T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

ÇOKLU HİPOFİZ HORMON EKSİKLİĞİ OLAN OLGULARDA YENİ NESİL DİZİLEME TEKNİKLERİNİN MOLEKÜLER PATOLOJİNİN AYDINLATILMASINA KATKISI VE GENOTİP- FENOTİP İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ZEHRA YAVAŞ ABALI

DANIŞMAN
PROF. DR. ZEHRA OYA UYGUNER

İKİNCİ DANIŞMAN
DOÇ.DR. GÜVEN TOKSOY

GENETİK ANABİLİM DALI

GENETİK DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2024

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 olmadığı beyan ederim.

Zehra Yavaş Abalı

AÇIKLAMA:

Kişisel Verileri Koruma Kurulu'nun 24/09/2020 tarihli ve 2020/722 sayılı toplantısında "Açık Erişim Sisteminde ıslak imzalı evrakların yayımlanması uygulamasının ilgili kişilere ait ıslak imzalı belgeleri içermeyecek şekilde güncellenmesi" Kararı üzerine tezlerde kişisel verilerin olmadan yüklenmesi uygulamasına başlanmıştır.

İTHAF

Aileme...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başından sonuna her aşamasında desteğini hissettiğim genetik ile ilgili olduğu kadar akademisyenlik adına da çok şey öğrendiğim, bilgi ve tecrübesini paylaşmayı seven, çok değerli danışman hocam *Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER*'e,

Tezimin analizlerinde ve genetik testlerin sonuçlarının değerlendirilmesi ve raporlanması aşamalarında önemli katkısı olan ikinci danışmanım *Doç. Dr. Güven TOKSOY'a,*

Bilgi ve destekleriyle hep yanımda olduklarını bildiğim sevgili hocalarım, *Prof. Dr. Birsen KARAMAN, Prof. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK, Prof. Dr. Asuman GEDİKBAŞI, Doç. Dr. Bilge ÖZSAİT ve Doç. Dr.* Çağrı *GÜLEÇ*'e,

Tez izleme komisyonumda görev alan çok değerli hocalarım *Prof. Dr Abdullah BEREKET* ve *Prof. Dr. Sibel A. UĞUR İŞERİ'ye*

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinolojisi BD ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Büyüme-Gelişme ve Pediatrik Endokrinoloji BD'de birlikte çalıştığım saygıdeğer hocalarım ve sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Tezimdeki olguları endokrinolojik açıdan birlikte değerlendirdiğimiz sevgili *Uzm.Dr. Ayşe Pınar ÖZTÜRK*'e ve klinik genetik değerlendirmelerde her aşamada desteğini hep hissettiğim çok değerli *Doç. Dr. Ayça D. ASLANGER'e*

Biyoinformatik analizlerde öğrendiklerini ve bilgilerini paylaşmaktan çekinmeyen kendilerinden çok şey öğrendiğim *Dr. Durmuş DURMAZ, Dr. Sinan AKBAŞ* ve tüm Tıbbi Genetik AD Tıpta Uzmanlık Öğrencilerine,

Pediatri uzmanlık öğrencisi olduğum günlerden doktora sürecime dek hep yanımda olup yardımcı olan sevgili Y*asemin ARI ŞENGÜL* ve *Cemal KOÇ'a,*

Tezimin laboratuvar aşamasında birlikte uzun saatler çalışıp emek verdiğimiz sevgili arkadaşım *Gülendam Bağırova*'ya

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimlerini aktarmaları yanında dostluklarını da hissettiğim arkadaşlarım *Volkan KARAMAN, Alev YALIN, Gizem KINA, Ebru BEKTAŞ, Hilal ŞENTÜRK, Ayşe TEKİN, Emine ASLAN'a* ve bizlere aileden biri gibi yaklaşan tüm Tıbbi Genetik laboratuvar ekibine,

Son olarak da bana her konuda destek olan doktora sürecimin de tüm aşamalarında yanımda olan sevgili eşim *Doç Dr. Saygın ABALI'ya* teşekkür ederim.

Zehra Yavaş Abalı, 2024 İstanbul

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-38742

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....ii
İTHAF……...iii
TEŞEKKÜR……..iv
İÇİNDEKİLER……...v
TABLOLAR LİSTESİ……...……...vi
ŞEKİLLER LİSTESİ……....…vii
KISALTMALAR……..ix
ÖZET……... xii
ABSTRACT……xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....1
2. GENEL BİLGİLER .....…3
2.1 Hipofiz Bezi……..3
2.2 Hipopituitarizm……...14
2.3 Genetik Tanı Yöntemleri……35
3. GEREÇ VE YÖNTEM 47
3.1 Klinik değerlendirme…….47
3.2 Moleküler yöntemler……..47
4. BULGULAR.....69
4.1 Klinik Özellikler…….69
4.2 Moleküler Genetik Sonuçların Değerlendirilmesi……..72
5. TARTIŞMA 99
KAYNAKLAR 116
FORMLAR 132
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 136

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 İzole büyüme hormon eksikliği fenotipleri 32

Tablo 2.2 İzole TSH eksikliği (santral hipotiroidi) nedenleri 33

Tablo 2.3 İzole ACTH eksikliği (santral adrenal yetersizlik) nedenleri 33

Tablo 2.4 ÇHHE'nin de gözlenebildiği hipogonadotropik hipogonadizm ilişkili genler 34

Tablo 2.5 YND platformlarının verimlilik ve maliyetlerinin karşılaştırılması 44

Tablo 3.1 Dizileme planı 50

Tablo 3.2 Düşük kapsam/kapsanmayan bölgeler için tasarlanan ve kullanılan primer çiftleri 53

Tablo 3.3 *Qubit* ölçümü için gerekli miktarlar 60

Tablo 3.4 Enzimatik fragmantasyon karışımı 60

Tablo 3.5 PZR programı 61

Tablo 3.6 Ligasyon karışımı 61

Tablo 3.7 Fragmantasyon ürünü, adaptörler ve karışım miktarı 62

Tablo 3.8 PZR karışımı 63

Tablo 3.9 PZR programı 63

Tablo 3.10 Kütüphane hazırlığı 64

Tablo 3.11 Hibridizasyon reaksiyonu için kullanılan miktarlar 64

Tablo 4.1 Olguların klinik özellikleri 70

Tablo 4.2 ÇHHE YND paneli ile g. etiyolojisi saptanabilen indekslerin varyant özellikleri 74

Tablo 4.3 ÇHHE YND panelinde saptanıp Sanger dizi analizi ile doğrulama ve segregasyon analizleri yapılarak dışlanan gen ve varyantların özellikleri 76

Tablo 4.4 İzole BH eksikliklerinin klinik özellikleri 82

Tablo 4.5 İzole BH eksikliği olgularının genetik özellikleri 83

Tablo 4.6 TED analizi ile incelenen olguların klinik özellikleri 85

Tablo 4.7 TED analizinde saptanan ÇHHE ilişkili gen varyantları 86

Tablo 4.8 *RNPC3* g. biallelik patojenik varyant taşıyan üç aileden beş olgunun özellikleri 91

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Hipofiz bezi ve anatomisi (sagittal kesit) 4
Şekil 2.2 Hipofiz bezi ve anatomisi (koronal kesit) 5
Şekil 2.3 Kemirgen hipofiz gelişiminin aşamaları 6
Şekil 2.4 Gelişmekte olan hipofiz bezinde sinyal molekülleri ve transkripsiyon faktörlerinin etkisi 9
Şekil 2.5 Kemirgenlerde transkripsiyon faktörlerinin ifadesinin zamanlaması 10
Şekil 2.6 Hipofiz gelişiminde transkripsiyon faktörlerinin seyri 11
Şekil 2.7 Hipotalamus – hipofiz – hedef organ eksenleri 14
Şekil 2.8 Yapısal hipofiz fenotiplerinin lateral kesitten görünümü 18
Şekil 2.9 BH – IGF1 ekseni 30
Şekil 2.10 MLPA reaksiyonu 36
Şekil 2.11 Sanger dizileme tekniği 38
Şekil 2.12 Dizileme teknolojilerinin yıllar içinde gelişimi 40
Şekil 2.13 Farklı ilkelere sahip YND platformlarının genel özellikleri 41
Şekil 2.14 *In situ* dizileme ve scRNA-seq kullanarak tek hücre gen ifadesi verilerinin mekansal yeniden yapılandırılması 41
Şekil 3.1 Çalışma protokolü 52
Şekil 3.2 TED analizi yapılan olguların sınıflandırılması 58
Şekil 4.1 Olgularda görülen hipofiz hormon eksikliklerinin sıklığı 71
Şekil 4.2 Çalışmada değerlendirilen 118 indeks olgunun elde edilen genetik sonuçlarının kullanılan yöntemlere göre dağılımı 73
Şekil 4.3 Benzer etkilenmiş iki kardeşte, P10 (IV:1) ve P10k (IV:2), MLPA yöntemi ile *PROP1* geninde homozigot tüm gen delesyonunun gösterimi 78
Şekil 4.4 P13'te (II:1) MLPA yöntemi ile saptanan *PROP1* geni ekzon 1, 2, 3 heterozigot duplikasyonunun gösterimi 79
Şekil 4.5 P123'te (II:1) MLPA yöntemi ile saptanan homozigot *GH1* tüm gen delesyonunun gösterimi 80
Şekil 4.6 *RNPC3* geninde homozigot varyant saptanan olguların, P14 (V:5) ve P14k (V:6) pedigrisi, IGV ve elektroferogram gösterimi 87
Şekil 4.7 *Wild-type* ve mutant RNPC3 proteinin üç boyutlu yapısı 88
Şekil 4.8 *RNPC3* geninde homozigot varyant saptanan P69 (III:2) olgusunun pedigri ve elektroferogram görüntüsü 89

Şekil 4.9 P112'de (II:2) Sanger dizi analizi ile *RNPC3* geninde saptanan homozigot c.484 C>T varyantının elektroferogram görüntüsü 90
Şekil 4.10 *GLI2* geninde heterozigot varyant saptanan P18'in (IV:6) pedigri, IGV ve Sanger doğrulamasının elektroferogram görüntüleri. 92
Şekil 4.11 *GLI2* geninde heterozigot c.2064delC varyantı saptanan P31'in (IV:1) ve etkilenmiş kardeş P31k'nin (IV:2) pedigri, IGV ve Sanger elektroferogramları. 93
Şekil 4.12 *ROBO1* geninde heterozigot varyant saptanan P109 olgusunun (IV:3) pedigri, IGV ve segregasyon analizlerinin elektroferogram görüntüsü. 94
Şekil 4.13 *ROBO1 (*NM_002941.4): c.1394C>T p.(Thr465Ile) varyantının Polyphen2 veritabanında değerlendirilmesi 94
Şekil 4.14 P40 olgusunun (IV:8) pedigri ile gösterimi ve *ALDH18A1* c.1502T>C varyantının IGV'de gösterimi 96
Şekil 4.15 P110 olgusunun (V:2) pedigri ile gösterimi 96
Şekil 4.16 P111 (IV:4) olgusunun pedigri ile gösterimi 97
Şekil 4.17 P114 ve P114k (VI:3 ve VI:5) olgularının pedigri ile gösterimi 98

KISALTMALAR LİSTESİ

ACMG	*American College of Medical Genetics and Genomics*
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AHH	Adenohipofiz hipoplazisi
ASD	Atrial septal defekt
AVP	Arginin vazopressin
BAM	*Binary Alignment Map*
BH	Büyüme hormonu
CGH	*Comparative Genomic Hybridisation*
CHARGE	*Coloboma, Heart, Choanal atresia, Retardation, Genital and Ear*
CRH	Kortikotropin salgılatıcı hormon
CNV	*Copy number variation*
CVID	*Common Variable Immundeficiency*
ÇHHE	Çoklu hipofiz hormon eksikliği
C/S	*Caesarean sectio*
DEHAB	Dikkat eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu
DGV	*Database of Genomic Variants*
ENH	Ektopik nörohipofiz
FASTQ	Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm and Quality
FSH	Folikül Stimülan Hormon
GHDM	Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi
GHR	Büyüme hormon reseptörü
GHRH	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
GHRHR	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörü
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
HGMD	*Human Gene Mutation Database*
HH	Hipogonadotropik hipogonadizm
HPE	Holoprozensefali
IGV	*Integrative Genomics Viewer*
IGF-1	*Insulin like growth factor-1*
IGFBP3	*Insulin like growth factor binding protein -3*

ISS	*In situ sequencing*
KED	Klinik ekzom dizileme
KH	Konjenital hipopituitarizm
KKH	Konjenital kalp hastalığı
KKA	Korpus kallozum agenezisi
LGA	*Large for gestational age*
LH	Luteinizan hormon
LP	*Likely pathogenic*
MLPA	*Multiplex-Ligation Probe Amplification*
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MSH	Melanosit Stimulan Hormon
MS-MLPA	*Methylation spesific- Multiplex Ligation Probe Amplification*
MSS	Merkezi sinir sistemi
MAF	Minör allel frekansı
NSD	Normal spontan doğum
OD	Otozomal dominant
OMIM	*Online Mendelian Inheritance in Man*
OR	Otozomal resesif
POMC	Proopiomelanorkortin
PS	Pulmoner stenoz
PSIS	*Pituitary Stalk Interruption Syndrome*
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RDS	Respiratuvar distres sendromu
Rsa	*Region spesific assay*
SDS	Standart deviasyon skoru
SGA	*Small for gestational age*
SHH	*Sonic Hedgehog*
SNP	*Single Nucleotide Polymorphism*
SMRT	*Single Molecule Real Time*
SOD	Septo-optik displazi
SS	Somatostatin
TED	Tüm ekzom dizileme
TGD	Tüm genom dizileme

TSH	Tiroid stimulan hormon
TRH	*Thyrotropin releasing hormone*
XR	X'e bağlı resesif
VACTERL	*Vertebral defects, Anal atresia, Cardiac defects, Tracheoesophageal fistula, Renal anomalies, and Limb*
VCF	*Variant Call Format*
VUS	*Variant of uncertain significance*
WT	*Wild type*
YND	Yeni nesil dizileme

ÖZET

Yavas Abalı Z. Çoklu Hipofiz Hormon Eksikliği Olan Olgularda Yeni Nesil Dizileme Tekniklerinin Moleküler Patolojinin Aydınlatılmasına Katkısı ve Genotip-Fenotip İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2024

Çoklu hipofiz hormonu eksikliği (ÇHHE), hipofiz transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki varyantlar nedeniyle bir veya daha fazla hipofiz hormonunun eksikliği olarak tanımlanmaktadır. ÇHHE olgularında genetik etiyolojinin belirlenmesi, hipofiz disfonksiyonunun derecesi ve hipofiz dışı özelliklerin öngörülmesini sağlar; ancak, günümüzde pek çok olgunun genetik etiyolojisi aydınlatılamamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, farklı moleküler teknikler kullanarak incelenmiş geniş bir ÇHHE kohortunda genetik etiyolojiyi tanımlamak ve genotip-fenotip ilişkisini belirlemektir. Hedefli bir ÇHHE gen paneli (25 gen) 118 indeks olguda (45 kadın) uygulanmıştır. Seksen bir olguda Multiplex ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) kullanılmıştır. Klinik ekzom dizileme (KED) 17 olguda, tüm ekzom dizileme (TED) ise 15 indekste (n=2 trio; n=2 duo) kullanılmıştır.

Olguların pediatrik endokrinoloji kliniğine başvuru yaşı ortanca 5,9 yıldı. Akrabalık oranı %40,8 idi. Boy kısalığı en sık başvuru nedeniydi (%63,2). Panel testi ile toplam 98 olgu analiz edilmiş ve 11 olguda ÇHHE ile ilişkili genlerde varyant tespit edilmiştir. Bu genler *GHSR* (n=1), *IGSF1* (n=2), *LHX3* (n=1), *POU1F1* (n=2), *PROKR2* (n=2) ve *GH1* genleriydi (n=1). KED ile analiz edilen olguların %29,4'ünde (5/17) moleküler etiyoloji belirlenirken TED analizinde *GLI2* (n= 2), *RNPC3* (n= 2), *ROBO1* (n=1) ve *SMCHD1* (n=1) genlerinde varyant saptanmıştır. TED analizi yapılan olguların üçünde aday gen tespit edilmiştir (*ALDH18A1, MFHAS1* ve *DHX29*).

Çeşitli tekniklerin kullanımı ile moleküler etiyoloji, toplamda kohortumuzun %21,2'sinde belirlenebilmiştir. Bu oran, henüz tanımlanmamış yolakların, epigenetik faktörlerin ve çevresel etkilerin de ÇHHE patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipofiz bezi, Çoklu hipofiz hormon eksikliği, Konjenital hipopituitarizm, Multipleks ligasyon prob amplifikasyon, Tüm ekzom dizileme

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-38742

ABSTRACT

Yavas Abalı Z. The Contribution of Next-Generation Sequencing Techniques to Elucidating the Molecular Pathology and Investigating the Genotype-Phenotype Relationship in Cases with Multiple Pituitary Hormone Deficiency. İstanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Genetics. Doctoral Thesis. Istanbul. 2024.

Multiple pituitary hormone deficiency (MPHD) is defined as the deficiency of one or more pituitary hormones due to variants in the genes encoding pituitary transcription factors.

Identifying the genetic etiology in MPHD enables the degree of pituitary dysfunction and extra-pituitary features to be predicted; however, there are still many cases that remain unresolved.

The objective of this study was to identify the genetic etiology and determine the genotype-phenotype correlations in a large cohort of MPHD using a combination of molecular techniques.

A targeted MPHD gene panel (25 genes) was applied in 118 indexes (45 female). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was used in a total of 81 cases. Clinical exome sequencing (CES) was employed in 17, and exome sequencing (ES) in 15 indexes (n=2 trio; n=2 paired).

The median age at admission to the pediatric endocrinology clinic was 5.9 years. The consanguinity ratio was 40.8%. Short stature was the most common reason for referral (63.2%). A total of 98 cases were analyzed with the panel, and variants in MPHD-associated genes were identified in 11 indexes. These genes were *GHSR*(n=1), *IGSF1*(n=2), *LHX3*(n=1), *POU1F1* (n=2), *PROKR2*(n=2), and *GH1* genes (n=1). CES revealed the molecular etiology in 29.4% (5/17). ES revealed *GLI2*(n= 2), *RNPC3*(n= 2), *ROBO1*(n=1), and *SMCHD1*(n=1) variants. Candidate genes were identified in 3 solo ES (*ALDH18A1*, *MFHAS1*, and *DHX29*).

The molecular etiology could only be determined in 21.2% of our cohort using various techniques. This indicates that yet unidentified pathways, epigenetic factors, and environmental influences may be involved in the pathogenesis of MPHD.

Key Words: Pituitary gland, Multiple pituitary hormone deficiency, Congenital hypopituitarism, Multiplex- ligation probe amplification, Whole exome sequencing

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2022-38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipofiz hormon eksikliği veya hipopituitarizm, büyüme, üreme, homeostaz ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli görevleri olan birçok hormonun salgılandığı hipofiz bezinin doğumsal veya edinsel hormon üretimi ve salgılamasında bozukluklar sonucunda ortaya çıkan endokrinolojik bir hastalık grubunu tanımlar.

İlk Çağ'dan itibaren yaşamsal önemi fark edilen hipofiz bezi, endokrin bir organdır. Ön hipofiz (adenohipofiz) ve arka hipofiz (nörohipofiz) olmak üzere embriyolojik, morfolojik ve işlevsel iki farklı bölümden oluşur. Adenohipofizden, büyüme hormonu (BH), tiroid stimulan hormon (TSH), adrenokortikotropik hormon (ACTH), prolaktin, luteinizan hormon (LH) ve folikül stimulan hormon (FSH), nörohipofizden ise arginin vazopressin (AVP) ve oksitosin salgılanmaktadır (1).

Hipopituitarizm, bu hormonlardan sadece birinin eksikliği yani "izole hipofiz hormon eksikliği" şeklinde olabileceği gibi, birden fazla hipofiz hormonunun eksikliği şeklinde de olabilir. Bu durum, "çoklu (multipl veya kombine) hipofiz hormon eksikliği" (ÇHHE) olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın etiyolojisinde konjenital ve edinsel nedenler rol oynar (2). Konjenital hipopituitarizmin (KH) doğumdaki insidansı 1/4.000-10.000 olarak bildirilmektedir. İzole hipofiz hormon eksikliği genellikle kalıtsaldır, ÇHHE ise çoğunlukla sporadiktir, olguların %5-30'u ailevi olabilmektedir (3). Ailevi olguların etiyolojisinde ise hipofizin embriyolojik gelişimini düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlayan *HESX1, LHX3, LHX4, POU1F1, PROP1, SIX6, OTX2, PTX2, GLI2, SOX3* gibi genlerdeki işlev kaybına neden olan değişimler rol almaktadır (4).

Günümüzde, yeni nesil dizileme (YND) tekniklerindeki hızlı ilerlemeler sayesinde ÇHHE ile ilişkilendirilmiş gen sayısında artış olsa da olguların büyük çoğunluğunun etiyolojisi henüz bilinmemektedir ve beşte birinden azında bilinen genlerde hastalık ile ilişkili varyantlar saptanabilmektedir (5, 6). Bu durum, ÇHHE ile ilişkili tanımlanmayı bekleyen pek çok gen veya gelişimsel mekanizma olduğunu düşündürmektedir.

Hipofizin karmaşık gelişimini ve işlevini sağlayan, yolakların devamında rol oynayan, bilinen ve bilinmeyen pek çok sinyal iletimi söz konusudur. Yeni moleküler mekanizmaların saptanarak genotip-fenotip ilişkilerinin aydınlatılması, olguların klinik izlemi ve tedavisi açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada; klinik ve biyokimyasal özellikleri ile ÇHHE tanısı almış, 25 ilişkili ve olası ilişkili gen içeren ÇHHE gen paneli ile moleküler genetik tanısı konamamış olgularda, MLPA (*Multiplex-Ligation Probe Amplification*), tüm ekzom dizileme (TED) ve tüm genom dizileme (TGD) yöntemleri kullanılarak moleküler genetik etiyolojinin aydınlatılması, bilinen genlerde ilişkili varyantların saptanması ve yeni genlerin tanımlanması, genotip-fenotip ilişkilerin değerlendirilmesi ve kullanılan farklı tanı yöntemlerinin tanıya olan katkısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hipofiz Bezi

Tarihçe

Hipofiz bezi ile ilgili ilk yazılı bilgiler MS 2. yüzyılda ortaya çıkmıştır. Bergama'lı Galen (129-216), hipofiz bezinin beyin atıklarını mukus veya balgam (Latince'de *pituita*) şeklinde alıp nazal boşluklardan dışarı atılmadan önce filtrelediğini düşünüyordu. Yunanca "ptuo" ve Latince "pituita" kelimelerinden türeyen ve "balgam" anlamına gelen "phlegm" kelimesi, hipofiz bezinin nazofarengeal kökenini yansıtır (1).

Rönesans ile birlikte artan çalışmalar hipofiz bezinin incelenmesini hızlandırmıştır. Andreas Vesalius (1514-1564), *De Humani Corporis Fabrica Libri Septem* adlı kitabında infindibulum ve hipofizin anatomik bağlantısını tanımlamıştır (7). Klinik nörobilimin kurucusu Thomas Willis 17.yüzyılda *Cerebri Anatome* adlı kitabında, beynin ventral yüzeyini perfüze eden kandan gelen "humorlar"ın hipofiz bezine taşındığını belirtmiştir (8). Descartes, 17. yüzyılda beynin vücuttaki pek çok endokrin işlevi kontrol ettiğini öne süren ilk kişi olmuştur. Morgagni, 1733 yılında anensefalik bir yenidoğanda adrenal bezlerin gelişmediğini tespit ederek beyin ile adrenal bezler arasında gelişimsel ve işlevsel bir bağlantının kanıtlarını sunmuştur. Claude Bernard, 1849'da dördüncü ventrikül bölgesindeki lezyonların poliüriye yol açtığını göstererek nöroendokrinolojide ilerlemelere zemin hazırlamıştır (1).

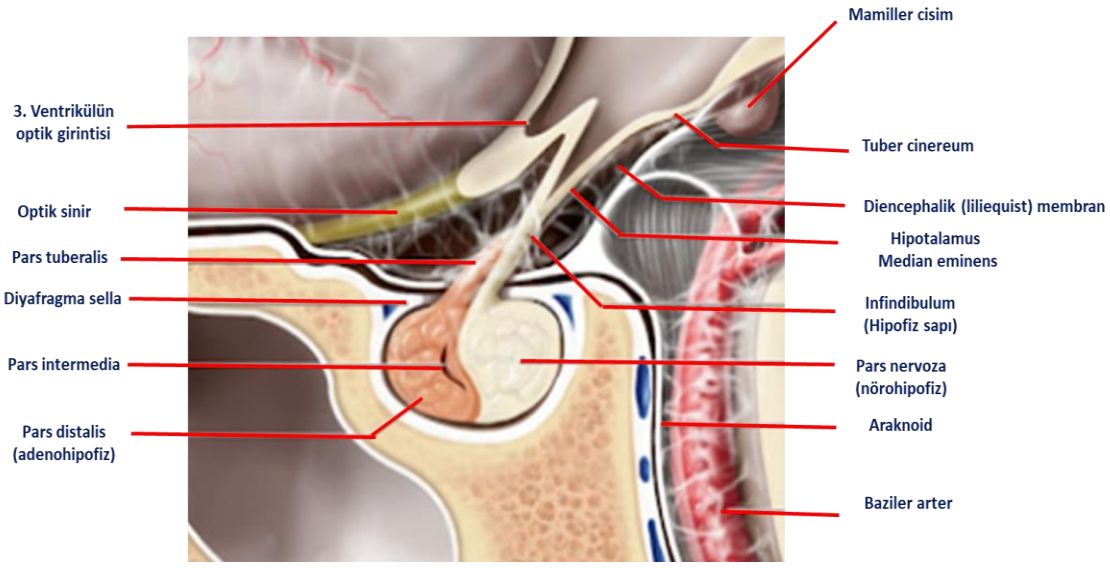
Daha sonraki araştırmalarda hipofiz hormonlarının tanımlanması ve kimyasal olarak izolasyonu ile hipofiz tümörlerinin akromegali ve Cushing hastalığı gibi hipofizin fonksiyonel hipersekretuvar sendromları ile ilişkisi tanımlanmıştır (1).

Modern nöroendokrinolojinin öncüsü kabul edilen Geoffrey Harris, 1948'de ön hipofiz hormonlarını incelemiş, bu hormonların kontrolünün hipotalamik düzenlemelerle ve buradan salınan özgün düzenleyici faktörlerle ilişkili olduğunu bildirmiştir (9).

Anatomi

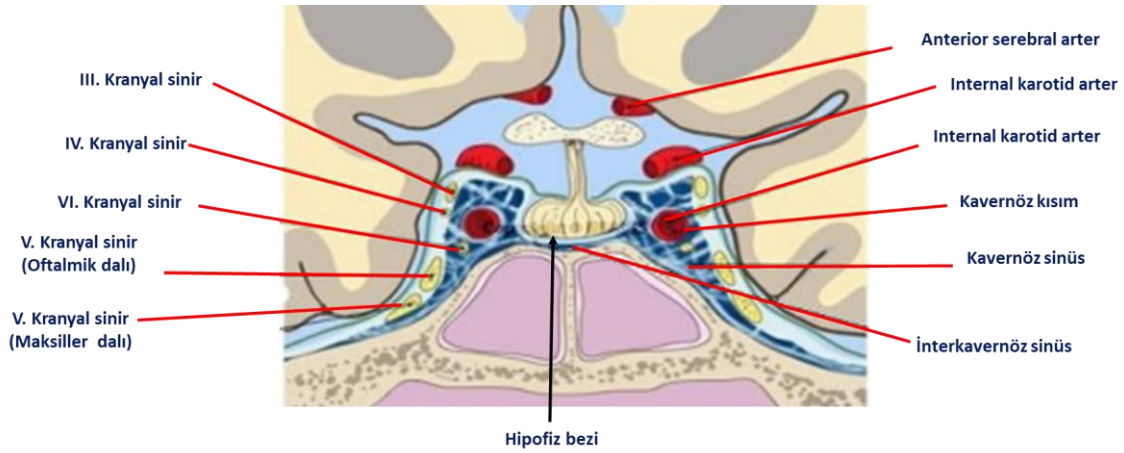
Hipofiz, ön (anterior) lob, arka (posterior) lob ve ara (*pars intermedia*) lob olmak üzere üç lobdan oluşmaktadır. Ön lob, adenohipofiz; arka lob nörohipofiz olarak da adlandırılmaktadır. Hipofiz sapı (infindibulum, *stalk*) ile hipotalamusa (*median eminen*se) bağlanır. *Sella turcica* içinde yer alır ve dura ile (diyafragma sella) örtülür. Yetişkinlerde hipofiz yaklaşık 600 mg ağırlığındadır (400-900 mg aralığında değişir). En geniş çapı (transvers) yaklaşık olarak 13 mm olup vertikal yükseklikte 6-9 mm ve anteroposterior boyutta yaklaşık 9 mm ölçülerindedir. Yaşamın farklı dönemlerinde (çocukluk, puberte, gebelik gibi) boyutlarında belirgin değişiklikler olmaktadır (1, 10).

Sella turcica, kafa tabanında yer alır ve sfenoid sinüsün ince kemik çatısını oluşturur. Yan duvarları, üçüncü, dördüncü ve altıncı kraniyal sinirler ile internal karotid arterlerin geçtiği kavernöz sinüsler ve etrafındaki kemik ile duradan oluşur. Dura örtüsü, hipofiz bezini beyin omurilik sıvısının basıncından korur. Hipofiz sapının önünde bulunan optik kiyazma, doğrudan diyafragma sellanın üstündedir. Bu nedenle, optik traktus, hipofiz kitlesi tarafından oluşturulan bası etkisine maruz kalabilir. Hipofiz bezinin anatomisi **Şekil 2.1** ve **Şekil 2.2**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Hipofiz bezi ve anatomisi (sagittal kesit) (11)

Oberfield SE, Gallagher MP, Hale DE. Endocrinology. In: Polin RA, Ditmar MF, editors. Pediatric Secrets (Fifth Edition). Philadelphia: Mosby; 2011. p. 197-228 kaynağından düzenlenmiştir.



Şekil 2.2 Hipofiz bezi ve anatomisi (Koronal kesit) (12)

Choe CH, Cornblath WT. Orbital Signs of Parasellar Syndromes. In: Servat JJ, Black EH, Nesi FA, Gladstone GJ, Calvano CJ, editors. Smith and Nesi's Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 667-87 kaynağından düzenlenmiştir.

Nörohipofiz doğrudan hipofiz sapının supraoptikohipofizer ve tuberohipofizer sinir kümeleri tarafından inerve edilir. Bu nedenle, hipotalamik nöronal lezyonlar, sap kesisi veya hipotalamusta sistemik olarak köken alan metastazlar sıklıkla AVP eksikliği veya oksitosin salgısında bozukluklar ile ilişkilidir (1).

Hipofizin kan dolaşımı

Hipofiz, birkaç kaynaktan sağlanan oldukça zengin bir kan dolaşımına sahiptir. Superior hipofiz arterler, internal karotis arterlerden dallanarak hipotalamusu besler; median eminens içinde bir kapiller ağ oluşturur ve kan-beyin bariyeri dışında bulunurlar. Hipofizin hem uzun hem de kısa portal damarları, sırasıyla infundibular pleksuslar ve hipofiz sapından köken alır. Bu damarlar, adenohipofizin temel kan akımını oluşturan hipotalamik-portal dolaşımı oluşturur. Böylece, adenohipofizin uyarıcı hormon üreten hücrelerine hipotalamik salınımı ve inhibisyon hormonlarını herhangi bir sistemik seyrelme olmadan iletmelerini sağlar; bu da hipotalamik hormon salınımının hipofiz zamanlamasına bağlı olarak düzenlenmesine olanak tanır. Hipotalamik hormonların vasküler taşınması, aynı zamanda superior hipofiz arterlerinin sap dallarından türeyen kontraktif bir iç kapiller pleksus (Gomitoli) tarafından bölgesel olarak düzenlenir. Geriye doğru median eminense kan akımı olması da, çift yönlü işlevsel hipotalamik-hipofiz etkileşimlerini kolaylaştırır. Sistemik arteriyel kan akışı, nörohipofizi öncelikle besleyen inferior hipofiz arteriyel dallar tarafından sağlanır (13).

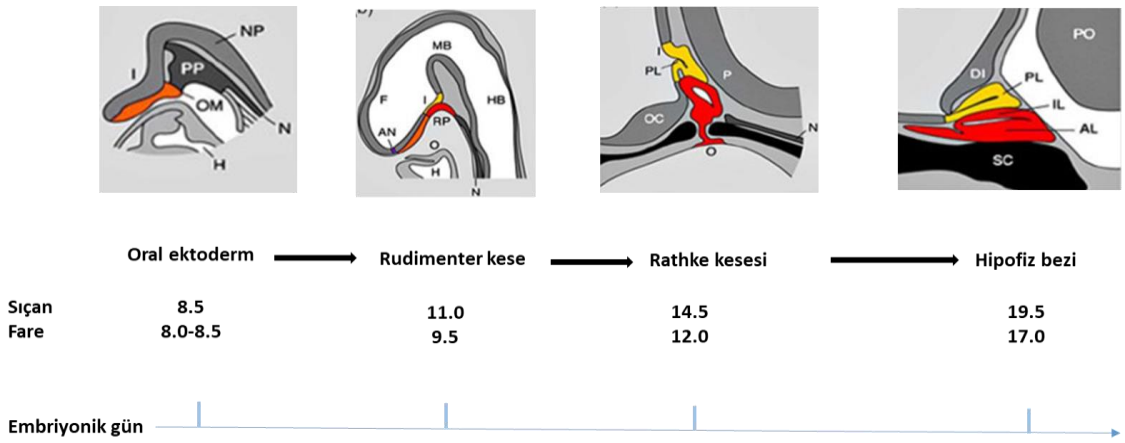
Sap bütünlüğünün bozulması, hipotalamik hormonların adenohipofiz hücrelerine erişimini engelleyerek hipofiz portal kan akımının zarar görmesine neden olabilir.

Hipofiz bezinin gelişimi

Yapısal gelişim

Adenohipofiz stomodeum (ağız boşluğu) tavanındaki Rathke kesesinden, nörohipofiz ise diensefalonun yaptığı çıkıntıdan gelişir. Bu gelişim, ekstrinsik ve intrinsik çok sayıda transkripsiyon faktörü ile sinyal molekülünün zamansal ve mekansal etkileşimleri sonucunda gerçekleşen aşamalı bir süreçtir. İnsanlarda bu süreçler için doğrudan kanıtlar yeterli değildir; ancak, zebra balığı, amfibiler ve kemirgenler dahil olmak üzere birçok omurgalı türünde hipofiz gelişiminin oldukça korunmuş bir süreç olduğu bilindiği için diğer türlere ait verilerden insana dair de oldukça fazla bilgi edinilmiştir. Özellikle farelerde hipofizin gelişimi oldukça iyi karakterize edilmiştir (14). Bu nedenle, klasik olarak insanda hipofiz gelişimi faredeki gelişim zamanlamasına göre tanımlanır.

Farede, hipofiz gelişimi insandaki gebelik yaşı eşdeğeri olan 4-6 haftada başlar ve (i) hipofiz plakodu, (ii) rudimenter Rathke kesesi, (iii) definitif Rathke kesesi ve (iv) olgun hipofiz olmak üzere dört aşamada gerçekleşir **(Şekil 2.3)**.



Şekil 2.3 Kemirgen hipofiz gelişiminin aşamaları (15)

Oral ve nöroektoderm yapılarının katlanma sürecinin lateralden gösterimi.

I: infundibulum; NP: nöral plak; N: notokord; PP: *Pituitary placode*, hipofiz plakodu; OM: oral membran: H: *heart*, kalp; F: *forebrain*, ön beyin; MB: midbrain, orta beyin; HB: hindbrain, arka beyin; RP: *Rathke Pouch*, Rathke kesesi; AN: anterior neural por; O: oral kavite; PL: *posterior lobe*, arka lob; OC optik kiyazma; P: pontin fleksur; PO pons; IL: *intermediate* lob, ara lob; AL: anterior lob, ön lob; DI: diensefalon; SC: *sphenoid cartilage*, sfenoid kıkırdak. Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. Trends Genet. 1999;15(6):236-40 kaynağından düzenlenmiştir.

Hipofiz gelişimi, fare modelinde embriyonik 7.5 günde (E7.5) nöral plağın ön sırtındaki hipofiz plakodundan başlar. Ventrale doğru yer değiştirme oral ektodermin ve oral kavitenin oluşumuna yol açar. Bu ektodermin bir kısmı rostral olarak invaginasyon öncesi kalınlaşır (E8.5). Dört haftalık gebeliğe karşılık gelen E9.5'te, dorsale göç olur ve rudimenter Rathke kesesi olarak bilinen bir koni şeklinde bir yapı ile sonuçlanır. Bu yapı, mezenkime yayılan artan rostral mitoz ile kalınlaşmaya devam eder. Rathke kesesi farelerde E10.5'te, insanlarda ise gebeliğin 5. haftasında belirgindir. Devam eden proliferasyonun ardından, E12.5'te (insanda 6. gebelik haftası) oral ektodermden ayrılır. Hormonal hücre öncülleri ventral kısımdan çoğalarak ortaya çıkar ve adenohipofizi oluşturur. Kök hücreler Rathke kesesinin artık yarığından ayrılır ve adenohipofiz hormonlarını üreten hücrelere dönüşür. Somatotroplar kaudomedialde, gonadotroplar rostroventralde ve kortikotroplar ventralde ortaya çıkar. Dorsal yön daha sonra inen infundibulumla birleşir ve ince kalır (ara lob) (16). Baş mezenkimi ve nöral krest hipofize ve vasküler yapılara katkıda bulunur. İnsanlarda hipofiz bezi 13. gebelik haftasında morfolojik olarak gelişmiştir ve 21. gebelik haftasına kadar büyümeye devam eder (17).

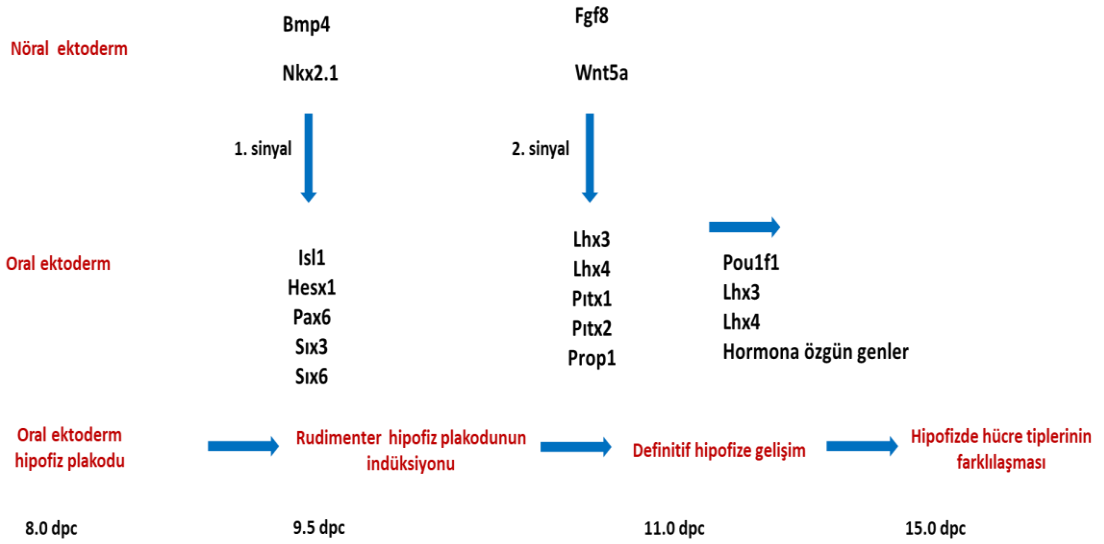
Tüm süreçlerin normal işlemesi için rudimenter Rathke kesesi ile diensefalon arasında etkileşim gereklidir. *In vitro* doku rekombinasyon deneyleri, nöral ektodermin Rathke kesesinin büyümesi ve farklılaşması üzerinde dramatik etkileri olduğunu göstermiştir. Bu durum, nöral ektodermin hipofiz oluşumu için gerekli olan indükleyici sinyalleri sağladığına dair hipotezleri geliştirmiştir. Salgılanan sinyal molekülleri *bone morphogenetic protein 4* (bmp4) ve *fibroblast growth factor 8* (fgf8)'dir. *Fgf8* de *LIM homeobox 3* (*lhx3*) ve LIM homeobox 4 (*lhx4*) olmak üzere iki düzenleyici geni aktive ederek rudimenter kesenin net bir keseye dönüşmesini sağlar (18). Bir *homeobox* geni olan *Nkx2.1*'in (T/ebp, Ttf1 *olarak* da bilinir), hipofiz hattına yakın bir yerde, ventral diensefalonda ifade edildiği gösterilmiştir. Bu gen, embriyogenez sırasında hiçbir zaman oral ektodermde veya Rathke kesesinde ifade edilmez. Bununla birlikte, *Nkx2.1* genindeki *null* mutasyon sadece diensefalon gelişiminde ciddi kusurlara değil, aynı zamanda hipofiz bezinin ablasyonuna da neden olur. Bu veriler, nöral ektodermden türetilen sinyallerin hipofiz bezinin oluşumu için gerekli olduğuna dair doğrudan kanıt sağlar (15).

Oral ektodermdeki sinyaller de önemlidir. *SHH* geninin ifadesi, Rathke kesesini üretmek için kalınlaşan oral ektodermde belirgindir. SHH sinyali, LIM homeobox transkripsiyon faktörü *LHX3*'ü indükler. β-katenin aracılı WNT sinyalizasyonu da Rathke kesesinin büyümesi ve nöral ektodermin uzanımını uyarmak için de gereklidir.

Nörohipofizin gelişimi için de Rathke kesesinin gelişmekte olan diensefalonun tabanı ile teması önemlidir. Bu temas ile nöroektodermden köken alan bir uzantı oluşur ve bu uzantı nörohipofizi oluşturmak üzere dorsale doğru ilerler. Üçüncü ventrikül dışa doğru bir uzantı şeklinde infundibulumu oluşturur. Bu uzantının hemen önündeki doku optik kiyazmayı oluştururken diensefalon da bu süreç boyunca hipotalamusu oluşturmak üzere gelişir (16).

Gonadotrop hücrelerin gelişiminde rol oynayan faktörler arasında olfaktör plakodun gelişimi de yer alır. Olfaktör plakod, nöral plak üzerindeki hipofizer plakodun hemen lateralinde oluşur. Buradaki hücreler olfaktör bulbusun yanı sıra altıncı gebelik haftasından itibaren ön beyne göç eden ve 15. haftada hipotalamusa ilerleyen GnRH salgılayan hücreleri de oluşturur. Bu hücrelerden çıkan aksonlar hipotalamik portal sisteme uzanarak gonadotrop hücrelerin düzenlenmesini sağlar (19).

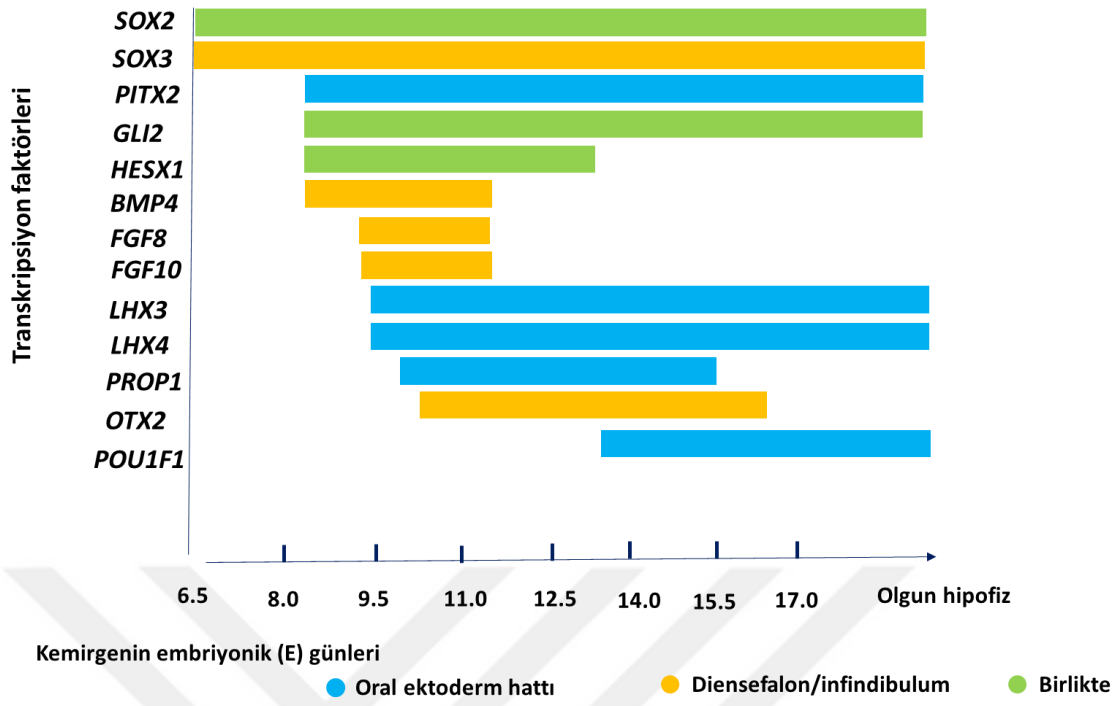
Özetle, erken aşamalarda rol alan sinyal molekülleri, ventral diensefalondan üretilen Bmp4, Fgf8, Fgf4, Nkx2.1, Wnt5a, oral ektodermden üretilen sonic hedgehog (Shh), ve çevre mezenkimden üretilen Bmp2 ve Chordin ile Rathke kesesinden üretilen Bmp2 ve Wnt4 olarak sayılabilir (20). Hipofiz organogenezinde erken dönemde ifade edilen diğer transkripsiyon faktörleri Hesx1, Lhx3, Lhx4, Sox2, Sox3, Gli2 ve Otx2'dir. Prop1 ve Pou1f1 (daha önce Pit1 olarak biliniyordu) daha sonraki aşamalarda görev alır (18).



Şekil 2.4 Gelişmekte olan hipofiz bezinde sinyal molekülleri ve transkripsiyon faktörlerinin etkisi (20)

dpc: *day post-coitum*

Kelberman D, Dattani MT. The role of transcription factors implicated in anterior pituitary development in the aetiology of congenital hypopituitarism. Ann Med. 2006;38:560-77 kaynağından düzenlenmiştir.

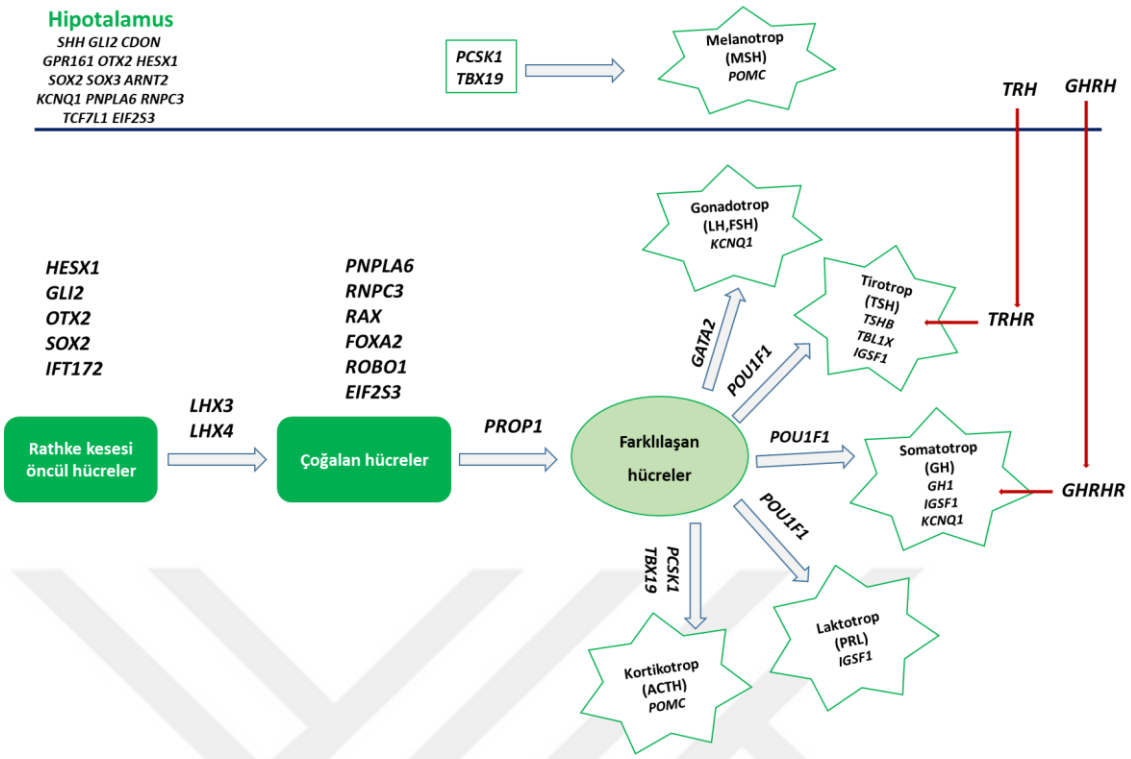


Şekil 2.5 Kemirgenlerde transkripsiyon faktörlerinin ifadesinin zamanlaması (2)

Cullingford DJ, Siafarikas A, Choong CS. Genetic Etiology of Congenital Hypopituitarism. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, ve ark., editors. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. kaynağından yeniden düzenlenmiştir.

Transkripsiyon faktörleri ve bu faktörleri kontrol eden genlerdeki değişimler hipofiz gelişiminin etkilenmesine veya durmasına neden olabilir. Erken gelişim sırasında ortaya çıkan bozukluklar genellikle göz, olfaktör bulbus, orta hat yapıları ve ön beyin gibi yakın yapıları etkileyebilirken daha sonraki aşamalardaki bozukluklar tipik olarak izole hipofiz anormalliklerine neden olmaktadır (2). Örneğin, *SOX2*, *HESX1* ve *GLI2* gibi gelişimin erken dönemlerinde ifade edilen genlerdeki kusurlar yakındaki diğer yapıları daha sık etkilerken, *PROP1* ve *POU1F1* gibi daha sonra ifade edilenler tipik olarak lokalize etkilere sahiptir.

Transkripsiyon faktörlerinin embriyolojik gelişim sırasında etkinlikleri birden fazla transkripsiyon faktörü tarafından arttırılabilir (*upregulation*) veya azaltılabilir (*downregulation*) ve ifade edildikleri bölgeler de değişebilir.



Şekil 2.6 Hipofiz gelişiminde transkripsiyon faktörlerinin seyri (3)

Gregory LC, Dattani MT. The Molecular Basis of Congenital Hypopituitarism and Related Disorders. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2019;105:e2103-e20 kaynağından yeniden düzenlenmiştir.

İşlevsel gelişim

Adenohipofizin en erken farklılaşma belirteci, E11.5'te ventral Rathke kesesindeki sınırlı bir hücre alanında ifade bulan α-glikoprotein alt birimidir (αGSU) (*Cga* tarafından kodlanır). Bu hücreler, transkripsiyon faktörü islet-1'i (*Isl1*) de ifade eden ve tiroid uyarıcı hormon β-alt ünitesinin (*Tshβ*) ifadesini başlatarak E12.5'te farklılaşacak olan tirotroplara karşılık gelir. Bu erken hücre popülasyonu geçicidir ve doğumda kaybolur; olgun hipofizde αGSU sadece definitif tirotrop ve gonadotroplarda tespit edilir.

Pomc ifadesi ile tanımlanan kortikotroplar E12.5'te başlar. *gh* ve *prl*'nin E15.5'e kadar ifade edilmesi, sırasıyla somatotrop ve laktotropların farklılaşmasının ayırt edici özelliğidir. Prolaktin, gelişmekte olan bezin anterolateral kanatlarında ortaya çıkar, ardından hücre sayıları önemli ölçüde artar ve E18.5'e kadar anterior lobun merkezi ve lateral kısımları boyunca göç ederler. Laktotroplar, ara lobun ventral yüzeyine bitişik medial bölgede lokalize kalır. Gonadotroplar, E16.5'te LH'nin β-alt biriminin (Lhβ) ve

bir gün sonra FSH'nin (Fshβ) ifadesinin başlamasıyla ortaya çıkan son hücre soyudur (10).

Benzerliklere rağmen farelerdeki hipofiz gelişiminin insanlarla tam olarak ilişkilendirilmesi zordur. Pluripotent kök hücreler, hipotalamus ve adenohipofiz hücrelerini oluşturmaya yönlendirilmiş olsa da transkripsiyon faktörlerinin karmaşık etkileşimi ve diğer anatomik yapılarla etkileşimleri nedeniyle insanlarda kesin zamanlamalar bilinmemektedir. Tarihsel embriyo örnekleri, gestasyonun dördüncü haftasında Rathke kesesinin oluştuğunu, altıncı haftada ağız boşluğu ile bağlantısının kesildiğini ve 16. haftada adenohipofizin tamamen farklılaştığını göstermektedir. Bu iki embriyolojik zaman çizelgesini ilişkilendirmek için hormon ifadesi kullanıldığında, insanlar sekizinci gebelik haftasında BH, FSH, LH ve ACTH, 13. haftada ise TSH ve prolaktin üretmeye başlar (21).

Geleneksel kabul gören hücre farklılaşmasının ardışık olarak ilerlediği görüşü yerine son yıllarda hücrelerin daha erken özelleştiği ve sonradan belirlenmiş konumlarına göç ettikleri görüşü önem kazanmaktadır. *Birth-dating* çalışmalarında da gösterilen, gelişim sürecinin basamaklı olarak ilerlemediği, hücrelerin daha karmaşık ve dinamik bir model ile özelleştiği öne sürülmektedir (22).

Hipotalamus, diğer nöron gruplarından farklı olarak hipofizotropik etkisi olan uyarıcı ve inhibe edici hormonları sentezleyen sinir hücre gövdelerini ve aynı zamanda nörohipofizden salınan AVP ve oksitosin hormonlarını içerir. Hipotalamik parvoselüler nörosekretuvar sistem adenohipofiz hormonlarının salınımından sorumludur. TSH ve prolaktin salgısını uyaran tirotropin salgılatıcı hormon (TRH), ACTH salgısını uyaran kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), FSH ve LH salınımını uyaran gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), BH salınımını uyaran büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH), BH salınımını negatif olarak düzenleyen somatostatin (SS) ve prolaktin salınımını inhibe eden dopamin gibi faktörler salgılar. Bu hipotalamik faktörler hipofizer portal kan dolaşımı aracılığıyla adenohipofize taşınır (23).

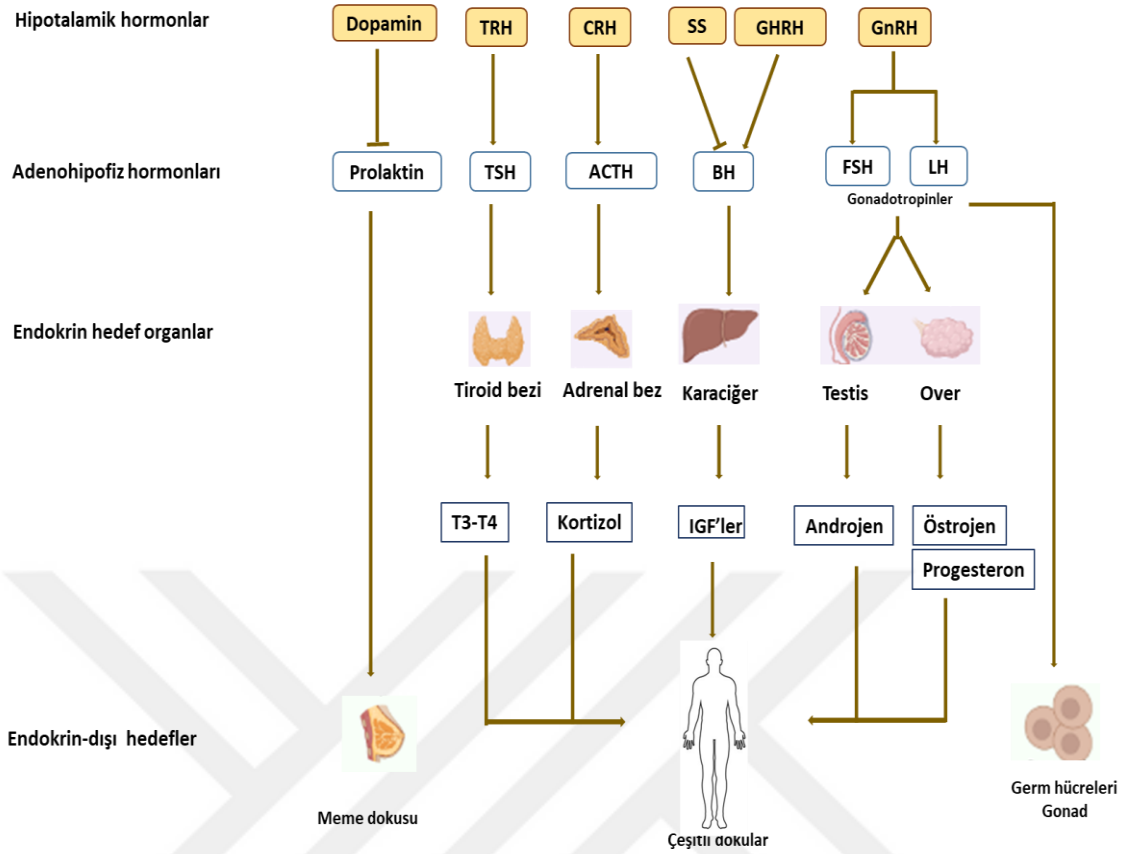
Olgun bir adenohipofiz içerisinde beş farklı hormon salgılayan hücre tipi bulunmaktadır:

- Kortikotrop hücreler, ACTH dahil olmak üzere pro-opiyomelanokortin (POMC) peptidlerini,
- Somatotrop hücreler BH'yi,
- Tirotrop hücreler, genel glikoprotein α-alt birimi ve özgün TSH-β alt birimini,
- Gonadotrop hücreler, FSH ve LH için hem α- hem de β-alt birimlerini,
- Laktotrop hücreler de, prolaktin salgısını düzenler.

Adenohipofizdeki hücre dağılımı %40-50 somatotrop, %15-20 kortikotrop, %10-15 laktotrop, %10-15 gonadotrop ve %3-5 tirotrop olarak sıralanabilir (2, 10).

Histolojik olarak hematoksilen-eozin ile boyanma özelliklerine göre de asidofilik (somatotrop ve laktotrop hücreler), bazofilik (gonadotrop, kortikotrop, tirotrop) ve kromofobik (POMC'nin yıkım ürünü olan α-MSH ve β-endorfin) olarak gruplandırılmaktadır.

Her hücre tipi, kendi farklılaşmış gen ifadesini düzenleyen son derece özgün sinyallerle kontrol edilmektedir (24). Büyüme hormonu, etkisini karaciğerden insülin benzeri büyüme faktörü 1'in (IGF-1) indüklenmesi yoluyla gösterir ve lineer büyüme için kritik öneme sahiptir. Prolaktin, meme bezinin gelişimini ve süt salgısını uyarır, tipik olarak gebelik ve emzirme döneminde aktifleşir. TSH, tiroid bezinden tiroid hormonu üretimini uyarır, bu da metabolik hızı düzenler. Çocukluk döneminde büyüme ve bilişsel gelişim için kritik öneme sahiptir. FSH ve LH gonad gelişimini, testosteron veya östrojen üretimini ve germ hücrelerinin olgunlaşmasını destekler. ACTH, kortizol üretimini uyarır. Nörohipofiz, hipotalamik-hipofizer yol olarak bilinen hipotalamik hücrelerden gelen aksonal uzantıların bir parçası olarak veziküllerde bulunan AVP ve oksitosin salgılar (10).



Şekil 2.7 Hipotalamus – hipofiz – hedef organ eksenleri

TRH: *Thyrotropin-releasing hormone*; CRH: *Corticotropin-releasing hormone*: SS: Somatostatin; GHRH: *Growth hormone-releasing hormone*: GnRH: *Gonadotropin-releasing hormone*: TSH: *Thyroid stimulating hormone*: ACTH: *Adrenocorticotropic hormone*: FSH: *Follicle stimulating hormone*: LH: *Luteinizing hormone*; T3: *Triiodothyronine*; T4: *Thyroxine;* IGF-1: *Insulin-like growth factor -1*

Kwadade, K. "Concept map of the endocrine system" (2024). [ONLINE] Available at https://www.myendoconsult.com/learn/glucose-transporters [Accessed 26 June 2024] kaynağından yeniden düzenlenmiştir.

2.2 Hipopituitarizm

Hipopituitarizm, sadece bir hipofizer hormonun eksik olduğu izole hipofiz hormon eksikliği ve birden fazla hormonun eksik olduğu ÇHHE olarak sınıflandırılabilir. Panhipopituitarizm terimi ise tüm adenohipofiz hormonlarının eksikliğini tanımlamak için kullanılsa da bazı durumlarda bu terim AVP eksikliğini de kapsayabilir.

Fetal gelişim sırasındaki olumsuzluklar sonucu gelişen hipopituitarizm, KH olarak ifade edilir. Olgular, bulguların geç ortaya çıkması veya tanıda gecikmeler sonucu ileri yaşlarda da tanı alabilir. KH, genetik nedenler veya antenatal olaylar

sonucu gelişebilir, sıklıkla idiyopatiktir. Nörohipofizin gelişim basamaklarındaki farklılıklar nedeniyle AVP eksikliği her olguda görülmez. AVP eksikliği, yakın zamana kadar santral diabetes insipidus (DI) olarak adlandırılmaktaydı; ancak, güncel literatürde AVP eksikliği şeklinde ifade edilmesi önerilmektedir. Bu yeni isimlendirme, diabetes mellitus ile karıştırılmayı önlerken hem etiyolojiyi hem de tedaviyi vurguladığı için tercih edilmektedir. AVP eksikliği diğer eksikliklerle bir arada bulunabilir veya izole olabilir (2, 10).

Çoklu hipofiz hormon eksikliği (ÇHHE)

Çoklu hipofiz hormon eksikliği çoğunlukla büyüme hormonu eksikliğine eşlik eden bir veya daha fazla hipofiz hormonunun eksikliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Konjenital formu hipofiz gelişiminde rol alan transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki bozukluklara bağlı gelişebileceği gibi; çoğu idiyopatiktir. Bilinen genetik nedenler arasında önemli ölçüde fenotipik değişkenlik vardır; bazı formlar eksik penetrans gösterir ve asemptomatikten şiddetli yenidoğan başlangıçlı formlara kadar değişken klinik söz konusudur. Farklı biyokimyasal ve yapısal formlarına neden olduğu gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörlerindeki kusurlar, normal hipofiz görünümünden adenohipofiz hipoplazisi (AHH) veya agenezisine kadar değişen bir dizi yapısal fenotipe neden olmaktadır. İnfundibulum/hipofiz sapı ince veya gelişmemiş olabilir. Nörohipofiz hipoplazik, gelişmemiş veya ektopik olabilir. Erken gelişimi aşamasında rol alan faktörlerin kusurlarında hipofiz gelişimine ek olarak nöroanatomik bozukluklar da tabloya eşlik edebilir (2). Septo-optik dispazi (SOD) ve holoprozensefali (HPE) bu duruma örnektir. Bu çalışmada, ÇHHE, “sendromik” ve “sendromik olmayan” olarak sınıflandırılarak neden olan transkripsiyon faktörleri ile birlikte ele alınacaktır.

Sendromik ÇHHE/hipopituitarizm

Septo-optik displazi (SOD)

de Morsier Sendromu olarak da adlandırılan SOD, optik sinir hipoplazisi, orta hat anormallikleri (korpus kallozum agenezisi (KKA) ve septum pellusidum yokluğu), ve hipopituitarizm ile birlikte hipofiz hipoplazisi gibi bulgulardan en az ikisinin varlığı ile tanı alan oldukça heterojen bir durumdur (25). Oldukça nadir görülür ve sıklığının 1/9.000-40.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir (26). Hipopituitarizm ve optik sinir hipoplazisi arasındaki ilişki, optik kiyazmanın embriyolojik kökeninin infundibular dokunun hemen önünde olmasıyla ilişkilidir, bu nedenle bu konumdaki bir uyaran her

iki yolu da kesintiye uğratabilir. Fenotip, ailesel SOD olgularında bile oldukça değişkendir. Çeşitli genetik nedenler tanımlanmış olsa da, bunlar SOD olgularının %10'undan azını oluşturur (27). Bugüne kadar, *HESX1, SOX2, SOX3 ve OTX2* gibi transkripsiyon faktörleri, SOD etiyolojisinde rolü en çok olan genlerdir. *KAL1, FGFR1, PROKR2* ve *FGF8* gibi hipogonadotropik hipogonadizme (HH) yol açan genlerdeki varyantlar da yakın zamanda SOD olgularında bildirilmiştir (6, 28). *GLI2, BMP4, TBC1D32, PROKR2* varyantları da SOD ile ilişkilidir; ancak, tipik fenotipleri SOD değildir.

SOD, genellikle primipar genç annelerin bebeklerinde gözlenir ve doğum öncesi alkol ve uyuşturucu kullanımına maruz kalma etiyolojide öne sürülmüş olsa da, nedenselliği destekleyecek yeterli kanıt yoktur (29, 30).

SOD'da gözlenen optik sinir hipoplazisi tipik olarak bilateraldir (%80-90) ve orta hat defektleri de septum pellusidumun (%85) veya korpus kallozumun (%30) hipoplazisi veya agenezisi şeklindedir (30). Hipofiz hormonu eksiklikleri %55-80'inde mevcuttur; BH ve TSH eksikliği en sık görülen eksikliklerdir ve bunları ACTH eksikliği izler. AVP eksikliği ve HH, olguların %30'undan azında gözlenir. Bu hormon eksikliklerinin yaklaşık yarısı yaşamın ilk iki yılında tespit edilir ve yenidoğanda ciddi hipoglisemi ve kardiyovasküler instabilite ile ortaya çıkabilir, geri kalanı ise çocukluk ve ergenlik döneminde ortaya çıkar. Hormonların eksiklik derecesinin zaman içinde ilerlediği de bildirilmiştir (25). SOD'lu çocuklarda tipik olarak belirli bir düzeyde görme bozukluğu mevcuttur ve %44-80'inde ağır görme bozukluğu vardır. Epilepsi ve davranış sorunları yaklaşık dörtte birinde ve bilişsel bozukluk %42,5'inde gözlenir (25, 30). Yakın zamanda, olguların %31'inin tedaviye rağmen obez olduğu saptanmıştır ve bu da hipotalamik etkilenmenin katkısı olduğunu düşündürmektedir (25).

Holoprozensefali (HPE)

Prozensefalon insanlarda gestasyonun 18 ve 28. günleri arasında sağ ve sol hemisferlere ayrılır. Bu süreçteki sorunlar, frontal korteks içinde bir bağlantı ile ayrılmış ventriküllere sahip lober HPE, kısmen ayrılmış semilobar HPE ve sürekli tek bir ön ventriküle sahip alobar HPE ile sonuçlanır. Yüz gelişimi de aynı süreçten etkilenir ve hipotelorizm veya yarık damağa neden olabilir. Ciddi olgularda anoftalmi veya siklopi gözlenebilir. Orta interhemisferik varyant HPE'de ise, frontal ve oksipital loblar normal olarak birbirinden ayrılmıştır ancak, frontal ve pariyetal lobların daha arka bölümlerinin

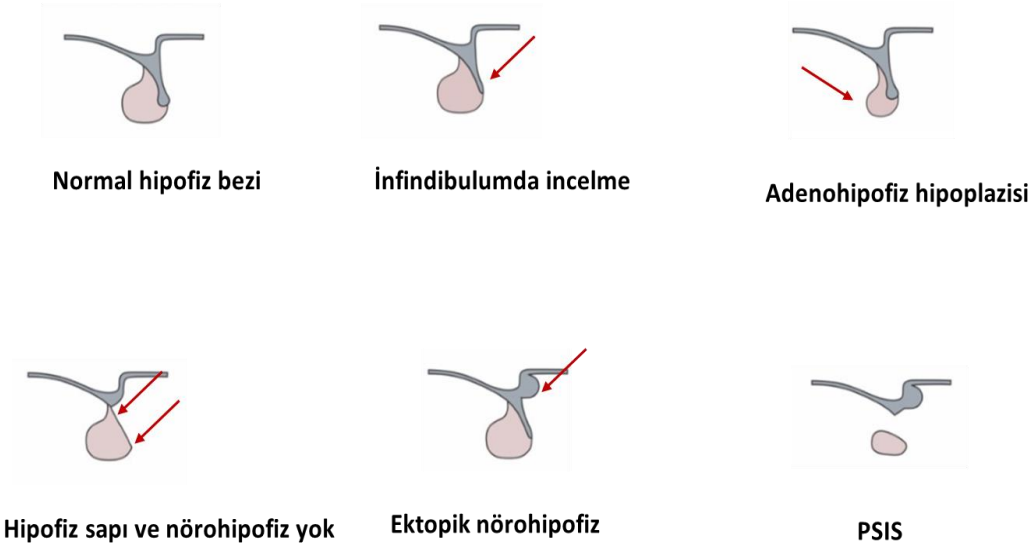
farklı kısımlarını içeren prozensefalik bir bölünme eksikliği mevcuttur. Bu formda korpus kallozum gövdesi yok iken korpus kallozumun genu ve spleniumu genellikle mevcuttur. Diğer HPE varyantları gibi, talamus ve kaudat çekirdekler tam olarak ayrılmamış olabilir, ancak hipotalamus ve lentiform çekirdekler ayrılmıştır (31). HPE, 250 embriyodan 1'inde görülür; ancak, fetal ölüm oranı yüksektir. Doğumda insidansının 1/8.000-16.000 olduğu tahmin edilmektedir (32).

Diğer ilişkili orta hat defektleri arasında olfaktor bulbus ve korpus kallozumun az gelişmiş olması, tek orta hat maksiller kesici diş ve hipoplastik hipofiz veya ektopik nörohipofiz (ENH) sayılabilir. HPE, olguların %5-10'unda anterior hipopituitarizm ile ilişkilidir ve %70'inde AVP eksikliği görülür (33).

Birçok olgu, tüm HPE nedenlerinin %40-60'ını oluşturan trizomi 13'ten kaynaklanır, trizomi 18 ve triploidi de ilişkilidir. *SHH* ve *ZIC2* genindeki varyantlar sendromik olmayan olguların %5'ini oluşturur. *SIX3, TGIF* ve *CDON*, HPE ile ilişkili diğer genlerdir. *SIX3*, ağır HPE fenotipi ile karakterize iken *TGIF*'de fenotip oldukça değişkendir. *CDON* gen varyantlarında konjenital kalp hastalığı, renal displazi, radiyal kusurlar ve safra kesesi agenezisi ile görülebilir (34).

Hipofiz Sapı Kesisi Sendromu (*Pituitary Stalk Interruption Syndrome, PSIS)*

İnfundibular hipoplazi/agenezi, AHH ve ENH birlikteliği, hipofiz sapı kesisi sendromu (PSIS) olarak tanımlanmaktadır. *SHH* ve *SIX3, TGIF, CDON* ve *GPR161* dahil olmak üzere SHH sinyal yolunun diğer genlerinin tümü, HPE olmaksızın PSIS ve ÇHHE'li olgularda bildirilmiştir (35). İlişkilendirilen diğer KH nedenleri arasında *POU1F1, PROP1, LHX3, LHX4, HESX1, SOX3, OTX2, PROKR2* ve *FOXA2* bulunmaktadır. Geniş serilerde olguların tamamında BH eksikliği olup çoğunluğunda gonadotropin, ACTH ve TSH eksiklikleri, azınlığında ise hiperprolaktinemi saptanmıştır (36).



Şekil 2.8 Yapısal hipofiz fenotiplerinin lateral kesitten görünümü (2)

PSIS *(Pituitary Stalk Interruption Syndrome)*: Pituiter sap kesisi sendromu PSIS: Adenohipofiz hipoplazisi, infundibular incelme/yokluk ve ektopik nörohipofiz (ENH) birlikteliği. Cullingford DJ, Siafarikas A, Choong CS. Genetic Etiology of Congenital Hypopituitarism. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, ve ark., editors. Endotext. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. kaynağından yeniden düzenlenmiştir.

Sendromik ÇHHE etiyolojisi ile ilişkili genler

HESX1 (*Hesx Homeobox 1*)

HESX1 geni (MIM*601802), kromozom 3p14.3 bölgesinde yer alan *homeobox* gen ailesinin bir üyesidir ve bu gendeki varyantlar dominant ve resesif kalıtımla hipopituitarizme yol açabilmektedir. *HESX1*'deki patojenik değişimlerin SOD olgularının yaklaşık %1'ne neden olduğu bildirilmiştir.

Hesx1, hipofiz primordiyumunun en erken belirteçlerinden biridir ve E7.5'ten E8.5'e kadar ön beyinde ve E8.5'ten E13.5'e kadar Rathke kesesinde tespit edilebilir. E12'den itibaren hızla *downregüle* olur ve E13.5'e kadar tespit edilemez hale gelir (6). *Hesx1* hipofizin yapısal organizasyonunu düzenler ve transkripsiyonu baskılayarak infundibulum ve çevre dokularla etkileşime girer. Transkripsiyonel bir baskılayıcı olan *Hesx1*'in *downregülasyonu Prop1* gibi sinyal yolağının aşağısında rolü olan diğer genleri aktive eder, bu da her ikisinin de karşıt transkripsiyon faktörleri olarak işlev gördüğünü düşündürür. Faredeki çalışmalar, *Hesx1* etkisi olmadığında tipik olarak Rathke kesesi/ön hipofiz oluşumunu engellemediğini (%5); ancak, polipitüitarizm ile sonuçlanabileceğini göstermektedir. *Hesx1*'in hedefli olarak yok edilmesi (*knock-out*),

SOD benzeri anoftalmi veya mikroftalmi ve orta hat kusurları (septum pellusidum yokluğu ve hipofiz hipoplazisi gibi) ile sonuçlanır (37).

HESX1'in *LHX3, PROP1, FGF8* ve *FGF10* genlerinin bölgesel ifadesini düzenleyerek hipofizin aşırı genişlemesini önlediği öne sürülmektedir. *HESX1, OTX2* ve *LHX3* transkripsiyon faktörleri tarafından aktive edilirken *FGF8* ve *PROP1* tarafından baskılanır (38).

İlk kez 1990'ların sonunda akrabalık olan bir ailede *HESX1*'de homozigot (p.(Arg160Cys)) varyantı tanımlamıştır. SOD fenotipi olan bu olgularda optik sinir hipoplazisi, orta hat kusuru, ENH ve hipopituitarizm ile birlikte AHH gösterilmiştir (37). Daha sonra bildirilen *HESX1* varyantlarında ise, anoftalmi, mikroftalmi, optik sinir hipoplazisi ve optik sinir aplazisi gibi bulgularla birlikte olguların yaklaşık %30'unda tam SOD triyadı olabileceğini göstermektedir (38). *HESX1* patojenik varyantlarının çoğunluğu BH eksikliği ile kendini gösterir ve diğer adenohipofiz hormonlarının eksikliği değişken ve AVP eksikliği nadirdir. Etkilenen bireylerde görünüm normal bir hipofiz bezinden, ENH ve AHH'ye dek değişebilir. Ayrıca hipoplazik burun boşlukları/olfaktör bulbuslar ve ön beynin az gelişmiş olması ile de ilişkilidir (38-41).

Otozomal dominant formlar tipik olarak ENH ve BH eksikliği ile daha hafif bir fenotipe neden olur; ancak, fenotip-genotip ilişkisi zayıftır. Asemptomatik ebeveynler ve kardeşlerin bildirilmesi ve bazı olgularda orta hat kusurları ve optik sinir anomalilerinin bulunmaması nedeni ile penetrans değişkendir. HH tanılı 217 olgu incelendiğinde, %1,4'ünde *HESX1* varyantı saptanmış ve bu olguların görüntülemelerinde hipofizin normal olduğu ortaya konmuştur (42).

SOX2 (*SRY-Box 2*)

SOX2 geni (MIM*****184429), 3q26.33 kromozom bölgesinde bulunur ve otozomal dominant kalıtım gösterir. Mikroftalmi ve anoftalmi olgularının %10-15'ine *SOX2* varyantları neden olabilmektedir. *SOX2* ve *SOX3,* transkripsiyon faktörlerinin SOX (*Sry-Related Hmg-Box Gene*) ailesindendir ve her ikisi de gelişimin erken dönemlerinde ifade edilen ve hücreler farklılaştıkça ifadesi azalan genlerdir (27).

Sox2 morula evresinde, E2.5'te ifade edilir; ancak gastrulasyondan itibaren presumptif nöroektoderm ile sınırlıdır ve E9.5'te beyinde, merkezi sinir sistemi (MSS)'de, duyusal plakodlarda, brankiyal arklarda, özofagusta ve trakeada bulunur (38).

E11.5'te Rathke kesesi boyunca ifade edilir; ancak, E18.5'ten itibaren ara lobla sınırlıdır (43). İnsanlarda 3.5-9. haftalar arasında gelişen adenohipofizde ve diensefalonda ifade edilir; nörohipofiz veya infundibulumda ifade edilmez (27).

İlk olarak 2006 yılında gelişimsel gecikme, özofagus atrezisi ve genital anomalilerle ilişkili bilateral anoftalmi veya şiddetli mikroftalmiye neden olan heterozigot *de novo SOX2* varyantları tanımlamıştır (44). Daha sonra Kelberman ve *ark. SOX2*'nin HH, BH eksikliği ve AHH ile ilişkisini bildirmiştir (45).

AHH'ye ek olarak, sıklıkla hipotalamik hamartomalar ve korpus kallozum anomalileri görülürken; ayrıca, hipokampus anomalileri, sensörinöral işitme kaybı, öğrenme güçlükleri ve bilişsel bozukluklar sıkça karşılaşılan durumlardır. Büyük çoğunluğunda en az bir gözde anoftalmi görülür; ancak, daha hafif olgularda mikroftalmi, kolobom ve optik sinir hipoplazisi de mevcuttur. Çok nadir durumlarda normal göz yapılarına rastlanır. *SOX2* varyantları, özofagus/trakea ve genital anomalilerle seyreden AEG sendromu (Anoftalmi- *Esophagus* (özofagus)- Genital) ile de ilişkilendirilmiştir. Mikropenis ve kriptorşidizm sıkça görülür. Genital anomaliler dişilerde daha az sıklıkta olmakla birlikte bazı olgularda vaginal agenezi gibi ciddi bulgular olabilir (10).

SOX3 (*SRY-Box 3*)

SOX3 geni (MIM*****313430) kromozom Xq27.1'de bulunur ve bu gendeki varyantlar X'e bağlı resesif kalıtılır. BH eksikliği olgularının %0,4'ünde görüldüğü bildirilmiştir. *Sox3* embriyonik gelişim sırasında merkezi sinir sistemi boyunca ve ilk olarak E6.5'te ifade edilir, ancak hızla ön ektoderm ve presumptif nöroektoderm ile sınırlanır. İnfundibulum ve presumptif hipotalamusta yüksek oranda ifade edilir ancak Rathke kesesinde ifade edilmez (38).

SOX3, hipotalamus ve infundibulumun gelişiminin yanı sıra adenohipofizin gelişimini de destekler. Gen ifadesinin olmaması, hipofiz proliferasyonunu desteklemekle ilişkili diğer genlerin ifadesini azalttığı düşünülerek infundibulumun incelmesiyle sonuçlanır. Sonuç olarak, Rathke kesesi başlangıçta genişler; ancak, sonunda AHH gelişir. *FGF8* ve *BMP4*'ün ifadesini sınırlandırarak aşırı aktiviteyi önlemede görevlidir. Ayrıca, *SOX3* duplikasyonları da fonksiyonel olmayan değişimler (tipik olarak polialanin genişlemeleri) benzer fenotiplerle ilişkilidir. Bu durum, optimal embriyolojik gelişim için doğru dozda *SOX3* gerektiğini göstermektedir (38).

Laumonnier ve *ark. SOX3* fonksiyon kaybı sonucu izole BH eksikliği ve öğrenme güçlüğü olan bir erkek çocuk tanımlamıştır (46). Daha sonra, BH eksikliği olan erkekler de bildirilmiştir ve bu olgularda gelişimsel gecikme veya değişken şiddette bilişsel bozukluk olduğu bildirilmiştir. Boy kısalığı ve dil/işitme bozukluğu olan beş etkilenmiş dişiden oluşan bir aile tanımlanmıştır. Diğer eş zamanlı hipofiz hormon eksiklikleri değişken sıklıkta mevcuttur ve bazı olgularda panhipopituitarizm tanımlanmıştır (38).

SOX3 eksikliğinde, KKA, infundibulum hipoplazisi/aplazisi ve ENH'ye ek olarak bilişsel bozukluk ve öğrenme güçlükleri de gözlenmektedir. *SOX3* mutasyonları optik sinir hipoplazisi ile ilişkilendirilmemiştir. Kraniyofasiyal anormallikler fare modellerinde sıklıkla bildirilmekle birlikte insanda nadirdir ve bir spina bifida olgusunda tanımlanmıştır (38).

OTX2 (*Orthodenticle Homeobox 2*)

OTX2 geni (MIM*****600037) 14q22.3 kromozomunda yer alır ve otozomal dominant kalıtılır. Anoftalmi/mikroftalmi olgularının %2-3'ünde tespit edilmiştir ve hipopituitarizm ile ilişkilidir. *OTX2,* beynin ön kısmındaki yapıların gelişimi ve ön beyin *(forebrain*) idamesi için kritik öneme sahiptir (47).

Farede E10.5'ten itibaren *Otx2,* nörohipofiz ve hipotalamusta güçlü şekilde ifade edilir. Rathke kesesindeki ifadesi oldukça azdır. Gen ifadesi E12.5'te susturulur. *Otx2* etkisizliği, nörohipofiz ve hipofiz sapı gelişiminde yetersizliğe ve sekonder AHH'ye yol açar. Bu duruma, FGF10 üretiminde eksikliğe bağlı AHH neden olur; hücre farklılaşması normal gelişir. Ayrıca, *Hesx1* ve *Pou1f1*'in düzenlenmesi (*upregülasyonu*) için de önemlidir.

OTX2'deki patojenik varyantlarda tipik olarak izole BH eksikliği gözlenmekle birlikte ÇHHE, TSH eksikliği, HH gözlenebilir. Hipofiz hipoplazisi olabileceği gibi hipofiz bezi normal de olabilir, ENH eşlik edebilir. Anoftalmi/mikroftalmiden optik sinir hipoplazisi veya retinal distrofiye kadar değişir ve normal oküler fenotip de tanımlanmıştır. Ek anomali görülmesi nadirdir (47).

PAX6 (*Paired Box 6 Gene*)

PAX6 geni (MIM***** 607108), 11p13 kromozomu üzerinde yer alır ve otozomal dominant özellikte eksik penetrans ile kalıtılır. Farede hipofiz gelişiminde *Pax6*, E9-12.5'ten itibaren Rathke kesesinin dorsalinde ifade edilir ve ventral-dorsal hücre sınırlarını oluşturur. Göz gelişiminin erken evrelerinde önemli bir rolü vardır, klasik olarak aniridiye neden olur, hipoplazi veya mikroftalmi veya anoftalmi gibi optik sinir anomalileri de tanımlanmıştır (48).

Bugüne dek çok sayıda *PAX6* varyantı taşıyan olgu tanımlanmış olup bunlardan çok azında hipopituitarizm bildirilmiştir. Bu nedenle, göz anomalileri olan hastalarda hipopituitarizmin nadir bir nedenidir ve SOD ile ortaya çıkabilir (49).

RAX (*Retina And Anterior Neural Fold Homeobox*)

RAX geni (MIM*****601881) kromozom 18q21.32 bölgesinde ön beyin ve göz gelişiminde rol alan ve resesif özellikte kalıtılan bir gendir. İnsanlarda anoftalmi, mikroftalmi ve palatal anomalilerle ilişkilidir. Anoftalmi/mikroftalmi olgularının yaklaşık %3'ünde bulunur (50). Bugüne kadar bir hastada panhipopituitarizm ve hipofiz agenezisi (ön ve arka hipofiz) saptanmıştır; ancak, diğer hastalarda hipofiz anomalileri gösterilmemiştir (51).

TCF7L1 (*Transcription Factor 7-Like 1*)

TCF7L1 geni (MIM***** 604652), kromozom 2p11.2 bölgesinde yer alır ve WNT/β-katenin sinyal yolu ile beyin gelişimi için önemli olan bir transkripsiyon düzenleyici gendir. *TCF7L1*'in heterozigot varyantlarının hastalığa yol açtığı, birinde BH ve ACTH eksikliği olan ve optik sinir hipoplazisi, AHH ve nörohipofizin agenezik olduğu iki SOD olgusunda tanımlanmıştır (52).

LHX3 *(LIM Homeobox Gene 3)*

LHX3 geni (MIM*****600577), kromozom 9q34.3 üzerinde bulunur ve eksikliği resesif kalıtım özelliği gösterir. Hipopituitarizm olgularının %0.5-1.2'sinde görülür. LIM homeobox proteinleri LHX3 ve LHX4 erken gelişim evrelerinde ifade edilir ve hipofiz gelişimini desteklemede birlikte rol alır (53, 54).

Lhx3 ilk olarak *Fgf8* tarafından indüklendikten sonra E9.5'te Rathke kesesinde ifade edilir ve E12.5'e kadar ağırlıklı olarak kesenin dorsal yönünde ifade edilir. Ayrıca

ventral arka beyin, iç kulak ve omurilikte de ifade edilir ve aktivitesi hipofizde *LHX4* ve iç kulakta *SOX2* tarafından düzenlenir. *Lhx3,* gelişim boyunca adenohipofiz ve ara lobda ifade edilir, yetişkinliğe kadar devam eder. Bu nedenle bazı hücre tiplerinin korunmasında rolü olduğu düşünülmektedir. *LHX3 null* farelerde, Rathke kesesi başlangıçta oluşur; ancak, *HESX1* ve *POU1F1* üretimini desteklememesine bağlı olarak ön ve ara lobların aplazisi oluşur ve kese de geriler. *L*hx3, Rathke kesesinin ön hipofize olgunlaşması için kritik öneme sahiptir ve kortikotroplar bir miktar korunmuş olsa da tüm ön hücre hatlarının farklılaşmasını düzenler (55).

LHX3 varyantları yaygın olarak ÇHHE'ye neden olur. Yaklaşık yarısında ACTH üretimi normaldir. Olgular tipik olarak doğumda tespit edilir; ancak, çocukluk boyunca hipopituitarizm geliştiren daha hafif fenotipler de tanımlanmıştır. Görüntülemelerde %10 olguda bulgular normaldir. Aplaziye kadar değişen değişken bir klinik de orataya çıkabilir ve bazı olgularda mikroadenom görünümü vardır (56). *LHX3, SOX2* ile birlikte iç kulağın kısıtlı bir bölgesinde bulunduğundan, yaklaşık yarısında sensörinöral işitme kaybı görülür. Olguların %38'inde zihinsel yetersizlik veya öğrenme güçlükleri bildirilmiştir (57). Yaklaşık %70'inde sınırlı rotasyona sahip kısa ve sert bir boyun, yaklaşık %50'sinde ise skolyoz gibi diğer vertebral anomaliler gözlenir. Respiratuvar distres sendromu (RDS) da bazı olgularda tanımlanmıştır (57). Erken başlangıçlı ÇHHE ile birlikte boyunda hareket kısıtlılığı ve/veya işitme kusuru olan olgularda *LHX3* ile ilişkili patolojiler akla gelmelidir. RDS de nadiren eşlik eden fakat *LHX3* yönünde yol gösterici bir bulgudur.

LHX4 (*LIM Homeobox gene 4*)

LHX4 geni (MIM***** 602146) kromozom 1q25.2 bölgesinde yer alır ve dominant kalıtılır. Hipopituitarizm olgularının %0,9-1,4'ünü oluşturur (58). *LHX4, LHX3* gibi E9.5'ten itibaren Rathke kesesinde ifade edilir; ancak, E12.5'e kadar ön lobla sınırlıdır. Ayrıca arka beyin, serebral korteks ve omurilik dokularında da ifade edilir. *LHX4* ve *LHX3*, hipofiz hücrelerinin özelleşmesini desteklemek için birlikte çalışır ve *LHX4, LHX3* ve *POU1F1*'i upregüle etmek ve bu indüksiyonun doğru zamanlamasını sağlamak için önemlidir. Bu nedenle, *LHX4* eksikliği *LHX3* eksikliğinin bir unsuruyla sonuçlanabilir ve uygun hücre farklılaşmasına sahip; ancak, hormon üreten hücrelerin sayısının azaldığı hipoplazik bir ön hipofize neden olabilir (59).

LHX3'te olduğu gibi, *LHX4* de tipik olarak ÇHHE'ye neden olur, ancak geçici izole BH eksikliği dahil olmak üzere daha hafif olgular bildirilmiştir (58). Resesif kalıtımda letal olabilen *LHX4* varyantının saptandığı bir ailede ÇHHE ve şiddetli hipopituitarizm ve solunum sıkıntısı bildirilmiştir. Görüntülemede ENH yaygındır ve adenohipofiz normalden aplaziye kadar değişkendir. Az sayıda olguda Chiari 1 malformasyonu da bildirilmiştir. Penetrans değişkendir ve asemptomatik etkilenmiş ebeveynler yaygındır (60).

GLI2 (*GLI-Kruppel Family Member 2*)

GLI2 geni (MIM*****165230) kromozom 2q14.2 bulunan bir çinko parmak transkripsiyon faktörüdür ve inkomplet penetrans ile otozomal dominant kalıtım gösterir. Hipopituitarizm olgularındaki prevalansı %13,6 olarak bildirilmiş olsa da diğer kohortlar bunun daha nadir (<%1) olduğunu göstermiştir (61).

Gli2, Bmp4 ve *Fgf8*'i indüklediği ventral diensefalonda ifade edilir ve *SHH* yanıtına aracılık etmek için önemli olduğu E8.5'ten itibaren oral ektoderm ve Rathke kesesinde bulunur. *GLI2* hipofiz öncül hücrelerin çoğalmasını desteklemek için önemlidir. Etkisizliği hipofiz hücre sayılarının, özellikle kortikotrop, somatotrop ve laktotropların azalmasına, ancak genel olarak hücrelerin uygun düzende farklılaşması ile sonuçlanır (62).

GLI2'nin *SHH* etkisine aracılık ettiği gösterilmiştir. *SHH* üzerindeki etkisi HPE'ye neden olabilmektedir. Roessler *ve ark.*, HPE kriterlerini karşılayan 390 hastanın yedisinde *GLI2* gen varyantlarını tanımlamıştır; ancak bunun nadir bir bulgu olduğu gösterilmiştir (63). *GLI2* varyantı olan 112 olgu ile yapılan bir çalışmada ise HPE'li yalnızca üç çocuk saptanmıştır. Bunlardan birinde de HPE'ye neden olan başka bir gende varyant tespit edilmiştir. Bu çalışma, trunkasyona neden olan *GLI2* varyantı taşıyanların %62'sinde hipofiz anomalileri ve polidaktili olduğunu ve sadece %15'inde her iki anomalinin de olmadığı gösterilmiştir. Protein trunkasyonuna neden olmayan varyant taşıyanların ise %58'inde hipopituitarizm gözlenmiştir. Yüzde 13'ünde orta yüz hipoplazisi ve %16'sında yarık damak/dudak saptanmıştır. Diğer HPE nedenlerinin aksine, *GLI2* tipik olarak adenohipofiz anomalileri, özellikle de BH ve ACTH eksikliği ile kendini gösterir (61).

Radyolojik bulgular optik sinir hipoplazisi, septum pellusidum veya korpus kallozum hipoplazisi/agenezi, AHH, ENH veya PSIS dahil olmak üzere çeşitlilik

gösterir. Dolayısıyla SOD, PSIS ve nadiren HPE, *GLI2* ilişkili hipopituitarizmin olası belirtileridir (64). ÇHHE, polidaktili, orta yüz hipoplazi, tek santral kesici diş varlığı, *GLI2* varyantlarını akla getirmelidir.

GLI3 (*GLI-Kruppel Famıly Member 3*)

GLI3 geni (MIM*****165240), kromozom 7p14.1 üzerinde bulunan bir diğer çinko parmak transkripsiyon faktörüdür ve heterozigot varyantları, mezoaksiyel polidaktili ve hipotalamik hamartomun gözlendiği **Pallister-Hall sendromuna** neden olur. Fare çalışmalarında, *GLI3*'ün hipofiz veya hipotalamik gelişim veya farklılaşma için kritik olmadığı gösterilmiş olsa da *GLI2* varyantları ile birleşirse, fenotip tek başına *GLI2* anomalilerinden daha şiddetlidir.

GLI3 geninin amino-terminal üçte birlik kısmındaki varyantlar, hipotalamik anormallikler olmadan polidaktili, makrosefali ve hipotelorizm ile ilişkili **Greig Sefalosindaktili sendromuna** neden olurken, Pallister Hall sendromu genin orta üçte birlik kısmındaki varyantlardan kaynaklanmaktadır.

Pallister Hall sendromunda, hipofiz fenotipi normal hipofiz işlevlerinden izole BH eksikliği ve panhipopituitarizme kadar değişkendir Ailesel formlar belirtilmiştir, bu nedenle tüm olgular hipofiz yetmezliği açısından değerlendirilmelidir. Hipotalamik hamartomun diğer nedenlerinde olduğu gibi, santral erken ergenlikle de ilişkili olabilir ve olgular bu açıdan da izlenmelidir (4, 65).

SHH *(Sonic hegdehog signaling molecule)*

SHH geni (MIM***** 600725), kromozom 7q36 üzerinde yer alır ve MSS'nin, özellikle de ön beynin erken gelişimi için kritik öneme sahiptir. Notokord, nöral tüp ve bağırsağın arka uzuv tomurcuklarında bulunur. HPE'de rol oynayan önemli bir gendir ve HPE olgularının yaklaşık %5'nin etiyolojisinde rol alır. Etkisine diğer transkripsiyon faktörleri aracılık eder. *SHH* ve *ZIC2* olguları bildirilmiş olmasına rağmen, her gen tipinde ön hipofiz disfonksiyonu oranlarına ilişkin sınırlı veri bulunmaktadır (32, 33). *ZIC2* de HPE olgularının %5'nin etiyolojisinde rol oynar. *SHH* ve *ZIC3* varyantlarında renal ve üriner anomali görülebilmektedir (2).

ROBO1 *(Roundabout Guidance Receptor 1)*

ROBO1 geni (MIM***** 602430), kromozom 3p12.3 bölgesinde yer alır ve bu gendeki varyantlar daha önce PSIS'li beş olguda monoallelik olarak altıncı olguda ise

biallelik olarak tanımlanmıştır. Hipermetropi ve pitoz dahil olmak üzere oküler anomaliler de görülmüştür. Bazı olgularda etkilenmemiş ebeveynler nedeniyle inkomplet penetrans bildirilmiştir. BH ve TSH eksikliği bir arada olan olgular ve bir panhipopituitarizm olgusu tanımlanmıştır (66).

FOXA2 (*Forkhead box A2*)

FOXA2 geni (MIM***** 600288), kromozom 20p11.21 bölgesinde yer alır ve dominant veya *de novo* olarak kalıtılır (67). *FOXA2, GLI2* ve *SHH* ifadesini düzenler ve *FOXA2* genindeki varyantlar ve genin yer aldığı 20p11 delesyonlarının hipopituitarizme neden olduğu bildirilmiştir (68). Görüntülemede AHH/aplazisi, ENH ve ince hipofiz sapı yani PSIS gözlenebilmektedir. *FOXA2* ayrıca pankreatik beta hücrelerindeki K-ATP kanalları için kritik olan *ABCC8* ve *KCNJ11* genlerinin düzenlenmesinde de rol oynar ve bu gendeki varyantların konjenital hiperinsülinizme neden olduğu gösterilmiştir. Diğer fenotipik özellikler arasında kraniyofasiyal dismorfizm, koroidal kolobom, karaciğer, akciğer ve kalp malformasyonları yer almaktadır (69, 70).

EIF2S3 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2*)

EIF2S3 geni (MIM***** 300161), Xp22.11 kromozomunda yer alır ve gendeki varyantlar **MEHMO sendromuna** (Mental retardasyon, epilepsi, hipogenitalizm, mikrosefali ve obezite) neden olur. X'e bağlı resesif olarak kalıtılır. *EIF2S3* embriyolojik gelişim sırasında hipofiz ve hipotalamusta ifade edilir. Tipik olarak BH eksikliği ile sonuçlanır, panhipopituitarizm de tanımlanmıştır. Görüntülemelerde tipik olarak korpus kallozum incelmesi ve normal ya da hipoplazik ön hipofiz saptanır (71).

BMP4 (*Bone morphogenetic protein 4*)

BMP4 geni (MIM***** 112262), kromozom 14q22-q23 bölgesinde yerleşir ve dominant kalıtım özelliğinde olup eksik penetrans gösterebilmektedir. Farede *Bmp4*, E8.5'ten itibaren diensefalon ve infundibulumda ifade edilir ve yokluğu hipofiz plakodu ve Rathke kesesi gelişiminde yetersizlikle sonuçlanır (72). Bu gendeki patojenik varyantlar sıklıkla anoftalmi/mikroftalmi, YDD ve polidaktili/sindaktili ile ilişkilidir. Rodríguez-Contreras ve *ark.*, 2018'de BH ve TSH eksikliği ve miyopi olan bir erkek çocukta patojenik bir *BMP4* varyantı bildirmiştir (73).

ARNT2 (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2*)

ARNT2 geni (MIM***** 606036), kromozom 15q25.1 lokusunda yer alır ve resesif kalıtılır. *ARNT2* gelişmekte olan ön ve arka hipofiz ve hipotalamusta ifade edilir ve bu gendeki patojenik varyantlar AVP eksikliği ile birlikte ÇHHE'ye neden olur. Hipofiz görüntülemesinde sap incelmesi ve hipoplastik bir ön hipofiz ile birlikte arka hipofizin *bright spot* özelliğinin olmadığı görülür. Ayrıca postnatal mikrosefali, hipoplazik frontal ve temporal loblar, renal anomaliler ve görme bozukluğu ile de ilişkilidir (74).

TBC1D32 (*TBC1 domain family member 32*)

TBC1D32 geni (MIM***** 615867), kromozom 6q22.31 bölgesinde bulunur ve ilişkili klinik otozomal resesif kalıtım gösterir. Bu gen gelişmekte olan hipotalamus ve Rathke kesesinde ifade edilir ve *SHH* sinyalizasyonunda ve siliyer fonksiyonda rol oynar. Bugüne kadar bildirilen az sayıda olguda izole BH eksikliği veya panhipopituitarizm gözlenmiştir. AHH veya aplazisi, parsiyel KKA ve optik kiyazma hipoplazisi, ENH bildirilmiştir. Diğer fenotipik özellikler arasında yarık damak ve dudak, hipertelorizm gözlenebilmektedir ve oro-fasiyal-dijital sendromla uyumlu ekstremite anomalileri (polidaktili/sindaktili) yer alır (75).

Sendromik olmayan ÇHHE/Hipopituitarizm

POU1F1 (*Pou Domain, Class 1, Transcription Factor 1*)

POU1F1 geni (MIM*****173110), kromozom 3p11.2 bölgesinde bulunan, başlangıçta farelerde (PIT-1 olarak bilinir) ve sonra insanlarda tanımlanan ÇHHE'nin saptanmış ilk genetik nedenidir. Olguların %65'i resesif, %35'i ise dominant kalıtım özelliğindedir. *POU1F1*, ailesel ÇHHE'nin %21'ine kadar olmak üzere ÇHHE'nin %2,8'inde gözlenmektedir.

Pou1f1'in ifadesi *Prop1* tarafından tetiklenir ve E13.5'ten itibaren hipofizde görülür ve yetişkinliğe kadar devam eder. Tirotrop, laktotrop ve somatotrop hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını desteklemek için kritik öneme sahiptir ve hormon sentezi için gerekli olan *Gh1*, *Prl* ve *TshB* genlerini uyarır. *Lhx3, Lhx44* ve *Otx2 Pou1f1*'i upregüle eder ancak *Pou1f1* geninin işlevi için *Prop1* gereklidir (55).

Literatürdeki olguların tamamında BH eksikliği, %87,5'inde TSH eksikliği ve %95,6'sında prolaktin eksikliği saptanmıştır. TSH eksikliği tipik olarak bebeklik döneminde, BH ve prolaktin eksikliğinden önce veya eş zamanlı olarak tespit edilirken, ~%13,5'i BH eksikliğinden sonra tespit edilir. Yüzde 70'inde AHH gözlenebilirken orta hat ve periferik kusurlar da nadiren görülür. Dominant formlarda hipofiz aplazisi olasılığı daha düşüktür (%63,6). Hipopituitarizm dışında, *POU1F1* ile ilişkili olduğu bilinen başka fenotipik özellik yoktur (76).

PROP1* (Prophet of POU1F1*)

PROP1 geni (MIM*****601538), 5q35 kromozomunda yer alan ve resesif kalıtım gösteren eşleştirilmiş *homeodomain* benzeri bir transkripsiyon faktörüdür. Tüm ÇHHE olgularının %11'ine, ailesel formların %50'sine ve sporadik formların yaklaşık %7'sine neden olduğu bilinmektedir. Bu durum farklı popülasyonlar ve etnik kökenler arasında oldukça değişkendir; Japonya, Almanya, Birleşik Krallık, İspanya veya Avustralya'daki çalışmalarda sık değilken Litvanya'daki sayılar ÇHHE olgularının %65'i ve ailesel olguların>%90'ı kadar yüksektir (54).

Prop1 başlangıçta E10'da Rathke kesesinde ifade edilir, seviyeler E12'ye kadar yükselir ve sona erdiğinde E15.5'e kadar düşer. Mezenkimal hücrelere kök hücre dönüşümünü uyarır, hücre göçünü ve farklılaşmasını destekler. Bunlar olmadan hücreler statik kalır. *Pou1f1*'in ifadesi için gereklidir ve bunun başarısız olması hücre farklılaşmasında başka sorunlara neden olur. Gonadotropinler ve daha az ölçüde kortikotroplar dahil olmak üzere tüm hücre hatlarının uyarılması ve farklılaşmasında rol oynar (77).

Çoğunda ÇHHE gözlenir ve tipik olarak ilerleyicidir, teşhis edilen eksikliklerin sayısı ve eksikliğin şiddeti zamanla artar. BH, TSH eksiklikleri ve HH'nin başlangıcı doğumda tanı ile antenatal olarak ortaya çıkabilir, ancak genellikle daha sonra ortaya çıkar ve nadir durumlarda bazı hücre hatları normaldir. ACTH eksikliği altı yaşından itibaren bildirilmiştir ve tipik olarak geç çocukluk ve ergenlik döneminde gelişir. Görüntüleme AHH veya normal bir ön hipofiz (nadiren hiperplazi gösterir ve hipogonadizme ikincil özellikler (mikropenis ve inmemiş testis) dışında ek fenotip tanımlanmamıştır (78).

İzole hipofizer hormon eksiklikleri (İzole hipopituitarizm)

Büyüme Hormonu eksikliği

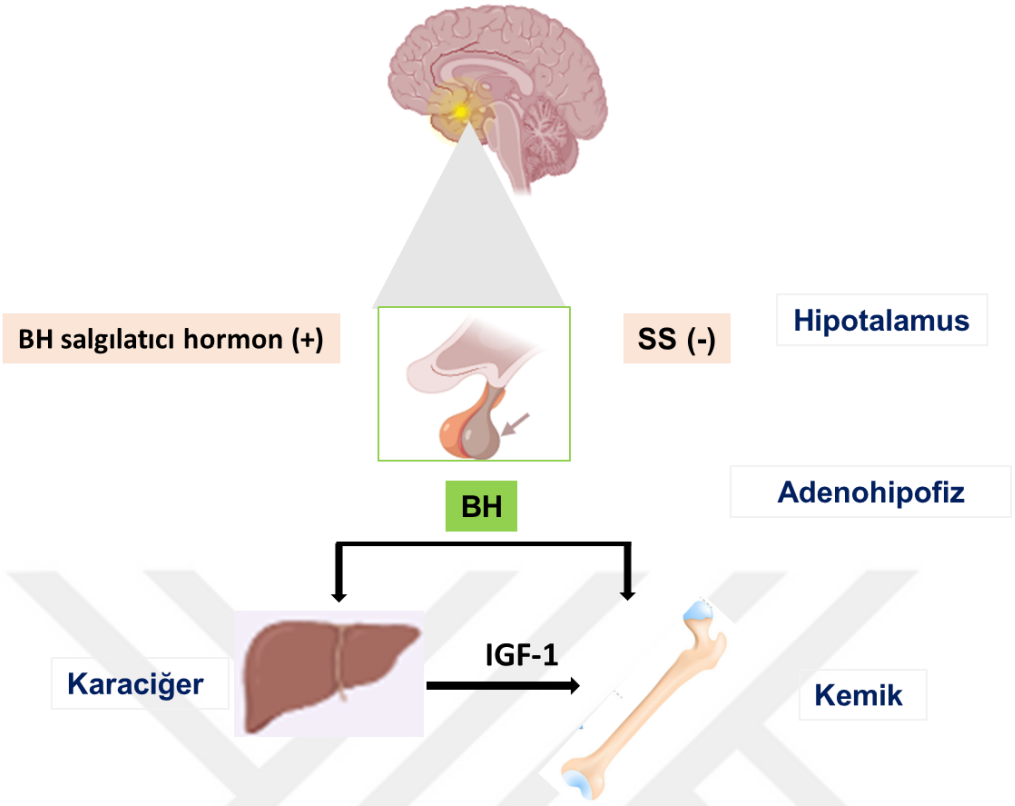
Harvey Cushing tarafından 1909 yılında adenohipofizin büyüme ve yağ metabolizması ile ilişkisi konusunda araştırmalar başlamış, 1958 yılında Raben BH eksikliği olan 17 yaşındaki bir olguda büyüme hormonu tedavisini yayımlamıştır (1, 79).

BH salgısının kontrolü

Hipotalamus tarafından salgılanan GHRH ve somatostatin, somatotropların ultradian ritimde pulsatil olan BH salgısını uyarır. BH karaciğerde IGF-1 üretimine neden olur. BH ve IGF-1, uzun kemiklerdeki hücresel proliferasyon ve farklılaşma etkileri ile lineer büyümeyi sağlar (80, 81).

GHRH, somatotrop hücrelerde G proteinine bağlı bir reseptör (GHRHR) ile etkileşime girerek cAMP sinyal yolunu aktive eder ve bu da BH mRNA transkripsiyonunun ve salınımının artmasına neden olur. BH, iki disülfit köprüsü ve 191 amino asit rezidüsü içerir. BH dolaşıma salındıktan sonra karaciğer, kas, kemik ve yağ dokusu gibi hedef dokularda hücre yüzeyindeki GHR'ye bağlanır. Bağlanma JAK2'nin aktivasyonuna yol açar ve bu da Raf-MEK-ERK, PI3K-Akt ve STAT5 dahil olmak üzere bir dizi sinyal kaskadını tetikler. ERK, Akt ve STAT5'in tümü IGF-1 sentezi ve salgılanması yoluyla büyümeyi destekler.

İzole BH eksikliğinin prevalansının 1/4.000-10.000 arasında olduğu bildirilmektedir. Çoğu sporadiktir, yaklaşık %6,5'inde saptanabilen genetik bir neden vardır. Aile öyküsü olanlarda bu oran %38'e kadar çıkmaktadır. Etiyolojide en sık *GH1* ve *GHRHR* genleri yer alır. *HESX1, SOX3, OTX2, LHX4* ve *GLI2* gibi ÇHHE'ye neden olan genler de izole BH eksikliğine neden olabilir. Otozomal resesif *GH1* gen delesyonlarında tespit edilemeyecek düzeyde düşük BH seviyelerine sahip Tip 1A, *GH1* genindeki *splice-site* varyantlar veya diğer genlerin neden olduğu Tip 1B, *GH1*'deki ekzon atlama (*exon skipping*) varyantları da dominant kalıtılan tip 2- BH eksikliğine neden olur. Tip 3 X'e bağlı resesiftir ve agamaglobulinemi ile ilişkilidir (82). Güncel sınıflamalarda ise tip 1B tip 4 olarak da ifade edilmektedir (2).



Şekil 2.9 BH – IGF1 ekseni (83)

BH: Büyüme hormonu; BH salgılatıcı hormon:*Growth hormone releasing hormone (GHRH);* SS: Somatostatin; IGF1: Insulin-like growth factor 1. Tseretopoulou X, Mushtaq T. How to interpret IGF-1 and growth hormone stimulation tests. Archives of disease in childhood -Education & practice edition. 2020;105(5):311-4 kaynağından yeniden düzenlenmiştir.

GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*)

GHRH geni (MIM*139190), 20q11.23 bölgesinde yer alan beş ekzonlu bir gendir. Bu gen, somatotrop hücrelerinin çoğalmasını ve BH salgısını uyaran hipotalamik bir peptid olan GHRH'yi kodlar. GHRH, preprohormon olarak sentezlenir ve N-terminal sinyal dizisi enzimatik olarak bölünerek GHRH'nin olgun 44-amino asit formunu ve C-terminal GHRH ile ilişkili bir peptidi (GHRH-RP) oluşturur.

Ghrh geninin intron 2 ve ekson 3'ünün çoğunun delesyonu ile işlevsel Ghrh'den yoksun fareler üretilmiştir. Genin bu kısmı, biyolojik aktivite için gerekli olan olgun proteinin ilk 14 amino asidini kodlar. *Ghrh* -/- fareler mendelian kalıtıma uygun oranda doğmuş ve doğumda normal görünmüştür. Yaşamın ikinci haftasından sonra büyüme geriliği gözlenmiştir. *Ghrh* -/- farelerin hipofiz bezlerinin boyutu küçülmüş ve şiddetli derecede düşük BH mRNA ve protein içeriği olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca serum Igf1

ve karaciğer Igf1 mRNA'ları da azalmıştır. *Ghrh -/-* fareler normal doğurganlık göstermiş, ancak mutant dişilerin yavru boyutunda tutarlı bir azalma olup bu yavrularda mortalite oranı yüksek saptanmış ve gelişme geriliği bildirilmiştir (84).

Yakın zamana kadar BH eksikliğine neden olan *GHRH* varyantı bildirilmemişti. Çin'den 2024 yılında bildirilen bir olguda, *GHRH* geninde işlev kaybına neden olarak izole BH eksikliğine neden olan heterozigot çerçeve kayması varyantı bildirilmiştir. Bu olgu, *GHRH* geninde haployetersizliğin neden olduğu izole BH eksikliğinin patogenezi hakkında yeni bilgiler sağlamıştır (85).

GHRHR (*Growth Hormone Releasing Hormone Receptor*)

GHRHR geni (MIM*****139191), kromozom 7p14.3 bölgesinde yer alan 13 ekzonlu bir gendir. Hindistan'dan akraba evliliği olan bir ailede iki bireyde şiddetli BH eksikliği (izole BH eksikliği tip 4; MIM#618157) gösterilmiştir. *GHRHR* geninde p.(Glu72*) varyantı biallelik olarak tespit edilmiştir (86). *GHRHR* sorunlarının AHH ile ilişkisi de gösterilmiştir (87).

GH1 (Growth Hormone 1)

GH1 geni (MIM *****139250), kromozom 17q23.3 üzerinde yer alan beş ekzonlu bir gendir. *GH1*'deki biallelik patojenik varyantlar tip 1 izole BH eksikliğine neden olurken monoallelik varyantlar tip 2 izole BH eksikliği veya ÇHHE'ye neden olabilmektedir. BH eksikliği fenotipleri **Tablo 2.1**'de verilmiştir.

Tablo 2.1 İzole büyüme hormon eksikliği fenotipleri

Tip	Kalıtım	Ailevi olgular (%)	Hipofiz görüntülemesi	Genetik özellikler	Ek özellik
1A	OR	2-4	Normal, AHH	*GH1* gen delesyonu, *nonsense* varyantlar	BH düzeyleri saptanamayacak kadar düşük, anti-GH antikorları
1B	OR	2-4	Normal, AHH	*GH1 splice-site* varyantları	
2	OD	15-22	Normal/AHH	*GH1 splice-site* ve *missense* varyantları	ÇHHE gözlenebilir
3	XR	Bilinmiyor	ENH	*SOX3*	Agamaglobulinemi
4	OR	16-19	Normal, AHH	*GHRHR* gen varyantları	

BH: Büyüme hormonu, OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif, AHH: Adenohipofiz hipoplazisi, ENH: Ektopik nörohipofiz, *Nonsense* varyant: anlamsız varyant, splice-site varyant: kırpılma- bölgesi varyantı, missense varyant: yanlış anlamlı varyant

İzole hipofiz hormon eksiklikleri, TSH eksikliği (santral hipotiroidi) **(Tablo 2.2)**, ACTH eksikliği (santral adrenal yetersizlik) **(Tablo 2.3)** ve hipogonadotropik hipogonadizm **(Tablo 2.4)** olarak sayılabilir.

Tablo 2.2 İzole TSH eksikliği (santral hipotiroidi) nedenleri

Gen	Kalıtım	Hipotiroidi derecesi	Diğer hipofiz hormon eksiklikleri	Diğer özellikler
TSHB	OR	Şiddetli	-	Sarılık, gelişim geriliği
TRHR	OR	Hafif	PRL	-
IGSF1	XR	Hafif-şiddetli	PRL, nadiren BH	Makroorşidi, obezite, DEHAB
TBL1X	XR	Hafif	-	İşitme kaybı, DEHAB

OR: Otozomal resesif; XR: X'e bağlı resesif; PRL: Prolaktin; BH: Büyüme hormone DEHAB: Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu ***IRS4*** (Xq22.3, *Insulin receptor substrate 4*), genindeki patojenik varyantlar genellikle izole TSH eksikliğinin bir nedeni olarak bilinmektedir; ancak, şimdiye kadar bildirilen olgularda düşük T4 ancak normal T3 ve TSH gözlendiği için bunun da gerçek bir santral hipotiroidizmi düşündürmediği belirtilmektedir (88)

Tablo 2.3 İzole ACTH eksikliği (santral adrenal yetersizlik) nedenleri

Gen	Kalıtım	Klinik özellik	Diğer hipofiz hormon eksiklikleri	Ek özellikler
TBX19	OR	Hipoglisemi, kolestaz, adrenal yetersizlik başlangıcı yenidoğan döneminde.	-	Geç tanı alırsa zihinsel yetersizlik, Chiari 1 malformasyonu
PCSK1	OR	Başlangıç yaşı değişken, malabsorbsiyon, ishal	FSH, LH, BH, TSH, nadiren AVP	Erken çocuklukta obezite
POMC	OR	Yenidoğan döneminde hipoglisemi, sarılık	TSH, BH, LH, FSH	Obezite, kızıl saç, diyabet
NFKB2	OD	Başlangıç yaşı değişken. Tekrarlayan sinopulmoner enfeksiyon	BH, TSH (nadir)	CVID

OR: Otozomal resesif; OD: Otozomal dominant; CVID: *Common variable immunodeficiency*

Tablo 2.4 ÇHHE'nin de gözlenebildiği hipogonadotropik hipogonadizm ilişkili genler

Gen	Kalıtım HH'de sıklık	MR görüntüleme	Diğer hipofiz hormon eksiklikleri	Ek özellikler
PROKR2	OD/OR %5-23	SOD/PSIS	ÇHHE	-
FGF8	OD/OR %1	SOD/HPE	BH/ÇHHE	VACTERL
FGFR1	OD %5-11	SOD/PSIS	BH/ÇHHE	Yarık el/ayak malformasyonu
CHD7 **(CHARGE)**	OD/*De novo* %6	-	BH/TSH	Kolobom, KKH, Koanal atrezi, boy kısalığı, zihinsel yetersizlik, genital hipoplazi, kulak anomalileri

OD: Otozomal dominant; HH: Hipogonadotropik hipogonadizm; KKH: Konjenital kalp hastalığı; HPE: Holoprosensefali; PSIS: *Pituitary Stalk Interruption Syndrome*, Pituiter sap kesisi sendromu; SOD – Septo-optik displazi; VACTERL- Vertebral defects, Anal atresia, Cardiac defects, Tracheo-esophageal fistula, Renal anomalies, and Limb abnormalities

2.3. Genetik Tanı Yöntemleri

Genetik hastalıkların tanı ve araştırılmasında kullanılan teknikler, analiz hedefine göre, sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler teknikler başlıkları altında toplanmaktadır. Klinik değerlendirme net bir tanıyı işaret ediyor ve ilişkili genlerde daha önce saptanmış varyantların çoğunluğunu küçük dizi varyantları oluşturuyor ise ilk basamak test Sanger dizi analizi olarak kabul edilmektedir. Lokus heterojenitesinin gözlendiği durumlarda veya pratik uygulamada Sanger dizi analizine uygun olmayan durumlarda laboratuvarın koşullarına göre yeni nesil dizi (YND) yöntemleri kullanılarak panel test de kullanılabilmektedir. Kliniklerin ve laboratuvarların bu testlere erişim olanağına göre tanıda kullanılan testler de değişebilmektedir. Özgün bir tanının elde edilemediği ve/veya tanımlanmamış genlerin araştırıldığı durumlarda, TED veya TGD analizi ön plana çıkmaktadır.

Genetik tanı yöntemlerine kolay erişim ve biyoinformatik alanındaki hızlı gelişmelerle birlikte, fenotipin doğru tanımlanması, saptanan varyantların patojenitesinin değerlendirilmesi, aday bulguların işlevsel doğrulaması ve tüm bu veriler ışığında doğru ve bilgilendirici raporlama, genetik bir tanının önemli aşamalarıdır.

Bu bölümde çalışmada kullanılan genetik tanı yöntemlerinden bahsedilecektir.

Moleküler sitogenetik yöntemler

Kromozomal mikroarray

***Array* CGH**

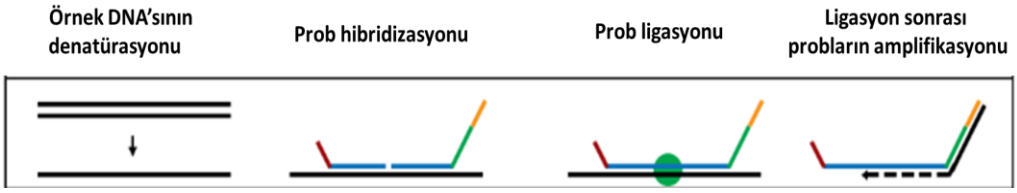
Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (*comparative genomic hybridization*, CGH), indeks DNA ile referans DNA'nın farklı floresan boyalar ile işaretlenerek metafaz kromozomlarına hibridizasyonu ve renklerin karşılaştırılmasına dayanır. *Array*-CGH (aCGH), mikroarray ve CGH tekniklerinin birleştirilmesiyle geliştirilen bir yöntemdir ve genom araştırmaları, kopya sayısı değişimleri (*Copy number variation*, CNV), submikroskobik delesyon/duplikasyon sendromlarının tespiti, onkogen ve tümör supressör gen bölgelerinin araştırılmasında kullanılmaktadır. Dengesiz anomalilerin yüksek çözünürlükle gösterilebilmesi ve tüm genomun kısa bir sürede incelenebilmesi gibi avantajları nedeniyle doğumsal anomali ve zihinsel yetersizliği olan olgularda ilk yöntem olarak önerilmektedir.

Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu

(*Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*, MLPA)

MLPA, birden fazla ekzondaki kopya sayısı değişikliklerinin (delesyon/duplikasyon) saptanmasında kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve ligasyon esasına dayanan bir yöntemdir. Çalışma prensibi, her biri yaklaşık 60 nükleotid (nt) uzunluğunda özgün bir DNA dizisini tespit eden 60 probun amplifikasyonuna dayanmaktadır.

Bir MLPA probu, hedefle eşleşen iki oligonükleotid zincirinden oluşur. Örnek DNA içinde hedef dizi varsa iki prob bu DNA'ya bağlanır. Hibridize olmuş probun iki parçası fosfodiester bağı kurarak ligasyon ile birleşir. Ligasyonu tamamlanan prob multipleks PZR ile amplifiye edilir. Sadece hedef diziye bağlanabilen problar ligasyona uğrar ve PZR ile çoğaltılırlar. PZR sonrası her bir prob için hedef bölge ile orantılı özgün uzunlukta (130-500 nt) amplikonlar elde edilir. İleri primerde floresan boya varlığı nedeniyle kapiler elektroforez sonrası görüntüleme yapılabilir. MLPA reaksiyonunda örneklerin kaynağı, izolasyon tekniği, DNA kalitesi ve referans örnek seçimi sonucun kalitesini doğrudan etkilemektedir. MLPA karşılaştırmalı bir tekniktir ve örnekte her bir hedef diziden elde edilen amplikonların miktarları karşılaştırılır ve veri analiz edilir.



Şekil 2.10 MLPA reaksiyonu

(https://www.mrcholland.com/products/4838/MLPA%20General%20Protocol%20MDP-v008.pdf; 27.06.2024) sitesinden yeniden düzenlenmiştir.

MLPA'da saptanan tek ekzon delesyonları, Sanger dizi analizi ile doğrulanmalıdır. Prob bağlanma bölgesinde herhangi bir nt değişimi varsa eşleşme olmaz, ligasyon gerçekleşmez ve bu bölge "görünürde" delesyon olarak algılanır.

MLPA tekniği, Hollanda Tıp Araştırma Konseyi'ndeki bilim insanları tarafından geliştirilmiştir (89). Bu kuruluş, günümüzde de MLPA prob setlerini geliştirmeye ve pazarlamaya devam etmektedir (https://www.mrcholland.com/).

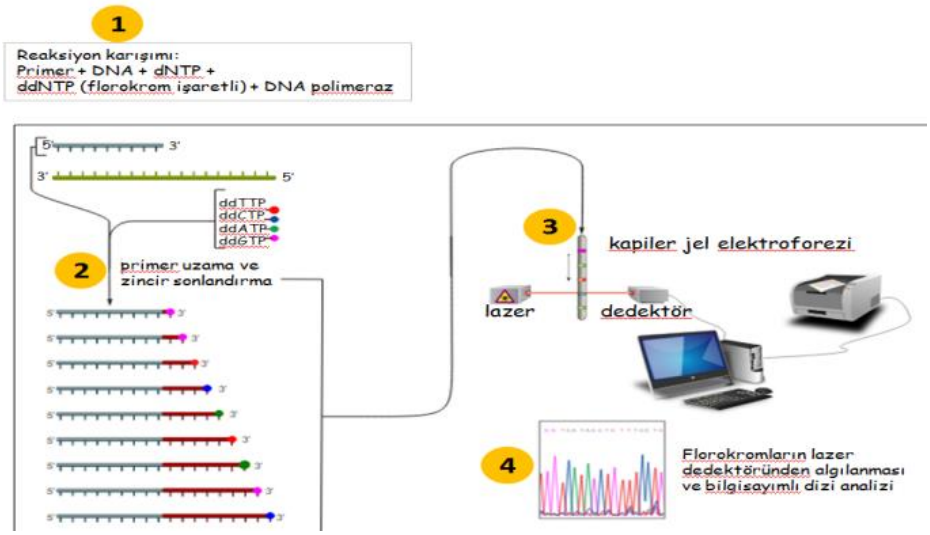
Moleküler genetik yöntemler

Sanger dizileme (Birinci nesil dizileme)

Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde ilk kullanılan teknikler, Sanger dideoksi dizileme ve Maxam-Gilbert kimyasal degredasyon yöntemleridir. Sanger yönteminin zamanla geliştirilip iyileştirilmesi ile Maxam-Gilbert yöntemi uygulamadan kalkmıştır. Frederick Sanger tarafından ilk kez 1970'li yılların sonunda tanımlanan Sanger dizileme, dideoksi DNA dizileme olarak tanımlanan ve sık kullanılan bir dizileme yöntemidir (90, 91).

Sanger dizileme yönteminin temel prensibini oluşturan dideoksi terimi, dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP) adı verilen modifiye edilmiş özel bir nükleotidden gelmektedir. Normal koşullarda, DNA polimeraz, DNA sentezi için nükleotid riboz halkasındaki 3’-hidroksil grubu ile ardından gelen nükleotidin 5’-fosfat grubu arasındaki reaksiyonu katalize eder. Ancak, ddNTP’de 3’-hidroksil grubu bulunmadığı için, reaksiyon gerçekleşemez ve DNA sentezi bu aşamada bloke olur.

Sanger dizilemede, ilk dönemlerde kullanılan radyografik etiketli nükleotidlerin yerini daha sonra özgün floroforlar veya floresan moleküller almıştır. Dizi reaksiyonunda her bir ddNTP farklı floresan etiket taşımaktadır. Son geliştirilen formlarda ise boya sonlandırıcı dizileme (*dye terminator sequencing*) tekniği kullanılmaktadır. Bu teknikle, her bir ddNTP farklı bir floresan boyayla etiketlenir. Etiketlenmiş DNA fragmanları poliakrilamid jel içeren uzun ve oldukça ince cam kapiller tüplerden elektroforezle yürütülürken ve boylarına göre ayrılırken etiketli bantlar lazer kullanılarak tespit edilir.



Şekil 2.11 Sanger dizileme tekniği

https://letstalkscience.ca/educationalresources/backgrounders/sanger-sequencing,Türkçeye çevrilerek yeniden düzenlenmiştir.

Sanger tekniği ile en fazla 1000 nükleotidlik bir dizi elde edebilir. Bunun da yaklaşık 700-800 nükleotidi net okunabilir. Her bir kapillerde tek seferde sadece bir okuma dizilenebilir, toplam çıktı okuma uzunluğuna eşittir. Birden fazla kapilleri olan dizileyicilerde ise bir seferde 8, 16, 48 veya 96 örneğin dizilenmesi sağlanabilir (92, 93).

Yeni Nesil Dizileme (YND)

İkinci, üçüncü ve dördüncü nesil dizileme

Masif (yüksek kapasiteli) paralel dizileme

Sanger dizileme, büyük gen ve genom dizilemelerinde zaman, maliyet ve etkinlik açısından yeterli olmadığı için daha hızlı yöntemlere gerek duyulmuştur (94). Bu nedenle, genomun belli bölgelerinin ya da tümünün kısa sürede dizilenmesini amaçlayan teknikler geliştirilmiştir. DNA'nın paralel olarak dizilenmesi esasına dayanan yaklaşımlar 2000'li yılların başlarından itibaren hız kazanmıştır. Bu yönde geliştirilen tekniklerin tümü YND, yüksek kapasiteli paralel dizileme veya ikinci nesil dizileme olarak adlandırılmaktadır

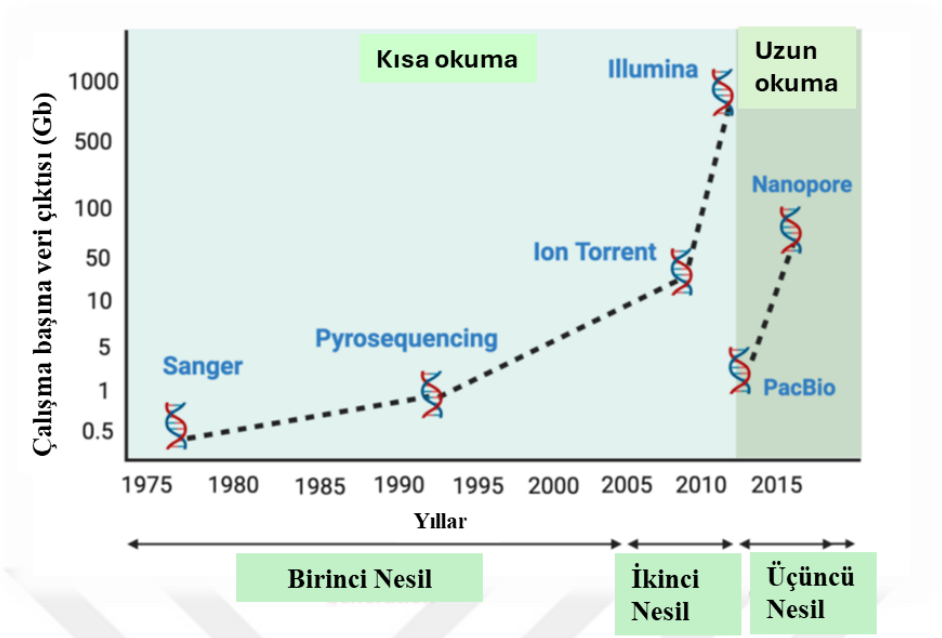
Yüksek verimliliği ve maliyet etkinliği ile YND, temel biyolojiden klinik tanı alanına kadar çeşitli disiplinlerde araştırmacılar için temel bir araç haline gelmiştir ve genom yapısı, işlevi ve dinamikleri hakkındaki bilgilerimizi genişletmektedir. Bu

kapasite, genetik varyasyonun, gen ifadesinin, epigenetik düzenlemelerin ve mikrobiyal çeşitliliğin, tümör heterojenitesi gibi birçok konunun aydınlatılmasında, ilaç hedeflerinin keşfedilmesinde etkili olmaktadır. Çok sayıda incelemeyi ve bireyi aynı test sürecinde yapabildiği için birinci nesil olan Sanger dizilemeye göre daha hızlı ve daha az maliyetlidir (95).

Bu teknolojinin dezavantajları, birinci nesil dizilemeye göre daha kısa okumalar yapması ve PZR amplifikasyonuna dayalı teknikler olduğu için yanlış okumalara neden olmasıdır. Özellikle aşırı Guanin (G), Sitozin (C) içeriğinden dolayı yanlış sıralama veya hatalı dizileme gözlenebilmekte ve tekrar bölgelerinde cihaz okuma hataları yapabilmektedir.

Ticari kullanım 2005 yılında Roche 454 *pirodizileme* ile başlamıştır. Bu tekniğin ardından 2007 yılında *sentez yolu ile dizileme* Illumina/Solexa tarafından ve *ligasyon ile dizileme* SOLiD Applied Biosystem tarafından geliştirilmiş ve kullanıma girmiştir. İyon yarı iletken sistemleri (Ion Torrent), 2010 yılında Life Technologies tarafından geliştirilmiştir. MGI DNA nanoball sistemleri ise 2012 yılında Beijing Genomics Institute (BGI) tarafından geliştirilmiştir (96).

Üçüncü nesil dizileme teknolojileri ise dizileme sürecini daha da hızlandırıp maliyeti azaltmayı hedeflemektedir. Bu teknikler ile daha uzun okumalar elde edilebilmektedir. *Pacific Biosciences* (PacBio) tarafından geliştirilen *Single Molecule Real Time (SMRT)* ve *Oxford Nanopore* tarafından geliştirilen nanopore dizileme teknolojileri üçüncü nesil dizilemeye örnektir (96).

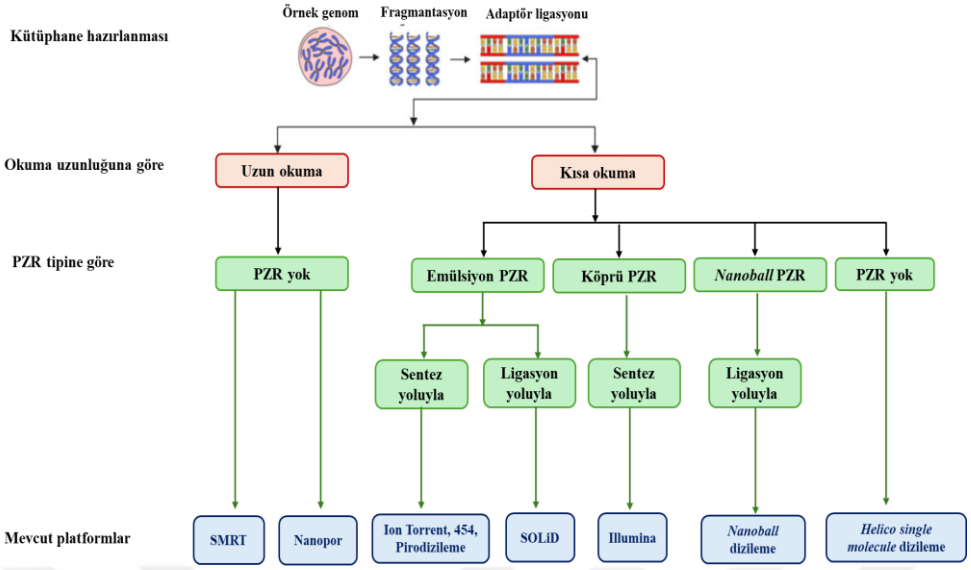


Şekil 2.12 Dizileme teknolojilerinin yıllar içinde gelişimi (96)

Dizileme teknolojilerinin gelişimi üç nesil olarak kategorize edilebilir. Birinci nesil, DNA dizileme için temel sağlayan Sanger dizileme, ikinci nesil, *Illumina* ve *Ion Torrent* gibi platformlarla masif paralel dizileme ile yüksek verimli dizilemeyi sağlamıştır. Üçüncü nesil ise, uzun okuma ve tek molekül dizileme olanağı sunan PacBio ve Nanopor platformlarını içermektedir. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, Thakare RP, Banday S, Mishra AK, Das G, Malonia SK. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. Biology (Basel). 2023; 12:997 kaynağından yeniden düzenlenmiştir.

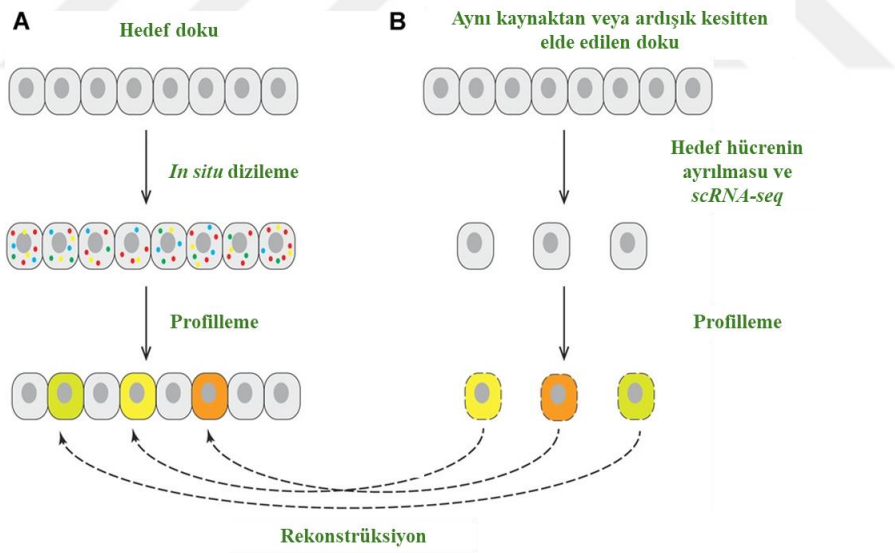
Dördüncü nesil dizileme, genom ve transkriptom işlemlerinin birlikte uygulanıp analiz edilebilmesine dayanmaktadır. Son yıllarda, YND tabanlı tek hücre RNA dizileme (scRNA-seq) teknolojisi, farklı uygulamalar için güçlü bir araç olduğunu kanıtlamıştır. Bu teknolojinin uygulamaları arasında hücre alt popülasyonlarının sınıflandırılması, nadir hücrelerin tanımlanması ve hücre soylarının belirlenmesi yer almaktadır. Bu sayede, dokuların bileşimi, transkripsiyon dinamikleri ve farklı genlerin düzenleyici bağlantıları hakkında yeni biyolojik veriler sağlamaktadır (97).

Özellikle *in situ* dizileme (ISS) gibi dördüncü nesil dizileme yöntemlerindeki gelişmeler, hücrelerde ve dokularda nükleik asitlerin doğrudan dizilenmesine ve böylece örnekten bağımsız olarak yüksek çözünürlüklü transkriptomik analizlerin yapılmasını sağlamaktadır. ISS yöntemleri, daha önce tanımlanmış YND reaksiyonlarına dayanmakta olup tek nükleotid varyasyonları da belirlenebilir (97).



Şekil 2.13 Farklı ilkelere sahip YND platformlarının genel özellikleri (96)

Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, Thakare RP, Banday S, Mishra AK, Das G, Malonia SK. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. Biology (Basel). 2023; 12:997 kaynağından yeniden düzenlenmiştir.



Şekil 2.14 *In situ* dizileme ve scRNA-seq kullanarak tek hücre gen ifadesi verilerinin mekansal yeniden yapılandırılması (97) **A:** Hedef dokuda *in situ* dizileme gerçekleştirilerek farklı hücre tiplerinin profillendiği gen ifadesi verileri oluşturulur. **B:** Aynı kökenden gelen (aynı morfoloji) veya ardışık bir kesitten elde edilen tek hücrelere scRNA-seq uygulanır. scRNA-seq verileri profillendikten sonra, *in situ* dizileme gen ifadesi örüntüleri ile eşleşen hücreler, dokunun mekansal organizasyonunu yeniden yapılandırmak için ilgili pozisyonlarına yerleştirilir. Ke R, Mignardi M, Hauling T, Nilsson M. Fourth Generation of Next-Generation Sequencing Technologies: Promise and Consequences. Hum Mutat. 2016; 37:1363-1367 kaynağından yeniden düzenlenmiştir.

Günümüzde çoğu yeni nesil teknolojisi, sentez yoluyla dizilemeye dayanmaktadır. İkinci nesil dizileme yöntemleri kısa okuma teknolojisi ile tanımlanırken üçüncü nesil gerçek zamanlı uzun okuma teknolojileri olarak tanımlanmaktadır. YND yöntemlerindeki farklılıklara karşın, iş akışı genellikle kütüphane hazırlığı, nükleik asit dizileme ve veri analizi gibi üç adımdan oluşur (96, 98).

Kütüphane hazırlığı, dizileme için nükleik asit örneklerinin (*template)* (DNA veya RNA) hazırlanmasıdır ve her platform için farklılık gösterir. Kısa okumalı teknikler için üç basamak şu şekildedir:

1. DNA'nın uygulamaya özgün örnek uzunluklarına parçalanması,
2. Adaptörlerin bağlanması (fragmanların mikroçip, mikrobilye veya nanokuyucuk gibi katı yüzeylere bağlanmasını veya dairesel hale getirilmesini kolaylaştırmak için gereklidir),
3. Amplifikasyon (Dizileyicinin algılamasına izin verecek kadar her örnekten yeterli kopya sağlanması)

Kütüphaneler, yalnızca bir uçtan okuma (*single-end)* veya her iki uçtan okuma (*pair-end*) olarak dizilenebilir. Kütüphane hazırlığında, PZR amplifikasyonu ile ilişkili sorunlar ve polimeraz hataları veya GC içeriğine bağlı olarak dizi reaksiyonu ile ilgili yetersizlikler yaşanabilmektedir. Son dönemde, kısa okuma platformları için PZR'siz kütüphane hazırlama yöntemleri de oluşturulmuştur; bu yöntemler, dizilemenin doğruluğunu artırarak teknik hataları azaltmayı amaçlamaktadır (95).

Aşağıda çalışmamızda kullanılan ikinci nesil YND tekniklerinin özelliklerinden kısaca bahsedilecektir.

İyon yarı-iletken dizileme (*ThermoFisher Scientific*)

İyon yarı-iletken dizileme yönteminde sentez yolu ile dizileme kullanılır. Kütüphane hazırlığı, örnek DNA'yı mikroboncukların yüzeyine izole eder, ardından bu boncuklar emülsiyon PZR ile çoğaltılır. Mikroboncuklar daha sonra her biri bir pH-metre olarak işlev gören özel bir sensörle eşleştirildiği bireysel mikrokuyucuklara dağıtılır. Bu yöntem, optik temelli değildir, işaretli nükleotidlere dayanmaz, bunun yerine nükleotidler tamamlayıcı zincire eklenmesi sırasında açığa çıkan hidrojen iyonlarının oluşturduğu pH değişikliğini ölçer. Bu yöntemin dezavantajı, örnek

dizisinde aynı nükleotidin bir homopolimeri mevcutsa nükleotidlerin sayısına orantılı olarak uygun olmayan elektriksel sinyaller kaydedebilmesidir (95).

İyon yarı-iletken dizileyicisinin mevcut versiyonu olan Ion Torrent Gene Studio S5, 200 ile 600 nt arasında okuma uzunlukları üreten ve %99'dan fazla doğrulukla 50 Gb'a kadar çıktı sağlayan bir dizi çip kullanan üç enstrüman içerir. Bu enstrümanların başlıca uygulamaları arasında hedeflenmiş yeniden dizileme, ekzom dizileme, transkriptom dizileme, küçük genom dizileme, sıvı biyopsi ve geniş kanser gen panelleri bulunur. Sistemin avantajları, işaretli nükleotidlerin yokluğundan ve yüksek maliyetli optik görüntülemeye ihtiyaç duyulmamasıdır. Ion Torrent yönteminin dezavantajları ise verimliğinin nispeten düşük olması ve homopolimerlerin çözülmesinde karşılaşılan zorluklardır. Bunlar, *indel* performansını etkileyebilir (95).

Kısa okuma sentez yolu ile dizileme (*Illumina*)

Illumina platformlarında kütüphane hazırlığı sonrası, yaklaşık 450 nt uzunluğundaki DNA parçalarına adaptörler eklenir, örnekler tamamlayıcı adaptörlerin belli bir düzendeki kümelerin olduğu cam slayta hibridize edilir. Katı yüzeye bağlandıktan sonra fragmanlar, yalnızca bir uçtan (tek uçlu okuma) veya her iki uçtan (eş uçlu okumalar) PZR ile çoğaltılır. Aynı anda dizilenebilen milyonlarca hatta milyarlarca klonal DNA fragmanı kümeleri oluşturulur. Geri dönüşümlü sonlandırıcı nükleotidler kullanılır ve her seferinde bir nükleotid eklenerek yüksek çözünürlüklü optik görüntüleme elde edilir. Bu işlem, okuma uzunluğu boyunca tekrarlanarak dizi çıktısını oluşturur ve okuma uzunlukları genellikle 75 – 250 nt arasındadır.

Illumina, halihazırda dört tezgah üstü dizileyici ve iki üretim ölçekli platforma sahip olup değişken uygulamalarla, *in vitro* tanı dahil olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Farklı kütüphane hazırlık kitleriyle birleştirildiğinde, her bir enstrüman çeşitli veri işleme kapasiteleri, çıktı, baz başına maliyet ve uygulama yelpazesi sunar. Tezgah üstü dizileyiciler (iSeq, MiniSeq, MiSeq ve NextSeq), bakteriyel genomlardan transkriptom ve TED'e kadar artan kapasiteyle daha küçük deneyler için uygundur (99). Üretim ölçekli dizileme platformları (HiSeq ve NovaSeq) ise esas olarak geniş ölçekli TED ve TGD analizleri için kullanılır. HiSeq X ve 4000 sistemlerinin akış hücresi teknolojisi *(patterned flow-cell)*, yılda on binlerce genomu dizileme kapasitesine sahip olup bu durum, maliyetleri azaltmaktadır. *Illumina* dizileyici serisine en son eklenen NovaSeq 6000, akış hücresini iki renkli nükleotid

tespit sistemiyle birleştirerek ultra derin TED ve TGD ile tümör profillemesi için hız, esneklik ve veri işleme kapasitesi sağlar (95, 100).

Tablo 2.5. YND platformlarının verimlilik ve maliyetlerinin karşılaştırılması (98, 101)

Platform	**Şirket**	**Okuma Uzunluğu (bç)**	**Verim (Gb)**	**Hata Oranı**	**Çalışma Süresi**	**Maliyet**
Sanger	*Applied Biosystems*	700-1000	0.001-0.01	Düşük (0.001%)	30 dk - 3 st	Yüksek
Pirodizileme	*Roche 454*	400-500	0.02- 0.7	Orta (1%)	10 - 24 st	Orta
Ion Torrent	*Thermo Fisher*	200-400	10- 50	Yüksek (1-2%)	2 - 7 st	Düşük
Illumina	*Illumina*	50-300	10- 6000	Düşük (0.1-1%)	1 - 14 gün	Düşük
PacBio	*Pacific Biosciences*	10,000-30,000	1- 10	Yüksek (10-15%)	4 - 6 saat	Orta
Nanopore	*Oxford Nanopore*	5,000-100,000+	1- 200	Yüksek (5-20%)	Gerçek zamanlı	Değişken (Düşük-Orta)

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. Nat Rev Genet 2016; 17:333-351 kaynağından yeniden düzenlenmiştir

Bahsedilen ikinci nesil dizileme yöntemlerinin genetik tanıda kullanımında farklı yollar izlenebilir. Hedeflenmiş dizileme yaklaşımları genom içindeki belirli bölgeler üzerine odaklanır. Çoğu klinik gen paneli, belirli fenotiplerle ilişkili genlerdeki genetik varyasyonu analiz etmek için hedeflenmiş gen dizileme yaklaşımını kullanır. Maliyetlerin azalması ve hata oranlarının düşmesi ile gen paneli yerine TED ve TGD'nin kullanımı artmaktadır.

Tüm Ekzom Dizileme (TED) (*Whole Exome Sequencing, WES*)

Hedeflenmiş dizilemeye yönelik daha kapsamlı bir yaklaşım olan TED, tüm genlerin protein kodlayan bölgelerini (ekzonlar) hedefler ve bu bölgeler, tüm genomun yaklaşık %2'sini oluşturur (102). Günümüzde bilinen hastalık ilişkili varyantların yaklaşık %85'inin ekzomda bulunduğu tahmin edilmektedir (95, 103).

TED'in özellikle, genetik heterojenitenin fazla olduğu hastalıklarda, klinik tanıyı desteklemede önemli katkısı mevcuttur (104). Ayrıca, nörogelişimsel yetersizlikler, otizm, epilepsi, konjenital kalp hastalıkları gibi birçok farklı hastalık grubunda yeni gen ve sinyal yolakları araştırılmasında da etkin olarak kullanılmaktadır (105).

Analizlerde farklı yaklaşımlar kullanılabilmektedir. Fenotip ile ilişkili olduğu bilinen genlerin bir listesini içeren biyoinformatik panel üzerinden analiz yapılması veya tüm nadir ve potansiyel olarak patojenik varyantların incelediği ve fenotipler ile eşleştirildiği yaklaşımlar örnek olarak verilebilir. Henüz fenotiple ilişkilendirilmemiş genlerdeki varyantların tanımlanması sağlanabilir.

TED tekniğinin kısıtlılıkları; gen bölgelerinin eksik kapsanması, tekrar bölgelerindeki değişimi tespit etme yeteneğinin sınırlı olması, yapısal varyantlar ile derin intronik varyantların saptanamaması olarak sayılabilir. Patojenik intronik varyantların veya bazı yapısal varyantların saptanmasına yönelik teknik ve biyoinformatik iyileştirmeler yapılabilmektedir.

Tüm Genom Dizileme (TGD) (*Whole Genome Sequencing, WGS*)

En kapsamlı genom dizileme yaklaşımı, hem kodlayan hem de kodlamayan bölgeleri dizilemektedir. Özellikle ekzon-intron birleşim bölgelerindeki varyantların saptanmasında daha etkili olduğu bilinmektedir. Kodlamayan bölgelerin analizine ek olarak hedefli panellerin ve TED'in detaylı *in silico* alt-analizlerini gerçekleştirmeye olanak tanır. TED analizi yapıldığı halde klinikle uyumlu herhangi bir varyantın saptanmadığı durumlarda TGD tekniği tercih edilebilmektedir (106). Son yıllarda TGD'yi ilk basamak inceleme olarak öneren klinikler de bulunmaktadır.

Biyoinformatik alanındaki gelişmeler ile genom ve transkriptomun kodlamayan bölgelerini sorgulamak giderek daha mümkün hale gelmekte ve bilinmeyen ve çözülemeyen hastalıkların anahtarı olabilecek çok miktarda küçük ve büyük ölçekli değişim ortaya çıkarılabilmektedir (107).

YND teknolojisi hızla gelişmekte olup, yüksek kapasiteli paralel dizilemenin farklı uygulamaları için artık çok sayıda seçenek mevcuttur. Dizi varyantlarının analizi ve yorumlanması iyileştikçe daha önce çözülemeyen hastalıkların tanısı kolaylaşacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Kliniği'ne ÇHHE ön tanısıyla yönlendirilen 148 olgunun dosya bilgileri incelendi. Klinik değerlendirmeleri yapıldı. Uyumsuz klinik ve yetersiz veri nedeniyle 23 olgu dışlandı.

Çalışmaya 118 aileden 125 (45 kız) olgu alındı.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2021/2094 tarih ve sayısı ile onaylanmıştır.

3.1 Klinik Değerlendirme

Klinik ve biyokimyasal olarak izole büyüme hormonu eksikliği veya ÇHHE tanısı konulan ve genetik analizler için Tıbbi Genetik'e yönlendirilmiş ve moleküler etiyolojisinin aydınlatılması amacıyla YND panel araştırmasına dahil edilmiş olgular ele alınmıştır. Edinsel nedenlere bağlı hipofiz hormon eksikliği olanlar dışlanmıştır. Hasta ve/veya hasta yakınlarının rızasının olmayışı veya çalışmaya katılmaktan vazgeçmesi durumunda araştırma dışı bırakılmıştır. Çalışmaya dahil edilen olgularda klinik genetik değerlendirme ve fenotipin detaylandırılmasının yanı sıra, üç kuşak aile ağacı, kalıtım modeli, radyolojik değerlendirme raporları (kraniyal ve hipofiz MR gibi), var olan moleküler analiz sonuçları gibi veriler incelenerek kaydedilmiştir.

3.2 Moleküler Yöntemler

DNA izolasyonu ve kalitesinin değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen olgulardan, hasta/aile onamları alındıktan sonra periferik venöz kan örneklerinden *DNA Isolation Kit for MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200, Cat.Op02001-4* kullanılarak DNA izole edilmiştir. Miktar ve kalite tayini yapılmıştır. Genomik DNA örneklerinin konsantrasyonları (ng/µl) ve absorbsiyon ölçümleri (A260/280~1,80-1,89) spektrofotometre ile yapılmıştır. Kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific™). PZR'de kullanılacak DNA miktarının reaksiyon başına 50-80 ng/µl olması hedeflenmiştir. Bir sonraki işleme kadar DNA örneği -20ºC'de saklamaya alınmıştır.

Genetik testlerin planlanması

ÇHHE/KH olgularında genetik etiyolojinin araştırılması amacıyla boy kısalığı ve/veya ÇHHE ilişkili 25 geni içeren panel Ion Torrent PGM platformu ile incelendi.

***Ion Torrent* Platformu iş akışı**

Platformda iş akışı, sinyal işleme, baz isimlendirme, haritalama, varyant isimlendirme ve önceliklendirme ile yorumlama basamaklarından oluşur. Bu basamaklar, platformun Torrent Suite Server (TSS) olarak adlandırılan programı ile yapılır. TSS ile varyant isimlendirme ve önceliklendirme yapılmış BAM ve BAM-BAI formatındaki veri, platformun *Ion Reporter* programı ile tekrar işlenerek ileri analize alınmaktadır. Sinyal işleme ve baz isimlendirme aşamasında veri haritalanmamış BAM formatına dönüştürülmektedir.

Ham verinin kalite kontrolünde verinin standartlara uymayan okumalarının çıkarılması veya düzeltilmesi, adaptör kontaminasyonu, indel ve düşük kaliteli okumalardan kaynaklanan yapay dizilerden temizlenmesi yapılır. Bu aşamada, nükleotid kalite değerleri ve dağılımları görsel olarak sunulur, primer kontaminasyonu, nükleotid içeriği ve GC zenginliği gibi özelliklere göre okumaların filtrelenmesi sağlanır.

Haritalama ve hizalama aşaması okumaların genomik lokalizasyonlarının belirlendiği basamaktır. FASTQ formatındaki diziler SAM/BAM formatına çevrilir. Veriler BAM dosyası formatında saklanır. Bu aşamada TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) algoritması kullanılmaktadır.

Varyant belirleme, filtreleme ve isimlendirme aşamasında hizalanmış diziler referans genomla kıyaslanır ve farklılıklar belirlenir. İleri analiz aşamasında hizalanmış veriler Ion Reporter'a aktarılır, Ion Reporter varyant isimlendirme ve analiz parametreleri ile değişimleri belirleyerek ayrıntılı *VCF* raporu oluşturur. Varyantlar belirlendikten sonra IGV (Integrated Genome Browser) programında görüntülenebilir (108).

IonTorrent PGM'de, boy kısalığı ve ÇHHE ilişkili 25 genin kodlayan ekzon ve UTR bölgeleri ile ekzonların ±10 bç intron sınır bölgelerini içeren 80 kb'lik alan toplam 275 amplikon ile % 99,25 kapsam (*coverage*)'da dizilendi.

Panelde bulunan genler: ***BMP4*** (14q22-q23, NM_001202.3); ***FGF8*** (10q24, NM_033163.3); ***FGFR1*** (8p11.2-p11.1, NM_023110.2); ***GH1*** (17q24.2, NM_000515.4); ***GHR*** (5p13-p12, NM_000163.4); ***GHRH*** (20q11.2, NM_021081.4); ***GHSR*** (3q26.31, NM_198407.2); ***HESX1*** (3p21.2-p21.1, NM_003865.2); ***HHIP*** (4q28-q32, NM_022475.2); ***IGFALS*** (16p13.3, NM_004970.2); ***IGF1*** (12q22-q23, NM_000618.3); ***IGF1R*** (15q26.3, NM_000875.4); ***IGFBP3*** (7p13-p12, NM_001013398.1); ***IGSF1*** (Xq25, NM_001170961.1); ***LHX3*** (9q34.3, NM_014564.3); ***LHX4*** (1q25.2, NM_033343.3); ***OTX2*** (14q21-q22, NM_172337.2); ***POU1F1*** (3p11, NM_000306.3); ***PROKR2*** (20p12.3, NM_144773.2); ***PROP1*** (5q35.3, NM_006261.4); ***SHH*** (7q36, NM_000193.2); ***SHOX*** (Xpter-p22.32;Yp11.3, NM_000451.3); ***SOX3*** (Xq27.1, NM _005634.2); ***STAT5B*** (17q11.2, NM_012448.3); ***WDR11*** (10q26, NM_018117.11) idi.

Altı çizili olarak işaretlenen genler ÇHHE ve/veya izole hipofiz hormon eksikliği ile ilişkili veya ilişkisi olabileceği literatürle bildirilmiş olan genlerdi.

Hedef bölgeler için özgün primer tasarımı Ion Ampliseq sistemi kullanılarak (https://www.ampliseq.com) yapıldı. Tasarımda hedef alınan bölgeler 275 amplikona bölünerek (142 ve 133 amplikonluk iki primer havuzu) multipleks PZR tasarımları tamamlandı. Tasarımda 77,2 kb uzunluğundaki hedef bölgenin toplam 319 bç'lik parçasına dizi motifi ve genomik lokalizasyonu gibi nedenlerle uygun tasarım yapılamadı ve % 99,25'i kapsanmış oldu.

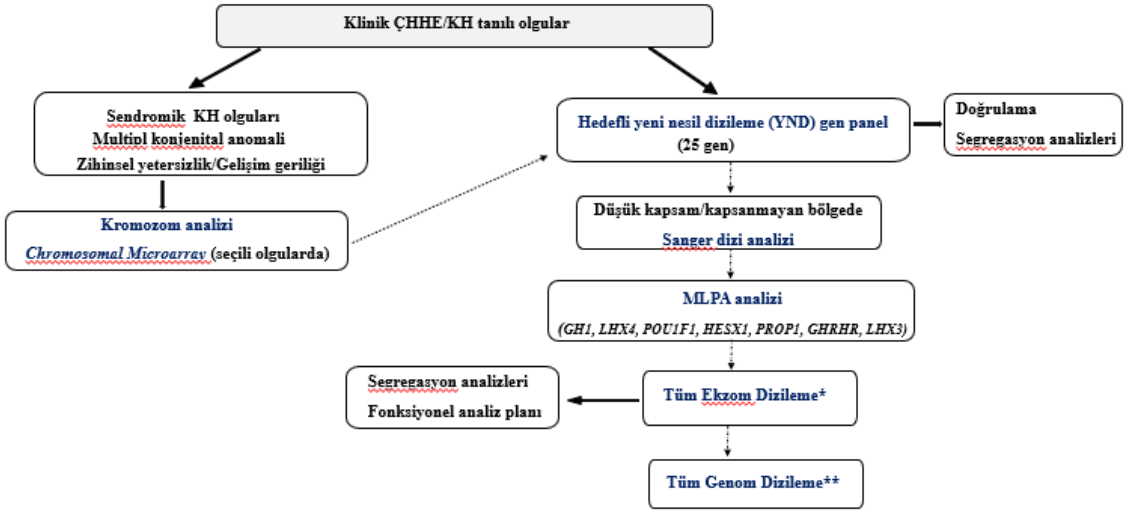
Tablo 3.1. Dizileme planı

Ion Reporter	Version 5.6
Örnek DNA	Hedef DNA
Hedef Tekniği	AmpliSeq DNA
Ion Reporter İş Akışı	SS_CHD_W_HOTSPOTv6
Kütüphane Hazırlama Kiti	Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit
Kütüphane Anahtarı	Ion TCAG (TCAG)
Template Kiti	Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2
Dizileme Kiti	Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit
Akış Sayısı	850
Çip Tipi	Ion 318™ Chip v2
3' Adaptör	Ion P1B (ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGCTGAGAC)
Barkod	IonXpress
Boncuk Yükleme (%)	10
Anahtar Sinyal (1-100)	30
Kullanılabilir Dizi (%)	30
Referans Kütüphane	Hg 38 (Homo sapiens)
Hedef Bölgeler	SS_CHD_IAD116213_197_Designed
Hotspot Bölgeler	SS_CHD_hotspots_v6
Eklentiler	Coverage analysis, FileExporter, RunTransfer, variantCaller (germline_low_stringency)
Proje	SS_CHD

ÇHHE panel testi analizleri yapıldıktan sonra çalışmada aşağıda belirtilen basamaklar uygulandı:

1. YND panel gen testinden elde edilmiş sonuçlar irdelenip ilişkili/olası ilişkili varyantlar için ailelerde segregasyon analizi yapıldı. Kliniği açıkladığı düşünülen ve kalıtım modeli ve segregasyon analizleri ile açıklanan sonuçların raporlanması ve genetik danışma verilmesi planlandı.
2. YND panel gen testinde ilişkili varyant saptanmayan olgularda incelemenin tamamlanabilmesi için düşük kapsam ya da kapsam dışı bölgeler Sanger dizi analizi ile incelenerek bu bölgelerdeki olası patojenik varyantların varlığı araştırılması planlandı.
3. Bahsedilen yöntemlerle genetik ilişkisi açıklanamayan olgular ÇHHE ilişkili yedi geni içeren MLPA- P216 B1 0815 probu ile delesyon/duplikasyonlar araştırılması planlandı. Saptanan kopya sayısı değişimleri için aile taraması yapılması ve doğrulanan sonuçların raporlanarak aileye genetik danışma verilmesi planlandı.
4. MLPA testi ile de genetik etiyolojisi açıklanamayan olguların ise aile ağaçları tekrar değerlendirilerek, izole ve ebeveynleri akraba olmayan/aynı köyden gelmeyen olgular *trio* (anne-baba-indeks), ailevi olgulalar *pair(duo)* (iki etkilenmiş ya da bir etkilenmiş bir etkilenmemiş), ebeveynleri akraba olan olgular ise *solo* (tek) yaklaşımı ile TED analizine seçilmesi planlandı.
5. TED'de de kliniği açıklayacak ilişkili varyant saptanmayan olgularda imkanlar dahilinde TGD analizi yapılması planlandı.

   Çalışma protokolü **Şekil 3.1**'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1 Çalışma Protokolü

ÇHHE: Çoklu hipofiz hormon eksikliği; KH: Konjenital hipopituitarizm

*Çalışma kapsamında 15 indeks olguya (trio ve duo analizler ile toplam 21 örnek) TED analizi uygulanmıştır

**Çalışma kapsamında benzer etkilenmiş iki kardeş olguya TGD analizi uygulanmıştır.

Kromozom analizi ve/veya kromozomal mikroarray analizler klinik genetik değerlendirmesinde gerekli görülen seçili olgularda uygulanmıştır.

Sanger Dizileme

Primerlerin tasarlanması

ÇHHE panelinde belirlenen varyantların doğrulanması ve segregasyonu için hedef bölgelere ait primer tasarlandı. Primer tasarımı sırasında dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış ve sıklığı %0,1'den fazla olan herhangi bir varyant olmamasına veya tekrarlayan dizi bölgesinde yer almamasına, ileri (*Forward, F*) ve geri (*Reverse, R*) primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olması (+/- 2-5˚C fark), A- T ve C - G nükleotidlerinin olabildiğince eşit dağılmasına dikkat edildi. Gen bölgesinde beklenen varyantların analiz edilmesine olanak sağlayacak derinlikteki intronik bölge içinde bulunmasına ve 18-24 nükleotid olarak tasarlandı. Primer özgünlüğü, *UCSC Genome Browser* sitesinden *in silico* PZR sistemi ile test edildi (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr).

ÇHHE gen panelinde ilişkili varyant saptanmayan olgularda düşük kapsam/kapsanmayan bölgeler tespit edildi. Bu bölgelerden *PROP1* geni ekzon 2 bölgesi ve *WDR11* geni ekzon 17 ve 26 bölgeleri için uygun yeni primerler tasarlandı.

Tasarlanan ve kullanılan primer çiftleri **Tablo 3.2**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Düşük kapsam/kapsanmayan bölgeler için kullanılan primer çiftleri

Primer	Ekzon	Primer dizisi	Amplikon, bç
PROP1-2A	2R	5'-CAA TCC CGG GAC AGG CAC A-3'	424
PROP1-2R		5'-GGC CTG TGT CTG GTG ACC A-3'	
WDR11-F17	17F Kapsanmayan bölge	5'-GTT GAA ATT GAT AGG CAA TGT AGC T-3'	376
WDR11-R17		5'-GCG ACA GAG CAA GAC ACC AT-3'	
WDR11-F26	26R Düşük kapsam	5'-ACT TCT CAA AGA AGG AGC TGC A-3'	355
WDR11-R26		5'-GCT ACC AAT GCA AGA TCC ATT-3'	

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR reaksiyonlarının her biri için 25 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific), 1x tampon solüsyonu [10x$(NH_4)_2SO_4$] (Thermo Scientific), %0-10 DMSO (Biomatik Coorporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2 − 0,5 µM ileri ve *revers* primerler (Sentebiolab), 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Hibrigen) ve 150-200 ng gDNA kullanıldı. GC yüzdesi yüksek olan reaksiyonlarda %10 DMSO (Biomatik 52 Coorporation) değişken yüzdelerde kullanıldı. Karışım, distile su (dH_2O) ile elde edilen volüm 25 µl olacak şekilde hazırlandı. İşlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR reaksiyonu DNA içermeyen negatif kontrol PZR ile birlikte uygulandı.

PZR; 94°C'de 5 dk denatürasyon 1 döngü, ardından 94°C'de 30 sn denatürasyon, primerlerin erime ısısına (*Temparature of Melting*, Tm) göre değişen (52°C'den 62°C'ye) ve 30 sn'lik bağlanma ısılarında ve 72°C'de 45-90 sn. (her bir 1 kb

için 1 dk) uzama basamaklarından oluşan toplam 35 (10+25) döngü ve son olarak 72°C'de 10 dk'lık uzama ile, termal döngü cihazlarında (SimpliAmp [Applied biosystems] gerçekleştirildi.

Amplifikasyon sonrası elde edilen ürünlerden alınan 5 µl örnek, %1.2'lik agaroz jelde (Sigma), 1xTBE tamponunda 160 voltta, 30 dk yürütüldü, beklenen bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Elde edilen bantlar ultraviyole altında görüntülenerek kaydedildi.

PZR Ürünü Saflaştırması

Saflaştırma için Exonuclease-I (Lot:00716871-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898141001-Roche) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazlarında 37°C'de 30 dk, 85°C'de 15 dk ve ardından +4°C'ye getirilerek PZR protokolü uygulandı. Saflaştırılmış amplikonların *ABI3500* otomatik sekiz kapillerli genom analizatörü (Applied Biosystems) cihazında dizi analizi gerçekleştirildi.

Dizi PZR Reaksiyonu

Tampon solüsyonu (x5) olarak kullanılan PZR için gerekli kimyasalları içeren BigDye buffer, ddNTP ve AmpliTaq DNA polimeraz içeren BigDye v3.1, tek veya çift yönlü primer/primerler, saflaştırılmış PZR ürünleri ve dH_2O eklenmesiyle, son volüm 10µl olacak şekilde *plate* (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate-N8010560) üzerinde her bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde yüklendi. 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 basamaklarını içerecek şekilde ayarlandı. *Plate* termal döngü cihazına yerleştirildi.

Dizi PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden arındırılması için *plate* içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat, 1 µl %2'lik glikojen ve 25 µl %100 soğuk etanol eklendi. *Plate* alüminyum koruyucu yapışkan bantla (*seal*) kapatılarak oda sıcaklığında 15 dk bekletildi ve santrifüj edildi (3810 rpm'de 45 dk). *Plate* üzerindeki koruyucu bant açıldı ve ters çevrilerek 1100 rpm'de 30 sn kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik soğuk etanol eklendi. *Plate* yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. *Plate* üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve ters çevrilerek 1170 rpm'de 60

sn.'ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized Formamid) eklendi. Örnekler 95°C'de 5 dk denatüre edildi ve buz üzerinde 2 dk bekletildi.

Elektroforez Cihazına Yükleme

Saflaştırılan örnekler *ABI3500* cihazı için uygun olan plak (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate-N8010560) her bir kuyuya bir örnek gelecek şekilde yerleştirildi. *Plate* santrifüjünde (Biosan LMC3000) 1200 rpm'de 2 dk çevrildi. Santrifüj bitince, *plate ABI3500* cihazına yerleştirilip yürütme işlemi geçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Z Dyeset seçildi.

Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller elektroforez sonucunda elde edilen *fasta* dosyası *ABI Sequencing Analysis v5.4* yazılım ve *SeqScape v.3.0* programlarında analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi. Tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde düzenlendi. Dizileme işleminden sonra *fasta* formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi. Analiz işlemi başlatıldı. Bu işlemden sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (*forward* ya da *reverse* 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 mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı.

SeqScape v3.0 programında elde edilen örnek dizi ile referans dizi karşılaştırılarak tanımlanmış değişimler *NCBI Entrez SNP*, *Ensembl* ve HGMD veri tabanları kullanılarak programda işaretlendi. Daha önce karakterize edilmemiş değişimlerin *in silico* olarak patolojenik olup olmadığı, *Mutation Taster* ve *Prediction of functional effects of human nsSNPs* (PolyPhen-2) *Protein Variation Effect Analyzer* (PROVEAN) (http://provean.jcvi.org/) veri tabanları kullanılarak analiz edildi. Varyantların sınıflandırılmasında *VarSome* veri tabanında interaktif analizlerden yararlanıldı. Varyantların sıklıklarının belirlenmesinde GnomAD veri tabanı kullanıldı. Olguda patojenik/olası patojenik varyant saptanmış ise bağımsız örnek çalışması ile doğrulandı. İlişkili olduğu öngörülen varyantlar için aile ağacına göre uygun aile bireylerinde segregasyon yapıldı.

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Analizi

Çalışmamızda, SALSA MLPA *probe mix* **P216 B1 0815** kiti kullanıldı. Bu MLPA kitin ile ***LHX4*** (NM_033343.3) geni tüm ekzonları: ekzon 1-6; ***HESX1*** (NM_003865.2) geni tüm ekzonları: ekzon1-4; ***POU1F1*** (NM_001122757.2)geni bazı ekzonları: ekzon 1,2,3,4,6; ***PROP1*** (NM_006261.4) geni tüm ekzonları: ekzon 1-3; ***GHRHR*** (NM_000823.3) geni bazı ekzonlar:ekzon 1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13; ***LHX3*** (NM_178138.5) geni tüm ekzonları ve intron 1:ekzon 1-6; ***GH1*** (NM_000515.4) geni bazı ekzonları ve *upstream* bölgesi:ekzon 3, 4, 5 kopya sayısı incelendi.

Tek bir PZR protokolünde uygun sıcaklıkta bekletme ve ekleme gibi işlemleri ile denatürasyon, hibridizasyon, ligasyon ve amplifikasyon aşamaları DNA Engine (BIORAD)-T100 termal döngü cihazında gerçekleştirildi. *Size standart* (Lize 500 (GS500-250)) eşliğinde kapiller elektroforez cihazında fragmanlar yürütüldü.

DNA Denatürasyonu ve Prob Karışımı ile Hibridizasyonu

Denatürasyon öncesinde stok DNA, yoğunluğu 25-30 ng/µl olacak şekilde yaklaşık 25µl miktarda TE tamponunda çözdürülerek seyreltildi. Prob kitinden SALSA Prob karışımı ve SALSA MLPA tamponu çıkarılarak oda sıcaklığında çözüldü. Tampon vorteks ile karıştırıldı ve kısa süreli santrifüj ile çöktürüldü. Uzun problar çökebileceğinden karışım santrifuj edilmedi, prob karışımı pipet ile karıştırıldı. DNA çözeltisinden her örnek için 5µl DNA etiketlenmiş 200 µl'lik PZR tüplerine alındı. Termal döngü cihazında 98°C'de 5 dk denatüre edildi. Her bir örnek için 1,5 µl MLPA tampon ve 1,5 µl prob olmak üzere karışım hazırlandı. Oda sıcaklığında beklemeye alınan tüplere cihaz üzerinde 3 µl olmak üzere dağıtılarak pipet ile karıştırıldı. 95°C'de 1 dakika kısa prob denatürasyonundan sonra 37°C'de 16 saat hibridizasyon için bekletildi. Hibridizasyon sonrası bekletilmeden ligasyon işlemine geçildi.

Ligasyon basamağı

Ligasyon tamponu A ve Ligasyon tamponu B oda ısısında çözdürüldü. Her bir örnek için 25 µl dH2O, 3 µl tampon A, 3 µl tampon B ve 1 µl Ligaz 65 enzimi eklenerek karışım hazırlandı. Termal döngü cihazı 54°C'de iken her bir tüpe hazırlanan 32 µl ligasyon karışımı eklendi ve 54°C'de 15 dk bekletme basamağına geçildi. Elde edilen ligasyon ürünü 4°C'de saklandı.

PZR basamağı

SALSA PZR tamponu ve SALSA PZR primeri (FAM boyalı) oda sıcaklığında çözüldü. Karışım için örnek başına ayrı bir tüpe 7,5 µl dH_2O, 2 µl SALSA PZR primeri ve 0,5 µl SALSA polimeraz enzimi eklendi. Pipetle iyice karıştırılarak homojen olması sağlandı. Ligasyon ürünlerinin üzerine 10'ar µl eklendi. PZR karışımı hazırlanırken, primerler floresan işaretli olduğundan ışıktan korunmasına dikkat edildi. Her bir örnek için eklenen karışımın pipetaj ile karışması sağlandı. 20°C'de bekleme aşamasındaki termal döngü cihazında sonraki basamağa geçiş yapıldı (35 döngüde; 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 60 saniye, 72°C'de 20 dakika ve 4°C'de bekleme aşamaları) 4°C'ye gelen örnekler için kapiller elektroforezine yükleme ve fragmanların yürütülmesi aşamasına geçildi. PZR ürünleri saklanacaksa ürünlerin ya ışık almayan kutuda saklanmasına ya da alüminyum folyo ile sarılmasına dikkat edildi.

Kapiler Elektroforez Cihazı ile Fragmanların Yürütülmesi

Boş bir karışım tüpüne yürütülecek örnek başına 0.2 µl LIZ size standard (Liz-500, Lot:0904226, Applied Biosystems) ve 9.5 µl formamid (Highly Deionized - HiDi) konularak karıştırıldı. Kapiller elektroforezine yüklenmek için oluşturulan numaralandırılmış ABI3500 cihazı için uygun olan *plate* (USA Scientific-800-522-8477) her bir kuyuya bir örnek başına 9,7 µl dağıtıldı. Üzerine 0,3 µl PZR reaksiyon ürünü *plate* kuyularına olgu numaralarına göre dağıtıldı. *Plate* kuyucuklarının üzeri uygun septayla kapatılarak, plate santrifüjünde 4000 rpm'de 2 dk çevrilerek çökmesi sağlandı. Santrifüj bitince, plate ABI3500 cihazına yerleştirildi ve kapiller elektroforez cihazında yürütme ayarları düzenlenerek fragman platformunda yürütme işlemine geçildi. [Yürütme voltajı; 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı; 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi: 180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi süresi (data delay): 250 sn. Kapiller sıcaklığı 60°C].

Veri Analizi

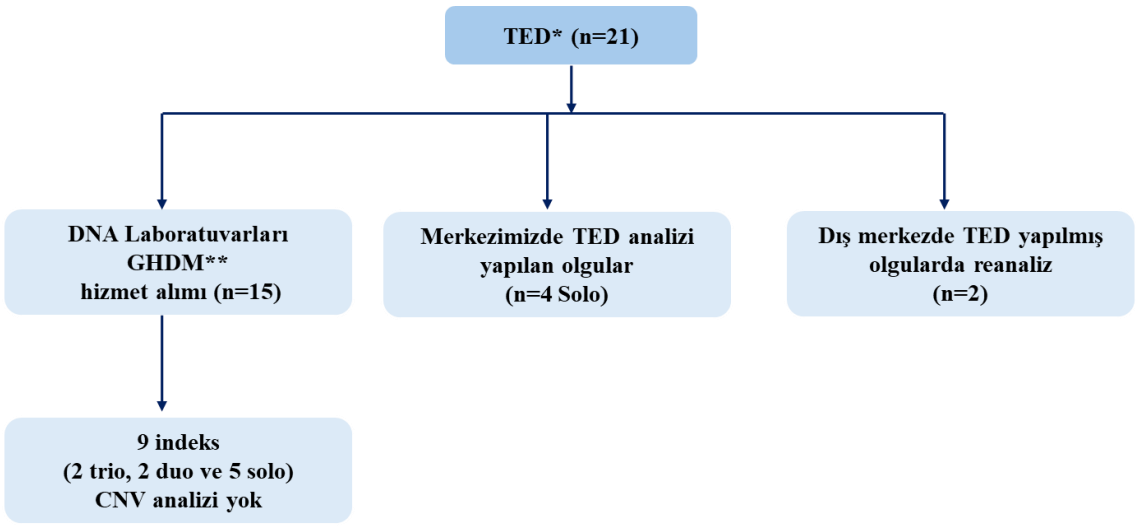
Kapiller elektroforez cihazından fsa formatında elde edilen fragmanlar *Coffalyser.Net* (v.1400701.0000) (MRC-Holland) programına tanıtıldı ve aktarıldı. Coffalyser.net programının gerekli analiz ayarları (prob türü, örnek türü, kitin lot numarası ve analiz türü) yapılarak örnekler yüklendi. Referans örnekler seçilerek önce fragman analizi ardından karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapıldı. Analiz işleminden sonra pik değerleri ve bar grafikleri değerlendirilerek var olan kopya sayısı

değişiklikleri tanımlandı. Kuşkulu sonuç gösteren olgular tekrar MLPA işlemine alındı. Tek ekzonda delesyon ve duplikasyon saptanan örneklerde prob ligasyon bölgesindeki varyasyonların dışlanması amacıyla Sanger yöntemiyle dizileme yapılması planlandı.

Tüm Ekzom Dizileme (TED)

Tüm ekzom dizileme işlemi öncesinde DNA yoğunluğu 1,6-2 ng/µl olacak şekilde gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme sonrası, her bir olgunun DNA örnekleri özgün kit kullanılarak (Qubit dsDNA HS Assay Kit) florometrik yöntemle (Qubit Fluorometre) tekrar ölçüldü. DNA yoğunluğunun TED için hedef aralıkta (1,6-2 ng/µl) olması sağlanana kadar gerekli işlemler tekrarlandı.

Çalışmamızda onbeş indeks olgu TED analizine dahil edildi. Dokuz indeks olgudan elde edilen genomik DNA örnekleri, kalite kontrol aşamasını takiben YND işlemleri için uygun oldukları tespit edildikten sonra, TED ıslak laboratuvar çalışmaları için hizmve arkımı kapsamında DNA Laboratuvarları Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi'nde (GHDM) gerçekleştirildi (2 trio, 2 duo ve 5 solo TED analizi toplam 15 örnek). Dört indeks olgunun TED analizi (Solo) ise merkezimizde çalışıldı. İki olguda ise farklı merkezlerde yapılmış TED verileri tekrar analiz edildi.



Şekil 3.2 TED analizi yapılan olguların sınıflandırılması

*TGD analizine alınan benzer etkilenmiş iki olgudan birine dış merkezde TED analizi yapılmış ve negatif olarak bildirilmişti fakat TED verisine erişilemediği için reanaliz yapılamadı ve TED çalışma listesine bu olgu dahil edilmedi.

** Bu laboratuvardan alınan TED verileri için CNV analizi yapılamamıştır.

Hizmet alımı kapsamında DNA Laboratuvarları GHDM'de yapılan ıslak laboratuvar çalışmalarında; dizileme öncesi kütüphane hazırlanması basamağında ekzom bölgesini hedef alan *Twist Comprehensive Exome* Kiti kullanılarak hedef genom bölgeleri zenginleştirildi ve MGI DNBSEQ-G400 platformunda Konsensüs Kodlama Dizilerinde (CCD) sunulan genomun protein kodlayan bölgelerinin >%99,2'sini içeren yaklaşık 33Mb'lık bir bölge ortalama 70-80 tekrarla dizilendi. Bu inceleme, hedef bazların %90'nından fazlasının >%90 kapsam homojenliği ile incelenmesini sağlamaktadır.

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Moleküler Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen TED çalışması kapsamında uygulanan TED ıslak laboratuvar çalışmaları aşağıda detaylandırılmıştır.

TED ıslak laboratuvar çalışmaları kapsamında, dizileme öncesi kütüphane hazırlığı ve hedef zenginleştirme protokolü için *Twist Human Core Exome* kiti kullanıldı.

Olguların ve ebeveynlerin DNA örnekleri özgün kit kullanılarak (*Qubit dsDNA Broad Range Quantitation Assay Kiti*) florometrik yöntemle (*Qubit Fluorometre*) tekrar ölçüldü. Kalibrasyon için kitin içeriğinde bulunan iki farklı standart örnek kullanıldı. Standart örnek başına 199 µl *Qubit Buffer* ve 2 µl floresan boya ile çalışma solüsyonu hazırlandı. Standart örnekten 10 µl ve çalışma solusyonundan 190 µl karıştırılıp oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilerek *Qubit* Florometre'de ölçüm yapıldı. Kalibrasyon ölçümü sonrasında, her bir örnek için aynı şekilde hazırlanmış çalışma solüsyonu kullanılarak karışım (198 µl çalışma solüsyonu ve 2 µl seyreltilmiş DNA) hazırlandı. İki dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası ölçüm yapılarak DNA konsantrasyonları belirlendi. *Qubit* ölçümü için gerekli miktarlar **Tablo 3.3**'te gösterilmektedir. Reaksiyona girecek DNA'ların tümünün aynı standartta olmaları için DNA'lar konsantrasyonlarına göre final ürün 10 µl olacak şekilde NFW (*nuclease free water*) ile sulandırıldı.

Tablo 3.3 *Qubit* ölçümü için gerekli miktarlar

	DNA (µl)	**Çalışma Solüsyonu (µl)**
Standart	10	190
Örnek	2	198

Kütüphane Hazırlığı

Birinci basamak: DNA fragmantasyonu, Uç onarımı, dA Kuyruklanması

Buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde enzimatik fragmantasyon karışımı **Tablo 3.4**'e göre hazırlanıp hafif pipetaj ile iyice karıştırıldı.

Tablo 3.4 Enzimatik fragmantasyon karışımı

Karışım	**1 örnek**	**8 örnek**	**16 örnek**	**32 örnek**
Nuclease free water (NFW)	25 µl	212,5 µl	425 µl	825 µl
10x fragmantasyon Buffer	5 µl	42,5 µl	85 µl	165 µl
5x Fragmantasyon enzimi	10 µl	85 µl	170 µl	330 µl
Toplam	**40 µl**	**340 µl**	**680 µl**	**1320 µl**

İstenen sayıda yakalama reaksiyonu eldesi için her örneğin 50 ng saflaştırılmış gDNA içermesi hedeflendi. Bu gDNA örnekleri NFW ile 10 µL'ye tamamlanarak seyreltildi ve 0.2 mL'lik PZR tüplerine alındı. Fragmantasyon karışımı hazırlandıktan sonra buz üzerinde her 10 µL'lik gDNA örneği üzerine 40 µl karışım eklendi. Pipet ile karıştırıldı. Örnekler, buz üzerinde bekletildi ve 4°C'ye geldiğinde PZR cihazına konuldu.

Tablo 3.5 PZR programı

	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Kapak	70	
Aşama 1	4	1
Aşama 2	32	22
Aşama 3	65	30
Aşama 4	4	Bekleme

İkinci Basamak: Evrensel adaptörlerin bağlanması ve pürifikasyon

Ligasyon karışımı **Tablo 3.6'da** gösterilen miktarlardaki gibi buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı.

Tablo 3.6 Ligasyon karışımı

Ligasyon karışımı	1 Örnek	8 Örnek	16 Örnek	32 Örnek
NFW	15 µl	127,5 µl	255 µl	495 µl
DNA Ligasyon Buffer	20 µl	170 µl	340 µl	660 µl
DNA Ligasyon Miks	10 µl	85 µl	170 µl	330 µl
Toplam	45 µl	382,5 µl	765 µl	1485 µl

PZR protokolü bittiğinde örnekler bekletilmeden buz bloğuna alındı ve üzerlerine 5 µl T*wist* evrensel adaptörler eklendi. Ardından hazırlanan ligasyon karışımından da 45 µl eklendikten sonra PZR programında 20°C'de 15 dk (kapak açık) inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.7 Fragmantasyon ürünü, adaptörler ve karışım miktarı

Fragmantasyon reaksiyon ürünü	50 µl
Twist Evrensel Adaptörler	5 µl
Ligasyon Miksi	45 µl
Toplam	100 µl

Pürifikasyon

İnkübasyon sonrası toplam 100 µl olan ürün üzerine 80 µl DNA pürifikasyon boncukları (*AMPure XP Beads*) eklendi. Pipet ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında beş dk bekletildi. Sonrasında örnekler manyetik stand üzerine alındı, 3 dk bekletildi. Böylece DNA pürifikasyon boncuklarının bir pellet oluşturması sağlandı, sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Boncuk peletine 200 µl %80 etanol eklendi, 30 sn bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Etanol ile işlem tekrarlandı ve sonra boncuk peleti manyetik stand üzerinde 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek kalan alkolün uzaklaşması sağlandı. Peletin tamamı kuruduktan sonra tüpler manyetik standdan çıkarıldı. Her tüpe 17 µL NFW eklenerek çözüldü, 5 dk bekletildi. Daha sonra tüpler manyetik standda 3 dk boyunca veya boncuk yapıları tamamen toplanana kadar bekletildi. Sonrasında 15 µl süpernatantlar yeni sekizli strip tüpe aktarıldı.

Primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu

PZR karışımı, 15 µl ürün üzerine 10 µl *Twist UDI* (*Unique Dual Index*) Primer ve 25 µl *KAPA HiFi HotStart ReadyMix* karışımı buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı. Pipetleme yapılarak **Tablo 3.8**'de belirtilen PZR programına ilerletildi.

Tablo 3.8 PZR karışımı

Fragmantasyon Reaksiyon Ürünü	15 µl
Twist UDI Primer	10 µl
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µl
Toplam	35 µl

Tablo 3.9 PZR programı

	Sıcaklık (°C)	**Süre (dk)**
Kapak	105	
Başlangıç Aşaması	98	45
Aşama 1	98	15
Aşama 2	60	30
Aşama 3	72	30
Son aşama	72	60
	4	Bekleme

Kalite kontrolü

Ürünlerden 2 µl alınarak tekrar *Qubit* ölçümü yapıldı. Sonuçlar istenildiği gibi 80 ng/µl'nin üzerinde ölçüldü.

Hedef zenginleştirme protokolü

Birinci Basamak: Hibridizasyon için kütüphane hazırlanması

Her hibridizasyon reaksiyonu, eşit havuzda toplanarak yapılan toplam 1500 ng indekslenmiş kütüphaneye gereksinim duyar. Bu nedenle, örneklerin her birinden 187,5 ng/µL olacak şekilde 8'li havuzlar oluşturuldu. Ürünler 0,2'lik PZR tüpünde birleştirildi ve pipet ile karıştırıldı. Havuz boş bir mikrosantrifüj tüpü içine kapağı açık şekilde koyularak vakum altında en düşük sıcaklıkta liyofilize edildi.

Tablo 3.10 Kütüphane hazırlığı

Havuza Giren Örnek Sayısı	**8 Örnek**
Kütüphane Başı DNA Miktarı (ng)	187,5
Havuzdaki Toplam DNA Miktarı (ng)	1500

İkinci Basamak: Kütüphanelerin yakalama probları ile hibridizasyonu

Hibridizasyon karışımından havuz başına 20 µl olacak şekilde ependorfa alınıp 65°C'de 10 dk inkübe edildi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi ve 0,2 mL'lik PZR tüpüne aktarıldı. Üzerine 4 µl ekzom probu ve 4 µl *Refseq* panel eklenip pipet ile karıştırıldı. 95°C'de 2 dk inkübe edildi. Liyofilize havuzun üzerine 5 µl bloke edici solüsyon ve 7 µl evrensel bloke ediciler eklenip karıştırıldı. Prob karışımı 95°C'de 2 dk bekledikten sonra alındı ve yerine havuzlar koyularak 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Aynı anda prob karışımı buzda 5 dk bekletildi, sonrasında hem prob miksi hem de havuzlar oda sıcaklığına alındı ve 5 dk bekletildi. Ardından her havuz üzerine prob karışımından 28 µl eklendi ve vortekslendi. Üzerine 30 hibridizasyon artırıcı eklendi, pipet ile karıştırıldı. Sonrasında 70°C'deki PZR cihazında 16 st inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.11 Hibridizasyon reaksiyonu için kullanılan miktarlar

	1 Havuz	**8 Havuz**	**16 Havuz**	**32 Havuz**
Hibridizasyon Miksi	20 µl	170 µl	340 µl	660 µl
Twist Sabit veya Özel Panel	4 µl	34 µl	68 µl	132 µl
Opsiyonel: İkincil Panel	4 µl	34 µl	68 µl	132 µl
NFW*	-	-	-	-
Toplam	28 µl	238 µl	476 µl	924 µl

*Not: Eğer ikincil panel için prob kullanılmayacaksa aynı miktarda NFW ile tamamlanır

Üçüncü Basamak: Hibridize hedeflere Streptavidin boncuklarının bağlanması

Boncukların hazırlanması

Streptavidin boncukları homojenleşene kadar vortekslendi. Mikrosantrifüj tüpüne (1,5 mL) havuz başında 100 µL streptavidin boncuğu eklendi. Tüplere 200 µL bağlama tamponu eklendi ve homojenleşene kadar pipetlendi. Tüpler manyetik standa alındı ve 1 dk bekletilip süpernatant atıldı. Tampon ile yıkama işlemini üç kez tekrarlandı. Dördüncü kez 200 µl bağlama tamponu eklendi ve homojen olana kadar vortekslendi. Ardından 70°C'deki 16 saatlik hibridizasyonu tamamlanan PZR ürünü içine eklenip pipet ile karıştırıldı ve sonra *midi plate* üzerine alındı.

Hedeflerin boncuklara bağlanması

Karışım oda sıcaklığında 30 dk vortekslenerek homojenize edildi. Manyetik standa alındı ve 1 dk bekletilip süpernatant atıldı. Tüpler manyetik standdan çıkarılarak 200 µL yıkama tamponu ile karıştırıldı. Tüm volüm 1,5 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Tüp manyetik standa alınıp 1 dk bekletildi. Sonrasında süpernatant atıldı. Tüpler manyetik standdan çıkarıldı ve 48°C'de önceden ısıtılmış 200 µl yıkama bufferı 2 eklenerek pipetleme yapıldı. Tüpler 48°C'de 5 dk inkübe edildi ve sonra manyetik standa alınıp 1 dk bekletilerek süpernatant atıldı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işlemlerinin sonunda tüpler manyetik standdan çıkartılarak 45 µl NFW eklendi ve boncuklar çözüldü.

Dördüncü Basamak: Yakalama Sonrası PZR amplifikasyonu, pürifikasyon ve kalite kontrolü

PZR Amplifikasyonu

Streptavidin boncuklarını içeren örneklerden 22.5 µL yeni bir 0.2 mL'lik PZR tüpüne aktarıldı (örneklerin kalan yarısı -20°C'de saklandı). Üzerine 2,5 µL amplifikasyon primerleri ve 25 µL *KAPA HiFi HotStart ReadyMix* eklendi. Pipet ile karıştırıldı ve PZR programına konuldu.

Pürifikasyon

DNA pürifikasyon boncukları homojenleşene kadar vortekslendi. PZR sonrası toplam 50 µl olan ürüne 50 µl DNA pürifikasyon boncukları (*AMPure XP Beads*) eklendi ve karıştırıldı. Örnekler oda sıcaklığında 5 dk ve ardından manyetik standa 3 dk bekletildi. Sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Boncuk peletine 200 µl %80 etanol ile eklendi, 30 sn bekletilip süpernatant uzaklaştırıldı. Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı. Manyetik stand üzerinde 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve kalan alkolün uzaklaşması sağlandı. Beklenen sürenin sonunda pelet 32 µl NFW ile çözüldü ve 5 dk bekletildi. Daha sonra manyetik standa alındı ve boncuk yapıları tamamen topaklanana kadar bekletildi. Sonrasında 28 µl süpernatantlar yeni 0,5 mL'lik *LoBind* tüpe aktarıldı.

Kalite kontrolü

Ürünlere *Qubit* ölçümü yapıldı. Sonuçlar istenildiği gibi 15 ng/µl'den yüksek ölçüldü. Örnekler *NovaSeq 6000* cihazında dizilendi. Elde edilen veriler biyoinformatik iş akışı ile analiz edilip varyant listesi elde edildi.

TED verilerinin biyoinformatik analizi

Merkezimizde çalışılan TED verilerinin biyoinformatik analizleri için *SOPHIA DDM v4.4.6.0* programı kullanıldı. Biyoinformatik analizlere başlamadan önce ÇHHE ile ilişkisi bilinen veya ilişkili olabilecek genlerden bir gen listesi oluşturuldu. İlk aşamada bu gen listesinde yer alan genler açısından veriler analiz edildi. İkinci aşamada klinik ilişkisi bilinen tüm genlerdeki patojenik/muhtemel patojenik/klinik önemi belirsiz değişimler incelendi. Üçüncü aşamada ise aday gen araştırılması amacıyla tüm genlerdeki *de novo* patojenik/muhtemel patojenik/klinik önemi belirsiz değişimler ile olası patojenik birleşik heterozigot varyantlar incelendi.

Biyoinformatik analizlerde varyantların patojenitesi ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) kriterlerine göre sınıflandırıldı (109). Bu kriterlere göre zararsız veya muhtemel zararsız olan varyantlar dışlandı. Yaygın bulunan tek nükleotid polimorfizmlerinin (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) dışlanması için filtrelemelerde minör allel frekansı (MAF) <0.05 olarak alındı. Bu varyant sıklıklarının değerlendirilmesinde GnomAD, G1000 ve ESP5400 gibi veri tabanları kullanıldı. Biyoinformatik analizlerde kullanılan programın '*in-house'* varyant sıklıkları

kullanılarak sık saptanan varyantlar dışlandı. Okuma derinliği 10x ve üzeri olan varyantlar incelendi.

Varyantlar kalıtım paterni ve varyant fraksiyonunun uygunluğu göz önüne alınarak değerlendirildi. Genlerin fenotipleri ve klinik bulguları OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) veri tabanında incelendi. Varyantların patojenitesinin değerlendirilmesinde *in silico* tahmin programları (MutationTaster, SIFT, POLYPHEN, SpliceAl, Human Splice Finder vb.) kullanıldı. Varyantların değerlendirilmesinde mutasyon tipi, evrimsel korunmuşluk, mutasyonun protein üzerindeki etkileri incelendi. Mutasyon tiplerine göre varyantlar anlamsız, çerçeve kayması, kırpılma hatası ve yanlış anlamlı olmak üzere öncelik sırasına göre değerlendirildi. Varyantların daha önce başka olgularda bildirilmiş olup olmadığı HGMD (*Human Gene Mutation Database*), ClinVar, Franklin ve Varsome veri tabanları kullanılarak araştırıldı. Varyantların okuma verileri IGV (*Integrative Genomics Viewer*) üzerinden görüntülendi.

Klinik ile ilişkili varyant saptanmayan olgularda aday genler açısından değerlendirmede gen yapı ve fonksiyonları, ekspresyon paternleri, ilişkili olduğu yolaklar/genler vb. bulguların değerlendirilmesinde GeneCards, Human Protein Atlas, UniProt vb. veri tabanlarından yararlanıldı. CNV analizinde saptanan varyantların değerlendilmesinde, yukarıda bahsedilen veri tabanlarına ek olarak DGV (*Database of Genomic Variants*), DECIPHER gibi veri tabanları kullanıldı. Klinik ile ilişkili bulunan varyantlar için Sanger analizi ile doğrulama ve aile segregasyonları planlandı.

Varyantların adlandırılması

Çalışmamız kapsamında CNV ve TED analizlerinde saptanan varyantların genomik adlandırılması özellikle belirtilmedikçe hg19/GRCh37'ye göre yapıldı.

DNA Laboratuvarları GHDM'den hizmve arkımı ile gerçekleşen TED analizlerinde CNV verisi bulunmadığı için bu olgularda CNV analizi yapılamadı.

TED Analizi ile saptanan varyantların Sanger izileme ile doğrulanması

TED analizinde saptanan her aday varyant için gene özgü *forward* ve *reverse* primerler tasarlandı. Sanger dizi analizi ile konfirmasyon ve aile segregasyon analizi yapılarak ilişkili bulunan varyantlar raporlandı.

Tüm Genom Dizileme (TGD)

Çalışma kapsamında benzer etkilenmiş iki kardeş olguya (P114 ve P114k) TGD analizi yapılmıştır. Bu olguların TGD hizmeti SZAOMICS Biyoteknoloji Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Kütüphane hazırlama için Illumina® DNA PCR Free Prep Kiti kullanılmıştır. Yeterli QC skoruna sahip olan örnekler TGD'ye alınmıştır.

TGD işlemi Illumina® NovaSeq 6000 (Illumina Inc., San Diego, CA, ABD) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonrasında elde edilen ham data (.blc) DRAGEN software v3.9.5. ile FASTQ (Fast Adaptive Shrinkage Thresholding Algorithm and Quality) formatına çevrilmiştir. FASTQ verisi GRCh38/hg38 insan referans genomuna göre hizalanarak BAM (Binary Alignment Map) dosyası elde edilmiştir. Hizalanmış ham veriler varyantların çağırıldığı VCF formatına dönüştürüldü.

TGD verilerinin biyoinformatik analizi

VCF formatındaki veri *Franklin by Genoox* kullanılarak analiz edilmiştir. Varyantların anotasyonlarının ardından filtreleme ölçütleri belirlenerek anlamlı varyantlar filtrelenmiştir. Fenotip ve aile ağacından elde edilen kalıtım bilgilerine göre varyant önceliklendirilmesi yapılmıştır. Varyantların patojenitelerini tahmin etmek amacıyla *in silico* araçlar (CADD Exome, FATHMM DANN Coding, MetaSVM, MutationTaster, PROVEAN, SIFT, MutationAssessor, MetaLR, PolyPhen-2, REVEL, SpliceAI) kullanılmıştır.

Tüm varyant analizi basamaklarında açık kaynaklı veya ücretli, popülasyona özgü, hastalıklara özgü ve dizilere özgü veri tabanları kullanılmıştır. En sık kullanılan veri tabanları gnomAD, 1000 Genomes Project, dbSNP, dbVar, ClinVar, OMIM, HGMD, Human Genome Variation Society, DECIPHER, Leiden Open Variation Society, NCBI Genome, RefSeq, GME, Ensembl ve Turkish Variome olarak sıralanmaktadır.

Okuma derinliği 30x için en az %95 olan varyantlar değerlendirmeye alınmıştır. Tespit edilen varyantlar ACMG varyant sınıflandırma klavuzuna göre sınıflandırılmıştır (109).

4. BULGULAR

4.1. Klinik özellikler

Çalışmaya dahil edilen 118 aileden 125 olgunun (45 kız) Endokrinoloji Kliniği'ne başvuru ortanca yaşı 5,9 yıl (IQR25-75: 1,1-11,3) olup 1 gün ile 28.3 yıl arasında idi. Başvuruda yaş döneminin %5,6'sı neonatal dönem, %34.4'ü iki yaş öncesi, ve %29,6'sı ise 10 yaş üzeri idi.

En sık başvuru nedenleri sırasıyla boy kısalığı (%63,2), hipoglisemi (%9,6) ve hipotiroidi (%6,4) idi. Diğer nedenler, mikropenis (%4,8), inmemiş testis (%4,8), yenidoğan sarılığı (%2,4), ergenlik gecikmesi (%2,4) ve birer olgu ise obezite, kardeş öyküsü, SOD saptanması idi.

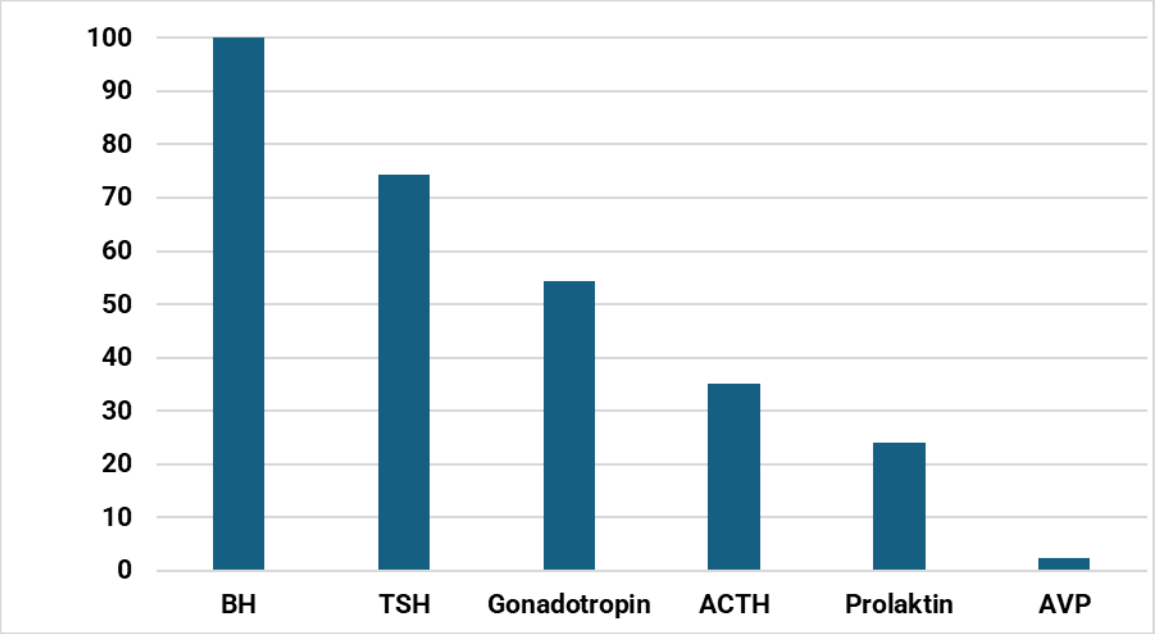
Olguların klinik özellikleri **Tablo 4.1**'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Olguların klinik özellikleri

Özellik		
Yaş (yıl) ort±SD		6,6±5,8
Kız n (%)		45 (36,0)
Natal ve neonatal dönem özellikleri	Gebelik yaşı (hafta) ort±SD	38,1±2,1
	Prematürite n (%) Postmatürite n (%)	9 (7,2) 1 (0,8)
	Doğum ağırlığı SDS ort±SD (ortanca)	-0,4±1,4 (-0,4)
	SGA n (%) LGA n (%)	11 (10,8) 7 (6,9)
	Sezaryen n (%)	61 (58,7)
	Yenidoğan hipoglisemisi n (%)	29 (23,2)
	Yenidoğan sarılığı n (%)	67 (62,6)
Akraba evliliği n (%)		51 (40,8)
Fizik bulgular		
Orta hat sorunları	Yarık dudak n (%)	1 (0,8)
	Tek ön kesici diş n (%)	1 (0,8)
İskelet özellikleri	Polidaktili	4 (3,2)
	Sindaktili	5 (4,0)
	Brakidaktili	3 (2,4)
	Servikal omurgada hareket kısıtlılığı	2 (1,6)
	Skolyoz ve diğer omurga sorunları	4 (3,2)
	Pektus deformitesi	5 (4,0)
	Gelişimsel kalça displazisi	4 (3,2)
	Pes ekinovarus	4 (3,2)
Genital anomali (erkeklerde)	Mikropenis n (%) İnmemiş testis n (%) Hipospadias n (%)	25 (31,3) 27 (33,8) 3 (3,8)
Konjenital böbrek ve üriner sistem anomalisi		4 (3,2)
Kardiyovasküler sistem anomalisi		7 (7,2)
İşitme kaybı		6 (4,8)
Oftalmolojik sorunlar		19 (15,2)
Zihinsel yetersizlik		33 (26,4)
Epilepsi		11 (8,8)
Nöropati		5 (4,0)

Endokrinolojik özellikler

Olguların tamamında büyüme hormonu eksikliği vardı. Bunu sırasıyla TSH (%74,4), gonadotropin (%54,4), ACTH (%35,2), prolaktin (%24,0) ve AVP (%2,4) eksikliği izliyordu.



Şekil 4.1 Olgularda görülen hipofiz hormon eksikliklerinin sıklığı

BH: büyüme hormonu, TSH: tiroid stimulan hormon, ACTH: Adrenokortikotrop hormon, AVP: arjinin vazopressin

Olguların %10.4'ünde (n= 12) tanı izole BH eksikliği idi. Diğer izole hipofiz hormon eksiklikleri çalışmaya dahil edilmedi. ÇHHE olgularında en sık görülen eksiklikler sırasıyla prolaktin hariç tüm ön hipofiz hormonlarının eksikliği (%20,8), BH+TSH eksikliği (%14,4) ve BH+TSH+gonatropin eksikliği (%12,8) idi. Olguların %4,4'ünde tüm ön hipofiz hormonları eksik, %2,4'ünde de AVP eksikliği mevcuttu. Yedi olguda (%5,6) prolaktin yüksekliği ön hipofiz hormon eksikliklerine eşlik ediyordu.

Beyin ve hipofiz görüntüleme özellikleri

Olguların tamamında MSS görüntülemesi yapılmış olup, bir olgunun görüntüleme sonucuna ulaşılamadı. Kırk beş olgunun (%36,0) hipofiz MR'ı normal idi. Hipofiz MR'ı normal olan iki olguda Arnold Chiari malformasyonu dışında beyin MR normal saptanmıştı.

Hipofiz görüntülemede en sık görülen özellikler sırasıyla adenohipofiz hipoplazisi (%20,0) ve adenohipofiz hipoplazisi – ektopik nörohipofiz (%20,0) idi. İki olguda ektopik nörohipofiz izole olarak saptanmıştı.

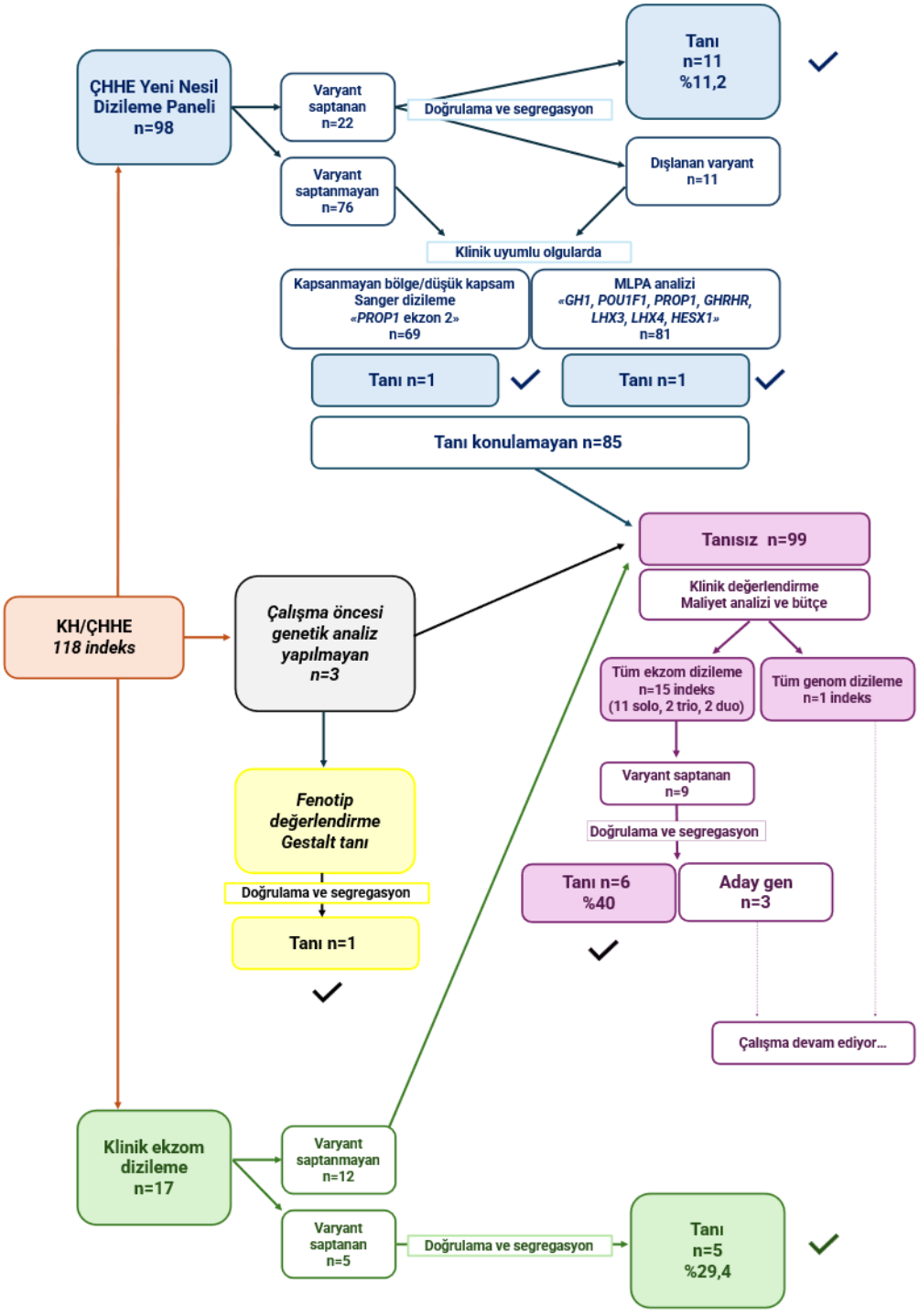
Altı olguda (%4,8) Rathke kisti saptanırken beş olguda da adenom/hiperplazi saptanmıştı (%4,0). Pitüiter sap kesisi sendromu 13 olguda (%10,4) mevcuttu. İki olguda SOD, iki olguda optik sinir hipoplazisi, bir olguda da HPE saptandı.

Beyin MR'ında dört olguda korpus kallosum gelişim kusuru saptanmıştı.

4.2 Moleküler genetik sonuçların değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında yer alan 118 indeks olgunun moleküler genetik tanı akış şeması **Şekil 4.2**'de verilmiştir.

Olguların 98'i ÇHHE YND paneli ile analiz edilmiş olup bu analizler sonucunda 11 olguda ÇHHE ilişkili bilinen genlerde çeşitli ilişkili varyantlar saptanarak kliniğin genetik kökeni aydınlatılmıştı. Bu genler *GHSR* (n=1), *IGSF1* (n=2), *LHX3* (n=1 indeks olgu, iki etkilenmiş kardeş), *POU1F1* (n=2), *PROKR2* (n=2), *GH1* (n=1) idi. Bu genlerde gösterilen varyantlardan beşi daha önce hastalıkla ilişkilendirilmiş idi (**Tablo 4.2).**



Şekil 4.2 Çalışmada değerlendirilen 118 indeks olgunun elde edilen genetik sonuçlarının kullanılan yöntemlere göre dağılımı

KH: Konjenital hipopituitarizm; ÇHHE: Çoklu hipofiz hormon eksikliği; MLPA: *Multiplex-Ligation Probe Amplification*;

Tablo 4.2 ÇHHE YND paneli ile genetik etiyolojisi saptanabilen indekslerin varyant özellikleri

No	Gen Transkript	Zigosite	Nukleotid	Protein	*ACMG*	dbSNP/ ClinVar/*Novel*	Segregasyon		
							Anne	Baba	Kardeş
35	***LHX3*** NM_014564.4	Hom	c.266+2T>C	p.(?)	*LP*	-/-/*Novel*	Het	Het	Hom*
39	***GH1*** NM_000515.4	Het	c.291+1G>A	p.(?)	*P*	rs71640277/ VCV000015970.6/ -	Het	*WT*	-
48	***PROKR2*** NM_144773.4	Het	c.518T>G	p.(Leu173Arg)	*VUS*	rs74315416/ VCV000003449.29 /-	Het	*WT*	-
51	***IGSF1*** NM_001170961.1	Hemi	c.2395C>T	p.(Arg799*)	*P*	-/-/-	Het	-	-
52	***POU1F1*** NM_000306.4	Hom	c.793C>T	p.(Arg265Trp)	*P*	rs780359925/ VCV002734543.1/ -	Het	Het	-
61	***GH1*** NM_000515.4	Hom	c.162C>G	p.(Tyr54*)	*LP*	-/-/*Novel*	Het	Het	-
64	***IGSF1*** NM_001170961.1	Hemi	c.3375G>A	p. (Trp112*)	*LP*	-/-/*Novel*	Het	*WT*	-
75	***POU1F1*** NM_000306.4	Hom	c.814delG	p.(Val272*)	*P*	-/-/*Novel*	Het	Het	-
79	***GHSR*** NM_198407.2	Het	c.931C>T	p.(Leu311Phe)	*VUS*	rs770465500/-/-	*WT*	Exitus	-
90	***POU1F1*** NM_000306.4	Het	c.669T>G	p.(Ile223Met)	*VUS*	-/-/*Novel*	*WT*	Het	-
96	***PROKR2*** NM_144773.4	Het	c.518T>G	p.(Leu173Arg)	*VUS*	rs74315416/ VCV000003449.29 /-	*WT*	Het	-

P35'te saptanan *LHX3* genindeki homozigot c.266+2T>C varyantı daha önce tanımlanmamış olup evrimsel olarak korunmuşluğu yüksek olan *splice* donör dizi bölgesinde yer aldığı için kırpılmayı bozması ve patojenik etki göstermesi beklenmektedir. P35'in benzer etkilenmiş kardeşinde de bu varyant homozigot olarak saptanmıştır.

GH1 gen varyantlarının özelliklerinden izole BH eksikliği kısmında bahsedilecektir.

P48 ve P96'da saptanan heterozigot *PROKR2* gen varyantı daha önce literatürde tanımlı olup HH ve ÇHHE ile ilişkilendirilmiştir (110). Bu varyantın patojenitesi ClinVar veri tabanında çeşitli yıllarda araştırmacılar tarafından 'muhtemelen benign' statüsünden 'patojenik' statüsüne kadar çeşitli derecelerde etiketlenmiştir.

P51'de hemizigot olarak saptanan *IGSF1* c.2395C>T, veri tabanlarında bildirilmemiş ancak literatürde hastalık ilişkisi bildirilmiş bir varyanttır (111). P64'te *IGSF1* geninde gösterilen hemizigot c.3375G>A/p.(Trp112*) varyantı ise daha önce literatürde tanımlanmamış olup anlamsız tipte bir değişim olması nedeniyle protein trunkasyonuna yol açması ve patojenik etki göstermesi beklenmektedir. Kalıtım modeli ile de uyumlu olarak varyant olgunun annesinde saptanmıştır.

P52'de homozigot olarak saptanan *POU1F1* c.793 C>T varyantı literatürde daha önce *POU1F1* ilişkili ÇHHE için tanımlı bir varyanttır (112).

P79'da *GHSR* geninde geninde heterozigot saptanan c.931C>T varyantı daha önce hastalıkla ilişkilendirilmemiştir ve toplum veri tabanlarında nadirdir (gnomAD'de 2/251490 birey). Bu varyantın *in silico* analizlerde patojenik (MT, Polyphen, SIFT, Provean) olduğu öngörülmektedir. Dominant ve resesif kalıtım özelliğinde olan *GHSR* genindeki bu heterozigot varyant olgunun sağlıklı olduğu bilinen annesinde de saptanmıştır ve segregasyon analizinin genişletilmesi planlanmıştır.

P90'da heterozigot saptanan *POU1F1* c.669T>G varyantı daha önce tanımlanmamıştır ve ACMG sınıflamasına göre önemi belirsiz varyant (VUS) özelliğinde olup *in silico* analizleri Mutation Taster, SIFT ve DANN veri tabanlarında patojenik etkili olarak belirtilmiştir. Bu varyant gnomAD gibi toplum veri tabanlarında da bildirilmemiştir. Segregasyon analizinde babasında ve babaannesinde saptanmıştır. *POU1F1* genin dominant ve resesif kalıtım özelliği dikkate alınarak karşı allelde

delesyon açısından yapılan MLPA analizi normal sonuçlanmıştır. Ailede varyantı taşıyan bireylerin ÇHHE açısından biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi ve dominant kalıtımda değişken ekspresivite dikkate alınarak varyantın yorumlanması planlanmıştır.

Tablo 4.3 ÇHHE YND panelinde saptanıp Sanger dizi analizi ile doğrulama ve aile segregasyon analizleri yapılarak dışlanan gen ve varyantların özellikleri

No	Gen Transkript	Zigosite	Nukleotid	Protein	Segregasyon		
					Anne	Baba	Kardeş
2	***GHRH*** NM_021081.5	Het	c.221G>A	p. (Arg74Gln)	Het	*WT*	-
5	***HHIP*** NM_022475.2	Het	c.1620delT	p. (Ser540ArgfsT*20)	*WT*	Het	-
14	***WDR11*** NM_018117.11	Het	c.2539C>G	p.(Leu847Val)	Het	*WT*	Het
	HHIP NM_022475.2	Het	c.1762C>T	p.(Pro588Ser)	Het	*WT*	Het
16	***PROP1*** NM_006261.4	Het	c.557C>T	p. (Ala186Val)	-	-	-
28	***IGSF1*** NM_001170961.1	Hemi	c.1389_1390insA	P.(Ser464Ilefs*10)	-	-	-
55	***LHX4*** NM_033343.3	Het	c.730A>G	p. (Ser244Gly)	*WT*	*WT*	*WT*
69	***WDR11*** NM_018117.11	Het	c.3450T>G	p. (Phe1150Leu)	*WT*	Het	-
73	***IGSF1*** NM_001555.4	Het	c.1280C>G	p. (Pro427Arg)	-	-	-
88	***HESX1*** NM_003865.2	Het	c.200G>C	p. (Ser67Thr)	Het	*WT*	Het
92	***GH1*** NM_000515.4	Het	c.478C>T	p. (Arg160Trp)	Het	*WT*	-
101	***WDR11*** NM_018117.11	Het	c.2921C>T	p. (Ala974Val)	-	-	-

WT: Wild type

P5'te saptanan *HHIP* geni varyantı daha önce hastalıkla ilişkilendirilmemiş olup toplum veri tabanlarında nadir olarak bildirilmiştir fakat *in silico* analizleri çoğunlukla '*benign*' özelliktedir. Bu varyant için sağlıklı babasının da heterozigot saptanması ve fenotipin net uymaması nedeniyle bu varyant dışlanmıştır.

P14'te saptanan varyantlar segregasyon analizleri ile dışlanmış olup bu olgu daha sonra TED çalışmasına alınmıştır.

P16'daki *PROP1* geni varyantı heterozigot olması nedeniyle resesif kalıtım modeline uymamaktadır. Karşı allelde MLPA ile delesyon saptanmadığı için bu varyant 'tesadüfi' olarak yorumlanmıştır.

P28'deki *IGSF1* varyantı Sanger dizi analizi ile doğrulanamaması nedeniyle dışlanmıştır.

P55'te YND ile saptanan *LHX4* varyantı Sanger dizi analizi ile doğrulanamamıştır.

P73'te saptanan X'e bağlı resesif kalıtılan *IGSF1* genindeki bu varyant kız olguda saptanmış ve klinik özellikleri de uyumlu olmadığı için analizler sonucu dışlanmıştır.

P88'deki *HESX1* geni varyantı daha önce tanımlanmış ve *in silico* analizleri çelişkili sonuçlar vermiştir (MT: polimorfizm; SIFT: Tolere edilebilir). Bu varyantın sağlıklı kardeşte de saptanması nedeniyle klinik bulguları net açıklayamadığı öngörülerek dışlanmış ve ileri analize alınması planlanmıştır.

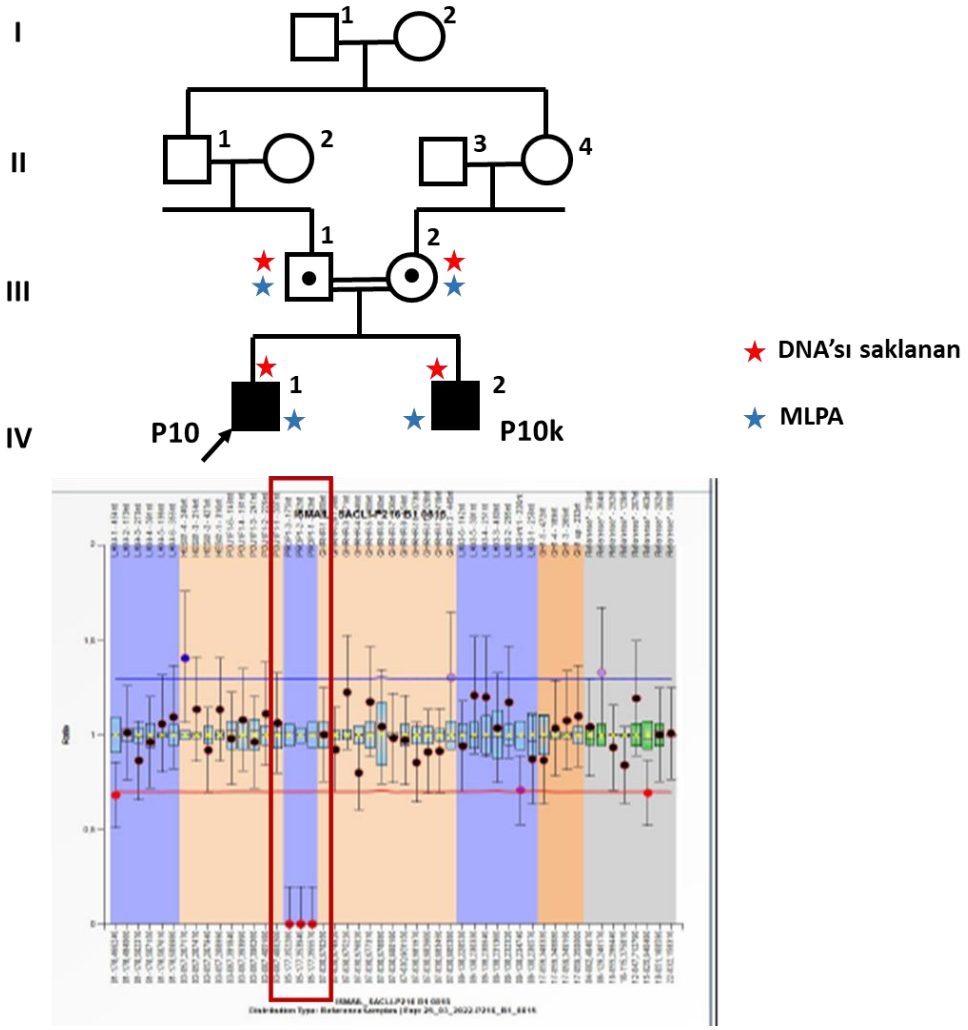
ÇHHE YND panelinde hastalık ilişkili patojenik varyant saptanmayan olgular kapsanmayan/düşük kapsamda olan bölgeler Sanger dizi analizi ile incelenmiştir. *PROP1* geni ekzon 2, *WDR11* geni ekzon 17 ve ekzon 26 bölgeleri için tasarlanan primerlerle Sanger dizi analizi yapılmıştır.

Çalışmada *PROP1* ekzon 2 bölgesi için kapsanmayan bölge analizi yapılan 69 olgudan birinde *PROP1* geninde homozigot (NM_006261.5): c.301_302del p.(Leu102Cysfs*8) rs193922688 varyantı saptanmıştır (P81). Bu varyant daha önce literatürde *PROP1* ilişkili ÇHHE için tanımlı patojenik bir değişimdir (113).

WDR11 geni ekzon 17 ve ekzon 26 bölgeleri ise 70 indeks olguda Sanger dizi analizi yöntemi ile dizilenmiş olup herhangi bir patojenik varyant saptanmamıştır.

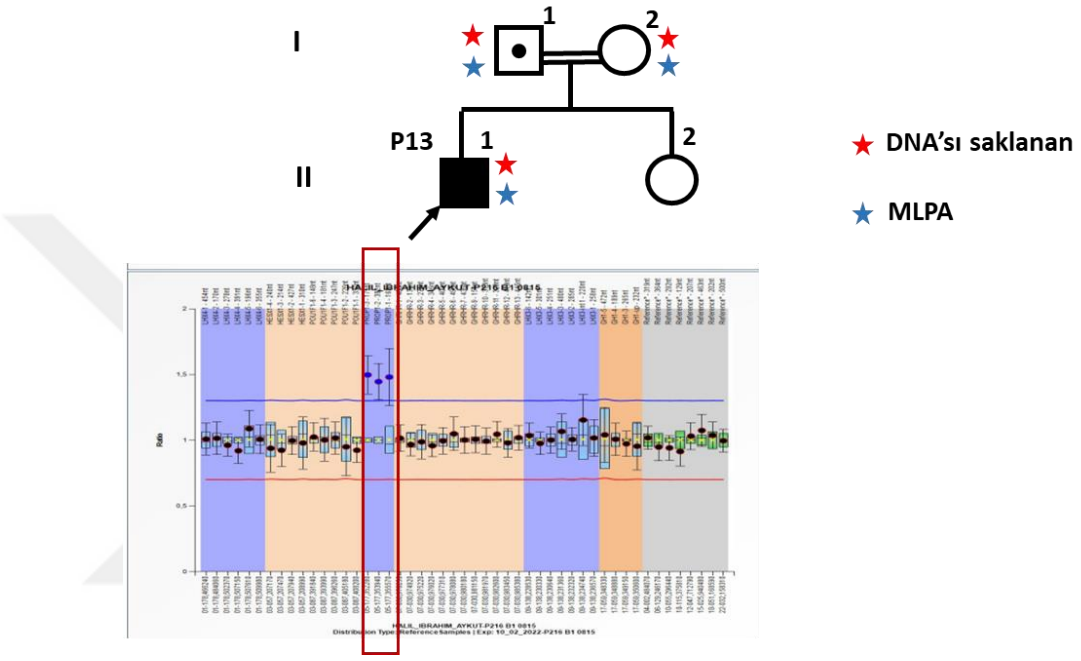
Çalışma protokolüne göre ÇHHE panelinde ve kapsanmayan bölge analizinde ilişkili varyant saptanmayan 81 indeks olguya MLPA analizi uygulanmıştır.

MLPA ile bir aileden benzer etkilenmiş iki olguda *PROP1* geninde homozigot tüm gen delesyonu saptanmıştır (P10 ve P10k). MLPA ile ebeveynlerde yapılan analizlerde delesyon için taşıyıcı oldukları ve etkilenmiş kardeşin homozigot delesyonu olduğu gösterilmiştir (IV:1ve IV:2) **(Şekil 4.3).**



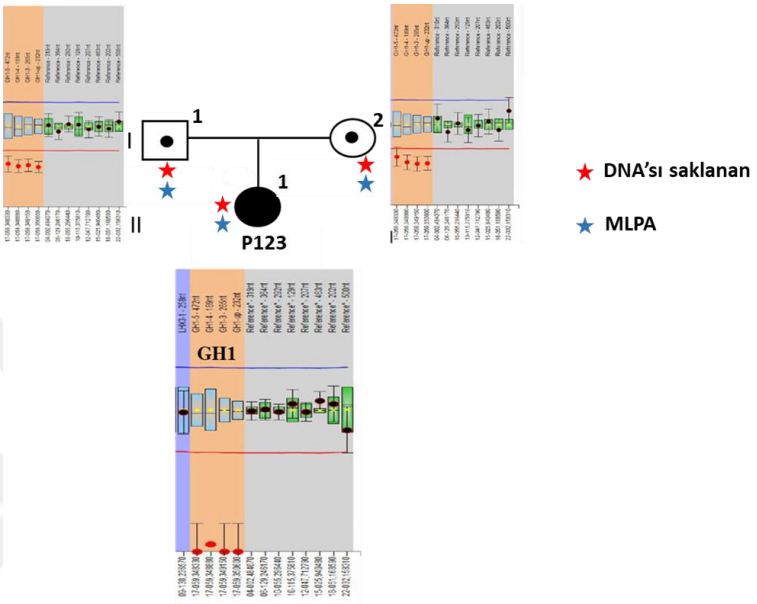
Şekil 4.3 Benzer etkilenmiş iki kardeşte (P10 ve P10k) MLPA yöntemi ile *PROP1* geninde homozigot tüm gen delesyonunun gösterimi.

Bir olguda (P13**)** MLPA analizinde *PROP1* geninde ekzon 1, 2 ve 3'ün heterozigot duplikasyonu saptanmış olup bu değişimi sağlıklı babasının da taşıdığı gösterilmiştir **(Şekil 4.4)**.



Şekil 4.4 P13'te MLPA yöntemi ile saptanan *PROP1* geni ekzon 1, 2, 3 heterozigot duplikasyonunun gösterimi.

MLPA yöntemi ek olarak, klinik ekzom dizileme (KED) verisindeki CNV analizinde delesyon şüphesi olan olguların doğrulamasında da kullanılmış ve iki indeks olguda (P113 ve P123) *GH1* geninde homozigot tüm gen delesyonu teyit edilmiştir **(Şekil 4.5).**



Şekil 4.5 P123'te (II:1) MLPA yöntemi ile saptanan homozigot *GH1* tüm gen delesyonunun gösterimi.

Çalışma kapsamında 17 olguda panelde ilişkili varyant saptanmayan veya direk KED analizinde dış merkezlerde uygulanmış KED analizinin değerlendirilmesinde beş olguda ÇHHE ilişkili genlerde kalıtım modeli uyumlu varyantlar saptanmıştır.

KED analizinde iki aileden üç olguda (P106, P106k ve P107) *GHRHR* geninde homozigot varyant saptanmıştır. P107'de saptanan *GHRHR (NM_000823*) genindeki homozigot c.880G>A p.(Gly294Arg) rs748546851 varyantı *VUS* karakterinde olup annesinde heterozigot olarak saptanmış, babada ise segregasyon analizi imkanı olamamıştır. Bu olguların özelliklerinden izole BH eksikliği bölümünde bahsedilecektir.

Bir olguda KED analizinde *GLI2* geninde (NM_001374353.1): c.2575del/p. p.(Ser859Profs*36) heterozigot olarak saptanmıştır. Bu varyant daha önce literatürde tanımlanmamış olup ACMG sınıflamasına göre patojenik ve toplum veri tabanlarında yer almayan bir varyanttır (P116). Bu varyant olgunun babasında heterozigot olarak saptanmıştır.

İzole BH eksikliği için değerlendirilen olgular

Çalışmamızda saptanan izole BH eksikliği olan olguların klinik özellikleri **Tablo 4.4**'te ve genetik özellikleri **Tablo 4.5**'te verilmiştir.

YND gen panelinde *GH1* geninin beşinci ekzonunda heterozigot c.291+1G>A/p.(?) daha önce bildirilmiş bir *splice-donor* bölgesi değişikliğine yol açan varyant saptanmıştır (114). Segregasyon analizi, aynı zamanda etkilenmiş annenin de bu varyant için heterozigot olduğunu göstermiştir.

P61'de *GH1* geninin ikinci ekzonunda c.162C>G p.(Tyr54*) daha önce tanımlanmamış homozigot varyant tespit edilmiştir. Bu varyant Sanger dizileme ile doğrulanmış ve segregasyon analizi ile ebeveynlerin heterozigot olduğu tespit edilmiştir. *In silico* analiz araçları patojenik olarak raporlanmış ve gnomAD'de bildirilmemiştir. Bu varyant HGMD'de mevcut değildir ve ACMG kriterlerine göre "muhtemelen patojenik" dir. Bu anlamsız varyantın gen transkriptinde erken 'dur' kodonuna ve fonksiyon kaybına yol açması beklenmektedir.

P113 ve P123, ÇHHE YND paneline dahil edilmemişti fakat dış merkezlerde KED yöntemi ile değerlendirildiğinde CNV analizinde *GH1* geninde homozigot delesyon şüphesi raporlanması üzerine MLPA analizine dahil edilmiştir. Bu iki olguda *GH1* geninde homozigot tüm gen delesyonu [rsa(GRCh38) 17q23.3(63,917,242-63,919,542) × 0] MLPA analizi ile doğrulanmıştır. Segregasyon analizinde ebeveynlerde de heterozigot tüm gen delesyonu saptanmıştır. *GH1* genin biallelik tüm gen delesyonları daha önce tanımlanmıştır (112). P123'de saptanan homozigot *GH1* tüm gen delesyonunun MLPA analizi sonuçları **Şekil 4.5**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. İzole BH eksikliklerinin klinik özellikleri

No	Cins.	Akrabalık	GH	DA SDS	Doğum şekli	Başvuru yaşı (yıl)	Başvuru yakınması	Ailede etkilenmiş birey	Dismorfik bulgular	Kraniyal ve Hipofiz MRG	Klinik uyumlu varyant
22	K	-	39	1,2	C/S	10,0	Boy kısalığı	-	Kalkan göğüs, Cubitus valgus	Normal	-
38	E	-	39	-0,4	NSD	17,4	Boy kısalığı	-	-	Normal	-
39	E	-	38	0,9	C/S	0,75	Boy kısalığı	Anne	Hipopituitarizm yüz görünümü	AHH	+
61	E	1º	39	-0,2	NSD	0,7	Boy kısalığı Hipoglisemi	-	Hipopituitarizm yüz görünümü	Normal	+
91	K	-	40	-1,7	NSD	3,5	Boy kısalığı	Babaanne?	Mikroftalmi, mikrosefali	ENH, AHH	-
94	K	-	38	-0,7	NSD	3,6	Boy kısalığı Mikrosefali	Kuzende mikrosefali	Mikrosefali, hipotelorizm, epikantus, ayak bileğinde kontraktür	SOD lober tip HPE	-
99	K	-	40	0,8	C/S	10,1	Boy kısalığı	-	-		
104	E	-	39	-	NSD	7,6	Boy kısalığı	Kardeşi	-	Normal	-
106	K	1º	36	-0,8	C/S	6,4	Boy kısalığı	İkizi	-	Normal	+
106k	E	1º	36	0,3	C/S	6,4	Boy kısalığı	İkizi	-	Normal	+
107	K	1º	38	1,0	NSD	2,0	Boy kısalığı	-	Brakidaktili	Rathke kisti	+
113	E	1º	39	-0,94	C/S	2,3	Boy kısalığı	-	Uzun yüz	Normal	+
123	K	2º	38	-0,2	C/S	3,4	Boy kısalığı Hipoglisemi	-	Basık burun kökü	Normal	+

Cins: Cinsiyet, K: Kız, E: Erkek, GH: Gestasyon hastası, DA SDS: Doğum ağırlığı standart deviasyon skoru, C/S: sezaryen, NSD, Normal spontan doğum, MRG:Manyetik rezonans görüntüleme, AHH: Anterior hipofiz hipoplazisi, ENH: Ektopik nörohipofiz, SOD: Septo-optik displazi

Tablo 4.5. İzole BH eksikliği olgularının genetik özellikleri

No	Gen	Transkript	Zigosite	Varyant		dbSNP/ClinVar/*Novel*	Segregasyon		Genetik tanı yöntemi
				Nükleotid	Protein		Anne	Baba	
39	***GH1***	NM_000515.4	Het	*c.291+1G>A*	p.(?)	rs71640277/ RCV001557907.3 /Tanımlı	Het	*WT*	ÇHHE YND panel
61	***GH1***	NM_000515.4	Hom	c.162C>G	p. (Tyr54*)	-/-/*Novel*	Het	Het	ÇHHE YND panel
106	***GHRHR***	NM_000823.4	Hom	*c.967C>T*	p. (Gln323*)	rs2128598609/SCV001571644/*Novel*	Het	Het	KED
106k	***GHRHR***	NM_000823.4	Hom	*c.967C>T*	p. (Gln323*)	rs2128598609/SCV001571644/*Novel*	Het	Het	Sanger dizi analizi
107*	***GHRHR***	NM_000823.4	Hom	*c.880G>A*	p. (Gly294Arg)	rs748546851/-/*Novel*	Het	-	KED
113	***GH1***	NM_000515.4	Hom	Tüm gen delesyonu		**-/-/**Tanımlı	Het	Het	KED (CNV analizi) Doğrulama ve segregasyon MLPA
123	***GH1***	NM_000515.4	Hom	Tüm gen delesyonu		-/-/Tanımlı	Het	Het	KED (CNV analizi) Doğrulama ve segregasyon MLPA

*P107'de segregasyon analizinde babasının DNA örneğine ulaşılamamıştır. Sağlıklı kardeşte segregasyon analizi yapılması planlanmıştır.

TED analizi ile incelenen olguların klinik ve genetik özelliklerinin değerlendirilmesi

Çalışmamızda 15 indeks olgu TED analizi ile değerlendirilmiştir. Dokuz indeksin TED ıslak laboratuvar çalışmaları hizmve arkımı kapsamında DNA laboratuvarları genetik tanı merkezi firmasında gerçekleştirilmiştir (2 Trio, 2 Duo ve 5 Solo TED analizi toplam 15 örnek). Dört indeks olgunun TED analizi (Solo) merkezimizde çalışılmıştır. İki olguda ise farklı merkezlerde yapılmış TED verileri tekrar analiz edilmiştir. Olguların klinik özellikleri **Tablo 4.6**'da gösterilmiştir. Bu analizler sonucunda altı olguda ÇHHE ilişkili varyant saptanırken üç olguda ise aday gen varlığı irdelenmiştir. Klinik ilişkili varyant gösterilen olguların genetik özellikleri **Tablo 4.7**'de verilmiştir.

Tablo 4.6 TED analizi ile incelenen olguların klinik özellikleri

No	Cins.	Akrabalık	GH	DA SDS	Doğum şekli	Başvuru yaşı (yıl)	Başvuru yakınması	Ailede etkilenmiş birey	Eşlik eden özellikler	Kraniyal ve hipofiz MRG	Endokrin fenotip
14	K	2º	38	-1,7	C/S	0,9	Boy kısalığı	Kardeş	GKD, Polinöropati	AHH	BH, TSH, PRL
18	K	-	38	-	-	1,4	Boy kısalığı	-	Yarık dudak, strabismus, ZY	AHH	BH, TSH, ACTH, PRL
31	E	-	-	-	-	0,41	İnmemiş testis	Kardeşte ÇHHE	Bilateral polidaktili	ENH AHH	BH, Gn
37	E	-	38	-0,5	C/S	0,3	Boy kısalığı, İnmemiş testis	-	Epilepsi, hafif pektus ekskavatum	AHH	BH, TSH, ACTH, Gn
40	K	1º	38	-2,4	C/S	15,8	Obezite	-	Epilepsi, otizm, cilt lezyonları, nistagmus, megakornea, ZY	KKA, PV heterotropi	BH, TSH, ACTH, Gn
57	E	-	28	2,3	C/S	5,3	Boy kısalığı	-	MY	AHH	BH, TSH, ACTH, Gn
69	K	2º	39	0,8	C/S	1,6	Boy kısalığı	-	ZY, Polinöropati	Normal	BH, TSH, PRL
95	K	-	38	0,2	C/S	5,7	Boy kısalığı	-	Kaygı bozukluğu	PSIS	BH, TSH, ACTH, Gn
108	K	-	37	0,4	C/S	5,9	Hipoglisemi	Babada epilepsi	ZY, HİE, epilepsi, nistagmus,	KKA, ENH	BH, TSH, ACTH, Gn
109	K	1º	38	1,0	NSD	12,9	Boy kısalığı	-	Epilepsi, ZY, hipoglisemi öyküsü	PSIS	BH, TSH, ACTH, Gn
110	E	2º	38	-3,5	C/S	0,33	Hipotiroidi	-	ASD, portal ven trombozu, özofagus varisi, polidaktili, ZY, işitme kaybı	Serebellum ak madde lezyonları	BH, TSH, Gn
111	K	1,5º	40	0,7	C/S	2,3	Boy kısalığı	-	-	PSIS	BH, ACTH, Gn, PRL
124	E	-	38	0,8	C/S	0,3	Mikropenis	-	-	AHH	BH, TSH, ACTH, Gn
125	E	1º	38	-0,9	C/S	0,3	Mikropenis, hipoglisemi	-	Sekundum ASD	KKA	BH, TSH, ACTH, Gn
126	E	-	40	0,5	C/S	0,1	Mikropenis, hipoglisemi	Kuzende ZY	Periferik PS, PEV, portal tromboz	PSIS	BH, TSH, ACTH, Gn

Cins: Cinsiyet, K: Kız, E: Erkek, GH: Gestasyon hastası, DA SDS: Doğum ağırlığı standart deviasyon skoru, C/S: sezaryen, NSD, Normal spontan doğum, ÇHHE: Çoklu hipofiz hormon eksikliği, GKD: Gelişimsel kalça displazisi, ZY: Zihinsel yetersizlik, HİE: hipoksik iskemik ensefalopati, ASD: atriyal septal defekt, PS: pulmoner stenoz, PEV: pes ekinovarus, MRG:manyetik rezonans görüntüleme, AHH: anterior hipofiz hipoplazisi, ENH: ektopik nörohipofiz, KKA: korpus kallosum agenezisi, PSIS: pitüiter sap kesisi sendromu

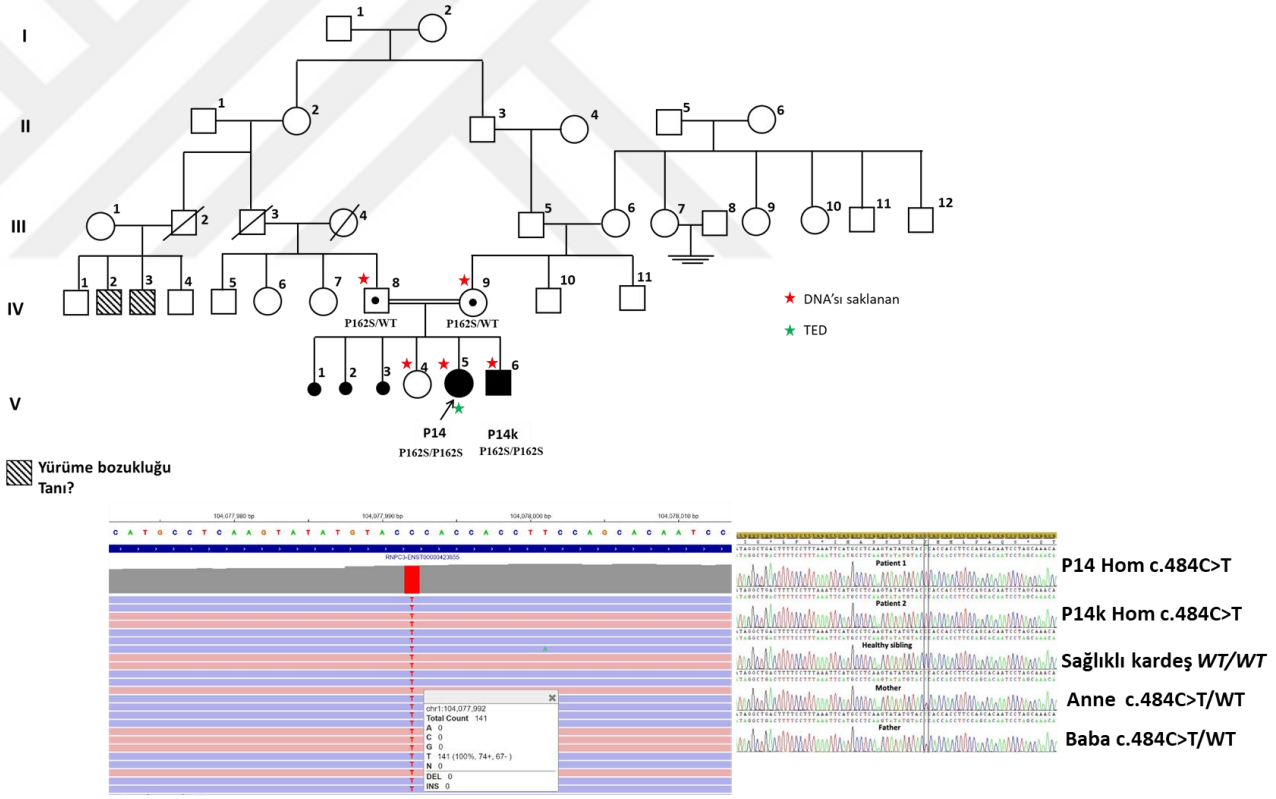
Tablo 4.7 TED analizinde saptanan ÇHHE ilişkili gen varyantları

No	Gen Transkript	Zigosite	Nukleotid	Protein	ACMG	Varyant özellikleri		Segregasyon analizi			
						In silico analizler*	Toplum veri tabanları sıklık	Anne	Baba	Kardeş	
										Sağlıklı	Etkilenmiş
14	***RNPC3*** NM_017619.4	Hom	c.484C>T	p.(Pro162Ser)	*VUS*	SIFT, MT, DANN, AlphaMissense	-	Het	Het	*WT/WT*	Hom
18¥	***GLI2*** NM_001374353.1	Het	c.1435 C>T	p.(Arg479*)	*LP*	MT, DANN, BayesDel	-	*WT*	*WT*	-	-
31¥	***GLI2*** NM_001374353.1	Het	c.2013delC	p.(Ser673fs)	*P*	Patojenik	GnomAD v4.1 0.00006569	Het	*WT*	-	Het
69	***RNPC3*** NM_017619.4	Hom	c.484C>T	p.(Pro162Ser)	*VUS*	SIFT, MT, DANN, AlphaMissense	-	Het	Het	-	-
95	***SMCHD1*** NM_015295.2	Het	c.1102 G>T	p.(Val368Phe)	*VUS*	DANN, *in silico* analizler çelişkili	GnomAD v4.1 0.00	WT	-	-	-
109	***ROBO1*** NM_002941.4	Het	c.1394 C>T	p.(Thr465Ile)	*VUS*	SIFT, MT, DANN, BayesDel, PrimateAI	GnomAD v4.1 0.00004962	Het	*WT*	*WT*	-

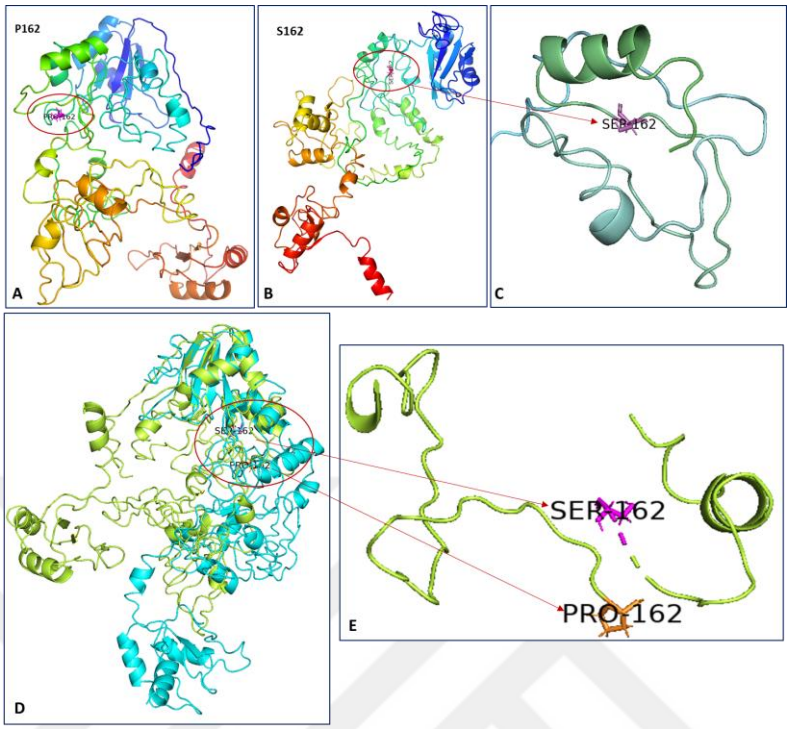
ACMG: American College of Medical Genetics; VUS: Variant of uncertain significance; LP: Likely Pathogenic; P: Pathogenic; WT: Wild type

Varyantın patojenik (zararlı) olarak bildirildiği *in silico* analiz programları tabloda gösterilmiştir.

¥ P18 ve P31'deki *GLI2* genindeki varyantlar literatürde daha önce tanımlanmıştır.

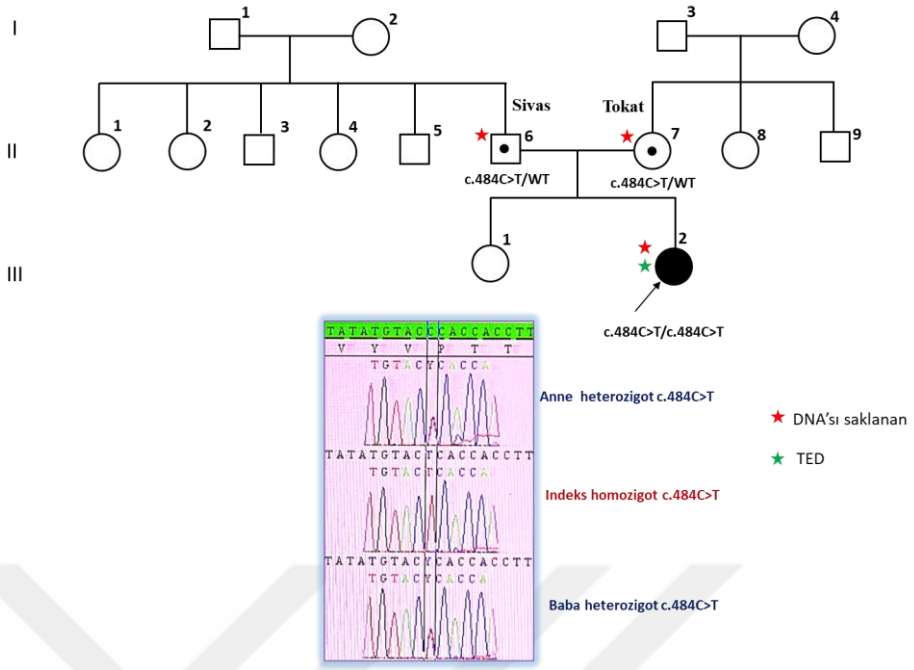


Şekil 4.6 *RNPC3* geninde homozigot varyant saptanan olguların [(P14 (V:5) ve P14k (V:6)] pedigrisi, IGV ve elektroferogram gösterimi.



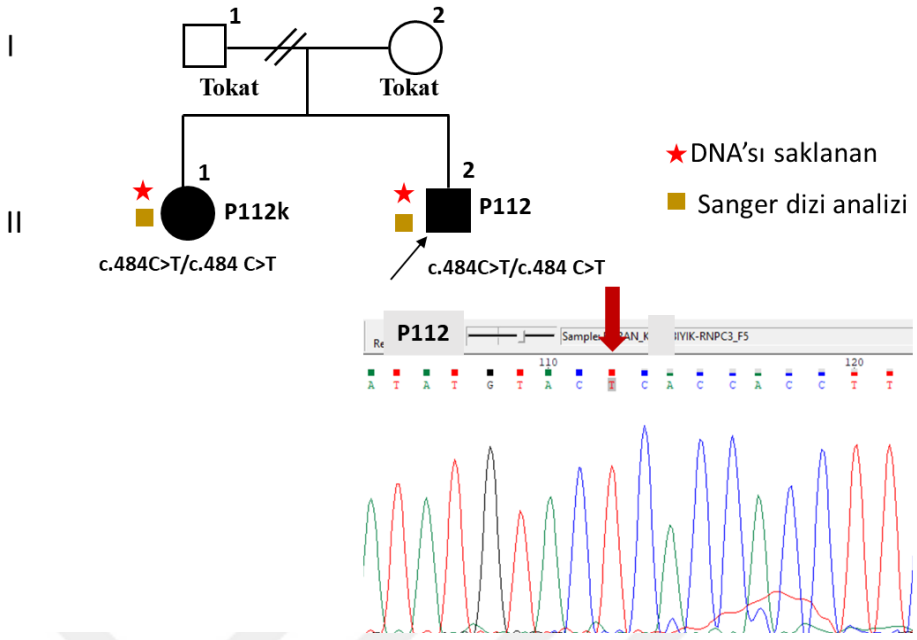
Şekil 4.7 *Wild-type* ve mutant RNPC3 proteinin üç boyutlu yapısı

RNPC3 proteininin hem vahşi tip (*WT*) hem de mutant (Mt) formlarının üç boyutlu modellerini göstermektedir. **A:** RNPC3 proteininin WT pPro162 formu, *I-Tasser* ile görselleştirilmiş ve N-terminalden (koyu mavi) C-terminal (kırmızı) sona kadar boyanmıştır. **B ve C:** RNPC3 proteininin mutant pSer162 formu, (C) büyütülmüş versiyonudur. **D:** *WT* (yeşil renk) ve *Mt* (mavi renk) protein formlarının üst üste bindirilmiş hali **E:** Üst üste bindirilmiş formların ayrıntılı, büyütülmüş görünümü. Yavas Abali Z, ve ark. A Novel RNPC3 Gene Variant Expands the Phenotype in Patients with Congenital Hypopituitarism and Neuropathy. Horm Res Paediatr. 2024; 97:157-164 kaynağından düzenlenmiştir (115).



Şekil 4.8 *RNPC3* geninde homozigot varyant saptanan P69 (III:2) olgusunun pedigri ve elektroferogram görüntüsü.

TED analizinde *RNPC3* geninde varyant saptanan olguların klinik ve genetik özelliklerinden edinilen bilgi sonrasında benzer şekilde bir aileden iki olguda ÇHHE ve polinöropati kliniği olması nedeniyle klinik açıdan hedef genin *RNPC3* geni olduğu tespit edilmiş ve Sanger dizi analizi yapılmıştır. *RNPC3* geninde (NM_017619.4) homozigot c.484C>T/p.(Pro162Ser) varyant saptanmıştır (P112 ve P112k). Benzer etkilenmiş kardeşte (P112k) de varyant homozigot olarak saptanmıştır **(Şekil 4.9).**



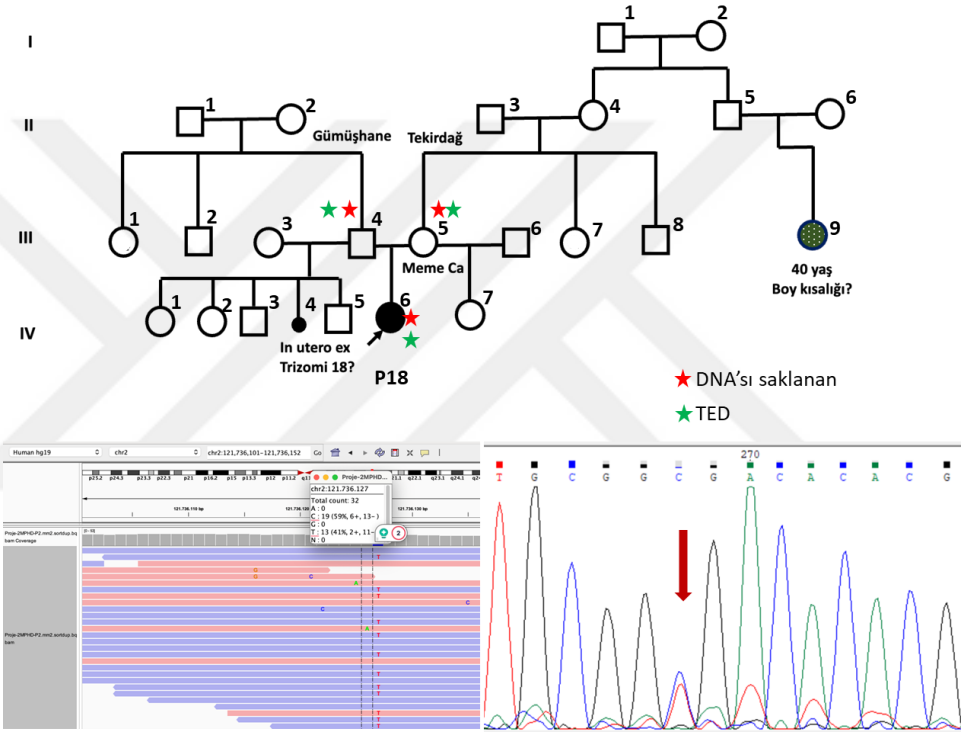
Şekil 4.9 P112'de (II:2) Sanger dizi analizi ile *RNPC3* geninde saptanan homozigot c.484 C>T varyantının elektroferogram görüntüsü.

Tablo 4.8 *RNPC3* geninde biallelik patojenik varyant saptanan üç aileden beş olgunun özellikleri

No	**14**	**14k**	**69**	**112k**	**112**
Cinsiyet (K/E)	K	E	K	K	E
Başvuru yaşı	16 aylık	23 günlük	19 aylık	5.8 yaş	7.5 aylık
Boy cm (SDS)	55,8 (-7.6)	42,3 (-4.4)	63,5(-5.8)	76,4 (-8.0)	56,0(-5.1)
Ağırlık kg (SDS)	6,5(-3.6)	2,8(-2.4)	6,3 (-4.3)	9,0 (-6.2)	4,8 (-1.5)
HB cm (SDS)	152,5 (-1.8)	165,5 (-1.7)	161,0(-0.4)	155,4 (-1.3)	168,4 (-1.3)
Laboratuvar					
sT4 (pmol/l/) /TSH (mIU/ml)	4,9/2,8	12,3/0,02	6,3/2,76	11,4/2,8	7,6/6,7
ACTH pg/ml	-	9,9	-	24,7	16,0
Kortizol µg/dl	6,4	7,6	11,2	9,1	11,5
IGF1 ng/ml	<25,0	<17,0	36,9	25	35
IGFBP3 ng/ml	<0,5	<0,5	1,66	0,5	0,71
Prolaktin ng/ml	0,1	0,16	0,12	0,47	0,77
Na/idrar dansitesi	139/1013	140/1007	139/1012	140/1022	143/1015
Görüntüleme					
Kraniyal MRG	-	Normal	Normal	Normal	Normal
Hipofiz MRG	AHH	Normal	Normal	Normal	Normal

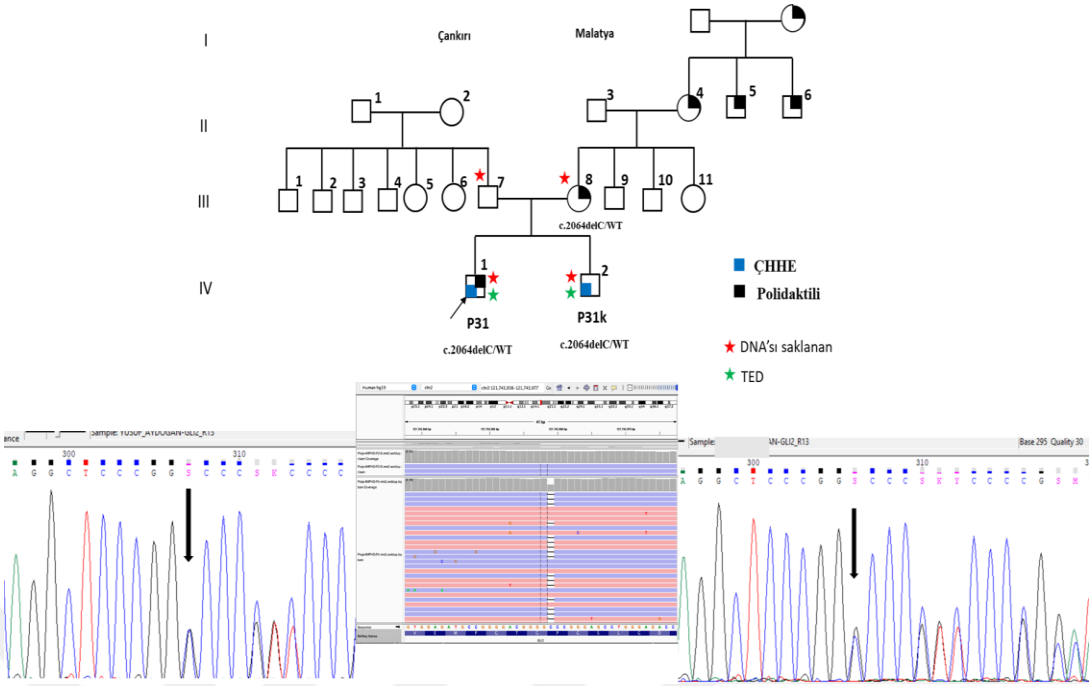
HB: Hedef boy; SDS: Standart deviasyon skoru; MRG: Manyetik rezonans görüntüleme; AHH: Anterior hipofiz hipoplazisi

Çalışmada TED analizinde iki aileden üç olguda *GLI2* geninde heterozigot varyant saptanmıştır. *Trio* TED analizinde P18'de *GLI2* (NM_001374353.1, NP_001361282.1) geninde ekzon 10'da heterozigot c.1435 C>T, p.(Arg479*) daha önce tanımlanmış patojenik bir değişim saptandı (116). Bu varyantı annesi ve babasının taşımadıkları belirlenmiş olup Sanger dizi ile doğrulanmıştır. Bu testte saptanan varyantın indekste *de novo* oluştuğu ve *GLI2* geni ilişkili ÇHHE ile uyumlu olduğu düşünülmüştür **(Şekil 4.10)**.



Şekil 4.10 *GLI2* geninde heterozigot varyant saptanan P18 olgusunun (IV:6) pedigri, IGV ve Sanger doğrulamasının elektroferogram görüntüleri.

Duo TED analizinde (P31 ve P31k) P31'de *GLI2* (NM_001374353.1) geninde ekzon 13'de daha önce tanımlanmış patojenik bir değişim heterozigot olarak saptandı (117). *GLI2* c.2013delC varyantı Sanger dizi ile doğrulandı bu varyantı benzer etkilenmiş kardeşi ve annesinin heterozigot olarak taşıdıkları belirlendi **(Şekil 4.11)**.

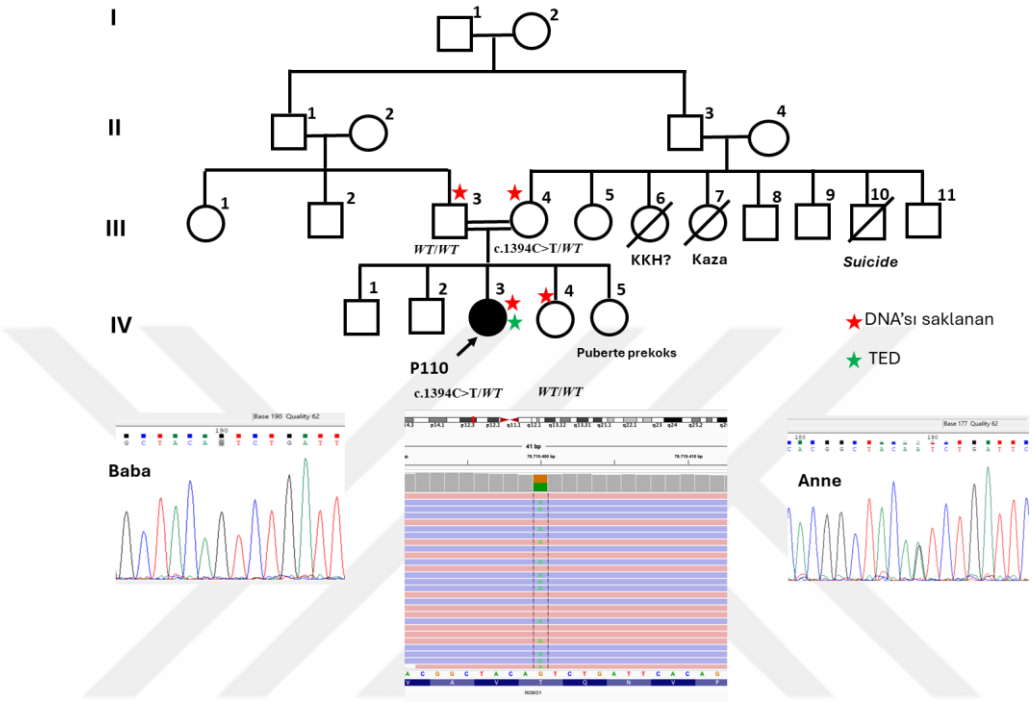


Şekil 4.11 *GLI2* geninde heterozigot c.2064delC varyantı saptanan P31'in (IV:1) ve etkilenmiş kardeş P31k'nin (IV:2) pedigri, IGV ve Sanger elektroferogramları.

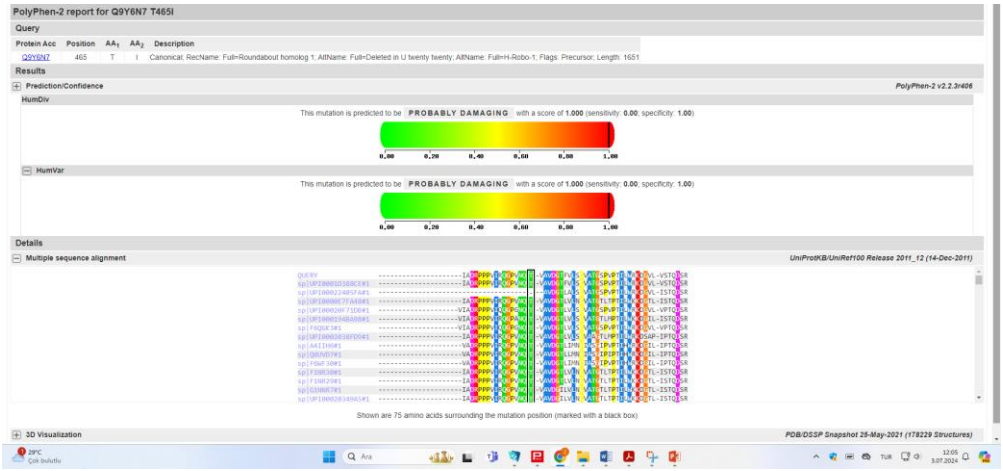
Solo TED analizinde P95'te *SMCHD1 (*MIM***** 614982) geninde c.1102G>T/ p.(Val368Phe) varyantı heterozigot saptandı. Bu varyant ACMG kriterlerine göre önemi belirsiz varyant kategorisinde olup *in silico* analizleri çelişkilidir. Toplum veri tabanlarında daha önce bildirilmemiştir. Bu varyant sağlıklı annede saptanmamış, babasının exitus olması nedeniyle segregasyon analizi tamamlanamamıştır. Merkezimizde yapılan TED analizinde bu olguda CNV analizinde patojenik kopya sayısı değişimi saptanmamıştır. *SMCHD1* geni dominant kalıtımda *Bosma Arhinia Mikroftalmi* sendromuna yol açmakla birlikte inkomplet penetrans bildirilmesi ve fenotipte HH tanımlanması nedeni ile bu olguda olası klinik ilişkili gen olarak değerlendirmeye alınmış, segregasyon analizinin genişletilmesi planlanmıştır.

Solo TED olarak incelenen P109'da *ROBO1* geninde (NM_002941.4) daha önce tanımlanmamış heterozigot c.1394 C>T/p.(Thr465Ile)/rs576393729 varyantı saptandı. Bu varyantı annesinin taşıdığı, baba ve sağlıklı kardeşin taşımadığı belirlendi **(Şekil 4.12).** Varsome ve Franklin veri tabanlarında önemi belirsiz varyant ve ClinVar'da ise '*Uncertain*' olarak bildirilmişti. Varyant *Polyphen2* veritabanında olası hastalık yapıcı

olarak bildirilmişti **(Şekil 4.13)** ve varyantın toplum veri tabanlarındaki sıklığı nadir olup gnomAD v4.1'de allel frekansı 0.00004962 idi.



Şekil 4.12 *ROBO1* geninde heterozigot varyant saptanan P109 olgusunun (IV:3) pedigri, IGV ve segregasyon analizlerinin elektroferogram görüntüsü.

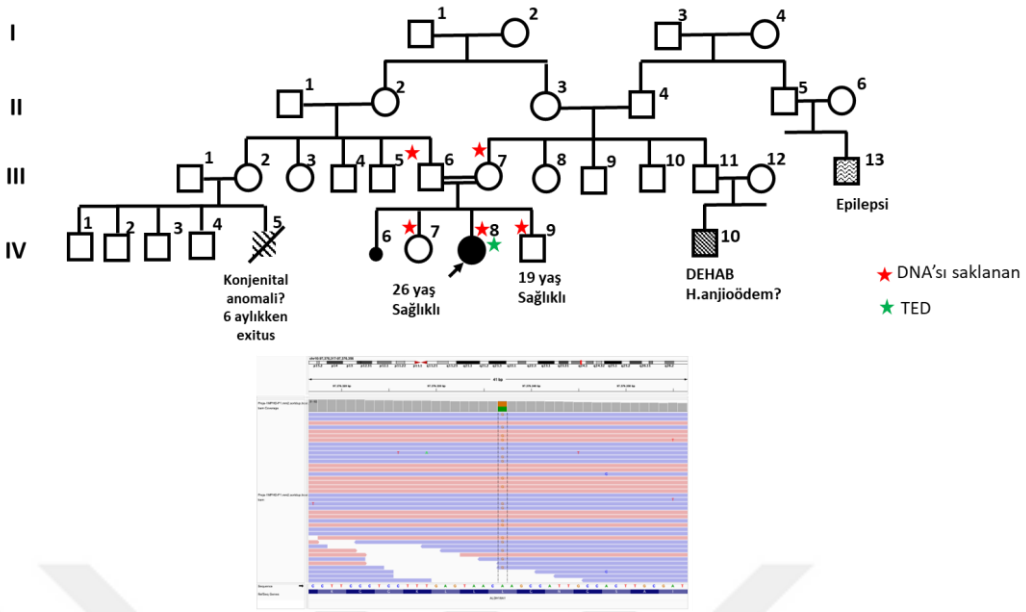


Şekil 4.13 *ROBO1* (NM_002941.4): c.1394C>T p.(Thr465Ile) varyantının *Polyphen2* veri tabanında değerlendirilmesi.
(http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/085ddb820411b7d4ffc2b97580754768b8b52262/9864310.html sitesinden düzenlenmiştir-04.07.2024).

TED analizinde aday gen saptanan olguların değerlendirilmesi

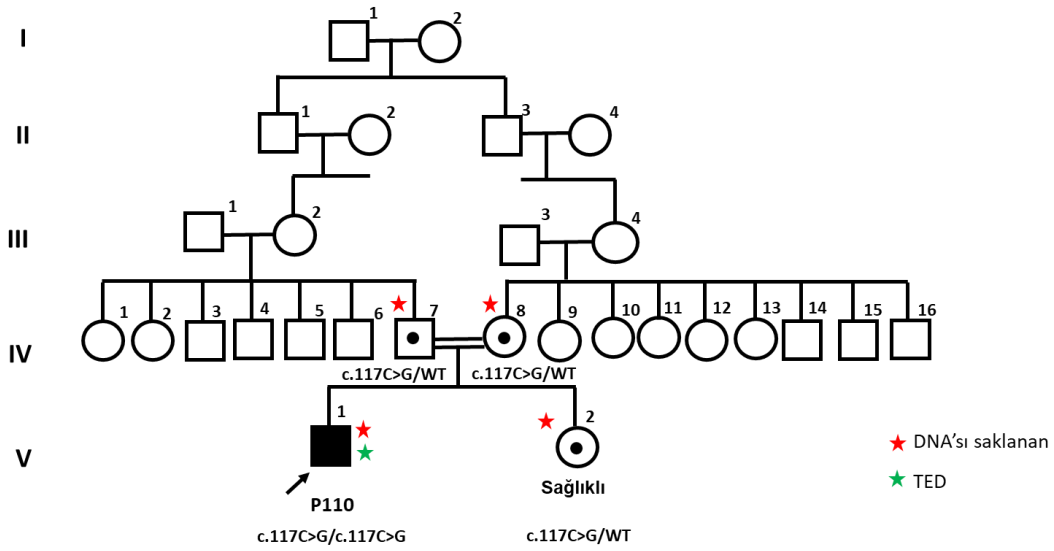
TED analizi yapılan olgulardan P40, P110 ve P111 olgularında ÇHHE ve sendromik bulguları açıklamaya yönelik aday gen için değerlendirildi. Bu olgularda uygulanan TED analizinde CNV kapsanmamış, ancak her üç olgunun da moleküler test öncesinde kromozom analizleri, Affymetrix Cytoscan Optima 315K mikroarray analizleri yapılmı ve normal olduğu belirlenmişti. KED analizlerinde klinik ilişkili bir varyant saptanmamıştır. P40'ta ÇHHE'ye ek olarak obezite, zihinsel yetersizlik, küçük el ve ayak gibi Prader Willi sendromunu akla getiren bulguları olması nedeniyle Metilasyon spesifik MLPA (MS-MLPA) testi yapılmış ve normal saptanmıştır.

Anne babası arasında birinci derece kuzen evliliği olan P40 olgusunda ÇHHE ilişkili bilinen genlerde resesif veya dominant herhangi bir patojenik varyant saptanmadı. *ALDH18A1* geninde (NM_002860.6): c.1502 T>C/p.(Leu501Ser)/ rs1342016344 varyantı heterozigot olarak saptandı **(Şekil 4.14).** Hem dominant hem resesif kalıtım özelliğinde olan *ALDH18A1* genindeki bu varyant *inhouse* veri tabanında bulunmamakla birlikte toplum veri tabanlarında oldukça nadirdir (gnomAD: %0,0006225). *In silico* tahmin yöntemlerinde çoğunlukla patojenik olarak bildirilmişti (Revel, Varity, SIFT, MT, BayesDel gibi). Ekzon 13'te yer alan bu varyant için primer tasarlanıp doğrulama ve aile segregasyon analizi yapıldı. Bu gendeki varyantlar dominant kalıtıldığından kutis laksa OD tip 3 (MIM # 616603) ve spastik parapleji 9A (MIM# 601162)'ya neden olmaktadır.



Şekil 4.14 P40 olgusunun (IV:8) pedigri ile gösterimi ve *ALDH18A1* c.1502T>C varyantının IGV'de gösterimi

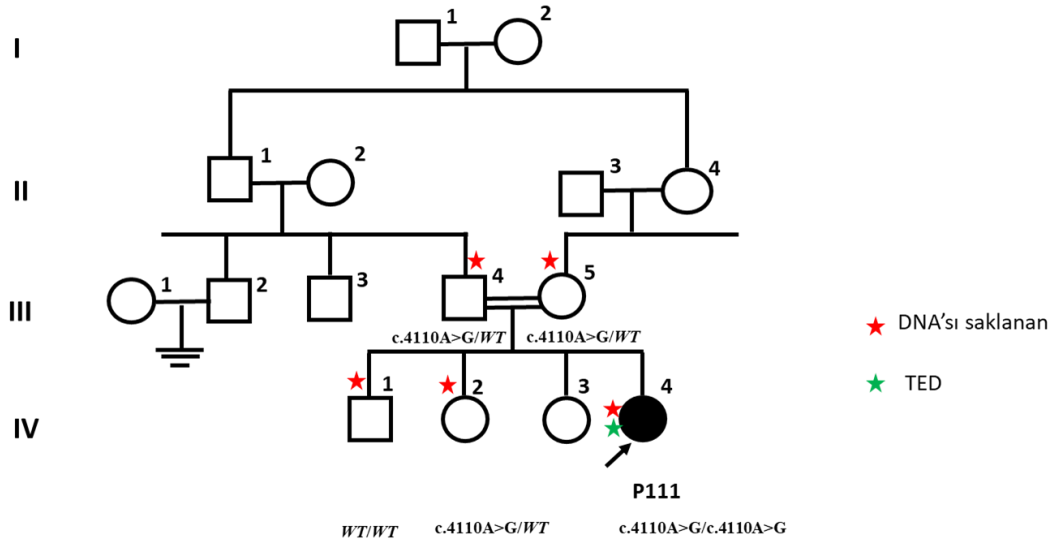
Solo TED analizinde P110 olgusunda *MFHAS1* geninde (NM_00225.3) c.117 C>G/p.(Ala39Ala)/rs770289859 varyantı homozigot olarak saptandı. Segregasyon analizinde bu varyant için anne ve baba heterozigot sağlıklı kardeşi de heterozigot saptandı **(Şekil 4.15).**



Şekil 4.15 P110 olgusunun (V:2) pedigri ile gösterimi

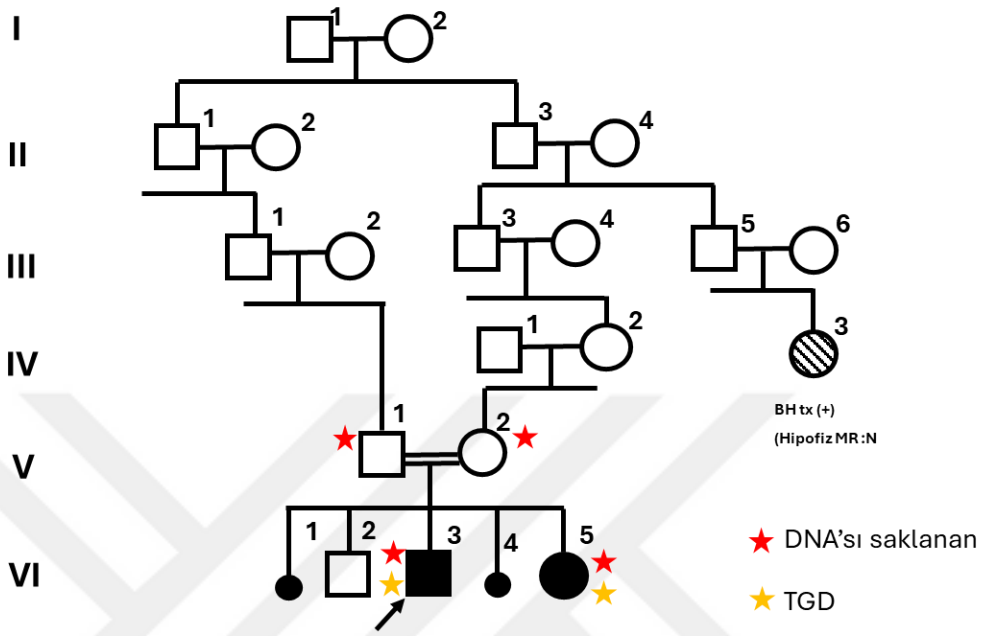
Bu varyantın *in silico* analizleri çelişkili olmakla birlikte toplum veri tabanlarında nadir olarak bildirilmiştir ve korunmuşluğu yüksektir. Varyantın kırpılmaya etkisini gösterebilmek için RNA analizi planlanmıştır. Periferik kan lökositlerinde ifadesi düşük olması nedeniyle kanda etkisi gösterilememiştir. İdrar örnekleri ile analizleri devam etmektedir. *MFHAS1* geninin OMIM veri tabanında bilinen fenotipi olmamakla birlikte literatürde zihinsel yeteresizlik, ekstremite anomalisi ve kalp anomalisi olan bir olguda mikroarray analizinde bu gende homozigot delesyon bildirilmiş olması bu geninin olgumuzdaki ek bulguları açıklayabileceğini düşündürmüştür (118).

Solo TED analizinde P111 olgusunda *DHX29* geninde (NM_019030.4) c.4110 A>G p.(Ter1370Trpext*2) rs1469972493 varyantı homozigot olarak saptanmıştır. Bu varyant *in house* veride gözlenmemiş olup ClinVar'da bildirilmemiştir. Varsome da olası patojenik olarak bildirilmiştir. Segregasyon analizinde bu varyant anne ve babada heterozigot sağlıklı kardeşlerin ikisinde heterozigot saptanmış olup diğer bir sağlıklı kardeşte ise saptanmamıştır **(Şekil 4.16).**



Şekil 4.16 P111 (IV:4) olgusunun pedigri ile gösterimi

Çalışmada TGD analizi ile değerlendirilen benzer etkilenmiş iki kardeşte (P114-P114k) KH'yi açıklayacak genetik etiyoloji saptanamamıştır.



Şekil 4.17 P114 ve P114k (VI:3 ve VI:5) olgularının pedigri ile gösterimi

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, KH tanılı 118 aileden 125 olgunun klinik ve genetik özellikleri incelenmiş, kullanılan farklı genetik yöntemlerin moleküler etiyolojinin belirlenmesine olan katkısı değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda erkek kız oranı 1,8 (80 erkek, 45 kız) saptanmıştır. Martinez-Mayer J ve ark.'ın (119) Arjantin kohortunun değerlendirildiği yakın zamanlı çalışmasında bu oran benzer şekilde 1,6 olarak bildirilmiştir. Geniş KH çalışmalarında cinsiyet dağılımı ile ilgili veri sınırlı olmakla birlikte hastalığın erkeklerde daha sık olduğu görülmektedir. Bazı çalışmalarda erkeklerde daha sık görülmesi X'e bağlı kalıtımın etkisi olarak yorumlanmış olsa da bu durumu destekleyen veri sınırlıdır(120).

Genel olarak KH olgularında doğum ağırlığı ve boylarının normal olması beklenir (18). Çalışmamızda doğum ağırlığı ortanca değeri -0,4 SDS olup doğum ağırlığına göre hesaplanan SGA oranının %11 olduğu saptanmıştır. SGA'nın tanımı gereği yaklaşık %3 oranında olması beklenirken çalışmamızdaki oranın yüksekçe olduğu görülmüştür. Bu durumun, endokrinolojik sorunlarından çok eşlik eden diğer sorunlara bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Olguların endokrinoloji kliniğine başvuru ortanca yaşının 5,9 yıl olduğu görülmüştür. Olguların sadece %5,6'sı yenidoğan döneminde tanı almıştır. Üçte biri 2 yaş altında, yine yaklaşık üçte biri 10 yaş üzerinde tanı almıştır. Literatürde, KH'li yenidoğanların %52'sinin doğum sonrasında ilişkili komplikasyonlarla başvurduğu ve %23'üne yenidoğan döneminde tanı konduğu görülmektedir (121). Çalışmamızda erken tanı oranının düşük olması, ülkemizde yenidoğan dönemi KH belirti ve bulguları ile ilgili farkındalığın artırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, en sık başvuru nedeni (olguların yaklaşık üçte ikisinde) boy kısalığı idi. Büyüme hormonu eksikliğinde boy kısalığı iki yaş üzerinde belirgin hale gelmektedir. Boy kısalığının en sık başvuru nedeni olması olgulara görece geç tanı konması ile ilişkili olarak yorumlanmıştır. Farklı çalışmalarda, yenidoğan veya süt çocukluğunda KH'li olguların %35'inde sarılık en yaygın başvuru nedeni olarak belirtilmiştir (122). Yenidoğan hipoglisemisi yine sık bulgular arasındadır (3). Çalışmamızda olguların üçte ikisinin öyküsünde yenidoğan döneminde sarılık gözlendiği; ancak, bu dönemde hipopituitarizm tanısı almadıkları görülmektedir.

Hipoglisemi, uzamış sarılık, kolestaz, yenidoğan ve erken süt çocukluğunda önemli bulgular olup akla KH gelmelidir. İnmemiş testis ve/veya mikropenis birlikteliği de önemli bulgular arasında olup mini puberte dönemi tanı için kaçırılmaması gereken bir fırsat sunmaktadır.

Olgular, hipofiz dışı anomaliler nedeniyle de tanı alabilmektedir. Beyin gelişimindeki anomalliler (HPE, SOD, KKA gibi), kraniyofasiyal gelişim anomalileri (orofasiyal yarık, maksillada tek santral kesici diş veya lateral kesici diş agenezisi, piriform sinus stenozu, koanal atrezi) veya göz anomalileri (mikroftalmi, anoftalmi, retinitis, iris veya retina kolobomu) gözlenebilir. Görme veya işitme sorunları ve farklı şiddette nörogelişimsel bozukluklar gibi diğer anomaliler de eşlik edebilir. Bu birliktelikler orta hat sendromu olarak da bir arada görülebilir. Hipopitüitarizm ek olarak CHARGE (*Coloboma, Heart, Choanal atresia, Retardation, Genital and Ear),* Fanconi, Rieger ve Pallister-Hall sendromları gibi çeşitli sendromların bir belirtisi olabilir (123-125). Bu durum, ortak embriyolojik gelişim mekanizmalarına ve ontogenez sırasında anomalinin gerçekleşme zamanına bağlıdır. Çalışmamızda olguların yaklaşık %10'unda bu bulguların en az birinin varlığı görülmektedir. İskelet (polidaktili) ve vertebral anomalileri (kısıtlı baş ve boyun rotasyonu, kısa boyun) de görülen bulgular arasındadır. Bu özgün bulgular, moleküler genetik tanı için yönlendirici olmaktadır.

Hipotalamus-hipofiz bölgesinin anatomik farklılıkları, ÇHHE olgularının %50−100'ünde, izole BH eksikliği olgularında ise daha nadiren görülebilmektedir. Bu anomaliler: AHH, izole ENH, PSIS, SOD ve homojen kontrast artışı ile artmış hipofiz hacmi olarak tanımlanabilir. Ayrıca, olfaktör bulbus ve/veya olfaktör traktus agenezisi, HPE, şizensefali, heterotopi, Chiari malformasyonu, serebellar malformasyon, Rathke kisti, mikroftalmi ve hipotalamik hamartom gibi diğer ilişkili intrakraniyal anomaliler de gözlenebilmektedir (126). Çalışmamızda, hipofiz görüntülemesinde en sık izlenen özellikler olguların beşte birinde görülen AHH ve yine beşte birindeki AHH-ENH birlikteliği idi. İki olguda SOD, iki olguda optik sinir hipoplazisi, bir olguda da HPE saptandı. Beyin görüntülemede dört olguda korpus kallosum gelişim kusuru saptanmıştı. Bir spektrum olarak tanımlanan HPE, SOD ve KH birlikteliği önemli morbiditeye yol açar ve bu spektrumda 30'dan fazla genin rolü olduğu tespit edilmiştir (4). Bu genler temel olarak hipotalamus ve hipofiz bezinin gelişimi sırasında hücre sinyali, siliya,

hücre dışı matriks ve hücre adhezyonu ve transkripsiyonel düzenleme ile ilgilidir. Bununla birlikte, klinik olarak tanı konulan hastaların çoğunluğunda (~%90) halen genetik temel bilinmemektedir (5). Çalışmamızda bu spektrumda yer alan iki olgu bulunmaktadır ve bu olgularda genetik etiyoloji saptanamamıştır.

İlk olarak 1987'de kesintiye uğramış bir hipofiz sapı ve ENH birlikteliği olarak tanımlanan PSIS, son yıllarda, nörohipofiz agenezisi ve kesintiye uğramış hipofiz sapı olan olguları da içerecek şekilde genişletilmiştir (127). Hipofiz sapı normal olup izole nörohipofiz yokluğu PSIS olarak kabul edilmemektedir. Bu özellik sağlıklı popülasyonun %10'unda tanımlanmıştır. Nörohipofizi MR görüntülemedeki belirleyicisi "parlak nokta" yaşamın ikinci ayında fark edilebilir hale gelir (128). PSIS'e farklı orta hat kusurları da eşlik edebilir. Günümüzde, PSIS geniş HPE spektrumunun bir parçası olarak kabul edilmektedir (127). Çalışmamızda olguların yaklaşık %10'unda PSIS mevcuttu.

PSIS patogenezi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Perinatal hipofiz hasarı ile mekanik olarak hipofiz sap rüptürü veya iskemiye neden olan doğum travması ilk teori olarak karşımıza çıkmaktadır. PSIS'li hastalarda perinatal olayların ve makat doğumun sıklığının yüksek olması bu teoriyi desteklemektedir. Bununla birlikte patolojik kanıtların yetersiz olması; ayrıca, ailevi veya akraba evliliğine bağlı olguların görülmesi genetik etiyolojileri, diğer konjenital anomalilerle birlikteliği ise embriyolojik gelişim kusurlarını ön plana çıkarmaktadır. Fare çalışmalarında, *Hesx1*, *Lhx2*, *Nkx2.1*, *Rax*, *Tbx3* ve *Hex1*/*Hes5* genlerindeki mutasyonların hipofiz sapının gelişiminde bozukluğa yol açtığı gösterilmiştir (129). Bunun yanında, PSIS olgularının %5'inde moleküler genetik etiyoloji saptanabilmektedir. Bu da genetik olmayan risk faktörlerinin de göz önünde bulundurulması gereğini ortaya koymaktadır. HPE'nin hafif bir formu olarak tanımlanan PSIS'de de HPE'ye benzer bir multifaktöriyel etiyoloji akla gelmelidir. Olgular, olasılıkla gen-çevre etkileşimi, epigenetik mekanizmaları da içeren "çoklu vuruş hipotezi" açısından değerlendirilmelidir. Düşük kolesterol düzeyi, maternal alkolizm veya diyabet, kokain gibi vazoaktif ilaçlar çeşitli HPE ve SOD gibi hipofiz anomalileri ile ilişkilendirilmiştir (130). Çalışmamızda, 13 PSIS olgusunun 4'ünde moleküler genetik etiyoloji saptanmıştır.

Özetle, hipopituitarizm olgularında hipotalamus hipofiz bölgesi anatomik farklılıkları ile beyin ve optik sinir anomalilerinin tanımlanması, güçlü tanısal ve etiyolojik kanıtlar sağlamaktadır. Bununla birlikte, görüntülemelerin normal olması KH tanısını dışlamaz.

KH olgularında gelişimsel bozukluklar, zihinsel yetersizlik ve epilepsi tabloya eşlik edebilir. Çoğunlukla anatomik beyin anomalilerinin varlığında bu bulguların olması beklenmektedir. Çalışmamızda zihinsel yetersizlik olguların dörtte birinde saptanmıştır. Zihinsel yetersizlik, beyin gelişim anomalileri veya özgül sendromlar sonucunda eşlik eden bir özellik olabileceği gibi ACTH ve BH eksikliklerine bağlı görülen hipoglisemi ve TSH eksikliğine bağlı hipotiroidi sonucunda sekonder de gelişebilir. Çalışmamızda bu ilişkilerde anlamlı sonuçlar bulunamamıştır. Bu durum alt grup analizlerindeki olgu sayılarındaki azlığa bağlanmıştır.

Epilepsi, literatürde KH olgularında nadir bir bulgu olarak verilmektedir (125). Çalışmamızda epilepsi oranı yaklaşık %9 idi. Bu durum da tanı öncesi görülen hipoglisemilerin sekel bulgusu olabilir. Olgu sayılarındaki azlık nedeniyle epilepsi etiyolojisinin belirlenmesi (hipoglisemi veya eşlik eden beyin anomalileri) güçtür.

Göz anomalileri olguların yaklaşık %10-%20'sinde mevcuttur ve oldukça değişkendir (131). Nistagmus, iki taraflı görme bozukluğunun (şiddetli iki taraflı kolobom, optik sinir hipoplazisi) veya okulomotor anomalilerin bir belirtisi olabilir. Çalışmamızda oftalmolojik sorunlar %15 olguda gözlenmiştir. KH'ye işitme kaybı da eşlik edebilmektedir (131). Çalışmamızda işitme kaybı oranı %4,8 olarak saptanmıştır.

Literatürde moleküler genetik etiyoloji KH olgularının yaklaşık %10'unda belirlenebilmektedir. Genetik etiyolojilerin sıklığı toplumlar arasında değişiklik göstermekle birlikte, hipofize özgü bir transkripsiyon faktörü olan *PROP1*, Avrupa'da en sık belirlenen gendir ve bunu *POU1F1* izlemektedir (119) (132).

Çalışmamızda, *PROP1* varyantı iki aileden 3 olguda saptanmıştır. Tanı alan olgularda kapsanmayan bölge analizinde küçük dizi varyantları ve MLPA'da delesyonlar gösterilmiştir. Kohortumuzda literatürün aksine *PROP1* varyantlarının nadir olması dikkat çekicidir.

Çalışmamızda ÇHHE panel testinde *PROP1* geni ekzon 2 bölgesi düşük kapsamda olduğu için bu bölge, Sanger dizi analizi ile yeniden değerlendirilmiştir.

Bunun sonucunda, bir olguda literatürde sık bildirilen c.301-302delAG varyantı saptanmıştır. Bu olguda BH, TSH, gonadotropin ve prolaktin eksikliği mevcuttu ve mikroadenom gözlenmişti. *PROP1* ilişkili ÇHHE olgularında hipofiz değişken morfolojilerde olabilmektedir. En yaygın bulgu, küçük veya normal bir adenohipofiz ile normal bir hipofiz sapı ve normal bir arka lobdur. Hipofiz hiperplazisi de tanımlanmıştır (18, 133). *PROP1* varyantları ve hipofiz büyümesi olan birçok olgu genellikle erken çocukluk döneminde görülür ve bunu ilerleyen yaşlarda AHH izler. Hipofiz hiperplazisi olan olguların çoğunun c.301-302delAG varyantını taşıdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, c.150delA/p.(Arg53Aspfs*112), c.247C>T/p.(Gln83*) ve c.217C>T/p.(Arg73Cys) varyantlarının da hipofiz büyümesi ile ilişkisi tanımlanmıştır (134). *PROP1* eksikliği olan Jamaikalı bir olguda opere edilen hipofiz kitlesinin histopatolojisi tanınabilir hücre hatları olmayan amorf bir materyal olarak sonuçlanmıştır (134). *PROP1* olgularında hipofiz büyümesinin ara lob kaynaklı da olabileceği bildirilmektedir (135).

Çalışmamızdaki diğer *PROP1* varyantı, bir aileden iki olguda MLPA analizi ile saptanana homozigot tüm gen delesyonudur. İndeks olgunun ÇHHE nedeni ile izlemi sırasında 21 yaşındayken hipofizde adenom saptanarak opere edildiği görülmüştür. Olgunun o dönemdeki patoloji raporuna ulaşılamamakla birlikte selim bir lezyon olduğu düşünülmüştür. Benzer etkilenmiş kardeşinde günümüze dek hipofizde herhangi bir kitle saptanmadığı bilgisine ulaşılmıştır. Literatürde, *PROP1* tüm gen delesyonu olan bir olguda 18 yaşında iken hipofizde büyüme saptandığı izleminde adenohipofiz boyutunda küçülme olduğu yer almaktadır (134).

PROP1 geninde günümüze dek (Haziran 2024), HGMD veri tabanında 58 varyant bildirilmiş olup bunların 29 adedi yanlış anlamlı/ anlamsız varyantlardır (136). Küçük delesyonlara ait dokuz varyant bildirilmiştir ve genel olarak en sık saptanan değişim ekzon 2'de iki baz çiftinin delesyonu (c.301_302delAG/ p.(Leu102Cysfs*8)) ve bir bazlık delesyon (c.150delA/ p.(Arg53Aspfs*112)) ile çerçeve kaymasına neden olan varyantlardır (121).

POU1F1, somato-laktotropların ve tirotopların farklılaşmasından sorumlu hipofize özgü bir transkripsiyon faktörüdür. ÇHHE ve izole BH eksikliği olgularının yaklaşık %8'i bu gendeki varyantlardan kaynaklanmaktadır (137). *PROP1* olgularında olduğu gibi, olgular BH eksikliği bulguları ile başvurabilir. TSH eksikliğinin ortaya

çıkış yaşı oldukça değişkendir ve TSH seviyeleri normal olan olgular bildirilmiştir. Hipofiz normal veya hipoplazik olabilir (121). Günümüze dek bu gende 67 varyant bildirilmiştir. Bildirilen varyantların 34'ünü yanlış anlamlı veya anlamsız, 10'nu kırpılma bölgesi varyantları, 5'ini de büyük delesyonlar oluşturmaktadır (136, 138).

Çalışmamızda ÇHHE panelinde iki olguda *POU1F1* geninde homozigot ve bir olguda heterozigot varyant saptanmıştır. Biallelik saptanan varyantlardan yanlış anlamlı olanı (c.793 C>T/p.(Arg265Trp)) literatürde daha önce tanımlı idi (112). Tanımlı olmayan c.814delG/ p.(Val272*) varyantının erken dur kodonuna yol açması beklendiğinden patojenik etkisi öngörülmüştür. Bu olgunun da biyokimyasal özellikleri *POU1F1* ilişkili ÇHHE ile uyumlu bulunmuştur. Hipofiz MR'ında boş (*empty*) sella saptanmıştır. *POU1F1* olgularında hipofiz MR normal olabilir veya AHH gözlenebilir, arka hipofiz ve infundibulum normaldir ve orta hat anormalileri bildirilmemiştir (139).

POU1F1 varyantları çoğunlukla resesif kalıtılır; ancak, son zamanlarda en sık c.811C>T/p.(Arg271Trp) olmak üzere dominant kalıtılan varyantlar da tanımlanmıştır (140). Çalışmamızda saptanan *POU1F1* c.669T>G/p.(Ile223Met) heterozigot varyantı ise literatürde daha önce tanımlanmamış ve önemi belirsiz varyant (VUS) olarak sınıflandırılmıştır. *In silico* analizleri çoğunlukla patojenik öngörmektedir (MT, DANN, SIFT) ve varyant gnomAD gibi popülasyon veri tabanlarında bildirilmemiş nadir bir değişimdir. *POU1F1* geninin dominant ve resesif kalıtım modelinde hastalık yapıcı etkisi bilindiğinden bu olguda karşı allelde olası kopya sayısı değişimini saptamak amacıyla yapılan MLPA analizinde delesyon gözlenmemiştir. Varyantı babası da heterozigot formda taşıdığı için aile segregasyon analizi genişletilmiş ve babaannede de saptanmıştır. Bu verilere dayanarak ailede varyantı taşıyan bireylerin ÇHHE klinik bulguları göstermediği düşünülerek varyantın 'tesadüfi' olabileceği ve olgudaki bulguları tam olarak açıklamadığını düşündürmekle birlikte etkisi net olarak dışlanamamıştır. Ek olarak, bu olguda inmemiş testis, HH ve sindaktili gibi bulguların varlığı *POU1F1* ilişkili ÇHHE fenotipine ek bulgulardır.

LHX3 geni, özgün bulguları ile ÇHHE etiyolojisinde yer alan bir diğer gendir. Çalışmamızda bir aileden iki benzer etkilenmiş olguda *LHX3* geninde homozigot c.266+2T>C/p.(?) varyantı saptanmıştır. Saptanan değişim literatürde daha önce bildirilmemiştir ve evrimsel korunmuşluğu yüksek olan *splice donor* dizi bölgesinde olduğu için kırpılmayı bozması beklendiğinden ACMG'ye göre olası patojenik

kriterinde olduğu tespit edilmiştir. Bu olgularda *LHX3* ilişkili ÇHHE ile uyumlu olarak tüm adenohipofiz hormonlarında eksiklik, boyun hareketlerinde kısıtlılık, kısa boyun ve bilateral sensörinöral işitme kaybı saptanmıştır. Olguların hipofiz MR incelemeleri normal bulunmuştur. *LHX3*'ün spinal motor nöronların gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (biallelik patojenik *LHX3* varyantı olanlarda boyun rotasyon anomalileri) ve ayrıca işitmeye de etkisi bilinmektedir (20).

IGSF1, son yıllarda santral hipotiroidi ve makroorşidi olgularında tanımlanmış bir KH genidir. Çalışmamızda, iki olguda *IGSF1* varyantları hemizigot olarak saptanmıştır. Çalışmada saptanan c.2395C>T/p.(Arg799*) varyantı daha önce tanımlanmıştır (111). Boy kısalığı nedeni ile başvuran bu olguda BH, TSH ve PRL eksikliği saptanmış olup radyolojik değerlendirilmesinde AHH saptanmıştı. Bu olguda, ÇHHE'ye ek olarak 14 yaşında testis hacminin 25 ml üzerinde saptanması nedeniyle *IGSF1* geni klinik olarak ön tanıda yer almıştır.

IGSF1 eksikliği tanısı alan diğer olgumuzda c.3375G>A/p.(Trp1125*) varyantı saptanmıştır. Bu değişim, literatürde daha önce tanımlanmamıştır. Toplum veri tabanlarında nadir olması ve anlamsız tipte bir değişim olduğu için protein trunkasyonuna neden olarak patojenik etkisi öngörüldüğü için hastalık ilişkili kabul edilmiştir. Bu olguda TSH ve prolaktin eksikliği saptanmıştı. Hipofiz MR ise normal idi.

IGSF1 genindeki işlev kaybı varyantları X'e bağlı santral hipotiroidizme neden olur ve santral hipotiroidizmin en yaygın genetik nedenidir. IGSF1 eksikliği ilk kez Sun ve ark. tarafından kompleks bir fenotipte karakterize edilmiş olup, bu fenotipte olguların tamamında TSH eksikliği mevcuttur (141). Daha geniş bir seride ise, bu fenotipe çocuklukta geçici kısmi BH eksikliği, prolaktin eksikliği, yetişkinlikte saptanan artmış IGF-1 seviyeleri, erken testiküler büyüme ile kontrast oluşturan gecikmiş testosteron artışı ve geç adrenarş, yetişkin evrede saptanan makroorşidizm ve artmış vücut kitle indeksi ile ilişkilendirilmiştir (142, 143).

GHSR, yedi transmembranlı, G proteinine bağlı bir proteindir ve fosfolipaz C'yi aktive ederek serbest iyonize kalsiyum artışını ve somatotrop hücrelerden BH salınımını uyarır. Bu reseptörün endojen ligandı 1999 yılında keşfedilmiş ve ghrelin olarak adlandırılmıştır. Ghrelin, mide tarafından salgılanan 28 amino asitlik bir peptid hormonudur ve plazmada asetile veya desasetile ghrelin olarak bulunur. Ghrelinin, BH

salgısı, iştah ve yağ birikimi üzerindeki etkileri ile bilinirken, ek olarak prolaktin, ACTH, LH ve TSH salgılanmasının düzenlenmesi gibi endokrin işlevlerini de kolaylaştırdığı hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Ghrelin, ayrıca gonadotropin sekresyonunu hem hipotalamik hem de doğrudan hipofiz etkileriyle düzenler. (144). Çalışmamızda, *GHSR* geninde heterozigot c.931C>T/p.(Leu311Phe)/ rs770465500 değişimi saptanmıştır. ACMG sınıflamasına göre önemi belirsiz varyant karakterinde olan bu değişim *in silico* analiz yöntemlerinde çoğunlukla patojenik etkili olarak bildirilmiş olup gnomADv4.1'de sıklığı %0.0004956 olup oldukça nadir bir varyanttır. Bu varyantı annesinin taşımadığı gösterilmekle birlikte babada analiz yapılamamıştır. OMIM veri tabanında *GHSR* (MIM*601898) geni, dominant ve resesif kalıtım özelliğinde bildirilmiş olup fenotipi izole parsiyel BH eksikliği ve AHH olarak tanımlanmıştır. Bu olguda, BH eksikliği yanında inmemiş testis, HH gibi bulguların olması *GHSR* geninin fenotiple ilişkisini ortaya koymak için segregasyon analizinin genişletilmesi ve ailedeki bireylerin klinik ve biyokimyasal olarak ileri değerlendirilmesini ve ek analizleri gerektirmektedir. Literatürde BH eksikliği dışında ön hipofiz hormon eksikliğinin eşlik ettiği *GHSR* varyantları henüz bildirilmemiş olsa da bizim olgumuz gibi olguların bu açıdan sorgulanması ve çalışmaların ilerletilmesi gerekmektedir.

ÇHHE YND panelinde, iki olguda *PROKR2* geninde c.518T>G/p.(Leu173Arg) varyantı heterozigot olarak saptanmış olup olgular klinik ve genetik özellikleri ile yayımlanmıştır (145). Literatürde daha önce tanımlanmış olan bu varyant toplum veri tabanlarında sık bildirilmiştir (gnomAD 152,244 allelin 322'sinde; *Turkish Variome*'da 6722 allelin 24'ünde) ve homozigotluğu ise nadir olarak bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda, bu gendeki varyantlara başka ilişkili yolak genlerde patojenik varyant eşlik ettiğinde digenik olarak patojen özelliği gösterdiği bildirilmiştir (110). Digenik kalıtım özelliğinin gösterilmesi adına mevcut koşullarda bu olgulara TED gibi ileri analizler yapılamadığı için bu konuda yorum yapılamamaktadır. Daha önce tanımlı ve HH ile ilişkilendirilmiş olan ve ClinVar'da patojenitesi konusu çelişkili olan *PROKR2* genindeki bu varyantın olgularda kliniği tek başına net açıklayamadığı düşünülmektedir. HGMD veri tabanında hastalık yapıcı mutasyon olarak bildirilmiş bu varyantın tek başına patojenik etkisinin ileri çalışmalar ile sorgulanması önemlidir.

İzole BH eksikliği (edinsel veya kalıtsal), çocukluk çağında gözlenen en sık hipofiz hormon eksikliğidir ve belirtisi boy kısalığıdır (146). Konjenital izole BH eksikliği olgularında genetik faktörlerin rolü giderek daha önemli hale gelmektedir. İzole *GH1, GHRHR* ve hipofiz gelişimindeki transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki ilişkiler nadiren görülmektedir, bu da başka bilinmeyen faktörlerin de etkili olduğunu düşündürmektedir. BH eksikliğinin genetik formları izole BH eksikliği veya ÇHHE'nin bir bileşeni olarak ortaya çıkabilir. Sporadik veya ailesel formlarda, otozomal resesif (tip IA ve IB), otozomal dominant (tip II) ve X'e bağlı (tip III) olmak üzere çeşitli kalıtımlarla ortaya çıkar. Özellikle tip II izole BH eksikliğinde ÇHHE'nin laboratuvar bulguları gözlenebilmektedir (146, 147).

Ağır BH eksikliği veya direncin karakteristik fenotipi kraniyofasiyal orantısızlık, frontal belirginlik, trunkal obezitedir. Kohortumuzdaki genetik olarak izole BH eksikliği tanısı almış tüm olgularda bu fenotip değişken derecelerde gözlenmiştir(148).

Literatürde, boyu -4,5 SDS'nin altında olan ve izole BH eksikliği saptanan olgularda *GH1* veya *GHRHR* genlerinin sıklığı %20 olarak bildirilmiştir (149). Çalışmamızda olguların başvuruda boy SDS değerleri de, annesindeki klinik BH eksikliği tanısı nedeniyle oldukça erken başvuran bir olgu hariç, -4,5 SDS'nin altında idi.

İzole BH eksikliği tip I, diğer hipofiz hormonları normalken BH eksikliği ile karakterizedir. En ağır tip olan IA'da, yenidoğan, süt çocukluğu döneminde hipoglisemi ve altı aylıktan itibaren fark edilen şiddetli büyüme geriliği gözlenir. Genel olarak, şiddetli boy kısalığı ile başvuran izole BH eksikliği olan olguların yaklaşık %10-15'inde *GH1* geninde delesyonlar olduğu bildirilmektedir (150). Büyük delesyonlar yanında çerçeve kayması ve anlamsız tipte *GH1* varyantları da tip IA'da tespit edilmiştir. Çalışmamızda homozigot anlamsız varyant ve homozigot tüm gen delesyonu olan olgular tip I, heterozigot kırpılma bölgesi varyantı taşıyan olgu ise tip II olarak sınıflandırılmıştır.

Çalışmamızda iki aileden 3 olguda *GHRHR* geninde daha önce tanımlanmamış varyant saptanmıştır. *GHRHR* (MIM#139191) genindeki biallelik patojenik varyantların izole BH eksikliği tip 1 (*GH1* ve *GHRHR*) ve tip IV'e neden olduğu bilinmektedir. Tip IV erken başlangıçlı ve şiddetli büyüme geriliği ile karakterize edilen bir durumdur. Etkilenen olguların BH uyarı testlerinde zirve yanıt değerleri ile IGF1 ve IGFBP3

düzeyleri oldukça düşüktür. (146, 151). Günümüze dek HGMD veri tabanında *GHRHR* geninde 89 patojenik varyant bildirilmiştir (yanlış anlamlı/anlamsız:55, *splice-site*:15, büyük delesyon:5)(136).

Hipopitüitarizm etiyolojisinde son yıllarda tanımlanan *RNPC3* geni, özgün bulguları ile karşımıza çıkmaktadır. Biallelik *RNPC3* varyantları ile ilişkili KH olgularının özellikleri gelişimsel gecikme, zihinsel yetersizlik, konjenital katarakt, polinöropati ve primer over yetersizliği yer almaktadır. *RNPC3*, RNA kırpılma mekanizmaları ile RNA'nın matürasyonuna katılan U12 tipi *spliceosome* kompleksinin bir bileşeni olan U11/U12-65K proteinini kodlar. Kırpılma sırasında, intronlar *spliceosome* tarafından pre-mRNA'dan ayrılır. *Spliceosome* bileşenleri, kırpılma faktörlerindeki mutasyonlar pre-mRNA işlenmesinde kusurlara yol açar (152-154). Bu çalışmada, BH, TSH, prolaktin eksikliği olan ve polinöropati tanısı ile izlenen 3 aileden 5 olguda *RNPC3* ilişkili KH tanısı konmuştur.

Son çalışmalara göre, *RNPC3* ile ilişkili KH, görece yeni bir durum olup fenotipik spektrumu hâlâ genişlemektedir (153, 155). Argente ve ark., bileşik heterozigot *RNPC3* varyantlarının şiddetli izole BH eksikliği ve AHH ile ilişkisini ilk olarak tanımlamıştır (154). Benzer şekilde, olgularımızda da ağır büyüme geriliği mevcuttu.

RNPC3 patolojileri izole BH eksikliği nedeni olarak bildirilmiş; ancak, hasta verileri yeniden değerlendirildiğinde, düşük-normal prolaktin konsantrasyonları da gözlemlenmiş ve bu durum KH'yi düşündürmüştür. Daha sonra, Verberne EA ve ark. üç kardeşte BH eksikliği, santral hipotiroidi, doğumsal katarakt, gelişimsel gecikme/zihinsel yetersizlik ve gecikmiş ergenlik bildirmiştir (156). Olgularımızda da özel eğitim gerektiren hafif ile orta derecede gelişimsel gecikme ve zihinsel yetersizlik mevcuttu. Verberne ve ark.'nın çalışmasındaki iki olguda HH nedeniyle gecikmiş ergenlik bildirilmiş; ancak, gonadotropin düzeylerine dair laboratuvar sonuçları bildirilmemiştir. Gonadotropin eksikliği, *RNPC3* ile ilişkili KH'nin bir özelliği değildir; çoğu olguda hipergonadotropik hipogonadizm tespit edilmiştir (153). Erkeklerde ise normal ergenlik süreci ve normal gonadotropin düzeyleri mevcut olup önceki yayınlarda erkeklerde gecikmiş ergenlik saptanmamıştır. Yakın tarihli bir çalışmada, Argente ve ark.'ı olguları yeniden değerlendirmiş ve kohortlarındaki kadın olgularda ileri yaşlarda hormon replasmanı gerektiren over yetersizliği gözlenebileceğini

bildirmişlerdir (153, 154). Bizim olgularımızda spontan menarş gözlenmiş olup henüz over yetersizliği tespit edilmemiştir.

Akin ve ark. tarafından bildirilen *RNPC3* varyantlarının saptandığı dört hastada polinöropati bildirilmiştir (153). Bezen ve ark. tarafından yapılan sonraki bir çalışmada, olgunun ölümü nedeniyle polinöropatiyi ENMG ile doğrulayamamışlardır. Ancak, klinik bulgulara dayanarak hastalarında polinöropati olduğunu öne sürmüşlerdir (157). *RNPC3* ile ilişkili KH'deki polinöropatinin patofizyolojisi henüz net değildir. Nöropati olgularının en küçüğü 5 yaşında olup, bazı hastaların yetişkinlik döneminde nöropati tanısı aldığı bildirilmiştir. Bizim olgularımız gibi, bu hastalar da geçmişlerinde stepaj yürüyüşü ve sık düşmeler yaşamışlardır.

Verberne ve ark.'nın çalışmasında, *RNPC3* genindeki p.(Gln18*) ve p.(Gly148Ala) varyantları için bileşik heterozigot olan tüm üç hastada katarakt bildirilmiştir (156). TED analizi, bu kohortta doğumsal kataraktlarla ilişkili bilinen herhangi bir gen kusuru ortaya çıkarmamış; dolayısıyla, hastalarındaki doğumsal kataraktın *RNPC3* varyantlarından kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Aslında, doğumsal kataraktların *RNPC3* kusurlarının fenotipik spektrumuna dahil edilmesi için daha fazla veri gerekmektedir. Olgularımızın oftalmolojik muayenesi normal bulunmuştur.

Bugüne kadar *RNPC3* geninde çerçeve kayması (n = 2), anlamsız (n = 3), kırpılma- bölgesi (n = 1) ve yanlış anlamlı (n = 5) varyant bildirilmiştir (136). Polinöropati sırasıyla homozigot ve bileşik heterozigot varyantlarda tespit edilmiştir; p.(Leu483Phe), p.([Pro474Thr]; [Arg502*]), ve p.([Pro474Thr]; [Pro474Leufs*10]). Çok yakın zamanda, homozigot p.(Tyr443Cys) varyantının da klinik verilere göre polinöropatiye neden olduğu öne sürülmüştür (157). Dolayısıyla, bu sınırlı bilgiyle *RNPC3* ile ilişkili KH'deki nöropatinin patofizyolojisini tanımlamak zordur.

Bugüne kadar varyant türüne göre fenotipik bir farklılık tespit edilmemiştir. Yanlış anlamlı p.(Leu483Phe) varyantı için işlevsel analizler, embriyogenez sırasında gelişen hipotalamus-hipofiz ekseninde *RNPC3* ifadesini göstermiş ve over yetersizliği ile *RNPC3* varyantları arasındaki ilişkiyi sorgulamıştır. Bununla birlikte, retrospektif olarak analiz edildiğinde, farklı varyantlara sahip daha önce bildirilen olgularda over yetersizliği ve nöropati gibi yeni fenotipler tanımlanmıştır.

İnsan U11/U12-65K proteini bir N ve C-terminal RRM ve merkezi olarak konumlanmış bir prolin zengin bölge içerir. Çoğu dizi korunumu RRM'ler içinde yer alır, özellikle C-RRM daha yüksek homoloji sergiler. Tüm olgularımızda saptanan p.(Pro162Ser) varyantı bu alanlarda lokalize değildir, ancak *M. musculus, X. laevis* ve *A. thaliana* ile aynı kalıntılara yerleştirilmiştir (115). RNPC3 proteini ve mutant p.(Pro162Ser) için üç boyutlu protein modeli, hem vahşi tip allel hem de mutant allelin proteinin iç kısımda düzensiz bölgesinde, yani N-RRM'den sonraki 60 kalıntıda (27-102 kalıntıları) yer aldığını ortaya koymuştur. Bu iki form karşılaştırıldığında, protein fonksiyonuna zarar verdiği tahmin edilen büyük bir konformasyonel değişiklik tespit edilmiştir.

Olgularımız ayrıca *RNPC3*'ün biallelik ifade kaybının tedaviye yanıt veren ciddi büyüme yetersizliği, nöropati ve zihinsel yetersizlik ile KH'ye neden olduğunu göstermiştir. Hormonal profil ve endokrin olmayan özellikler açısından heterojenite de tanımlanmıştır. *RNPC3* varyantlarının spektrumunu belirlemek ve genotip-fenotip korelasyonunu tanımlamak için daha fazla olguya ve işlevsel analizlere ihtiyaç vardır.

GLI2 genindeki monoallelik patojenik varyantlar Culler-Jones sendromu ve HPE tip 9 ile ilişkilendirilmiştir. Culler-Jones sendromunda polidaktili, yarık dudak-damak, AHH ve ENH birlikte ÇHHE gözlenebilmektedir. *GLI2*, SHH sinyal yolağının bir transkripsiyon faktörü bileşenini kodlar, HPE ve diğer orta hat nörogelişimsel anomalilerin etiyolojisinde rol oynar. Özellikle HPE'ye neden olduğu tanımlanan *SHH*'nin aksine, *GLI2* orta hat beyin anomalileri olmadan da KH ile de ilişkilidir ve Culler-Jones sendromuna yol açar. Bu olgularda, değişken derecede polidaktili, yarık dudak/damak, AVP eksikliği, dismorfik özellikler ve ENH'ye ek olarak izole BH eksikliğinden ÇHHE'ye kadar değişken fenotip gözlenebilir. Pedigriler içinde fenotipik değişkenlik belirgin olabilir ve eksik veya değişken penetrans da gözlenebilir (158). Çalışmamızda benzer etkilenmiş iki kardeşin *duo* TED analizi ile incelenmesinde çerçeve kaymasına neden olan daha önce tanımlı bir *GLI2* varyantı tespit edilmiş olup indekste ÇHHE ve polidaktili mevcutken etkilenmiş kardeşte polidaktili yoktu. Olguların hipofiz MR'ında AHH ve ENH saptanmıştır. Polidaktilisi olan annede de bu varyantın saptanmış olması değişken ekspresyona örnek teşkil etmektedir. Annenin akrabalarında polidaktili başka olguların varlığı tespit edilmiş ve bu bireylerin hipofiz fonksiyonlarının değerlendirilmesi ve segregasyon analizinin genişletilmesi

planlanmıştır. *Trio* TED ile *GLI2* geninde heterozigot *de novo* p.(Arg479*) varyantı saptanan olguda ise ön hipofiz hormonlarının tümünün eksikliği ile tek santral kesici diş ve yarık dudak mevcuttu. Hipofiz MR'da ise AHH dışında ek patoloji gözlenmemişti.

SMCHD1, multipl genomik lokusun DNA metilasyonunu düzenleyen ve X inaktivasyon mekanizmalarında rolü olan bir gendir (159). Son çalışmalar *SMCHD1*'in maternal olarak sessizleştirilmiş *(imprinted*) olduğunu göstermiştir (160). *SMCHD1* geni, dominant kalıtımda *Bosma Arhinia Mikroftalmi* sendromuna yol açmaktadır. Kinjo ve ark., burun gelişimi normal ve bilinen herhangi bir nedensel gende patojenik varyant bulunmayan 43 ÇHHE olgusunda *SMCHD1* gen varyantlarını araştırmış ve hafif zihinsel yetersizliğin eşlik ettiği ÇHHE'li (BH, ACTH, TSH ve gonadotropin eksikliği) bir olguda *SMCHD1* varyantı (c.1192G>A/p.(Asp398Asn)) tanımlamışlardır. Göz ve burun yapıları normal olan bu olguda adenohipofiz agenezisi, ENH ve optik sinir hipoplazisi saptanmıştı (161, 162).

Çalışmamızda solo TED analizinde *SMCHD1* geninde heterozigot yanlış anlamlı varyant saptandı. Bu varyant ACMG kriterlerine göre önemi belirsiz varyant (VUS) kategorisinde olup *in silico* analizleri çelişkilidir. Toplum veri tabanlarında daha önce bildirilmemiştir. Bu varyant sağlıklı annede saptanmamıştır; ancak, babada segregasyon analizi yapılamamıştır. Olgumuzda ÇHHE ve PSIS olması ve dominant kalıtılan *SMCHD1* varyantları için eksik penetrans bildirilmesi, literatürde ise HH ve ÇHHE tanımlanması nedeni ile bu olguda *SMCHD1* ilişkili KH açısından segregasyon analizinin genişletilmesi planlanmıştır.

ROBO1 geni varyantlarının resesif kalıtımda konjenital nistagmus ve nörookulorenal sendroma, dominant kalıtıldığı takdirde ise izole hipopituitarizm veya ÇHHE tip 8'e neden olduğu bildirilmiştir. Literatürde biallelik *ROBO1* gen varyantlarının da ÇHHE'ye neden olduğu gösterilmiştir (163). *ROBO1*'in PSIS'e neden olduğu yakın zamanda bildirilmiş olsa da KH'deki prevalansı henüz tam olarak bilinmemektedir (66). Bununla birlikte, *ROBO1* işlev kaybının eksik penetransı, varyantların ve özellikle yanlış anlamlı varyantların yorumlanmasını zorlaştırabilir.

Günümüze dek HGMD profesyonelde (Haziran-2024) *ROBO1* geninde toplam 70 varyant bildirilmiştir. Bunlardan 54'ü yanlış anlamlı/anlamsız özellikte varyantlar olup sadece 4'ü PSIS ile ilişkilendirilmiştir. *ROBO1* varyantları konjenital kalp anomalisi, üriner sistemin konjenital anomalileri ile de sıkça ilişkilendirilmiştir (136).

ROBO1 sinyalizasyonunun PSIS'e yol açma mekanizması tam olarak bilinmemektedir, ancak Notch etkili gen olan *Hes1*'in rol oynayabileceği düşünülmektedir. Gelişim sırasında, *Hes1*'in ifade edilmesi, hipofiz hücre farklılaşması için susturulmalıdır. *Hes1 null* embriyolar arka hipofiz lobundan yoksundur ve hipotalamik aksonların yönlendirilmesinde sorunlar yaşar. Robo1'in Hes1'in transkripsiyonunu modüle ederek nörogenezi düzenlediği bilinmektedir. Ancak, *ROBO1* mutasyonlarının Notch/Hes1 sinyalizasyonunu etkileyip etkilemediği veya PSIS'e başka bir yolakla mı neden olduğu henüz belirlenmemiştir (77).

Çalışmamızda, PSIS ve ÇHHE olan bir olguda solo TED'de *ROBO1* geninde heterozigot önemi belirsiz bir varyant saptanmıştır. Etkilenmemiş olduğu düşünülen annede de varyantın saptanması değişken ekspresiviteyi de akla getirmektedir. Benzer şekilde, Bashamboo A ve ark., *ROBO1* varyantı saptanan iki ailede etkilenmemiş ebeveynlerin de varyantı heterozigot olarak taşıdığını bildirmiştir. Bu durum, daha önceki gözlemlerle benzerdir (129, 164).

ALDH18A1 genindeki varyantlar prolin sentezinde bozukluğa yol açar ve kutis laksa, spastik parapleji 9A ile ilişkilidir (165). KKA eşlik edebilmektedir. KKA'da hipopituitarizm görülebilmektedir. Kutis laksa ve BH eksikliği birlikteliği de bildirilmiştir (165). Çalışmamızda birinci derece kuzen evliliği olan ÇHHE, otizm, epilepsi, nistagmus, KKA ve periventriküler heterotropi nedeni ile izlenen bir olguda, ÇHHE panel testi, mikroarray analizi ve Prader Willi sendromu açısından MS-MLPA testleri normal saptanmıştır. Olguda obezite, deride ekimotik lezyonlar ve lenfödem kuşkusu mevcuttu. *Solo* TED analizi ile değerlendirilmiş, *ALDH18A1* geninde heterozigot yanlış anlamlı bir varyant saptanmıştır. *ALDH18A1* genindeki bu varyant toplum veri tabanlarında oldukça nadirdir ve i*n silico* tahmin yöntemlerinde yüksek oranda patojenik olarak bildirilmişti.

ÇHHE, ekstremite anomalisi, kamptodaktili, polidaktili, portal ven trombozu, işitme kaybı, zihinsel yetersizlik tanıları ile izlenen bir olguda çalışmamızda solo TED analizinde *MFHAS1* geninde homozigot sinonim bir varyant saptandı. Segregasyon analizinde bu varyant için anne ve baba heterozigot sağlıklı kardeşi de heterozigot saptandı. *MFHAS1* geninin OMIM veri tabanında bilinen fenotipi olmamakla birlikte literatürde ERI1 ve MFHAS1 genlerini içeren 8p23.1 bölgesinde küçük bir homozigot mikrodelesyonun saptandığı bir erkek olguda zihinsel yetersizlik ve gelişimsel gecikme

gözlenmiştir. Boy kısalığı, dismorfik yüz özellikleri, ekstremite anomalileri, pitoz ve ASD gibi anomalilerin de eşlik ettiği bildirilmiştir. Kalıtım şekli, taşıyıcı olan kardeşler ve ebeveynlerin etkilenmemesi nedeniyle otozomal resesif olarak öngörülmüştür. Bu bulgular önemli olmakla birlikte, olgudaki bulguların yalnızca ERI1'in, yalnızca MFHAS'ın ya da her iki genin işlev kaybına mı bağlı olduğu net değildir. ERI1 geninde varyant saptanan başka bir olguda ise zihinsel yetersizlik ve distal ekstremite anomalisi gözlenmesi, bu ortak fenotiplerin büyük olasılıkla ERI1 gen delesyonundan kaynaklandığını ve MFHAS1 gen delesyonundan kaynaklanmadığını önermektedir (118, 166).

Bir indeks olgumuzda TED analizinde *DHX29* geninde c.4110A>G p.(Ter1370Trpext*2) rs1469972493 varyantı homozigot olarak saptanmıştır. *DHX29* geni, hücresel büyüme ve protein sentezi gibi önemli biyolojik süreçlerde rol alan bir ATP bağımlı RNA helikazdır. Bu genin patojenik varyantları, protein sentezini etkileyebilir. Bu tür bir 'dur' kodon değişikliği ve uzatmanın genellikle protein fonksiyonunu ciddi şekilde etkileyebileceği öngörülmektedir. OMIM veri *DHX29* geni ile ilişkilendirilmiş bir fenotip bulunmamaktadır. *DHX29* geninin böbrek medullası ve beyinde serebellar hemisferleri ve hipofizde ifadesinin olduğu bilinmektedir (145).

Son yıllarda hedefli gen panelleri ve TED gibi yöntemlerin kullanımına rağmen KH olgularının yaklaşık %85'inin genetik etiyolojisi hala aydınlatılamamaktadır. Çalışmamızda hedefli panel, MLPA, KED, TED ve iki benzer etkilenmiş olguda TGD olma üzere olanaklar ve bütçe dahilinde çeşitli genetik testlerin etiyolojiye katkısı değerlendirilmiştir. Literatürde ailevi olgularda *PROP1* varyantları en sık bildirilse de çalışmamızda ailevi olgularda *LHX3* ve *RNPC3* genlerinde patojenik varyantlar daha sık saptanmıştır.

On biri *solo* TED olmak üzere 15 indekste yapılan TED analizinde altı olguda daha önce ÇHHE ile klinik ilişkisi olduğu bildirilen genlerde varyant saptanması tanı oranımızı %40'lara ulaştırmaktadır. Martinez-Mayer J ve ark. ise 137 indeks olguya solo TED analizi yapmış ve bu olgulardan %19,1'nde bilinen genlerde %16'sında ise yeni genlerde patojenik veya olası patojenik varyant tespit etmiştir. Ek olarak, %28.2 oranında da önemi belirsiz varyant saptanmıştır. Bu oranlarda ayrıntılı aday gen listelerinin oluşturulması (örneğin hayvan modellerinde bildirilen), yeni biyoinformatik

iş akışı yöntemlerinin eklenmesi (yüksek pLI olan genlerin incelenmesi) ve CNV analizinin önemi vurgulanmıştır (119).

Klinik bulguları çeşitli ve ağır olan olguların veya *trio* TED analizi ile değerlendirilen araştırmalar en yüksek tanı oranlarına sahiptir (167-169). Gregory LC ve ark.'nın çalışmasında oldukça geniş bir ÇHHE kohortu (N = 1765) Sanger dizileme ve YND (51 ailede; TED, az sayıda olguda TGD) ile genetik etiyoloji ile araştırılmış ve sonuçta tüm kohortun %10'nda (178/1765) genetik etiyoloji saptanabilmiştir (170).

Mevcut genomik yaklaşımların KH olgularının büyük çoğunluğunda başarısızlığı birkaç konuyu gündeme getirmektedir. Hipofiz (veya hipotalamik) genlerin ifade düzeyini etkileyen kodlamayan varyantların varlığı olasıdır; ancak, bunlar TGD kullanılarak ve büyük analiz zorlukları ile karşılaşarak saptanabilmektedir. Bazı varyantların, farklı popülasyonlarda, bu popülasyonların farklı genetik altyapılarının varyant ifadesini etkilemesi nedeniyle penetrans farklı olabilir. Arjantin'de KH üzerine yapılan bir çalışmada gözlemlenen bazı (veya birçok) varyantlar, ABD Beyaz, ABD Afro-Amerikan, Avrupa, Asya veya Türk hastalarda gözlemlenenlerden özellik veya sıklık açısından farklı olabilir (119, 171).

KH'nin etiyolojisi yalnızca monogenik nedenlere bağlı olmayabilir (172). Aslında, birçok KH olgusunda neden genetik ve çevresel faktörlerin etkileşiminden kaynaklanan oligogenik, poligenik veya hatta multifaktöriyel bir yapı olarak düşünülmektedir. Bu durumda, allelik karşılaştırmalar için büyük olgu ve kontrol kohortlarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Nedensel varyantlar nadir veya yaygın olabileceğinden, bir hastalığın poligenik yapısını çözmek genellikle binlerce örnekte genomik çalışmaları gerektirir, bu da KH için ulaşılması zor bir değer gibi görünmektedir. Kalıtsal olmayan epigenetik varyasyonun gen-çevre etkileşiminden kaynaklandığı bilinmektedir. Dikkat çekici bir şekilde, fetal yaşam, spesifik doku seviyelerinde hücre farklılaşması ve proliferasyonu ile ilişkili gelişimsel olayların aktif epigenetik düzenlemesinin olduğu bir dönemdir ve bu, hipotalamus ve hipofiz bezini de içerebilir. KH patogenezinin karmaşıklığı, araştırmacıları TED'in ötesine geçip farklı yöntemlerle çalışmaktan vazgeçirmemelidir (171).

Teknolojilerde ilerlemeler ile TED veya TGD sonucu saptanan önemi belirsiz bir varyantın hipofiz fonksiyonlarına gerçek katkısını belirlemenin hem daha kolay hem de daha net hale geleceği öngörülmektedir. Hasta fibroblastları, hastadan türetilmiş

pluripotent kök hücreler veya *CRISPR-Cas9* gen düzenleme yöntemiyle *knock-out* hücre hatları kullanılarak yapılan işlevsel analizler, KH'nin altında yatan patofizyolojiyi tanımlamaya yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak, çeşitli tekniklerin kullanımı ile moleküler etiyoloji, toplamda kohortumuzun %21,2'sinde belirlenebilmiştir. Bu oran, henüz tanımlanmamış yolakların, epigenetik faktörlerin ve çevresel etkilerin de ÇHHE patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Kaiser U, Ho KKY. Pituitary Physiology and Dignostic Evaluation. İçinde Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM. Williams Textbook of Endocrinology. Elsevier; 2016. pp. 176-231.

2. Cullingford DJ, Siafarikas A, Choong CS. Genetic Etiology of Congenital Hypopituitarism. 2023 Feb 5. İçinde: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trence DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–.

3. Gregory LC, Dattani MT. The molecular basis of congenital hypopituitarism and related disorders. J Clin Endocrinol Metab. 2020;105:dgz184.

4. Fang Q, George AS, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Gergics P, Cheung LY, ve ark. Genetics of combined pituitary hormone deficiency: Roadmap into the genome era. Endocr Rev. 2016;37:636-675.

5. Castinetti F, Reynaud R, Quentien MH, Jullien N, Marquant E, Rochette C, ve ark. Combined pituitary hormone deficiency: Current and future status. J Endocrinol Invest. 2015;38:1-12.

6. Jorge AAL, Grinberg A, Dattani MT, Baron J. Disorders of child growth.. İçinde Sperling MA, Majzoub JA, Menon RK, Stratakis CA. Sperling Pediatric Endocrinology Elsevier; 2021. pp. 299-355.

7. Sawday J. The Fabrica Remade: A new translation of the De Humani Corporis Fabrica Libri Septem (1543, 1555) of Andreas Vesalius. Isis. 2015;106:677-683.

8. Arráez-Aybar LA, Navia-Álvarez P, Fuentes-Redondo T, Bueno-López JL. Thomas Willis, a pioneer in translational research in anatomy (on the 350th anniversary of Cerebri anatome). J Anat. 2015;226:289-300.

9. Harris GW. Neural control of the pituitary gland. Physiol Rev. 1948;28:139-79.

10. Gan HW, Alatzoglou KS, Dattani MT, İçinde: Dattani MT, Brook CGD. Brook's Clinical Pediatric Endocrinology. Wiley; 2020. pp.133-198.

11. Oberfield SE, Gallagher MP, Hale DE. Endocrinology. İçinde: Polin RA, Ditmar MF, editors. Pediatric Secrets. Philadelphia: Mosby; 2011. p. 197-228.

12. Choe CH, Cornblath WT. Orbital signs of parasellar syndromes. İçinde: Servat JJ, Black EH, Nesi FA, Gladstone GJ, Calvano CJ.. Smith and Nesi's Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 667-87.

13. Cironi KA, Decater T, Iwanaga J, Dumont AS, Tubbs RS. Arterial supply to the pituitary gland: A comprehensive review. World Neurosurg. 2020;142:206-211.

14. Rizzoti K, Lovell-Badge R. Early development of the pituitary gland: Induction and shaping of Rathke's pouch. Rev Endocr Metab Disord. 2005;6:161-172.

15. Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. Trends Genet. 1999;15:236-240.

16. Alatzoglou KS, Gregory LC, Dattani MT. Development of the pituitary gland. Compr Physiol. 2020;10:389-413.

17. Pérez Millán MI, Cheung LYM, Mercogliano F, Camilletti MA, Chirino Felker GT, Moro LN, ve ark. Pituitary stem cells: Past, present and future perspectives. Nat Rev Endocrinol. 2024;2:77-92.

18. Bosch IAL, Katugampola H, Dattani MT. Congenital hypopituitarism during the neonatal period: Epidemiology, pathogenesis, therapeutic options, and outcome. Front Pediatr. 2020;8:600962.

19. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: Signaling and transcriptional networks. Physiol Rev. 2007;87:933-963.

20. Kelberman D, Dattani MT. The role of transcription factors implicated in anterior pituitary development in the aetiology of congenital hypopituitarism. Ann Med. 2006;38:560-577.

21. Matsumoto R, Takahashi Y. Human pituitary development and application of iPSCs for pituitary disease. Cell Mol Life Sci. 2021;78:2069-2079.

22. Davis SW, Mortensen AH, Camper SA. Birthdating studies reshape models for pituitary gland cell specification. Dev Biol. 2011;352:215-227.

23. Davis SW, Ellsworth BS, Peréz Millan MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N, ve ark. Pituitary gland development and disease: From stem cell to hormone production. Curr Top Dev Biol. 2013;106:1-47.

24. Mehta A, Dattani MT. Developmental disorders of the hypothalamus and pituitary gland associated with congenital hypopituitarism. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2008;22:191-206.

25. Morishima A, Aranoff GS. Syndrome of septo-optic-pituitary dysplasia: The clinical spectrum. Brain Dev. 1986;8:233-239.

26. Patel L, McNally RJ, Harrison E, Lloyd IC, Clayton PE. Geographical distribution of optic nerve hypoplasia and septo-optic dysplasia in Northwest England. J Pediatr. 2006;148:85-88.

27. McCabe MJ, Alatzoglou KS, Dattani MT. Septo-optic dysplasia and other midline defects: the role of transcription factors: HESX1 and beyond. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25:115-124.

28. McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Tziaferi V, Gregory LC, Alatzoglou KS, Signore M, ve ark. Novel *FGF8* mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96:1709-1718.

29. Atapattu N, Ainsworth J, Willshaw H, Parulekar M, MacPherson L, Miller C, ve ark. Septo-optic dysplasia: antenatal risk factors and clinical features in a regional study. Horm Res Paediatr. 2012;78:81-87.

30. Garcia-Filion P, Borchert M. Prenatal determinants of optic nerve hypoplasia: review of suggested correlates and future focus. Surv Ophthalmol. 2013;58:610-619.

31. Kousa YA, du Plessis AJ, Vezina G. Prenatal diagnosis of holoprosencephaly. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2018;178:206-213.

32. Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. Orphanet J Rare Dis. 2007;2:8.

33. Hahn JS, Hahn SM, Kammann H, Barkovich AJ, Clegg NJ, Delgado MR, ve ark. Endocrine disorders associated with holoprosencephaly. J Pediatr Endocrinol Metab. 2005;18:935-941.

34. Obara-Moszyńska M, Budny B, Kałużna M, Zawadzka K, Jamsheer A, Rohde A, ve ark. CDON gene contributes to pituitary stalk interruption syndrome associated with unilateral facial and abducens nerve palsy. J Appl Genet. 2021;62:621-629.

35. Lichiardopol C, Albulescu DM. Pituitary stalk interruption syndrome: Report of two cases and literature review. Acta Endocrinol (Buchar). 2017;13:96-105.

36. Wang CZ, Guo LL, Han BY, Su X, Guo QH, Mu YM. Pituitary stalk interruption syndrome: From clinical findings to pathogenesis. J Neuroendocrinol. 2017;29(1).

37. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Mårtensson IL, ve ark. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. Nat Genet. 1998;19:125-133.

38. Kelberman D, Dattani MT. Genetics of septo-optic dysplasia. Pituitary. 2007;10:393-407.

39. Sajedi E, Gaston-Massuet C, Signore M, Andoniadou CL, Kelberman D, Castro S, ve ark. Analysis of mouse models carrying the I26T and R160C substitutions in the transcriptional repressor HESX1 as models for septo-optic dysplasia and hypopituitarism. Dis Model Mech. 2008;1:241-254.

40. Silva TS, Faucz FR, Hernández-Ramírez LC, Pankratz N, Lane J, Kay DM, ve ark. Whole Exome Sequencing in Patients With Ectopic Posterior Pituitary. J Endocr Soc. 2022;6:bvac116.

41. Thomas PQ, Dattani MT, Brickman JM, McNay D, Warne G, Zacharin M, ve ark. Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. Hum Mol Genet. 2001;10:39-45.

42. Newbern K, Natrajan N, Kim HG, Chorich LP, Halvorson LM, Cameron RS, ve ark. Identification of *HESX1* mutations in Kallmann syndrome. Fertil Steril. 2013;99:1831-1837.

43. Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:2907-2901.

44. Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, Fiedler Z, ve ark. Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. Hum Mol Genet. 2006;15:1413-1422.

45. Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, ve ark. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. J Clin Invest. 2006;116:2442-2455.

46. Laumonnier F, Ronce N, Hamel BC, Thomas P, Lespinasse J, Raynaud M, ve ark. Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. Am J Hum Genet. 2002;71:1450-1455.

47. Gregory LC, Gergics P, Nakaguma M, Bando H, Patti G, McCabe MJ, ve ark. The phenotypic spectrum associated with OTX2 mutations in humans. Eur J Endocrinol. 2021;185:121-135.

48. Lima Cunha D, Arno G, Corton M, Moosajee M. The spectrum of *PAX6* mutations and genotype-phenotype correlations in the eye. Genes (Basel). 2019;10:1050.

49. Hergott-Faure L, Borot S, Kleinclauss C, Abitbol M, Penfornis A. Pituitary function and glucose tolerance in a family with a PAX6 mutation. Ann Endocrinol (Paris). 2012;73:510-514.

50. Chassaing N, Causse A, Vigouroux A, Delahaye A, Alessandri JL, Boespflug-Tanguy O, ve ark. Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia. Clin Genet. 2014;86:326-334.

51. Brachet C, Kozhemyakina EA, Boros E, Heinrichs C, Balikova I, Soblet J, ve ark. Truncating *RAX* mutations: Anophthalmia, hypopituitarism, diabetes insipidus, and cleft palate in mice and men. J Clin Endocrinol Metab. 2019;104:2925-2930.

52. Gaston-Massuet C, McCabe MJ, Scagliotti V, Young RM, Carreno G, Gregory LC, ve ark. Transcription factor 7-like 1 is involved in hypothalamo-pituitary axis development in mice and humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:548-557.

53. Blum WF, Klammt J, Amselem S, Pfäffle HM, Legendre M, Sobrier ML, ve ark. Screening a large pediatric cohort with GH deficiency for mutations in genes regulating pituitary development and GH secretion: Frequencies, phenotypes and growth outcomes. EBioMedicine. 2018;36:390-400.

54. De Rienzo F, Mellone S, Bellone S, Babu D, Fusco I, Prodam F, ve ark. Frequency of genetic defects in combined pituitary hormone deficiency: A systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort. Clin Endocrinol (Oxf). 2015;83:849-860.

55. Ellsworth BS, Butts DL, Camper SA. Mechanisms underlying pituitary hypoplasia and failed cell specification in Lhx3-deficient mice. Dev Biol. 2008;313:118-129.

56. Xatzipsalti M, Voutetakis A, Stamoyannou L, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. Congenital hypopituitarism: Various genes, various phenotypes. Horm Metab Res. 2019;51:81-90.

57. Rajab A, Kelberman D, de Castro SC, Biebermann H, Shaikh H, Pearce K, ve ark. Novel mutations in *LHX3* are associated with hypopituitarism and sensorineural hearing loss. Hum Mol Genet. 2008;17:2150-2159.

58. Cohen E, Maghnie M, Collot N, Leger J, Dastot F, Polak M, ve ark. Contribution of *LHX4* mutations to pituitary deficits in a cohort of 417 unrelated patients. J Clin Endocrinol Metab. 2017;102:290-301.

59. Machinis K, Amselem S. Functional relationship between *LHX4* and *POU1F1* in light of the *LHX4* mutation identified in patients with pituitary defects. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:5456-5462.

60. Gregory LC, Humayun KN, Turton JP, McCabe MJ, Rhodes SJ, Dattani MT. Novel lethal form of congenital hypopituitarism associated with the first recessive *LHX4* mutation. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100:2158-2164.

61. França MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Otto AP, Correa FA, ve ark. Relatively high frequency of non-synonymous *GLI2* variants in patients with congenital hypopituitarism without holoprosencephaly. Clin Endocrinol (Oxf). 2013;78:551-557.

62. Wang Y, Martin JF, Bai CB. Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. Dev Biol. 2010;348:199-209.

63. Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillessen-Kaesbach G, ve ark. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:13424-13429.

64. Paulo SS, Fernandes-Rosa FL, Turatti W, Coeli-Lacchini FB, Martinelli CE, Jr., Nakiri GS, ve ark. Sonic Hedgehog mutations are not a common cause of congenital hypopituitarism in the absence of complex midline cerebral defects. Clin Endocrinol (Oxf). 2015;82:562-569.

65. Haddad-Tóvolli R, Paul FA, Zhang Y, Zhou X, Theil T, Puelles L, ve ark. Differential requirements for Gli2 and Gli3 in the regional specification of the mouse hypothalamus. Front Neuroanat. 2015;9:34.

66. Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Moussi N, McElreavey K, Brauner R. Mutations in the human ROBO1 gene in pituitary stalk interruption syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2017;102:2401-2406.

67. Vajravelu ME, Chai J, Krock B, Baker S, Langdon D, Alter C, ve ark. Congenital hyperinsulinism and hypopituitarism attributable to a mutation in *FOXA2*. J Clin Endocrinol Metab. 2018;103:1042-1047.

68. Dayem-Quere M, Giuliano F, Wagner-Mahler K, Massol C, Crouzet-Ozenda L, Lambert JC, ve ark. Delineation of a region responsible for panhypopituitarism in 20p11.2. Am J Med Genet A. 2013;161:1547-1554.

69. Giri D, Vignola ML, Gualtieri A, Scagliotti V, McNamara P, Peak M, ve ark. Novel *FOXA2* mutation causes hyperinsulinism, hypopituitarism with craniofacial and endoderm-derived organ abnormalities. Hum Mol Genet. 2017;26:4315-4326.

70. Tsai EA, Grochowski CM, Falsey AM, Rajagopalan R, Wendel D, Devoto M, ve ark. Heterozygous deletion of *FOXA2* segregates with disease in a family with heterotaxy, panhypopituitarism, and biliary atresia. Hum Mutat. 2015;36:631-637.

71. Gregory LC, Ferreira CB, Young-Baird SK, Williams HJ, Harakalova M, van Haaften G, ve ark. Impaired *EIF2S3* function associated with a novel phenotype of X-linked hypopituitarism with glucose dysregulation. EBioMedicine. 2019;42:470-480.

72. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, ve ark. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. Development. 1998;125:4835-4840.

73. Rodríguez-Contreras FJ, Marbán-Calzón M, Vallespín E, Del Pozo Á, Solís-López M, Lobato-Vidal N, ve ark. Loss of function *BMP4* mutation supports the implication of the BMP/TGF-β pathway in the etiology of combined pituitary hormone deficiency. Am J Med Genet A. 2019;179:1591-1597.

74. Webb EA, AlMutair A, Kelberman D, Bacchelli C, Chanudet E, Lescai F, ve ark. *ARNT2* mutation causes hypopituitarism, post-natal microcephaly, visual and renal anomalies. Brain. 2013;136:3096-3105.

75. Hietamäki J, Gregory LC, Ayoub S, Iivonen AP, Vaaralahti K, Liu X, ve ark. Loss-of-function variants in TBC1D32 underlie syndromic hypopituitarism. J Clin Endocrinol Metab. 2020;105:1748-1758.

76. Jadhav S, Diwaker C, Lila AR, Gada JV, Kale S, Sarathi V, ve ark. *POU1F1* mutations in combined pituitary hormone deficiency: Differing spectrum of mutations

in a Western-Indian cohort and systematic analysis of world literature. Pituitary. 2021;24:657-669.

77. Ward RD, Raetzman LT, Suh H, Stone BM, Nasonkin IO, Camper SA. Role of PROP1 in pituitary gland growth. Mol Endocrinol. 2005;19:698-710.

78. Böttner A, Keller E, Kratzsch J, Stobbe H, Weigel JF, Keller A, ve ark. *PROP1* mutations cause progressive deterioration of anterior pituitary function including adrenal insufficiency: a longitudinal analysis. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:5256-5265.

79. Raben MS. Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. J Clin Endocrinol Metab. 1958;18:901-903.

80. Blum WF, Alherbish A, Alsagheir A, El Awwa A, Kaplan W, Koledova E, ve ark. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in the diagnosis and treatment of growth disorders. Endocr Connect. 2018;7:212-222.

81. Steyn FJ, Ngo ST. Endocrine rhythms of growth hormone release: Insights from animal studies. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2017;31:521-533.

82. Alatzoglou KS, Turton JP, Kelberman D, Clayton PE, Mehta A, Buchanan C, ve ark. Expanding the spectrum of mutations in *GH1* and *GHRHR*: Genetic screening in a large cohort of patients with congenital isolated growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(9):3191-3199.

83. Tseretopoulou X, Mushtaq T. How to interpret IGF-1 and growth hormone stimulation tests. Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2020;105:311-314.

84. Alba M, Salvatori R. A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: A new model of isolated growth hormone deficiency. Endocrinology. 2004;145:4134-4143.

85. Wei S, Zhang M, Li Y, Yang W, Zhang C, Liu F, ve ark. Identification and functional analysis of first heterozygous frameshift mutation in the GHRH gene in a Chinese boy with isolated growth hormone deficiency. Gene. 2024;907:148283.

86. Wajnrajch MP, Gertner JM, Harbison MD, Chua SC, Leibel RL. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. Nat Genet. 1996;12:88-90.

87. Lin SC, Lin CR, Gukovsky I, Lusis AJ, Sawchenko PE, Rosenfeld MG. Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. Nature. 1993;364:208-213.

88. Tajima T, Nakamura A, Oguma M, Yamazaki M. Recent advances in research on isolated congenital central hypothyroidism. Clin Pediatr Endocrinol. 2019;28:69-79.

89. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002;30:e57.

90. Caspar SM, Dubacher N, Kopps AM, Meienberg J, Henggeler C, Matyas G. Clinical sequencing: From raw data to diagnosis with lifetime value. Clin Genet. 2018;93:508-519.

91. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74:5463-5467.

92. Ellard S, Charlton R, Yau S, Gokhale D, Taylor GR, Wallace A, ve ark. Practice guidelines for Sanger sequencing analysis and interpretation. ACGS, 2016. https://www.acgs.uk.com/media/10788/acgs_sanger_sequencing_bpg_update_2016.pdf (erişim tarihi 15.05.2024)

93. De Cario R, Kura A, Suraci S, Magi A, Volta A, Marcucci R, ve ark. Sanger validation of high-throughput sequencing in genetic diagnosis: Still the best practice? Front Genet. 2020;11:592588.

94. ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. Science. 2004;306:636-640.

95. Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. Semin Thromb Hemost. 2024. Online ahead of print.

96. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, ve ark. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. Biology (Basel). 2023;12:997.

97. Ke R, Mignardi M, Hauling T, Nilsson M. Fourth generation of next-generation sequencing technologies: Promise and consequences. Hum Mutat. 2016;37:1363-1367.

98. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. Nat Rev Genet. 2016;17:333-351.

99. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, ve ark. Comparison of next-generation sequencing systems. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:251364.

100. Raine A, Liljedahl U, Nordlund J. Data quality of whole genome bisulfite sequencing on Illumina platforms. PLoS One. 2018;13:e0195972.

101. Levy SE, Myers RM. Advancements in next-generation sequencing. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2016;17:95-115.

102. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends Genet. 2014;30:418-426.

103. Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: Single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. Genet Med. 2015;17:444-451.

104. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, ve ark. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. Genet Med. 2016;18:696-704.

105. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, ve ark. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. JAMA. 2014;312:1870-1879.

106. Vinkšel M, Writzl K, Maver A, Peterlin B. Improving diagnostics of rare genetic diseases with NGS approaches. J Community Genet. 2021;12:247-256.

107. Deveson IW, Hardwick SA, Mercer TR, Mattick JS. The Dimensions, dynamics, and relevance of the mammalian noncoding transcriptome. Trends Genet. 2017;33:464-478.

108. Merriman B, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. Electrophoresis. 2012;33:3397-417.

109. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, ve ark. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17:405-424.

110. Monnier C, Dodé C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, ve ark. *PROKR2* missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. Hum Mol Genet. 2009;18:75-81.

111. Joustra SD, Heinen CA, Schoenmakers N, Bonomi M, Ballieux BEPB, Turgeon MO, ve ark. IGSF1 deficiency: Lessons from an extensive case series and recommendations for clinical management. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101:1627-1636.

112. Kale S, Gada JV, Jadhav S, Lila AR, Sarathi V, Budyal S, ve ark. Genetic spectrum and predictors of mutations in four known genes in Asian Indian patients with

growth hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary: An emphasis on regional genetic diversity. Pituitary. 2020;23:701-715.

113. Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, ve ark. Mutations in *PROP1* cause familial combined pituitary hormone deficiency. Nat Genet. 1998;18:147-149.

114. Hamid R, Phillips JA, Holladay C, Cogan JD, Austin ED, Backeljauw PF, ve ark. A molecular basis for variation in clinical severity of isolated growth hormone deficiency type II. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94:4728-4734.

115. Yavas Abali Z, Gokpinar Ili E, Bas F, Ulak Ozkan M, Gulec Ç, Toksoy G, ve ark. A Novel RNPC3 gene variant expands the phenotype in patients with congenital hypopituitarism and neuropathy. Horm Res Paediatr. 2024;97:157-164.

116. Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, ve ark. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. Science. 2015;347:1254806.

117. Finn SB, Frew RA, Leibowitz R, Morse W, Manson-Hing L, Brunelle J. The effect of sodium trimetaphosphate (TMP) as a chewing gum additive on caries increments in children. J Am Dent Assoc. 1978;96:651-655.

118. Choucair N, Rajab M, Mégarbané A, Chouery E. Homozygous microdeletion of the ERI1 and MFHAS1 genes in a patient with intellectual disability, limb abnormalities, and cardiac malformation. Am J Med Genet A. 2017;173:1955-1960.

119. Martinez-Mayer J, Vishnopolska S, Perticarari C, Garcia LI, Hackbartt M, Martinez M, ve ark. Exome Sequencing has a high diagnostic rate in sporadic congenital hypopituitarism and reveals novel candidate genes. J Clin Endocrinol Metab. 2024. Online ahead of print.

120. Phillips JA, Cogan JD. Genetic basis of endocrine disease. 6. Molecular basis of familial human growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 1994;78:11-16.

121. Parkin K, Kapoor R, Bhat R, Greenough A. Genetic causes of hypopituitarism. Arch Med Sci. 2020;16:27-33.

122. Ellaway CJ, Silinik M, Cowell CT, Gaskin KJ, Kamath KR, Dorney S, ve ark. Cholestatic jaundice and congenital hypopituitarism. J Paediatr Child Health. 1995;31:51-53.

123. Cameron FJ, Khadilkar VV, Stanhope R. Pituitary dysfunction, morbidity and mortality with congenital midline malformation of the cerebrum. Eur J Pediatr. 1999;158:97-102.

124. Garcia-Filion P, Epport K, Nelson M, Azen C, Geffner ME, Fink C, ve ark. Neuroradiographic, endocrinologic, and ophthalmic correlates of adverse developmental outcomes in children with optic nerve hypoplasia: a prospective study. Pediatrics. 2008;121:e653-659.

125. Castets S, Thomas-Teinturier C, Villanueva C, Amsellem J, Barat P, Brun G, ve ark. Diagnosis and management of congenital hypopituitarism in children. Arch Pediatr. 2024;31:165-171.

126. Pampanini V, Pedicelli S, Gubinelli J, Scirè G, Cappa M, Boscherini B, ve ark. Brain magnetic resonance imaging as first-line investigation for growth hormone deficiency diagnosis in early childhood. Horm Res Paediatr. 2015;84:323-330.

127. Vergier J, Castinetti F, Saveanu A, Girard N, Brue T, Reynaud R. Diagnosis of Endocrine Disease: Pituitary stalk interruption syndrome: Etiology and clinical manifestations. Eur J Endocrinol. 2019;181:199-209.

128. Di Iorgi N, Allegri AE, Napoli F, Bertelli E, Olivieri I, Rossi A, ve ark. The use of neuroimaging for assessing disorders of pituitary development. Clin Endocrinol (Oxf). 2012;76:161-176.

129. Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Moussi N, McElreavey K, Brauner R. Mutations in the human ROBO1 gene in pituitary stalk interruption syndrome. J Clin Endocrinol Metabol. 2017;102:2401-2406.

130. Dominguez R, Aguirre Vila-Coro A, Slopis JM, Bohan TP. Brain and ocular abnormalities in infants with in utero exposure to cocaine and other street drugs. Am J Dis Child. 1991;145:688-695.

131. Jullien N, Saveanu A, Vergier J, Marquant E, Quentien MH, Castinetti F, ve ark. Clinical lessons learned in constitutional hypopituitarism from two decades of experience in a large international cohort. Clin Endocrinol (Oxf). 2021;94:277-289.

132. Mody S, Brown MR, Parks JS. The spectrum of hypopituitarism caused by *PROP1* mutations. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2002;16:421-431.

133. Andersen B, Rosenfeld MG. POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. Endocr Rev. 2001;22:2-35.

134. Abrão MG, Leite MV, Carvalho LR, Billerbeck AE, Nishi MY, Barbosa AS, ve ark. Combined pituitary hormone deficiency (CPHD) due to a complete *PROP1* deletion. Clin Endocrinol (Oxf). 2006;65:294-300.

135. Voutetakis A, Argyropoulou M, Sertedaki A, Livadas S, Xekouki P, Maniati-Christidi M, ve ark. Pituitary magnetic resonance imaging in 15 patients with Prop1 gene mutations: pituitary enlargement may originate from the intermediate lobe. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:2200-2206.

136. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. Hum Genet. 2014;133:1-9.

137. Turton JP, Reynaud R, Mehta A, Torpiano J, Saveanu A, Woods KS, ve ark. Novel mutations within the POU1F1 gene associated with variable combined pituitary hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:4762-4770.

138. McLennan K, Jeske Y, Cotterill A, Cowley D, Penfold J, Jones T, ve ark. Combined pituitary hormone deficiency in Australian children: clinical and genetic correlates. Clin Endocrinol (Oxf). 2003;58:785-794.

139. Cohen LE, Wondisford FE, Salvatoni A, Maghnie M, Brucker-Davis F, Weintraub BD, ve ark. A "hot spot" in the Pit-1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency: Clinical and molecular correlates. J Clin Endocrinol Metab. 1995;80:679-684.

140. Pfäffle RW, DiMattia GE, Parks JS, Brown MR, Wit JM, Jansen M, ve ark. Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. Science. 1992;257:1118-1121.

141. Sun Y, Bak B, Schoenmakers N, van Trotsenburg AS, Oostdijk W, Voshol P, ve ark. Loss-of-function mutations in IGSF1 cause an X-linked syndrome of central hypothyroidism and testicular enlargement. Nat Genet. 2012;44:1375-1381.

142. MacGloin H, Schoenmakers N, Moorwood C, Buchanan CR, Arya VB. Congenital central hypothyroidism caused by novel variants in IGSF1 gene: Case series of three patients. Horm Res Paediatr. 2024. Online ehead of print.

143. Fourneaux R, Reynaud R, Mougel G, Castets S, Bretones P, Dauriat B, ve ark. IGSF1 mutations are the most frequent genetic aetiology of thyrotropin deficiency. Eur J Endocrinol. 2022;187:787-795.

144. Reichenbach A, Steyn FJ, Sleeman MW, Andrews ZB. Ghrelin receptor expression and colocalization with anterior pituitary hormones using a GHSR-GFP mouse line. Endocrinology. 2012;153:5452-5466.

145. Kardelen AD, Najafli A, Baş F, Karaman B, Toksoy G, Poyrazoğlu Ş, ve ark. *PROKR2* mutations in patients with short stature who have isolated growth hormone deficiency and multiple pituitary hormone deficiency. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2023;15:338-347.

146. Alatzoglou KS, Webb EA, Le Tissier P, Dattani MT. Isolated growth hormone deficiency (GHD) in childhood and adolescence: Recent advances. Endocr Rev. 2014;35:376-432.

147. Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency-an update. Nat Rev Endocrinol. 2010;6:562-576.

148. Öztürk AP, Yavas Abali Z, Aslanger AD, Bas F, Toksoy G, Karaman V, ve ark. Phenotype-genotype correlations of GH1 gene variants in patients with isolated growth hormone deficiency or multiple pituitary hormone deficiency. Horm Res Paediatr. 2024;97:126-133.

149. Keselman A, Scaglia PA, Rodríguez Prieto MS, Ballerini MG, Rodríguez ME, Ropelato MG, ve ark. Type IA isolated growth hormone deficiency (IGHD) consistent with compound heterozygous deletions of 6.7 and 7.6 Kb at the GH1 gene locus. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2012;56:558-563.

150. Giordano M. Genetic causes of isolated and combined pituitary hormone deficiency. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2016;30:679-691.

151. Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG. Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. Nature. 1992;360:765-768.

152. Moyer DC, Larue GE, Hershberger CE, Roy SW, Padgett RA. Comprehensive database and evolutionary dynamics of U12-type introns. Nucleic Acids Res. 2020;48:7066-7078.

153. Akin L, Rizzoti K, Gregory LC, Corredor B, Le Quesne Stabej P, Williams H, ve ark. Pathogenic variants in *RNPC3* are associated with hypopituitarism and primary ovarian insufficiency. Genet Med. 2022;24:384-397.

154. Argente J, Flores R, Gutiérrez-Arumí A, Verma B, Martos-Moreno G, Cuscó I, ve ark. Defective minor spliceosome mRNA processing results in isolated familial growth hormone deficiency. EMBO Mol Med. 2014;6:299-306.

155. Turunen JJ, Niemelä EH, Verma B, Frilander MJ. The significant other: splicing by the minor spliceosome. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2013;4:61-76.

156. Verberne EA, Faries S, Mannens M, Postma AV, van Haelst MM. Expanding the phenotype of biallelic RNPC3 variants associated with growth hormone deficiency. Am J Med Genet A. 2020;182:1952-1956.

157. Bezen D, Kutlu O, Mouilleron S, Rizzoti K, Dattani M, Guran T, ve ark. A homozygous Y443C variant in the *RNPC3* is associated with severe syndromic congenital hypopituitarism and diffuse brain atrophy. Am J Med Genet A. 2022;188:2701-2706.

158. Gregory LC, Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Carreno G, Webb EA, Kelberman D, ve ark. The role of the sonic hedgehog signalling pathway in patients with midline defects and congenital hypopituitarism. Clin Endocrinol (Oxf). 2015;82:728-738.

159. Nozawa RS, Nagao K, Igami KT, Shibata S, Shirai N, Nozaki N, ve ark. Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. Nat Struct Mol Biol. 2013;20:566-573.

160. Wanigasuriya I, Gouil Q, Kinkel SA, Tapia Del Fierro A, Beck T, Roper EA, Breslin K, Stringer J, Hutt K, Lee HJ, Keniry A, Ritchie ME, Blewitt ME. *Smchd1* is a maternal effect gene required for genomic imprinting. Elife. 2020;9:e55529.

161. Kinjo K, Nagasaki K, Muroya K, Suzuki E, Ishiwata K, Nakabayashi K, ve ark. Rare variant of the epigenetic regulator SMCHD1 in a patient with pituitary hormone deficiency. Sci Rep. 2020;10:10985.

162. Bando H, Urai S, Kanie K, Sasaki Y, Yamamoto M, Fukuoka H, ve ark. Novel genes and variants associated with congenital pituitary hormone deficiency in the era of next-generation sequencing. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:1008306.

163. Dateki S, Watanabe S, Mishima H, Shirakawa T, Morikawa M, Kinoshita E, ve ark. A homozygous splice site *ROBO1* mutation in a patient with a novel syndrome with combined pituitary hormone deficiency. J Hum Genet. 2019;64:341-346.

164. Pfaeffle RW, Hunter CS, Savage JJ, Duran-Prado M, Mullen RD, Neeb ZP, ve ark. Three novel missense mutations within the LHX4 gene are associated with variable pituitary hormone deficiencies. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93:1062-1071.

165. Iancu ME, Albu AI, Albu DN. The response to growth hormone treatment in a child with short stature, growth hormone deficiency and autosomal dominant cutis laxa type 3 - Case report. J Pediatr Endocrinol Metab. 2022;35:1211-1214.

166. Hoxha V, Aliu E. ERI1: A case report of an autosomal recessive syndrome associated with developmental delay and distal limb abnormalities. Am J Med Genet A. 2023;191:64-69.

167. Brauner R, Bignon-Topalovic J, Bashamboo A, McElreavey K. Pituitary stalk interruption syndrome is characterized by genetic heterogeneity. PLoS One. 2020;15:e0242358.

168. Fang X, Zhang Y, Cai J, Lu T, Hu J, Yuan F, ve ark. Identification of novel candidate pathogenic genes in pituitary stalk interruption syndrome by whole-exome sequencing. J Cell Mol Med. 2020;24:11703-11717.

169. Brauner R, Bignon-Topalovic J, Bashamboo A, McElreavey K. Exome sequencing in 16 patients with pituitary stalk interruption syndrome: A monocentric study. PLoS One. 2023;18:e0292664.

170. Gregory LC, Cionna C, Cerbone M, Dattani MT. Identification of genetic variants and phenotypic characterization of a large cohort of patients with congenital hypopituitarism and related disorders. Genet Med. 2023;25:100881.

171. Bougnères P. Congenital hypopituitarism: Current agnostic genetics faces its limits. J Clin Endocrinol Metabol 2024. Online ahead of print.

172. Jee YH, Gangat M, Yeliosof O, Temnycky AG, Vanapruks S, Whalen P, ve ark. Evidence that the etiology of congenital hypopituitarism has a major genetic component but is infrequently monogenic. Front Genet. 2021;12:697549.

FORMLAR

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Çoklu hipofiz hormon eksikliği olan olgularda Yeni Nesil Dizileme Tekniklerinin moleküler patolojinin aydınlatılmasına katkısı

Hasta Takip Formu

Tarih:

TC Kimlik numarası:

Olgu No:

Ad-Soyad: Protokol No:

D.T./ yaşı: DNA No:

Cinsiyet:

Adres:

Tel:

Özgeçmiş:

Akrabalık:

Soygeçmiş:

Öykü:

Aile ağacı:

Fizik muayene:

Tetkikler:

Karyotip:

Moleküler analizler:

LABORATUVAR								
	Başvuru	**6.ay**	**12.ay**	**.....ay**	**.....ay**		**……..**	**Son Muayene**
LH								
FSH								
E2 (kız) / Testosteron (erk)								
ACTH								
Kortizol								
Prolaktin								
IGF-1								
IGFBP3								
Serbest T4								
TSH								
İdrar dansitesi								

Radyolojik görüntüleme:

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÇOKLU HİPOFİZ HORMON EKSİKLİĞİ OLAN OLGULARDA YENİ NESİL DİZİLEME TEKNİKLERİNİN MOLEKÜLER PATOLOJİNİN AYDINLATILMASINA KATKISI VE GENOTİP- FENOTİP İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%16	%12	%6	%10
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%6
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
3	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	<%1
4	openaccess.maltepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to University of Messina Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Öğrenci Ödevi	<%1
8	"60th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE)",	<%1