon 9 ve ekzon 10’da (veya bitişiğindeki ‘splice acceptor’ bölgesinde)yeni mutasyonlar olmak üzere sekiz mutasyonun biri ekzon 6’da, dördü ekzon 7’de, biri ekzon 9’da, ikisi ekzon 10’dadır.

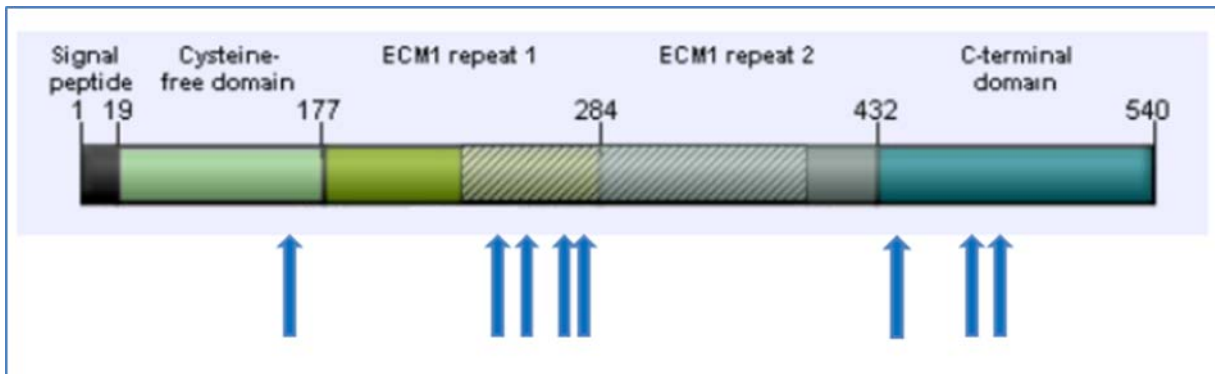
Olgulardaki sekiz mutasyonun beşi daha önce literatürde bildirilmiş olup, c.507delT Türk ve birçok ırkta gösterilmiş ve en sıklıkla saptanan mutasyondur. Diğer tanımlanmış mutasyonlardan c.735\_736delTG mutasyonu Türk,c.806G>A mutasyonu Suudi Arap, *founder etkisi* ile açıklanan c.826C>T mutasyonu Alman kökenli Güney Afrikalılarda, c.1441C>T Hint bireyde tanımlanmıştır. Ailelerimizden birinde (LP 01) akraba evliliği bulunmasına rağmen biri daha önce tanımlanmış diğeri tanımlanmamış bir mutasyon saptanması dikkat çekici bulunmuştur. Çalışmamızda dokuz ailede sekiz farklı mutasyonun saptanması nedeniyle ülkemizde Güney Afrika’daki gibi ‘*founder etkisi*’nin olmadığı, belki de heterozigot taşıyıcılık insidansının düşünülenenden daha yüksek olduğu, etkilenmiş bireylerin doğru tanı alamayıp hastalığın gözden kaçtığı düşünülebilir. Bu nedenle ilgili dal uzmanlarının (dermatolog, nörolog ve psikiyatristlerin) bilgilendirilerek farkındalık yaratılabilmesi için girişimlerde bulunulmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

Olgu serimizde *ECM1* geninde saptanan sekiz farklı mutasyondan (Şekil 44) üçü daha önce literatürde bildirilmemiştir. Bunlardan c.709-2A>G ve c.1305-2A>G’nin ekzonik RNA segmentlerinin kırılmasında önemli olan ve evrimce korunmuş olan ‘*splice acceptor*’ dizilimini bozarak (GT-AG kuralı) gende kırılma hatasına yol açması beklenmektedir. c.1411\_1412insAT’nin transkriptte çerçeve kaymasına ve translasyonda protein trunkasyonuna yol açması beklenmektedir.

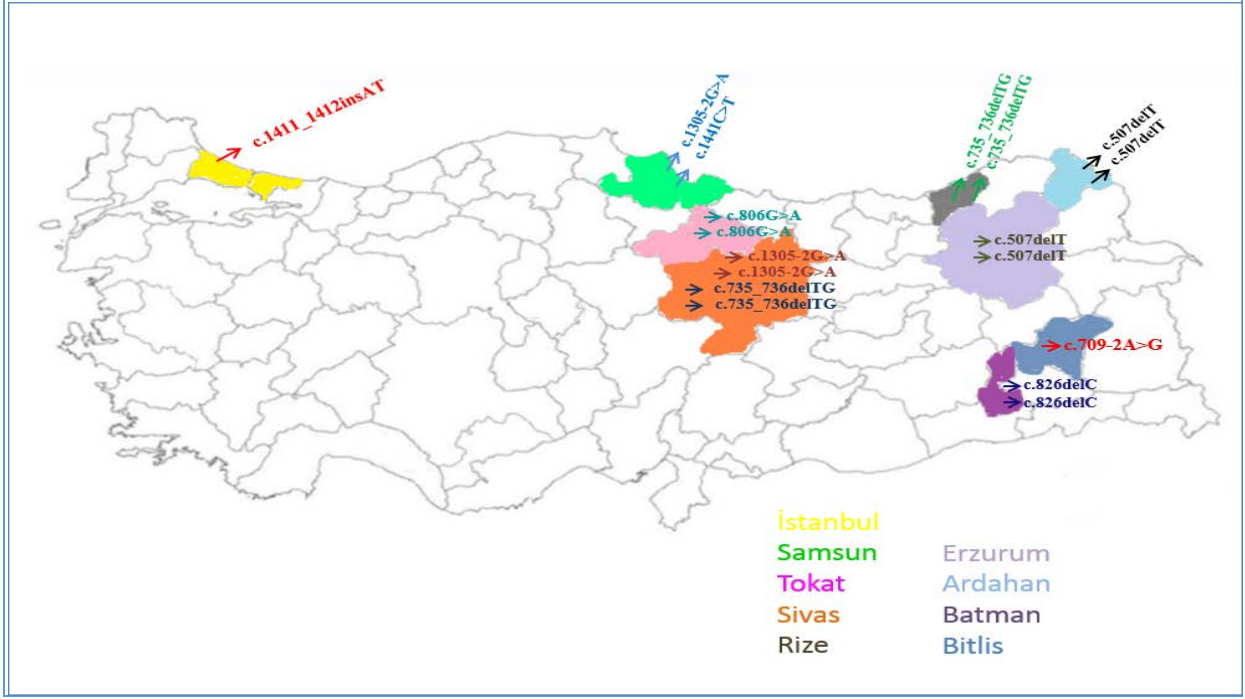
*ECM1* proteini, bir sinyal peptidi (19 aa), bir sistein-free domain, iki tandem repeats ve bir C-terminal domainden oluşmaktadır. Proteinin sistein-free domainini etkileyen c.507delT mutasyonu, *ECM1* repeat 1 bölgesini etkileyen c.709-2A>G, c.735\_736delTG, c.806G<A, c.826delC mutasyonları ve C terminal domainini etkileyen c.1305-2A>G, c.1411\_1412insAT, c.1441C>T mutasyonlarının etkiledikleri domain Şekil 45’te gösterilmektedir. Çalışmamızda, mutasyon tipi veya mutasyonların etkiledikleri domain ile olguların fenotipleri arasında ilişki kurulamamıştır.



**Şekil 44.** Olgularımızda saptanan mutasyonların *ECM1* genindeki lokalizasyonları (üç yeni mutasyon yıldızla gösterilmiştir, homozigot mutasyonlar çift okla gösterilmiştir)



**Şekil 45.** *ECM1* proteininin domainleri (Olgularımızda etkilenen aminoasitlerin proteindeki lokalizasyonları mavi oklarla gösterilmiştir) (73'ten modifiye edilmiştir)



**Şekil 46.** Olgularımızda saptanan mutasyonların Türkiye’de il bazında dağılımı

Bu çalışma ile LP ile ilişkili üç yeni mutasyon (c.709-2A>G,c.1305-2G>A, c.1411\_1412insAT) tanımlanmış oldu. Yeni mutasyonların görüldüğü üç olgunun cilt ve mukoza tutulumu diğer olgulardan farklılık göstermemektedir. c.1305-2G>A mutasyonu saptanan LP01 ve LP02 olgularında nörolojik, nöropsikiyatrik bulgu saptanmamıştır. c.709-2A>G ve c.1411\_1412insAT birleşik heterozigot mutasyonunu taşıyan LP05’te ise nörolojik, nöropsikiyatrik bulgular mevcuttur. LP01’in *ECMI* geninde saptanan birleşik heterozigot mutasyonlardan ekzon 10’daki c.1441C>T mutasyonu daha önce literatürde Hindistanlı bir olguda homozigot formda bildirilmiş ve fenotipinin diğer LP olgularından farklı olmadığı belirtilmiştir (6). LP03 ve LP04’ün *ECMI* geni 7. ekzonunda homozigot c.735\_736delTG mutasyonu saptanmıştır. Bu iki olgunun klinik bulguları karşılaştırıldığında, 39 yaşındaki LP03, 18 yaşında temporal lob epilepsisi tanısı almış ve bilateral anteromedial temporal kalsifikasyon saptanmıştır ve olguda sendromun diğer nöropsikiyatrik bulguları da görülmektedir. 21 yaşındaki LP04’ün ise beyin görüntülemesinde kalsifikasyon saptanmamıştır ve nörolojik veya nöropsikiyatrik bulgusu yoktur. Diğer cilt tutulumu bulguları arasında fark olmamakla birlikte LP04’te LP03’ten farklı olarak verrüköz lezyonlar gözlenmezken, yamalı alopesi bulgusu belirgindir. LP03’te ek olarak sialoadenit öyküsü,

anjionörotik ödem, tip 2 DM mevcuttur. Literatürde cilt, mukoza tutulumu ve temporal lob kalsifikasyonları olan 14 ve 4 yaşındaki iki Türk kardeşinde c.735\_736delTG mutasyonu bildirilmiş ve intrafamiliar varyabilite gözlemlendiğini belirtilmiştir (47). Aile LP06'da üç etkilenmiş kardeşin klinik bulguları farklı olmakla birlikte üçünde de ekzon 7'de daha önce tanımlanmış homozigot c.826delC (p.Gln276Serfs\*40) mutasyonu saptanmıştır. Sendromun cilt ve mukoza tutulumu olan üç olgudan, 34 yaşındaki dişi olguda nörolojik, nöropsikiyatrik bulgu olmamasına karşın 33 yaşındaki daha hafif cilt lezyonları erkek kardeşinde intrakraniyal kalsifikasyon, konvülziyon, hafıza kaybı, yönetsel fonksiyon kaybı, agresif davranışları mevcuttur. 22 yaşındaki kız kardeşinde ise cilt lezyonları daha belirgin iken intrakraniyal kalsifikasyon, konvülziyon öyküsüne ek başka bir psikiyatrik bulgusu bulunmamaktaydı. Ek olarak, 33 yaşındaki olguda erkek kardeşinde Tip 1 DM ve serebrovasküler olay öyküsü ve 22 yaşındaki kardeşinde tip 1 DM mevcuttu. İntrafamiliar varyabilitenin çok güzel bir örneğini gösteren bu ailenin varyabiliteye yol açan diğer olası genetik faktörlerin (modifier genler, CNV farkları gibi) araştırılması için iyi bir aday aile olduğunu düşünmekteyiz. *ECM1* geni 6. ekzonda homozigot c.507delT mutasyonunun gözlemlendiği LP08 ve LP09'un klinik bulguları karşılaştırıldığında, her iki olguda da cilt ve mukoza tutulumu mevcuttur, 9 yaşındaki LP08'de nörolojik, nöropsikiyatrik bulgu yokken 17 yaşındaki LP09'da sendromun tüm nörolojik, nöropsikiyatrik bulguları görülmektedir. Ek olarak, LP08'de sürrenal bezde kalsifikasyon mevcuttur. Aynı mutasyona sahip olgular, farklı yaşlarda olduklarından ve LP09'un nörolojik, nöropsikiyatrik bulgularının 13 yaşında ortaya çıkması nedeniyle genotip-fenotip ilişkisi açısından yorum yapmak zordur. LP09'un aynı mutasyonun gösterildiği, cilt bulguları daha hafif olan ve nörolojik, nöropsikiyatrik bulguları olmayan 12 ve 19 yaşında iki kardeşi mevcuttur. c.507delT daha önce literatürde, cilt, mukoza tutulumu ve nörolojik bulguları olan 38 yaşındaki Taylandlı bir olguda bildirilmiştir (47). Cilt ve mukoza bulguları olan, nörolojik, nöropsikiyatrik bulguları olmayan 35 yaşındaki LP10'da ise c.806G>A mutasyonu saptanmıştır. c.806G>A mutasyonu daha önce literatürde, cilt, mukoza bulguları olan nörolojik, nöropsikiyatrik bulguları olmayan 12 ve 19 yaşında iki kardeşinde (74) ve cilt, mukoza bulguları olan 21 yaşında İranlı bir olguda bildirilmiştir (75).

Olgularımızdan LP03'te tip 2 DM, LP06 ailesinde iki etkilenmiş olguda tip 1 DM tanıları mevcuttur. Mekanizma netleşme de *ECM1*'in pankreas adacık hücreleri üzerine etkisi olduğu bildirilmektedir. Literatürde LP olgularında ve akrabalarında DM insidansı %20 olarak bildirilmiştir (76). Serimizde de DM sıklığı literatürle uyumlu olarak %20

bulunmuştur. LP10 konstipasyon şikayeti nedeniyle pankreas enzimlerini içeren ilaç kullandığını ve şikayetlerinin gerilediğini belirtmektedir. LP08’de görülen LP sürrenal bezde kalsifikasyon birlikteliğine literatürde rastlanmamıştır.

Ekspresivite değişkenliği, otozomal dominant kalıtılan sendromlarda görülebilen bir durumken, otozomal resesif kalıtılan sendromlarda az rastlanan bir durumdur (77). Örneğin, otozomal resesif kalıtılan kistik fibroziste genotip-fenotip ilişkisi pankreatik fonksiyon için kurulabiliyorken, pulmoner tutulum için kurulamamaktadır (78). Mutasyonun fenotipe yansıma şiddetini, allelik heterojenite, epigenetik faktörler, gen-çevre etkileşimi, yaş ve cinsiyetin etkisi, modifiye edici genler, CNV’ler, SNP’ler değiştirebilmektedir (77). Olgularımızdan LP03 ve LP04 aynı homozigot mutasyonunu ve homozigot rs11801190 polimorfizmini birlikte taşımalarına rağmen nörolojik ve nöropsikiyatrik bulgular açısından diskordanttır. Bu bulgularla en azından rs11801190 polimorfizminin fenotipik variabilite ile ilişkisi olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda Türkiye popülasyonunda LP olgularındaki mutasyon çeşitliliği gözlenmiştir. *ECM1* geninde saptanan üç yeni mutasyonun fenotipe etkisi incelenmiş, bu olguların fenotipinin diğer olgulardan farklı olmadığı saptanmıştır. Aynı mutasyonu taşıyan olgularda, hatta ailevi olgularda klinik bulguların değişkenlik göstermesi nedeni ile mutasyonun tipi veya lokalizasyonu ile fenotip arasında bir ilişki kurulamamıştır. Olgularda genotip-fenotip ilişkisi kurulamadığından, ailelere özgün genetik danışma vermek zorlaşmaktadır. LP’ye neden olan mutasyonun bilindiği taşıyıcı çiftlerin prenatal tanı istemesi durumunda, fetusun sendromdan etkilendiği saptansa dahi, fenotip hakkında net bir yorum yapılamayacaktır.

## VI. KAYNAKLAR

1. Urbach E, Wiethe C. Lipoidosis cutis et mucosae. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 1929; 273: 285–319.
2. Hofer P. Urbach–Wiethe disease (lipoglycoproteinosis; lipid proteinosis; hyalinosis cutis et mucosae). A review. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1973; 53: 1–52.
3. Hamada T. Lipoid proteinosis. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 624–629.
4. Lipoid proteinosis (internette) erişim: 15.06.2015 World Wide Web URL <http://www.omim.org/clinicalSynopsis/247100>
5. Teive H A, Pereira E R, Zavala J A et al. Generalized dystonic and striatal calcifications with lipid proteinosis. *Neurology* 2004; 63: 2168–2169.
6. Chan I, Liu L, Hamada T, Sethuraman G, McGrath J A. The molecular basis of lipid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1. *Exp Dermatol* 2007; 16: 881–890.
7. Sercu S., Zhang M., Oyama N., Hansen U., El Ghalbzouri A., Jun G., Geentjens K., Zhang L., Merregaert J. Interaction of Extracellular Matrix Protein 1 with Extracellular Matrix Components: ECM1 is a Basement Membrane Protein of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology* (2008) 128, 1397–1408.
8. van Hougenhouck-Tulleken W, Chan I, Hamada T et al. Clinical and molecular characterization of lipid proteinosis in Namaqualand, South Africa. *Br J Dermatol* 2004; 151: 413–423.
9. Findlay G, Scott F P, Cripps D J. Porphyria and lipid proteinosis. *Br J Dermatol* 1966; 78: 69–80.
10. Sellami D, Masmoudi A, Turki H et al. Ophthalmic manifestations of lipid proteinosis. *Presse Med* 2006; 35: 796–798.
11. Ramsey ML, Tschen JA, Wolf JE Jr. Lipoid proteinosis. *Int J Dermatol* 1985; 24: 230–2.
12. Kurtulus B, Dog an Onur O, Olgac V, Balik A, Batur B. OC12 lipid proteinosis (Urbach-Wiethe disease). *Oral Dis* 2006; 12: 12.
13. Wong C K, Lin C S. Remarkable response of lipid proteinosis to oral dimethyl sulphoxide. *Br J Dermatol* 1988; 119: 541–544.

14. Kaya T I, Kokturk A, Tursen U, Ikizoglu G, Polat A. D-penicillamine treatment for lipoid proteinosis. *Pediatr Dermatol* 2002; 19: 359–362.
15. Hofer P. Urbach-Wiethe disease (lipoglycoproteinosis; lipoid proteinosis; hyalinosis cutis et mucosae, a review. *Acta Derm (Stockh) (Suppl.)*. 1973; 53: 1–52.
16. Genodermatoses. *A Clinical Guide to Genetic Skin Disorders*. Joel L. Spitz. 2005.. Second Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Sayfa 155.
17. Köylü H. *Tıbbi Fizyoloji- Klinik Anlatımlı*. 2014, Nobel Tıp Kitabevleri. Sayfa 71.
18. Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum and A. J. Hudspeth. *Principles of Neural Science*, Fifth Edition. 2013, The McGraw-Hill Companies. Sayfa 1083- Figure 48-4.
19. John E. Hall. *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*, Onikinci Baskı. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Berrak Çağlayan Yeğen. 2013, Nobel Tıp Kitabevleri. Sayfa 708-709.
20. Appenzeller S, Chaloult E, Velho P, et al. Amygdalae calcifications associated with disease duration in lipoid proteinosis. *J Neuroimaging* 2006;16:154–56.
21. Yakout YM, Elwanyy S, Abdel-Kreem A, Abou-Seif S. Radiological findings in lipoid proteinosis. *J Laryngol Otol* 1985;259-265.
22. Chelvan HT, Narasimhan M, Shankaran Subramanian A, Subramaniam S. Lipoid proteinosis presenting with an unusual nonsense Q32X mutation in exon 2 of the extracellular matrix protein 1 gene. *Australas J Dermatol*. 2012 Nov;53(4):E79-82.
23. Dyer J A, Yu Q C, Paller A S. “Free-floating” desmosomes in lipoid proteinosis: an inherent defect in keratinocyte adhesion? *Pediatr Dermatol* 2006; 23: 1–6.
24. Uchida T, Hayashi H, Inaoki M, Miyamoto T, Fujimoto W. A failure of mucocutaneous lymphangiogenesis may underlie the clinical features of lipoid proteinosis. *Br J Dermatol* 2007; 156: 152–157.
25. Mirancea N, Hausser I, Beck R, Metze D, Fusenig N E, Breitkreutz D. Vascular anomalies in lipoid proteinosis (hyalinosis cutis et mucosae): basement membrane components and ultrastructure. *J Dermatol Sci* 2006; 42: 231–239.
26. Mirancea N, Hausser I, Metze D, Stark H J, Boukamp P, Breitkreutz D. Junctional basement membrane anomalies of skin and mucosa in lipoid proteinosis (hyalinosis cutis et mucosae). *J Dermatol Sci* 2007; 45: 175–185.
27. Moy L S, Moy R L, Matsuoka L Y, Ohta A, Uitto J. Lipoid proteinosis: ultrastructural and biochemical studies. *J Am Acad Dermatol* 1987; 16: 1193–1201.

28. Gjersvik P J, Thorsrud A K, Jellum E. Lipoid proteinosis: high-resolution two-dimensional protein electrophoresis of affected and nonaffected skin. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 230–231.
29. Bauer E A, Santa-Cruz D, Eisen A Z. Lipoid proteinosis: in vivo and in vitro evidence for a lysosomal storage disease. *J Invest Dermatol* 1981; 76: 119–125.
30. Olsen D R, Chu M L, Uitto J. Expression of basement membrane zone genes coding for type IV procollagen and laminin by human skin fibroblasts in vitro: elevated  $\alpha 1$  (IV) collagen mRNA levels in lipoid proteinosis. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 734–738.
31. Fleischmajer R, Krieg T, Dziadek M, Altchek D, Timpl R. Ultrastructure and composition of connective tissue in hyalinosi cutis et mucosae skin. *J Invest Dermatol* 1984; 82: 252–258.
32. Mathieu E, Meheus L, Raymackers J, Merregaert J. Characterization of the stromal osteogenic cell line MN7: identification of secreted MN7 proteins using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting and microsequencing. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 903–913.
33. Bhalerao J, Tylzanowski P, Filie J D, Kozak C A, Merregaert J. Molecular cloning, characterization and genetic mapping of the cDNA coding for a novel secretory protein of mouse. Demonstration of alternative splicing in skin and cartilage. *J Biol Chem* 1995; 270: 16385–16394.
34. Smits P, Ni J, Feng P et al. The human extracellular matrix gene 1 (ECM1): genomic structure, cDNA cloning, expression pattern and chromosomal localization. *Genomics* 1997; 45: 487–495.
35. Johnson M R, Wilkin D J, Vos H L et al. Characterization of the human extracellular matrix protein 1 gene on chromosome 1q21. *Matrix Biol* 1997; 16: 289–292.
36. Deckers M M, Smits P, Karperien M et al. Recombinant extracellular matrix protein 1 inhibits alkaline phosphatase activity and mineralization of mouse embryonic metatarsals in vitro. *Bone* 2001; 28: 14–20.
37. Sekiya I, Vuoristo J, Larson B, Prockop D J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4397–4402.

38. Han Z, Ni J, Smits P et al. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. *FASEB J* 2001; 15: 988–994.
39. Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A et al. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocytederived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 2001; 276: 17920–17931.
40. Rickman D, Bobek M, Misek D et al. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 2001; 61: 6885–6891.
41. Mongiat M, Fu J, Oldershaw R, Greenhalgh R, Gown AM, Iozzo RV. Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis. (2003) *J Biol Chem* 278:17491–9.
42. Fujimoto N, Terlizzi J, Brittingham R, Fertala A, McGrath JA, Uitto J (2005) Extracellular matrix protein 1 interacts with the domain III of fibulin-1C and 1D variants through its central tandem repeat 2. *Biochem Biophys Res Commun* 333:1327–33.
43. Fujimoto N, Terlizzi J, Aho S, Brittingham R, Fertala A, Oyama N et al. (2006) Extracellular matrix protein 1 inhibits the activity of matrix metalloproteinase 9 through high-affinity protein/protein interactions. *Exp Dermatol* 15:300–7
44. Amano S, Akutsu N, Matsunaga Y, Nishiyama T, Champlaud MF, Burgeson RE et al. (2001) Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 271:249–62.
45. [http://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=MODBASE&template=2fd6A&pmpuid=1000557225330&range\\_from=1&range\\_to=540&ref\\_ac=Q16610&mapped\\_ac=Q16610&zid=async](http://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=MODBASE&template=2fd6A&pmpuid=1000557225330&range_from=1&range_to=540&ref_ac=Q16610&mapped_ac=Q16610&zid=async)
46. Hamada T, McLean W H I, Ramsay M et al. Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1). *Hum Mol Genet* 2002; 11: 833–840.
47. Hamada T, Wessagowit V, South A P et al. Extracellular matrix protein 1 gene (ECM1) mutations in lipoid proteinosis and genotype–phenotype correlation. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 345–350.
48. Chan I. The role of extracellular matrix protein 1 in human skin. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 52–56.

49. *UCSC Genome Browser* erişim: 16.06.2015 World Wide Web URL [http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&position=chr1%3A150508062-150513789&hgid=431416123\\_aqsfGpPPR21nF9pxrqzia8IEq3I](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&position=chr1%3A150508062-150513789&hgid=431416123_aqsfGpPPR21nF9pxrqzia8IEq3I)
50. [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000143369;r=1:150508062-150513789](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000143369;r=1:150508062-150513789)
51. <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=ECM1>
52. Fujimoto N, Terlizzi J, Aho S et al. Extracellular matrix protein 1 inhibits the activity of matrix metalloproteinase 9 through high affinity protein / protein interactions. *Exp Dermatol* 2006; 15: 300–307.
53. Sander C S, Sercu S, Ziemer M et al. Expression of extracellular matrix protein 1 (ECM1) in human skin is decreased by age and increased upon ultraviolet exposure. *Br J Dermatol* 2006; 154: 218–224.
54. Wang L, Yu J, Ni J et al. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors. *Cancer Lett* 2003; 200: 57–67.
55. Pauws E, Veenboer G J, Smit J W, de Vijlder J J, Morreau H, Ris-Stalpers C. Genes differentially expressed in thyroid carcinoma identified by comparison of SAGE expression profiles. *FASEB J* 2004; 18: 560–561.
56. Fluge O, Bruland O, Akslen L A, Lillehaug J R, Varhaug J E. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* 2006; 16: 161–175.
57. Han Z, Lin G, Huang J, Chi F, Zhang L. The relationship between ECM1 and the angiogenesis and metastasis of laryngeal carcinoma. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2006; 20: 116–118.
58. Kreunin P, Urquidi V, Lubman D M, Goodison S. Identification of metastasis-associated proteins in a human tumor metastasis model using the mass-mapping technique. *Proteomics* 2004; 4: 2754–2765.
59. Oyama N, Chan I, Neill S M et al. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosis. *Lancet* 2003; 362: 118–123.
60. Blaine SA, Ray KC, Branch KM, Robinson PS, Whitehead RH & Means AL. Epidermal growth factor receptor regulates pancreatic fibrosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009; 297 G434–G441.

61. Daoud J, Petropavlovskaja M, Rosenberg L & Tabrizian M. The effect of extracellular matrix components on the preservation of human islet function in vitro. *Biomaterials* 2010; 31 1676–1682.
62. Zeugin JA, Hartley JL. (1985). Ethanol Precipitation of DNA. *Focus*, 7, 12.
63. [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP).
64. [www.ensembl.org/genesnpview](http://www.ensembl.org/genesnpview).
65. <http://genome.ucsc.edu/>.
66. <http://www.biobase-international.com/>.
67. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>.
68. Burpo, F. J., 2001, A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study, *J. Biochem.*, 218-230.
69. <http://www.mutationtaster.org/>.
70. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
71. Uematsu S, Goto Y, Suzuki T, Sasazawa Y, Dohmae N, Simizu S. N-Glycosylation of extracellular matrix protein 1 (ECM1) regulates its secretion, which is unrelated to lipoid proteinosis. *FEBS Open Bio*. 2014 Oct 12;4:879-85.
72. [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr1%3A150350000-150550000&hgid=436514313\\_tyzRO5WpF1DBYMWgHXdgYqayBi4d](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr1%3A150350000-150550000&hgid=436514313_tyzRO5WpF1DBYMWgHXdgYqayBi4d)
73. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ECM1ID40398ch1q21.html>
74. Salih MA, Abu-Amero KK, Alrasheed S, Alorainy IA, Liu L, McGrath JA, et al. Molecular and neurological characterizations of three Saudi families with lipoid proteinosis. *BMC Med Genet*. 2011 Feb 24; 12:31.
75. Izadi F, Mahjoubi F, Farhadi M, Tavakoli M M and Samanian S. A novel missense mutation in exon 7 of the ECM1 gene in an Iranian lipoid proteinosis patient. *Genetics and Molecular Research* 2012; 11 (4): 3955-3960.
76. Navarro C, Fachal C, Rodriguez C et al. Lipoid proteinosis: a biochemical and ultrastructural investigation of two new cases. *Br J Dermatol* 1999; 141: 326–331.

77. Rabah M. Shawky. Reduced penetrance in human inherited disease. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2014; 15: 103-111.
78. Braun AT, Farrell PM, Ferec C, Audrezet MP, Laxova A, Li Z, Kosorok MR, Rosenberg MA, Gershan WM. Cystic fibrosis mutations and genotype-pulmonary phenotype analysis. J Cyst Fibros. 2006;5:33–41.
79. Muhammad Nasir, Amir Latif, Muhammad Ajmal, Reem Qamar, Muhammad Naeem and Abdul Hameed. Molecular analysis of lipoid proteinosis: identification of a novel nonsense mutation in the *ECM1* gene in a Pakistani family. Diagnostic Pathology 2011; 6:69.

**VII. MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAMFORMU**

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ, İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Proje Adı

**“LİPOİD PROTEİNOZİS TANILI OLGULARDA GENOTİP FENOTİP İLİŞKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI”**

Tarih:

Bu inceleme ile klinik incelemeler sonucunda lipoid proteinozis olduğu saptanan olgularda klinik bulgular, fenotipin yaşla değişimi, aile içi fenotipik değişkenlik, fenotipe neden olan moleküler patolojinin araştırılması ve olası genotip fenotip korelasyonu varlığının araştırılması amaçlanmaktadır. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine gönderilen olgularda araştırma amaçlı moleküler incelemelerinin yapılmasına izin vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz.

Aşağıdaki Moleküler İncelemeler için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı vererseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı: İnceleme, lipoid proteinozis saptanan olgularda altta yatan nedenin aydınlatılmasını ve olası genotip fenotip korelasyonu varlığının araştırılmasını amaçlamaktadır. Bu çalışmalar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

Moleküler analizlerin yapılması için hastalardan ve taşıyıcılık riski bulunan bireylerden doku örnekleri alınacaktır. Tanı amacı ile önceden alınmış olan mevcut doku örnekleri varsa hastaların onayı alınarak o örnekler kullanılacaktır. Eldeki örneklerin yetersiz olması ya da kullanılamaması durumunda hastadan yeniden doku (kan, vb) örnekleri almamız gerekebilir. Bu durumda hasta ve aile bilgilendirilecek ve izni alınacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Bu incelemeler için sizden alınan kanlardan elde edilecek örneklerinizin saklanması konusunda lütfen aşağıdaki seçeneklerden birini seçiniz:

- a. Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra bölümünüz örnek bankasında saklanmasına izin veriyorum.
- b. Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra imha edilmesini istiyorum.

Doku örneğiniz saklandığı takdirde size sorulmadan, izniniz alınmadan hiçbir şekilde başka bir çalışma için kullanılmayacaktır.

## 2. Olası riskler ve faydalar:

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişmesi durumu.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin iznimize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne ya da babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Olası yararlar: Bu incelemelerin esas amacı sizde/aile bireyinizde saptanan hastalığı daha detaylı araştırmak ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Uygulanacak işlemin yapısı ve amacı hakkında, olası riskleri ve yararları tarafımdan,

------(Doktor Adı)

hastaya, -----(Aile Adı)

------(Tanık Kişi)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek yeni riskler ve/veya yararlar tarafımdan katılımcıya iletilecektir.

Tarih:

Doktorun imzası:

Kontakt kurulabilecek kişiler: Doç. Dr. Birsen Karaman

Dr. Firdevs Dinçsoy

Ulaşılabilir Tel. No.'ları: Direk hat: (0 212) 534 84 40

Dahili hat: (0 212) 414 20 00 - 32564 - 32327

Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi: bkaraman@istanbul.edu.tr

İzin: Yukarıda tanımlanan ileri düzey incelemenin uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında şayet vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin/çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım. Araştırma bulguları, ailedeki genetik hastalığın klinik ve moleküler tanısına ve tedavisine faydalı sonuçlar vermesi durumunda bana rapor edileceğini kabul ettiğimi bildirmek istiyorum.

	Adı Soyadı	Doğum tarihi	İmza	(Ebeveyn)
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----

## VIII. EKLER

### A. *ECM1* geninin genomik DNA primerleri

**Tablo 2.** *ECM1* geninin genomik DNA primerleri

Primer adı	Ekzon	Primer Dizisi	Tm (°C)	PCR ürünü (bp)
ECM1-F1	ekzon 1	5'-GGA GAT CAC ACC AGA CAA-3'	52	328
ECM1-R1		5'-GCC AAA CGG AGA ATC ACT-3'	56	
ECM1-F2	ekzon 2-3-4-5	5'-GGA GAG GAT TAG GGG ACA-3'	54	908
ECM1-R2		5'-GGT GAG TGG CAG AGC CCA-3'	63	
ECM1-F3	ekzon 6-7	5'-GGC AGG CTG TGA GCT GAC A-3'	63	1279
ECM1-R3		5'-GTG GAC GCA CTC ACA GCA-3'	60	
ECM1-F3-1	ekzon 7	5'-GTC CCG TTC ACT GGC CCT A-3'	63	
ECM1-R3-1	ekzon 6	5'-GGC CAG TGA ACG GGA CCT-3'	63	
ECM1-F4	ekzon 8-9	5'-CTT TGG GCC TCT CGG GCT-3'	65	685
ECM1-R4		5'-CCA AAG GCT GGT TTG AGG T-3'	60	
ECM1-F5	ekzon 10	5'-GAA TCC AGC TGT GCA AGG CA-3'	64	526
ECM1-R5		5'-GAC AAT GAG GAC ACC AAA TC-3'	57	
ECM1-F6	ekzon 8-9	5'-CCC TGA GAG CCT GTT TGC CT-3'	64	1266
ECM1-R6		5'-CCT CCT GGG GCC CAG AGA-3'	66	

### B. LP05 ailesinin STR analizi

**Tablo 3.** LP05 ailesinin STR analizi

GRUP	RENK	BANT ARALIĞI		ANNE	INDEX	KARDES	BABA
CSF1PO		161-228	NON -İNF	197-205	197-205	197-197	197-201
AML		309-313	NON -İNF	310-310	310-314	310-310	310-314
D16SS539		250-292	İNFORMATİF	250-262	254-262	250-258	254-258
VWF		316-376	NON -İNF	352-367	352-367	352-352	350-352
D10S1248		111-155	İNFORMATİF	123-127	123-131	127-139	131-139
D8S1179		174-210	İNFORMATİF	193-202	193-198	194-202	194-198
D1S1656		215-320	İNFORMATİF	229-240	229-233	240-248	233-248
DYS392		324-368		-	344	-	344
D12S391		147-205	NON -İNF	184-200	184-200	184-184	180-184
D19S433		197-237	NON -İNF	206-206	206-206	206-208	206-208
D21S11		312-372	İNFORMATİF	371-375	358-375	371-379	358-379
PENTD		348-423	İNFORMATİF	380-389	380-398	389-398	398-403
D2S1778		115-231	İNFORMATİF	120-127	120-136	127-136	124-136
D18S51		224-332	İNFORMATİF	246-273	246-250	246-250	250-250
D2S1338		370-450	İNFORMATİF	376-380	380-387	380-387	387-387
THO-1		450-474	İNFORMATİF	453-467	464.5-467	453-457	457-464

**IX. ETİK KURUL KARARI**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 10

Tarih : 07.01.2015

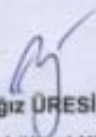
Konu : Doç.Dr. Birsen KARAMAN

Sayın Doç.Dr. Birsen KARAMAN  
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgilendirilen : Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 19/12/2014 gün ve 385 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Firdevs DİNÇSOY'un yürüteceği 2014/1974 dosya numaralı "Lipoid Proteinosis Olgularında Genotip Fenotip İlişkisinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurumumuzun 26/12/2014 tarih ve 22 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

  
Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU**

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>	ETİK KURULUN ADI	<b>İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU</b>
	AÇIK ADRESİ:	<b>İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL</b>
	TELEFON	<b>0 (212) 414 21 53</b>
	FAKS	<b>0 (212) 414 21 53</b>
	E-POSTA	<b>itfetikkurul@istanbul.edu.tr.</b>

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	<b>"Lipoid Proteinozis Olgularında Genotip Fenotip İlişkisinin Araştırılması"</b>			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	<b>Doç.Dr. Birsen KARAMAN</b>			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	<b>Tıbbi Genetik</b>			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	<b>İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı</b>			
	DESTEKLEYİCİ	<b>İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi</b>			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz :				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI "Lipoid Proteinozis Olgularında Genotip Fenotip İlişkisinin Araştırılması"

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	19/12/2014	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	■		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:22	Tarih: 26/12/2014		
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında görevli Doç.Dr. Birsen KARAMAN'ın sorumluluğunda ve Firdavs DİNÇSOY'un yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşımları ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU							
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilgili *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyostatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyostatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

- \* :Araştırma ile ilgili  
\*\* :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığında izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabii değildir.

## X. ÖZGEÇMİŞ

İş Adresi	İstanbul Üni., İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, 34390, Çapa, İstanbul Tel/Fax:0212.534 84 40
Ev Adresi	Kartaltepe Mah. 50. Yıl Cad. 54/1 Bayrampaşa/İstanbul Tel: 05055215729 e-mail: firdevsdincsoy@gmail.com
Doğum Tarihi	29.09.1985
Doğum Yeri:	Ankara
Tıpta Uzmanlık	2011-2015 İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD
Üniversite-Lisans	2003-2009 Hacettepe Üniversitesi, Hacettepe Tıp Fakültesi
Ortaöğretim	1999-2003 Çankaya Mili Piyango Anadolu Lisesi
İlköğretim	1997-1999 Şehit Öğretmen M. Ali Durak Ortaokulu 1992-1997 Zehra Önder İlkokulu

### Uluslararası yayınlar:

1. Cleidocranial Dysplasia; Clinical, endocrinologic and molecular findings in 15 patients from eleven families. Firdevs Dinçsoy, Nuriye Dinçkan, Yeliz Güven, Umut Altunoğlu, Senem S. Kuvvetli, Şükran Poyrazoğlu, Firdevs Baş, Z. Oya Uyguner, Hülya Kayserili. Clinical Genetics dergisine değerlendirilmesi için gönderildi.

### Uluslararası katıldığı akademik faaliyetler:

1. European Human Genetics Conference 2013 / June 8-11, 2013 / Paris, France / Poster sunumu  
“Drawbacks of genotype-phenotype correlation in Cleidocranial Dysplasia in eleven families”
2. ESHG-PPPC Course Genetics in health care: Practice and Policies / February 12-13, 2015 / Istanbul, Turkey

### Ulusal katıldığı akademik faaliyetler:

1. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi / 20-23 Aralık, 2012 / Bursa / Sözlü sunum  
“Lipoid proteinozis tanılı iki olguda klinik bulgular ve moleküler sonuçlar”
2. 11. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi / 24-27 Eylül 2014 / İstanbul / Poster sunumu

- “Prader Willi sendromluolguda 15. kromozomda maternalheterodizomi”
3. 6. İstanbul Dismorfoloji Günleri / 03-04 Mayıs 2013 / İstanbul / Sözlü Sunum  
“CUTIS LAXA SYNDROME Type IIB: in two family members at different ages”
  4. V. Dismorfoloji Günleri / 29-30 Nisan 2011 / İstanbul
  5. FRAJİL X Sendromu Paneli ve İdiyopatik Mental Retardasyonda Array Uygulamaları: Nijmegen Deneyimi toplantısı / 25 Haziran 2011 / Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi
  6. Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri AD Toplantıları
    - V- Otizm Paneli / 17 Şubat 2012
    - VII-1. Frajil X Sendromu Paneli / 26.09.2012
  7. 2. Nörometabolik Dismorfoloji Sempozyumu / 08-09 Mart 2013 / İstanbul
  8. Erişkin yaşta görülen genetik hastalıklar sempozyumu / 6-7 Aralık 2013 / İstanbul

#### **Klinik genetik istanbul grubu toplantıları** (sözlü sunumlar)

1. Kseroderma pigmentosum varyantı (11 Ocak 2013)
2. Ellis-van Creveld Sendromu tanılı olgu sunumu (31.05.2013)
3. Tanısı bilinmeyen sendromlar (A/T VACTERL asosiasyonu-tibial aplazi) (25.10.2013)
4. Tanısı bilinmeyen sendromlar (Mikrosefali, hafif MR ve vertebrokostal anomalili aile) (26.11.2013)
5. Kleefstra sendromu tanılı olgu sunumu (21.02.14)
6. Opsismodisplazi tanılı olgu sunumu (28.11.14)
7. Olgu Serisi Sunumu: Megalensefali-Kapiller Malformasyon Sendromu (23.01.15)

#### **Eğitim semineri toplantıları**

- Perinatoloji BD- Tıbbi Genetik ortak toplantıları
- Pediatri vaka takdimi toplantıları (sözlü sunumlar)
  - Ellis-van Crevald Sendromu (27 Eylül 2011)
  - De Sanctis Cacchione Sendromu (02.10.2012)
  - Lipoid Proteinozis (25.12.2012)
  - Kleefstra Sendromu (07.01.14)
- Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD mezuniyet sonrası eğitim toplantıları
- El Cerrahisi- Klinik Genetik ortak toplantıları
- ÇSvH AD Pediatrik Nöroloji BD Vaka Sunumu (28.08.13)

- Myasthenia gravis tanılı olgu
- ÇSvH AD Pediatrik Endokrinoloji BD (26.07.13)
  - Dismorfoloji nedir, sitogenetik ve moleküler test sonuçlarının değerlendirilmesi
- Tıbbi Genetik AD - Makale sunumu
  - Clinical Insights Gained From Eight New Cases and Review of Reported Cases With Jeune Syndrome
  - Human and Mouse Mutations in *WDR35* Cause Short-Rib Polydactyly Syndromes Due to Abnormal Ciliogenesis
  - Loss-of-Function Mutations in *RAB18* Cause Warburg Micro Syndrome
- Tıbbi Genetik AD- Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Eğitim Programı
  - Kromozom kırık Sendromları
  - Santral Dogma Gen Ekspresyonu (11.04.2012)