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

FETAL RADYAL APLAZİ / HİPOPLAZİ OLGULARININ GENETİK ETİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Behiye Tuğçe YILDIRIM

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER

İSTANBUL
2023

TEZ ONAYI

ETİK 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.

Behiye Tuğçe Yıldırım

İTHAF

Aileme…

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimdeki katkıları ve tez çalışmamın her aşamasındaki desteği için tez danışmanım Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner'e,

Gerek akademik gerek sosyal her konuda desteğini hissettiğim hocam Prof. Dr. Birsen Karaman'a,

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Seher Başaran, Prof. Dr. Gözde Yeşil Sayın, Uzm. Dr. Ayça Dilruba Aslanger ve tüm hocalarıma,

Beraber çalışmaktan ve vakit geçirmekten keyif aldığım, asistanlık sürecinde yol arkadaşlarım olan asistan arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım sürecinde yardımlarını esirgemeyen tüm tıbbi genetik klinik ve laboratuvar çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve verdikleri destekle bugüne gelmemi sağlayan canım aileme,

Her güzellikte ve zorlukta yanımda olan sevgili eşime,

Sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Behiye Tuğçe Yıldırım, 2023

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39315

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI i

ETİK BEYAN ii

İTHAF iii

TEŞEKKÜR iv

TABLOLAR LİSTESİ xi

ŞEKİLLER LİSTESİ xii

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ xiv

ÖZET 1

ABSTRACT 3

1. GİRİŞ VE AMAÇ 5

2. GENEL BİLGİLER 7

2.1. Üst Ekstremite Embriyolojisi 7

2.1.1. Proksimalden Distale Büyüme 9

2.1.2. Radyoulnar (Anteroposterior) Farklılaşma 10

2.1.3. Dorsoventral Farklılaşma 11

2.2. Konjenital Üst Ekstremite Anomalilerinin Sınıflandırılması 12

2.2.1. Malformasyonlar 12

2.2.2. Deformasyonlar 12

2.2.3. Displaziler 13

2.2.4. Sendromlar 13

2.3. Radyal Işın Defekti ile Seyreden Kromozom Anomalileri 13

2.4. Radyal Işın Defekti ile Seyreden Tek Gen Sendromları 13

2.4.1. Holt-Oram Sendromu 13

2.4.1.1. Klinik Bulgular 14

2.4.1.2. Moleküler Etiyoloji 14
2.4.2. Fanconi Anemisi 15
2.4.2.1. Klinik Bulgular 15
2.4.2.2. Moleküler Etiyoloji 18
2.4.3. TAR Sendromu 22
2.4.3.1. Klinik Bulgular 22
2.4.3.2. Moleküler Etiyoloji 23
2.4.4. Townes-Brocks Sendromu 24
2.4.4.1. Klinik Bulgular 24
2.4.4.2. Moleküler Etiyoloji 25
2.4.5. Townes-Brocks Sendromu 2 26
2.4.5.1. Klinik Bulgular 26
2.4.5.2. Moleküler Etiyoloji 27
2.4.6. Cornelia de Lange Sendromu 27
2.4.6.1. Klinik Bulgular 27
2.4.6.2. Moleküler Etiyoloji 29
2.4.7. Roberts Sendromu 31
2.4.7.1. Klinik Bulgular 31
2.4.7.2. Moleküler Etiyoloji 32
2.4.8. Baller-Gerold Sendromu 34
2.4.8.1. Klinik Bulgular 34
2.4.8.2. Moleküler Etiyoloji 35
2.4.9. Rothmund-Thomson Sendromu 36
2.4.9.1. Klinik Bulgular 36
2.4.9.2. Moleküler Etiyoloji 38
2.4.10. RAPADILINO Sendromu 39
2.4.10.1. Klinik Bulgular 39
2.4.10.2. Moleküler Etiyoloji 40
2.4.11. Duane-Radyal Işın Sendromu 40

2.4.11.1. Klinik Bulgular 40
2.4.11.2. Moleküler Etiyoloji 41
2.4.12. IVIC Sendromu 42
2.4.12.1. Klinik Bulgular 42
2.4.12.2. Moleküler Etiyoloji 42
2.4.13. Nager Sendromu 42
2.4.13.1. Klinik Bulgular 43
2.4.13.2. Moleküler Etiyoloji 43
2.4.14. Diamond-Blackfan Anemisi 44
2.4.14.1. Klinik Bulgular 44
2.4.14.2. Moleküler Etiyoloji 45
2.4.15. Mandibulofasyal Dizostoz, Guion-Almeida Tip 47
2.4.15.1. Klinik Bulgular 47
2.4.15.2. Moleküler Etiyoloji 49
2.5. Radyal Işın Defekti ile Seyreden Moleküler Etiyolojisi Aydınlatılamamış Sendromlar ve Asosiasyonlar 49
2.5.1. VACTERL Asosiasyonu 49
2.5.1.1. Klinik Bulgular 50
2.5.1.2. Moleküler Etiyoloji 51
2.5.2. Gershoni-Baruch Sendromu 51
2.5.2.1. Klinik Bulgular 51
2.5.2.2. Moleküler Etiyoloji 51
2.5.3. X'e Bağlı Radyal Işın Defektleri 51
2.5.3.1. Klinik Bulgular 52
2.5.3.2. Moleküler Etiyoloji 52
2.5.4. Radyal-Renal Sendrom 52
2.5.4.1. Klinik Bulgular 52
2.5.4.2. Moleküler Etiyoloji 52
2.5.5. Radyal Işın Defektleri ile Birlikte Hemifasyal Mikrozomi 53

2.5.5.1. Klinik Bulgular 53
2.5.5.2. Moleküler Etiyoloji 53
2.5.6. İskelet Defektleri, Genital Hipoplazi ve Mental Retardasyon 53
2.5.6.1. Klinik Bulgular 53
2.5.6.2. Moleküler Etiyoloji 54
2.6. Radyal Işın Defekti ile Seyreden Teratojenler 54
2.6.1. Talidomid 54
2.6.2. Valproik Asit 55
3. GEREÇ VE YÖNTEM 56
3.1. Çalışma Grubu 56
3.2. Klinik Değerlendirmeler 56
3.3. Moleküler Araştırmalara Hazırlık 56
3.4. Moleküler Yöntemler 57
3.4.1. DNA İzolasyonu ve Kalitesinin Değerlendirilmesi 57
3.4.2. Tüm Ekzom Dizileme (TED) Islak Laboratuvar Çalışmaları 57
3.4.2.1. Kütüphane Hazırlığı 58
3.4.2.1.1. Birinci Basamak: DNA Fragmantasyonu, Uç Onarımı, dA Kuyruklanması 58
3.4.2.1.2. İkinci Basamak: Evrensel Adaptörlerin Bağlanması ve Pürifikasyon 59
3.4.2.1.3. Üçüncü Basamak: Primerler Kullanılarak PZR Amplifikasyonu, Pürifikasyon ve Kalite Kontrolü 61
3.4.2.2. Hedef Zenginleştirme Protokolü 62
3.4.2.2.1. Birinci Basamak: Hibridizasyon İçin Kütüphanelerin Hazırlanması 62
3.4.2.2.2. İkinci Basamak: Kütüphanelerin Yakalama Probları ile Hibridizasyonu 63
3.4.2.2.3. Üçüncü Basamak: Hibridize Hedeflere Streptavidin Boncuklarının Bağlanması 64
3.4.2.2.4. Dördüncü Basamak: Yakalama Sonrası PZR Amplifikasyonu, Pürifikasyon ve Kalite Kontrolü 64
3.4.3.Tüm Ekzom Dizileme Verilerinin Biyoinformatik Analizi 66
3.4.4. Varyantların Sınıflandırılması 67

3.4.5. Varyantların Adlandırılması 70
3.4.6. TED Analizi ile Saptanan Varyantların Sanger Dizileme ile Doğrulanması 70
3.4.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 71
3.4.6.2. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması 72
3.4.6.3. Dizi PZR Çalışması 73
3.4.6.4. Dizi PZR Ürünlerinin Saflaştırılması 73
3.4.6.5. Elektroforez Cihazına Yükleme 74
3.4.6.6. Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi 74
3.4.7. CNV Analizinde Saptanan Kopya Sayısı Değişiminin Gerçek Zamanlı PZR ile Doğrulanması 74
4. BULGULAR 76
4.1. Antenatal US Bulguları 76
4.2. İnvazif Girişimler 76
4.3. Postmortem Fetal Değerlendirme 77
4.4. Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Bulgular (Retrospektif) 77
4.5. Moleküler Bulgular 78
4.6. Olgular 79
4.6.1. Olgu 1 79
4.6.1.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları 79
4.6.1.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları 80
4.6.1.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular 81
4.6.2. Olgu 2 85
4.6.2.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları 85
4.6.2.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları 86
4.6.2.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular 87
4.6.3. Olgu 3 91
4.6.3.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları 91
4.6.3.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları 92

4.6.3.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular 94
4.6.4. Olgu 4 97
4.6.4.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları 97
4.6.4.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları 98
4.6.4.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular 100
4.6.5. Olgu 5 101
4.6.5.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları 101
4.6.5.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları 101
4.6.5.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular 103
4.6.6. Olgu 6 105
4.6.6.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları 105
4.6.6.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları 106
4.6.6.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular 107
5. TARTIŞMA 108
KAYNAKLAR 126
EKLER 147
ÖZGEÇMİŞ 153

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Fanconi anemisi moleküler etiyolojisi 19
Tablo 2: CdLS moleküler etiyolojisi 29
Tablo 3: DBA moleküler etiyolojisi 45
Tablo 4: *Qubit* ölçümü için gerekli miktarlar 58
Tablo 5: Enzimatik fragmantasyon miksi 58
Tablo 6: PZR programı 59
Tablo 7: Ligasyon miksi 59
Tablo 8: Fragmantasyon ürünü, adaptörler ve miks miktarı 60
Tablo 9: PZR miksi 61
Tablo 10: PZR programı 61
Tablo 11: Kütüphane hazırlığı 62
Tablo 12: Hibridizasyon reaksiyonu için kullanılan miktarlar 63
Tablo 13: PZR programı 65
Tablo 14: Patojenik varyantların sınıflandırılmasında kullanılan nitelikler 67
Tablo 15: Zararsız varyantların sınıflandırılmasında kullanılan nitelikler 68
Tablo 16: Varyant puanlama tablosu 69
Tablo 17: Çalışmamız kapsamında tasarlanan primer dizileri 71
Tablo 18: PZR döngü koşulları 72
Tablo 19: Dizi PZR döngü koşulları 73
Tablo 20: qPZR için tasarlanan primer çiftleri 75
Tablo 21: qPZR döngü koşulları 75
Tablo 22: Çalışma grubumuzdaki olgularda saptanan submikroskobik kromozom anomalileri 77
Tablo 23: Çalışma grubumuzdaki olgularda TED analizleri ile saptanan varyantlar 78
Tablo 24: Çalışma grubumuzdaki olgularda CNV analizleri ile saptanan varyantlar 79
Tablo 25: *RBM8A* geninde literatürde bildirilen hipomorfik alleller ve popülasyon frekansları 111
Tablo 26: *RBM8A* geninde literatürde bildirilen *null* alleller 112

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Ekstremite gelişimindeki moleküler yolaklar 8
Şekil 2: Proksimodistal büyüme 10
Şekil 3: Fanconi anemisinde sitogenetik bulgular 18
Şekil 4: C-bantlama ile boyanmış metafazlardaki erken sentromer ayrışması 33
Şekil 5: Prenatal invazif girişimlerin yönteme göre dağılımı 76
Şekil 6: Olgu 1'e ait aile ağacı 80
Şekil 7: Olgu 1'e ait fizik muayene ve grafi bulguları 81
Şekil 8: Olgu 1'de array-CGH çalışmasında 1q21.1 bölgesinde heterozigot delesyon görüntüsü 82
Şekil 9: Olgu 1'e ait moleküler analiz sonuçları 83
Şekil 10: Olgu 1'in annesine ait moleküler analiz sonuçları 84
Şekil 11: Olgu 1'in babasına ait moleküler analiz sonuçları 85
Şekil 12: Olgu 2'ye ait aile ağacı 86
Şekil 13: Olgu 2'ye ait fizik muayene ve grafi bulguları 87
Şekil 14: CNV analizlerinde olgu 1, 2 ve ebeveynlerinde saptanan 1q21 delesyonu 89
Şekil 15: Olgu 2'ye ait moleküler analiz sonuçları 89
Şekil 16: Olgu 2'nin annesine ait moleküler analiz sonuçları 90
Şekil 17: Olgu 2'nin babasına ait moleküler analiz sonuçları 91
Şekil 18: Olgu 3'e ait aile ağacı 92
Şekil 19: Olgu 3'e ait fizik muayene ve grafi bulguları 93
Şekil 20: Olgu 3'e ait *TFAP2A* geni duplikasyonu görüntüsü 95
Şekil 21: Olgu 3 ve ebeveynlerine ait CNV analizlerinin görüntüsü 96
Şekil 22: qPZR'de indeksteki *TFAP2A* geni ekzon 6 duplikasyonuna ait görüntü 97
Şekil 23: Olgu 4'e ait aile ağacı 98
Şekil 24: Olgu 4'e ait fizik muayene ve grafi bulguları 99
Şekil 25: Olgu 4'e ait moleküler analiz sonuçları 100
Şekil 26: Olgu 5'e ait aile ağacı 101
Şekil 27: Olgu 5'e ait fizik muayene ve grafi bulguları 102
Şekil 28: Olgu 5'e ait moleküler analiz sonuçları 103
Şekil 29: Olgu 5'in babasına ait moleküler analiz sonuçları 104
Şekil 30: Olgu 5'e ait moleküler analiz sonuçları 105

Şekil 31: Olgu 6'ya ait aile ağacı 106
Şekil 32: Olgu 6'ya ait fizik muayene ve grafi bulguları 107
Şekil 33: *RBM8A* geninde bildirilen *null* ve hipomorfik alleller 112
Şekil 34: Olgu 1 ve 2'deki delesyon bölgesi ve literatürde benzer bölgede delesyon saptanan olgular.....113
Şekil 35: TFAP2A proteinin yapısı.....117

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics*

AER: *Apical ectodermal ridge* (Apikal ektodermal çıkıntı)

AML: Akut miyeloid lösemi

APC / C*: Anaphase-promoting complex / cyclosome* (Anafaz teşvik edici kompleks / siklozom)

AS: Amniyosentez

ASD: Atriyal septal defekt

AV: Atriyoventriküler

BA: *Benign stand-alone*

bç: Baz çifti

BGS: Baller-Gerold sendromu

BOF: Brankiyo-okülo-fasyal

BP: *Benign supporting*

BS: *Benign strong*

CdLS: Cornelia de Lange sendromu

CNV: *Copy number variation* (Kopya sayısı değişimi)

CVS: Koryon villus biyopsisi

DBA: Diamond-Blackfan anemisi

DGV: *Database of Genomic Variants*

DRRS: *Duane-radial ray syndrome* (Duane-radyal ışın sendromu)

EJC: *Exon junction complex* (Ekzon birleşke kompleksi)

EN1: *ENGRAILED1*

G: Gravida

GBS: Gershoni-Baruch sendromu

GH: Gebelik haftası

HGMD: *Human Gene Mutation Database*

HOS: Holt-Oram sendromu

HR: *Heterochromatin repulsion*

IGV: *Integrative Genomics Viewer*

IFSSH / OMT: *International Federation of Societies for Surgery of the Hand / Oberg-Manske-Tonkin*

İUBK: İntrauterin büyüme kısıtlılığı

kb: Kilobaz

LPM: Lateral plak mezodermi

MAF: Minör allel frekansı

MDS: Miyelodisplastik sendrom

MFDGA: Mandibulofasyal dizostoz, Guion-Almeida tip

NFW: *Nuclease free water*

OD: Otozomal dominant

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

OR: Otozomal resesif

P: Parite

PALB2: *Partner and localizer of BRCA2*

PCS: *Premature centromere separation* (Erken sentromer ayrışması)

PDA: Patent duktus arteriyozus

PEV: Pes ekinovarus

PIF: Proksimal interfalengeal

PM: *Pathogenic moderate*

PP: *Pathogenic supporting*

PS: *Pathogenic strong*

PVS: *Pathogenic very strong*

PZ: *Progress zone* (İlerleme bölgesi)

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RA: Retinoik asit

RP: Ribozomal protein

RTS: Rothmund-Thomson sendromu

SALL4: *Sal-like protein 4*

SAP49: *Spliceosome-associated protein*

SD: Standart deviasyon

SHH: S*onic hedgehog*

snRNP: Küçük nükleer ribonükleoprotein

SNP: *Single nucleotide polymorphism* (Tek nükleotid polimorfizmi)

TAR: *Thrombocytopenia Absent Radius*

TBS: Townes-Brocks sendromu

TBS2: Townes-Brocks sendromu 2

TED: Tüm ekzom dizileme

TT: Tıbbi terminasyon

US: Ultrason

VA: VACTERL asosiasyonu (*vertebral anomalies, anal atresia, ardiac anomalies, tracheoesophageal fistula, renal anomalies and limb anomalies*)

VSD: Ventriküler septal defekt

YND: Yeni nesil dizileme

ZPA: *Zone of polarizing activity* (Polarize edici aktivite bölgesi)

ÖZET

Radyal ışın defektleri; radiusun, radyal karpal kemiklerin veya başparmağın aplazisi veya hipoplazisi ile karakterize bir klinik spektrumdur. Radyal ışın defektleri 1,64/10.000 ile 1/30.000 arası değişen prevalansı ile üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalileridir. İnfantil dönemde ölüm oranının %35 kadar yüksek olduğu bildirilmiştir. Radyal ışın defektlerinin etiyolojisi komplekstir ve klinik bulgular aileler arası ve aile içi değişkenlik gösterir. Kromozom anomalileri, tek gen hastalıkları, teratojen maruziyetleri etiyolojide yer almaktadır. Valproat veya talidomid maruziyetinin radyal ışın defektleri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Sendromik olgularda etiyolojide sıklıkla trizomi 18, Holt-Oram sendromu, trombositopeni-radius yokluğu (TAR) sendromu, VACTERL asosiasyonu (vertebral anomaliler, anal atrezi, kardiyak anomaliler, trakeoözofageal fistül, renal anomaliler ve ekstremite anomalileri), Fanconi anemisi yer almaktadır. Radyal ışın defekti olgularının yarısında Mendelyan kalıtım ve ilişkili gen gösterilir. Ancak geri kalan yarısı sporadiktir ve ilişkili gen bilinmediğinden tanı klinik olarak kalır. Radyal ışın defekti saptanan olgularda genetik tanı varlığı etiyopatogenezin netleştirilmesi, özgün genetik danışma verilmesi ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamıza 2016-2023 yılları arasında prenatal ultrasonda radyal ışın defekti ve ek anomaliler saptanan, tıbbi terminasyon sonrasında postmortem değerlendirilen ve DNA örnekleri ailelerin verdiği yazılı onay ile saklanan, kromozom analizleri normal sonuçlanan altı fetus dahil edildi. Çalışmaya alınan etkilenmiş altı fetal olgu ve 12 sağlıklı ebeveyn ile trio tüm ekzom dizileme (TED) analizleri gerçekleştirildi. Ek olarak kopya sayısı değişimi (CNV) analizleri yapıldı. Altı olgunun üçünde genetik köken desteklenebildi. Bu olgularda gösterilen dizi değişimleri için Sanger dizileme ile doğrulama ve aile segregasyon analizleri gerçekleştirildi. İki fetal olguda 1q21.1 bölgesinde *RBM8A* genini içeren heterozigot patojenik delesyon ve *RBM8A* geninde hemizigot patojenik varyant bileşik heterozigot olarak saptandı. Ebeveynlerin taşıyıcı olduğu gözlendi. Bir olguda *de novo* heterozigot *TFAP2A* tüm gen duplikasyonu saptandı. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile duplikasyon doğrulanmış oldu. Bir olguda ve babasında *FANCI* geninde heterozigot klinik önemi belirsiz nitelikte bir varyant için taşıyıcılık saptandı.

Bu çalışmada prenatal dönemde radyal aplazi / hipoplazi saptanan altı olgunun klinik bulguları ve TED analizi sonuçları sunulmuştur. Bu çalışma, prenatal dönemde saptanan radyal

ışın defektlerinde CNV analizlerinin de eşlik ettiği trio TED analizinin tanı verimliliği ile ilgili ilk çalışma olup genetik tanı konulan olgularımızla birlikte radyal ışın defekti etiyopatogenezinin aydınlatılması açısından ve fetal dönemdeki klinik bulgularının detaylandırılması ile literatüre katkı sağlamaktadır.

ABSTRACT

Radial ray defects are a clinical spectrum characterized by aplasia or hypoplasia of the radius, radial carpal bones or thumb. Radial ray defects are the most common congenital anomalies of the upper extremity with prevalence ranging from 1.64/10.000 to 1/30.000. It has been reported that the mortality rate in the infantile period is as high as 35%. The etiology of radial ray defects is complex, and characterized by high inter- and intra-familial clinical variability. Chromosomal abnormalities, single-gene diseases, and teratogenic exposures are involved in the etiology. It has been reported that exposure to valproate or thalidomide may be associated with radial ray defects. In syndromic cases, trisomy 18, Holt-Oram syndrome, thrombocytopenia-radius absence (TAR) syndrome, VACTERL association (vertebral anomalies, anal atresia, cardiac anomalies, tracheoesophageal fistula, renal anomalies and limb anomalies), Fanconi anemia are frequently included in the etiology. In half of the cases of radial ray defects, Mendelian inheritance and the associated gene are shown. However, the remaining half is sporadic and the diagnosis remains clinical, as the associated gene is unknown. The presence of genetic diagnosis in cases with radial ray defects is of great importance in terms of clarifying etiopathogenesis, providing specific genetic counseling and determining treatment options.

In our study, six fetuses with radial ray defects and additional anomalies detected in prenatal ultrasound between 2016-2023 were included. These cases were postmortem evaluated after medical termination, and DNA samples were preserved, upon written approval of the families. Whole exome sequencing (WES) analyses were conducted on the six affected fetal cases and 12 healthy parents. In addition, copy number variation (CNV) analyses were performed. Genetic origin could be supported in three out of the six cases. Confirmation and family segregation analyses were carried out for identified sequence changes using Sanger sequencing. In two fetal cases, a heterozygous pathogenic deletion encompassing the *RBM8A* gene in the 1q21.1 region and a compound heterozygous state with a hemizygous pathogenic variant in the *RBM8A* gene were detected. It was observed that the parents were carriers. A *de novo* heterozygous whole gene duplication of *TFAP2A* was identified in one case. The duplication was confirmed by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In one case, a variant of uncertain significance (VUS) in the heterozygous state was identified in the *FANCI* gene, both in the affected individual and their father, consistent with carrier status for this variant.

This study presents the clinical findings and WES analysis results of six cases with prenatal detection of radial aplasia / hypoplasia. As the first investigation into the diagnostic efficiency of trio WES analysis, accompanied by CNV analyses, in cases with radial ray defects identified during the prenatal period, this research contributes to the literature by elucidating the etiopathogenesis of radial ray defects in cases with a genetic diagnosis and detailing the clinical findings during the fetal period.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Radyal ışın defektleri; radiusun veya diğer radyal ışın yapılarının (skafoid ve trapezium kemikleri, birinci metakarpal kemik ve el başparmağı) hipoplazisi veya aplazisi ile seyreden bir spektrumdur. Radyal ışın defektleri; üst ekstremitenin en sık konjenital anomalileri olup, prevalansının 30.000 canlı doğumda bir olduğu bildirilmiştir (1). Fin popülasyonü tabanlı bir çalışmada ise radyal ışın defekti sıklığının 10.000 canlı doğumda 1,64 olduğu, ölüm oranının prenatal dönemde %29, infantil dönemde ise %35 kadar yüksek olduğu belirtilmiştir (2).

Radyal ışın defektleri; olguların 1/3'ünde izole, olguların 2/3'ünde ise sendromik veya ek anomaliler ile birlikte saptanmaktadır (3). Sendromik nedenler arasında sık olarak Holt-Oram sendromu, trombositopeni-radius yokluğu (TAR) sendromu, VACTERL asosiasyonu (vertebral anomaliler, anal atrezi, kardiyak anomaliler, trakeoözofageal fistül, renal anomaliler ve ekstremite anomalileri), Fanconi anemisi yer almaktadır (3). Ek anomaliler arasında sık olarak kardiyak anomaliler, kas-iskelet anomalileri, spinal anomaliler, hematolojik anomaliler, gastrointestinal ve genitoüriner sistem anomalileri yer almaktadır (4). Prenatal ultrason ile tanıda tek ön kol kemiği izlenmesi ve elde radyale deviasyon tipik bulgudur (4).

Üst ekstremitenin oluşumu fertilizasyon sonrası 24. günde lateral plak mezoderminin 9 ve 12. somitler arasına göçü ile başlar ve 26. günde ekstremite tomurcuğunun oluşması ile devam eder (5). Üst ekstremitenin oluşumu ve büyümesi ile ilişkilendirilmiş moleküler faktörler arasında *HOX, WNT* ve *FGF* gen aileleri ile *TBX5* geni yer almaktadır (5). Radyoulnar farklılaşmada ise *SHH* ve *GLI3* genleri rol oynamaktadır (5).

Radyal ışın defektlerinde etkilenme unilateral veya bilateral izlenebilmekle beraber, bilateral etkilenme olan olgularda altta yatan genetik etiyoloji olasılığı daha yüksektir (6). Etiyolojide kromozom anomalileri, tek gen hastalıkları, teratojen maruziyetleri yer almaktadır. Radyal ışın defektleri ilişkili kromozom anomalileri arasında en sık saptanan trizomi 18'dir (2). Bunun dışında trizomi 13 ve 22q11.2 delesyon sendromlu olgularda da radyal ışın defekleri bildirilmiştir (2, 7). Radyal ışın defektleri ilişkili teratojenler arasında talidomid ve valproik asit maruziyeti yer almaktadır (8, 9). Radyal ışın defektleri ilişkili sendromlar arasında ise Holt-Oram sendromu, Fanconi anemisi, trombositopeni-radius yokluğu (TAR) sendromu, VACTERL asosiasyonu, Cornelia de Lange sendromu, Roberts sendromu, Akrofasiyal dizostoz 1, Nager tipi, Duane-radyal ışın sendromu, Townes-Brocks sendromu, RAPADILINO sendromu, Baller-Gerold sendromu, Rothmund-Thomson sendromu başta olmak üzere birçok sendrom yer

almaktadır. Radyal ışın defektlerinin yaklaşık yarısını oluşturan Mendelyan kalıtım gösteren olgularda tanıda genetik testler önemli bir rol oynamakla beraber, diğer yarısını oluşturan sporadik olgularda ilişkili gen bilinmediğinden tanı klinik olarak kalmaktadır (10).

Bu çalışmada radyal aplazi / hipoplazi saptanan fetuslarda etiyopatogenezde rol oynayan genlerin ve bu genlerdeki varyantların tüm ekzom dizileme yöntemi kullanılarak araştırılması ve sonuçların literatüre katkı sağlaması amaçlanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen verilerin etiyopatogenezin netleştirilmesi ile özgün genetik danışma sonrası prenatal / preimplantasyon genetik tanı olanaklarına, genotip-fenotip korelasyonunun detaylandırılmasına ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üst Ekstremite Embriyolojisi

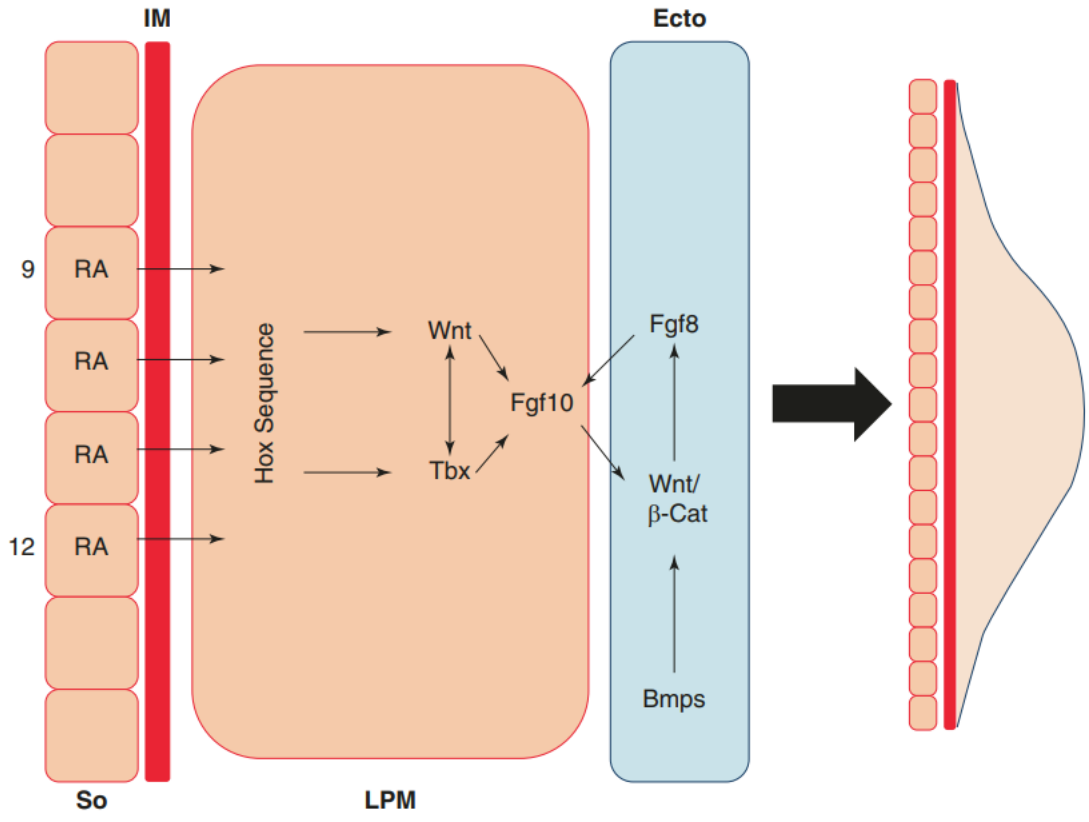
Üst ekstremitenin oluşumu fertilizasyon sonrası 24. günde, lateral plak mezoderminin 9 ve 12. somitler arasına göçü ve büyümesi ile başlar (5). Bu süreç *HOX* (*homebox*) gen ailesine bağımlıdır (5). 9 ve 12. somitlerden salınan ve A vitaminin aktif formu olan retinoik asit *HOX* genlerinin ekspresyonunu düzenler (11). *HOX* genleri sadece üst ekstremite tomurcuğunun ortaya çıkmasından değil, aynı zamanda ekstremite segmentasyonu ve dokulara farklılaşma sürecinden de sorumludur (5). İnsanda her biri farklı bir kromozom üzerinde yer alan ve A, B, C, D adı verilen dört set *HOX* geni vardır (5). Bu genlerden her biri aynı DNA zinciri üzerinde ardışık olarak bulunan bir gen kümesi oluştururlar (5). DNA zincirinin okunduğu yöne göre belirlenen sırayla birbiri ardına aktive edilirler (5). Bu genler mimar genler olarak adlandırılırlar, çünkü aktivasyonları hücre çoğalması ve farklılaşmasından sorumlu birçok genin ekspresyonu tetikler (5).

Ekstremite tomurcuğu 26. günde ortaya çıkmaya başlar (5). *HOXC6*'nın etkisi altında, lateral plak mezoderminden hücreler TBX5 ve WNT salgılamaya başlar, bu da önemli bir hücre çoğalması ve büyüme faktörü olan FGF10'un üretilmesini sağlar (5). Mezoderm hücreleri çok hızlı çoğalır ve üst ekstremite tomurcuğu görünür bir hale gelir (5). Ekstremitenin büyümesi ve şekillenmesi, *HOXA* ve *HOXD* genleri tarafından uygulanan kronolojik sırada gerçekleşir (5). Gelişimin 37. gününde ekstremitenin distal kısmı bir el plakası olarak tanınabilir hale gelir (11). 56. günde ise üst ekstremitenin majör morfolojik yapıları tamamlanır (11).

Ekstremite gelişiminde en önemli olay, apikal ektodermal çıkıntının (*apical ectodermal ridge*, AER) oluşumudur (5). Ekstremite tomurcuğu, başlangıçta dorsoventral polarizasyona sahip olan periferik bir ektoderm tabakasından oluşur (5). Dorsal ektodermin hücreleri *WNT7A*'yı eksprese ederken, ventral ektodermin hücreleri *WNT7A*'nın antagonisti olan *ENGRAILED1*'i (*EN1*) eksprese eder (5). Ektodermin bu ventral ve dorsal bölgeleri arasındaki bölgede AER bulunur (5). AER ekstremite tomurcuğunun distalinde bulunan kalınlaşmış ektodermdir ve AER hücreleri FGF8 salgılar (11). FGF8, mezodermde *FGF10* ekspresyonunu uyararak üst ekstremitenin proksimalden distale büyümesinde belirleyici bir role sahiptir (11). AER'nin çıkarılması üst ekstremitenin büyümesinin durmasına neden olur (11). FGF8 ayrıca polarize edici aktivite bölgesinin (*zone of polarizing activity,* ZPA) oluşumunda ve korunmasında önemli bir

role sahiptir (5). ZPA distal posterior (ulnar) sınırda bulunan bir mezodermal hücre kümesidir ve anteroposterior eksen için sinyal merkezidir (11).

Mezodermde, hücreler morfojenlerin etkisi altında çok hızlı bir şekilde çoğalır ve üst ekstremitenin hem uzunluğunun hem de kalınlığının büyümesine yol açar (5). Bu büyüme üç eksene ayrılır: proksimodistal eksen (uzunlamasına büyüme), anteroposterior eksen (radyoulnar polarizasyon) ve dorsoventral eksen (eldeki dorsal-palmar bölgeler) (11). Bu eksenler sırasıyla üç polarizasyon merkezinin (AER, ZPA ve dorsal ektoderm) etkisi altında mezodermal hücrelerin farklılaşmasına karşılık gelir (5). Bu merkezlerin her biri, membrandaki reseptörlerine bağlanarak bir hücreye sinyal sağlayan ligandlar gibi spesifik morfojenler aracılığıyla hareket eder (5). Bu nedenle bunlara, hücreler içindeki bir dizi kimyasal reaksiyona karşılık gelen ve protein sentezi veya hedef genlerin transkripsiyonu ile sonuçlanan sinyal yolakları denir (5).



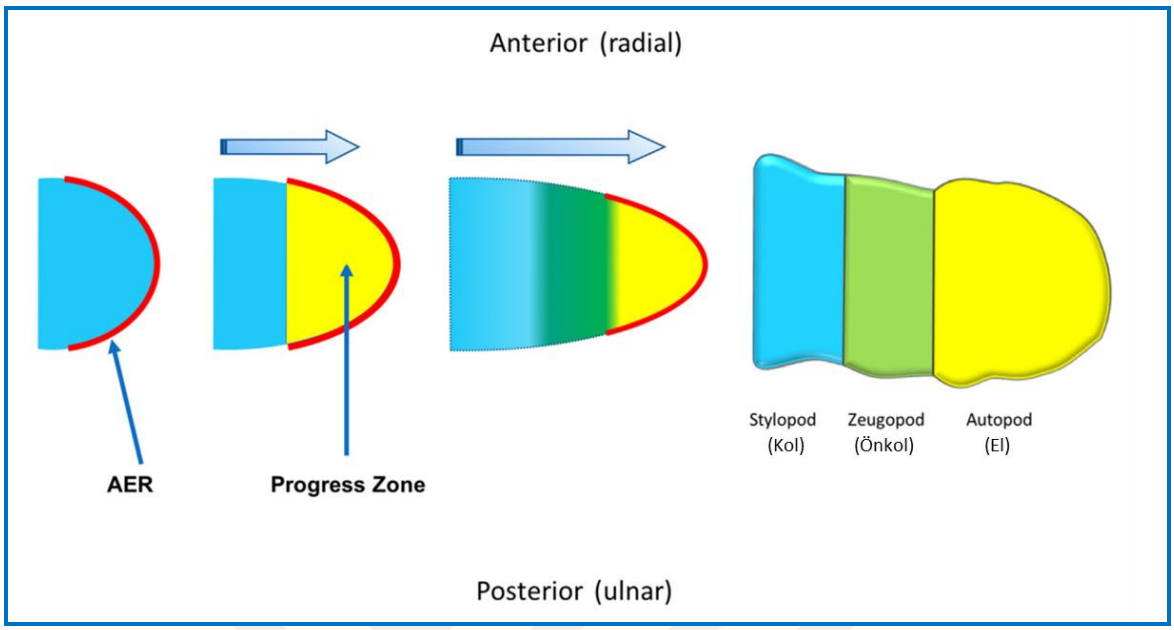
Şekil 1: Ekstremite gelişimindeki moleküler yolaklar

9 ve 12. somitlerde üretilen retinoik asit (RA) *HOX* genlerinin ekspresyonunu düzenler. *HOX* genleri lateral plak mezoderminde (LPM) *WNT* ve *TBX* genlerinin ekspresyonunu indükler ve düzenler. Bu genler Fgf10 ekspresyonunu indükler. Eş zamanlı ektodermden Bmp sinyali Wnt/ß-catenin yolağını indükler (bu yolak ayrıca Fgf10 tarafından da indüklenir). Bu yolak Fgf8 salınımının indükler, ektodermden salınan Fgf8 mezodermde Fgf10 salınımını indükler, Fgf10 ekstremitenin proksimodistal büyümesinde önemli rol oynar.

Congenital Anomalies of the Upper Extremity, 2021 baskısından alıntılanmıştır (11).

2.1.1. Proksimalden Distale Büyüme

Proksimodistal eksenin sinyal merkezi AER'dir ve AER proksimodistal büyümeyi FGF sinyali ile düzenler (11). Proksimalden distale büyüme AER'nin şekillenmesi ile başlar (11). AER'den salgılanan FGF8 mezoderme yayılır ve FGF10'un salgılanmasını destekler (5). AER altında mezodermal hücrelerin çok hızlı çoğaldığı bir alan vardır (5). WNT faktörleri bu hücreleri farklılaşmamış halde tutar (5). Bu, ilerleme bölgesi (*progress zone*, PZ) adı verilen hızlı büyüme alanıyla sonuçlanır (5). Büyüme sırasında, AER ve PZ embriyonik eksenden uzaklaşır ve ekstremitede üç segmentin farklılaşmasına katkıda bulunur: proksimal bölge (embriyonun sefalokoaudal ekseninden retinoik asidin etkisi altında gelişen bölge), distal bölge (AER ile temas halinde olan PZ bölgesi), ara bölge (proksimal ve distal bölgeler arasında bulunan bölge) (5). Bu üç bölge spesifik morfojenlerin ekspresyonu nedeniyle farklı şekilde gelişir ve ekstremitenin üç segmente ayrılmasıyla sonuçlanır: proksimal segment veya stylopod (humerus gelişir), ara segment veya zeugopod (radius ve ulna gelişir) ve distal segment veya autopod (karpaller, metakarpaller ve falankslar gelişir) (11).



Şekil 2: Proksimodistal büyüme

AER ve altında yer alan PZ'den stylopod (kol), zeugopod (ön kol) ve autopod (el) bölgelerinin gelişimi gösterilmiştir.

S. Guero, 2018 çalışmasından alıntılanmıştır (5).

2.1.2. Radyoulnar (Anteroposterior) Farklılaşma

Anteroposterior eksenin sinyal merkezi ZPA'dır ve ZPA anteroposterior farklılaşmayı SHH (*sonic hedgehog*) sinyali ile düzenler (11). Anteroposterior polarizasyon, ekstremite tomurcuğu ortaya çıktığında başlar (5). Anteroposterior eksen boyunca ekstremite iki segmente ayrılır: başparmak ve radiustan oluşan anterior (radyal) segment, ulna ve ulnar (2, 3, 4, 5. parmaklar) parmaklardan oluşan posterior (ulnar) segment (11).

Mezoderm hücreleri anterior üçte ikisinde bir transkripsiyon faktörü GLI3'ü eksprese eder ve posterior üçte birinde farklı bir faktör olan HAND2'yi eksprese eder (5). Son *HOXD* genlerinin etkisi altındaki bir grup hücre, ekstremite tomurcuğu üzerinde çok posterior ve distalde bulunan ZPA olmak için farklılaşmıştır (5). ZPA, üst ekstremitenin büyümesinde ve morfolojisinde hayati bir role sahiptir ve SHH adı verilen küçük bir proteini salgılayacak birkaç yüz hücreden oluşur (5). SHH, nöral tüpün, dişlerin ve ekstremitelerin embriyonik gelişiminde önemli rol oynayan bir liganddır (5). SHH distal ekstremitenin (ön kol ve el) doğru gelişiminde

kritik bir rol oynar (11). SHH bir hücrenin yüzeyine bağlandığında, GLI3 transkripsiyon faktörünün hücre içine taşınmasıyla sonuçlanan bir dizi kimyasal reaksiyonu tetikler (11). SHH varlığında, GLI3 molekülü aktif formdadır (GLI3A) (5). SHH yokluğunda, GLI3 baskılayıcı formundadır (GLI3R) ve hedef genlerin transkripsiyonu inhibe edilir (5). GLI3R artışı ekstremite mezenkiminde apoptoz hızının artması ile sonuçlanır (11).

SHH, ekstremite tomurcuğunun posterior kısmında yüksek oranda salgılandığından, onu salgılayan hücrelerin yakınında büyük miktarlarda bulunur (5). Radyal (anterior) taraftaki hücreler SHH'ye maruz kalmaz (5). Bu aynı zamanda GLI3'ün aktif ve baskılayıcı formları arasında bir gradyan olduğu anlamına gelir (5). Posterior bölgede, yüksek konsantrasyonda GLI3A bulunurken, ön veya radyal bölgede sadece GLI3R bulunur (5). GLI3 bir transkripsiyon faktörü olduğundan inaktif olduğunda bazı hedef genler asla transkribe edilmez, bu da ulnar taraf ile radyal taraf arasındaki morfolojik farklılıkları açıklar (5).

PZ her zaman ekstremite tomurcuğunun posterior ve distalinde kalır (5). ZPA, proksimalden distale büyüme sırasında AER'ye eşlik eder (5). AER, FGF'yi salgılayarak SHH üretimini aktive eder ve sürdürür (5). ZPA, büyüme sırasında distal olarak hareket eder (5). Sonuç olarak, üst kolun oluşacağı tomurcuğun proksimal bölgesi SHH'den minimum düzeyde etkilenir, ön kol SHH'ye daha fazla maruz kalır ve elin ulnar tarafı bu proteine uzun süre maruz kalır (5). ZPA'nın çıkarılması, ulna ve ulnar taraflı parmakların gelişmemesine neden olur (5). SHH, AER'yi korumak için gereklidir (5). Bu ligand tamamen eksikse, bu ekstremite transvers büyümesinin durması ve merkezi sinir sisteminin ciddi anomalilerine (holoprozensefali) yol açabilir (5). *GLI3* gen mutasyonları ise postaksiyel polidaktili veya Greig sefalopolisindaktili sendromu ve Pallister-Hall sendromu gibi polidaktili ile karakterize otozomal dominant genetik hastalıklara yol açar (5). Elin radyal tarafında, özellikle o bölgede ifade edilen başka morfojenler de (TBX5, ETV4 ve ETV5 gibi) vardır (5).

2.1.3. Dorsoventral Farklılaşma

Dorsoventral eksenin sinyal merkezi dorsal ektodermdir ve dorsal ektoderm dorsoventral farklılaşmayı WNT7A sinyali ile düzenler (11). Dorsal ektodermde *WNT7A* eksprese olurken, ventral ektodermde *EN1* eksprese olur (11). WNT7A sinyal yolu, ektodermin dorsal tarafında aktiftir (5). WNT7A sinyalizasyonu ekstremite yapılarının dorsal tarafını tanımlarken, EN1 WNT7A ekspresyonunu dorsal ektoderm ile sınırlayarak ventral ekstremite dokularının

dorsalleşmesini önler (11). Ek çalışmalar, WNT7A'nın işlevini altındaki dorsal mezodermde LMX1B'nin indüksiyonu yoluyla gerçekleştirdiğini göstermektedir (11). Tanımlanmış bir mutasyona sahip tek dorsoventral farklılaşma bozukluğu, *LMX1B* gen mutasyonlarının sebep olduğu Nail-Patella sendromudur (5). *WNT7A* genindeki değişiklikler ise fokomeliye yol açar (5).

2.2. Konjenital Üst Ekstremite Anomalilerinin Sınıflandırılması

Konjenital üst ekstremite anomalilerinin insidansı farklı çalışmalarda 10.000 canlı doğumda 22,5 ile 10.000 canlı doğumda 16 arasında bildirilmiştir (12, 13). Üst ekstremite anomalileri için şimdiye kadar birçok sınıflandırma yapılmıştır. IFSSH / OMT (*International Federation of Societies for Surgery of the Hand / Oberg-Manske-Tonkin*) sınıflandırması 2014 yılında oluşturulmuş ve önerilen sınıflandırma sistemi olmuştur (11). En son 2020 yılında güncellenmiştir (14). Bu sınıflandırmada üst ekstremite anomalileri malformasyonlar, deformasyonlar, displaziler ve sendromlardan oluşan dört gruba ayrılmaktadır (14).

2.2.1. Malformasyonlar

Malformasyonlar normal gelişim veya farklılaşmada bozukluklardır ve üst ekstremitenin en sık anomalileridir (11). IFSSH / OMT 2020 sınıflandırmasına göre malformasyonlar tüm üst ekstremitenin tutulumu ve elin tutulumu olmak üzere iki gruba ayrılır (14). Bu iki grup da kendi içerisinde proksimodistal, radyoulnar, dorsoventral ve özelleştirilmemiş eksen tutulumu olarak dört gruba ayrılır (14). Radyal longitudinal eksiklik; malformasyon grubunda, tüm ekstremite tutulumu başlığının içerisinde ve radyoulnar eksen tutulumu alt başlığında yer almaktadır.

2.2.2. Deformasyonlar

Deformasyonlar normal gelişim veya farklılaşmadan sonra ortaya çıkan bozukluklardır (11). Disrüpsiyonlar ise normal dokularda genellikle vasküler nedenlerden dolayı oluşan bozukluklardır (11). Konjenital üst ekstremite anomalileri için hem deformasyonlar hem disrüpsiyonlar normal gelişimden sonra ortaya çıktıkları için aynı grupta yer almaktadır (11). Bu grup için tipik örnek amniyotik bant sekansıdır (14). Eksenlere bağlı bir sınıflandırma bulunmamaktadır.

2.2.3. Displaziler

Displaziler izole dokuların gelişim ve farklılaşma bozukluklarıdır (11). IFSSH / OMT 2020 sınıflandırmasına göre displaziler varyant büyüme, tümöröz durumlar ve konjenital kontraktürler olmak üzere üç gruba ayrılır (14).

2.2.4. Sendromlar

IFSSH / OMT 2020 sınıflandırmasında bu grupta 50 sendrom listelenmiştir (14). Ancak bunlar ekstremite anomalisine sahip olan ve yaygın olarak tanınan sendromlardır. Örnek olarak, bir bulgu olarak başparmağın anormal gelişimine sahip 500'den fazla sendrom vardır (11).

2.3. Radyal Işın Defekti ile Seyreden Kromozom Anomalileri

Radyal ışın defektlerinde en sık saptanan kromozom anomalisi trizomi 18'dir. Pakkasjärvi ve arkadaşları tarafından radyal ışın defekti tanılı 138 olgunun değerlendirilmesinde; olgulardan %28'inde (38 olgu) kromozom anomalisi saptanmıştır (2). Otuz iki olgu trizomi 18 (olguların %23'ü) tanısı almıştır (2). Trizomi 18 dışındaki kromozom anomalileri ise altı olguda (olguların %4.3'ü) saptanmıştır (2). Bunlardan bir olgu trizomi 13, bir olgu mozaik trizomi 16 tanısı almıştır (2). Diğer anomaliler arasında duplikasyonlar (3q duplikasyonu) ve büyük delesyonlar yer almaktadır (2). Radyal ışın defektli olgularda bildirilmiş diğer kromozom anomalileri arasında 22q11.2 delesyonu, 1q21 mikroduplikasyonu, 7q22.1 delesyonu, 10q24.3 delesyonu bulunmaktadır (7, 15).

2.4. Radyal Işın Defekti ile Seyreden Tek Gen Sendromları

2.4.1. Holt-Oram Sendromu

Holt-Oram sendromu (HOS, #MIM 142900); üst ekstremite defektleri ve konjenital kalp anomalileri ile karakterizedir (16). Prevalansı 100.000 canlı doğumda 0.7 ile 1 arasında bildirilmiştir (17, 18). Bu sendrom ilk olarak 1960 yılında Holt ve Oram tarafından 4 kuşak boyunca atriyal septal defekt ve konjenital başparmak anomalileri izlenen bir ailede tanımlanmıştır (19).

2.4.1.1. Klinik Bulgular

Tüm olgularda üst ekstremite defektleri izlenmekle beraber, sendromda görülen üst ekstremite defektleri trifalangeal başparmak veya başparmak aplazisinden fokomeliye (ekstremitede uzun kemiklerin aplazisi sonucu el ve ayakların doğrudan gövdeye yapışık bulunması) kadar değişkenlik gösterebilir (16). Ayrıca bu defektler unilateral, bilateral / simetrik veya bilateral / asimetrik olarak izlenebilir (16). Diğer üst ekstremite anomalileri arasında radius aplazisi veya hipoplazisine bağlı oluşan kol uzunluklarında eşitsizlik, karpal ve tenar kemiklerde anormal gelişim veya füzyon, anormal ön kol pronasyon ve supinasyonu, başparmağın anormal opozisyonu, düşük omuzlar ve omuz ekleminde hareket kısıtlılığı yer almaktadır (16). Anormal karpal kemik etkilenmiş bireylerin tümünde mevcuttur ve sendromun tek belirtisi olabilir (20, 21).

Olguların %75'inde konjenital kalp anomalisi mevcuttur ve bu anomaliler sıklıkla kardiyak septumda izlenir (16). Atriyal septal defekt (ASD) ve ventriküler septal defekt (VSD) her sayı, boyut ve lokasyonda olabileceği gibi, kompleks kardiyak anomaliler de izlenebilir (18, 22). Ayrıca HOS'lu olgularda konjenital kalp anomalisi varlığından bağımsız olarak kardiyak iletim defektleri için artmış risk mevcuttur (16). Olgularda doğumda sinüs bradikardisi ve birinci derece atriyoventriküler (AV) blok izlenebilir, AV blok komplet kalp bloğu gibi ileri derece iletim defektlerine ilerleyebilir (16).

2.4.1.2. Moleküler Etiyoloji

HOS otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. 12q24 lokusunda yer alan *TBX5* genindeki heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. Etkilenmiş olguların %85'inde patojenik varyantların *de novo* oluştuğu, yaklaşık %15'inde ise familyal olduğu gösterilmiştir (17, 18). HOS'da penetrans tamdır (16). HOS klinik tanı kriterlerini karşılayan olguların %70'ten fazlasında HOS ile ilişkilendirilmiş tek gen olan *TBX5* geninde dizi analizi ile, %1'den azında ise delesyon / duplikasyon analizleri ile patojenik varyantlar saptanmaktadır (23, 24). Geri kalan yaklaşık %30'luk kısmında ise *TBX5* geninde patojenik varyant saptanamaması, bu olgularda *TBX5* geninde kodlamayan veya regülatör bölgelerde patojenik varyantların olabileceğini ya da henüz tanımlanmamış başka genlerin ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (23, 25).

TBX5 geni (T-box transkripsiyon faktörü 5) hem kardiyogenez hem de ekstremite gelişiminde önemli bir transkripsiyon faktörüdür (16). *TBX5*; *NKX2.5* ve *GATA4* gibi diğer

transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girebilmekte ve bu etkileşimler ile kardiyogenezin düzenlenmesine katılabilmektedir (16). *TBX5* ve diğer T-box transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu arasındaki denge embriyogenezde kalp ve ekstremite yapılarının özelleşmesinde gereklidir (26, 27, 28).

TBX5 geninde çoğu anlamsız ve çerçeve kayması patojenik varyantlarının *TBX5* mRNA'larının degradasyonuna ve sonuç olarak haployetersizliğe neden olduğu varsayılmıştır (16). Bazı yanlış anlamlı patojenik varyantlar ise transkriptlerde azalmış DNA bağlama aktivitesi ile sonuçlanmaktadır (16). İki durumda da fonksiyonel TBX5'de azalma hastalığa yol açmaktadır (29). Buna karşılık, uzamış bir *TBX5* veya intragenik bir *TBX5* duplikasyonunu öngören patojenik varyantları bildiren çalışmalar, downstream hedeflerde dominant negatif etki olasılığını ortaya koymaktadır (30, 31). *TBX5*'in T-box domainin kristal yapısını DNA'ya bağlanmamış ve DNA'ya bağlı formlarında aydınlatan araştırmacılar, *TBX5*'in DNA ile etkileşimi için gerekli olabilecek bir indüklenebilir bir C-terminal elemanını T-box domaini içinde tanımlamışlardır (32).

2.4.2. Fanconi Anemisi

Fanconi anemisi; fiziksel anomaliler, kemik iliği yetersizliği ve malignite riskinde artış ile karakterizedir (33). Prevalansı 100.000 canlı doğumda 1 ile 250.000 canlı doğumda 1 arasında değişkenlik göstermekle birlikte, ortalama 136.000 canlı doğumda 1 olarak bildirilmiştir (34). Fanconi anemisi aplastik aneminin en sık genetik nedenidir ve hematolojik malignitelerin en sık genetik sebeplerindendir (33). Taşıyıcı sıklığı Kuzey Amerika'da 1:181, İsrail'de 1:93 gibi yüksek oranlarda bildirilmiştir (35). İlk olarak 1927 yılında Guido Fanconi tarafından pansitopeni ve fiziksel anomaliler saptanan üç kardeşte tanımlanmıştır (36).

2.4.2.1. Klinik Bulgular

Fiziksel anomaliler Fanconi anemili olguların %75'inde izlenir (33). Bu anomaliler (33):

1. Büyüme geriliği: Prenatal veya postnatal başlangıçlı boy kısalığı, düşük doğum ağırlığı
2. Anormal cilt pigmentasyonu (%40): Generalize hiperpigmentasyon (cafe au lait lekeleri), hipopigmentasyon
3. Üst ekstremitelerde bilateral veya unilateral iskelet anomalileri:

- ✓ Başparmak anomalileri (%35): Aplazi, hipoplazi, bifid, duplike, trifalangeal, uzun, proksimal yerleşimli
- ✓ Radius anomalileri (%7): Aplazi, hipoplazi, nabız yokluğu veya zayıf nabız
- ✓ El anomalileri (%5): Düz tenar eminens, birinci metakarp aplazisi, klinodaktili, polidaktili
- ✓ Ulna (%1): Displastik, kısa

4. Alt ekstremitelerde iskelet anomalileri (%5): Sindaktili, anormal parmaklar, pes ekinovarus (PEV), konjenital kalça dislokasyonu
5. Mikrosefali (%20)
6. Göz anomalileri (%20): Mikroftalmi, katarakt, astigmatizm, strabismus, epikantus, hipotelorizm, pitoz
7. Genitoüriner anomaliler:
   - ✓ Renal (%20): Atnalı, ektopik, pelvik, hipoplastik, displastik, aplazik, hidronefroz, hidroüreter
   - ✓ Genital-Erkek (%25): Hipospadias, mikropenis, kriptoorşidizm, anorşi, oligospermi, azospermi, fertilitede azalma
   - ✓ Genital-Dişi (%2): Bikornuat uterus veya uterus malpozisyonu, küçük overler
8. Endokrin hastalıklar (%50-%75): Hipotiroidi (%30-%60), diyabet (%8-%10), hiperglisemi / bozulmuş glikoz toleransı (%25-%70) ve insülin rezistansı
9. İşitme kaybı (%10): Genellikle iletim tipi [ek kulak anomalilerinin (displastik kulak, dar kulak kanalı, anormal pinna vb.) eşlik ettiği veya etmediği orta kulak kemik anomalilerine sekonder]
10. Konjenital kalp hastalıkları (%6): Patent duktus arteriyozus (PDA), ASD, VSD, aort koarktasyonu, turunkus arteriyozus, situs inversus
11. Gastrointestinal anomaliler (%5): Özofageal, duodenal veya jejunal atrezi, imperfore anüs, trakeözofageal fistül, anüler pankreas, malrotasyon
12. Santral sinir sistemi anomalileri (%3): Küçük hipofiz, hipofiz sapı kesilme sendromu, korpus kallozum agenezisi, serebellar hipoplazi, hidrosefali, dilate ventriküller
13. Yüz bulguları (%2): Triangüler yüz, mikrognati, ortayüz hipoplazisi

14. Spinal anomaliler (%2): Spina bifida, skolyoz, hemivertebra, kosta anomalileri koksigeal aplazi
15. Boyun anomalileri (%1): Sprengel deformitesi, Klippel-Feil anomalisi, kısa veya yele boyun, düşük saç çizgisi

Gelişim geriliği ve / veya bilişsel yetersizlik Fanconi anemili olguların %10'unda izlenir (33).

Fanconi anemili olgularda kemik iliği yetersizliğinin başlangıç yaşı oldukça değişkendir (33). *FANCA, FANCC* ve *FANCG* genlerinde patojenik varyantlar saptanan 754 olgunun analizinde ortalama başlangıç yaşı 7.6 yaş olarak bulunmuştur (33). Nadiren kemik iliği yetersizliği yenidoğanlarda ve küçük çocuklarda izlenebilir (37). Herhangi bir hematolojik anomali gelişim riski 40 yaşında %90 olarak bildirilmiştir (38).

Trombositopeni veya lökopeni genellikle anemiden önce başlar (33). Bu bulgular genellikle makrositoz ve artmış fetal hemoglobin ile ilişkilidir (33). Pansitopeni genellikle zamanla birlikte kötüleşir (33). Sweet sendromu (nötrofilik cilt infiltrasyonu) Fanconi anemili yedi hastanın altısında hematolojik hastalığın progresyonu ile ilişkilendirilmiştir (39).

Kemik iliği yetersizliğinin ağırlığı sitopenilerin derecesine göre sınıflandırılabilir (33). Kemik iliği yetersizliği kriterlerinin karşılanması için sitopeniler persistan olmalı ve diğer nedenler dışlanmalıdır (33).

Fanconi anemisinde kanser yatkınlığı:

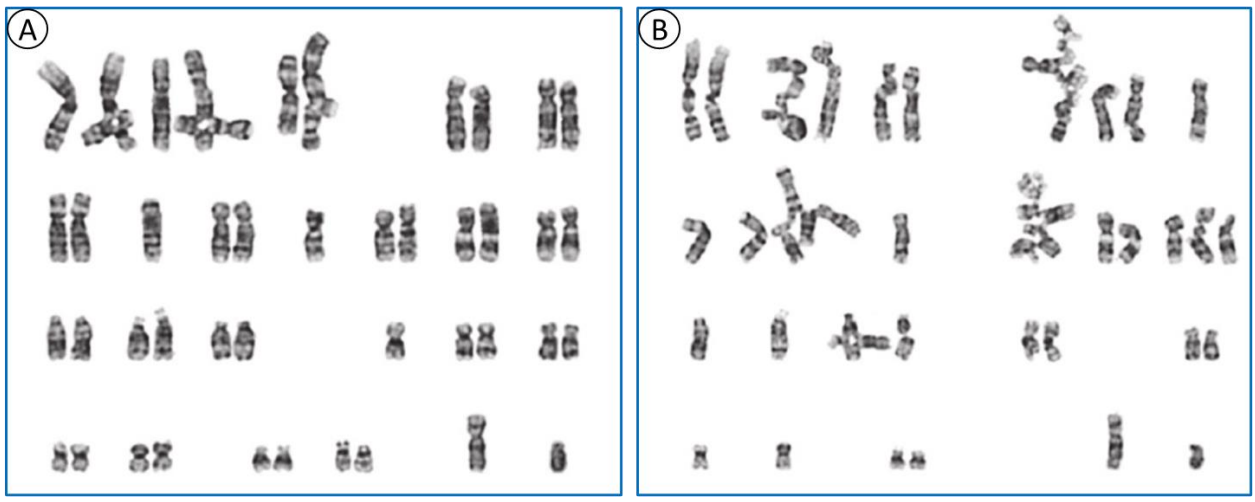
1. Akut miyeloid lösemi (AML): Fanconi anemili olgularda AML için rölatif risk 500 kat kadar artmıştır (40, 41). Kombine kohortların risk analizlerinde AML için kümülatif insidans 50 yaşta %13 olarak bulunmuş, çoğu olgu 15-35 yaş arasında tanı almıştır (33). Miyelodisplastik sendrom (MDS) / AML gelişimi için artmış risk monozomi 7 ve 7q delesyonlarıyla ilişkilidir (33). Kromozom 3q26-29'un klonal amplifikasyonlarının MDS / AML'ye ilerleme riskinde artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (42).
2. Solid tümörler: Doğum defekti olmayan ve kemik iliği yetersizliği gelişmeyen olgularda hastalığın ilk bulgusu solid tümörler olabilir (33).
   - ✓ Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomları Fanconi anemili olgularda en sık izlenen solid tümördür (33). İnsidans genel popülasyona göre 500-700 kat yüksektir (33). Ayrıca Fanconi anemili olgularda gözlenen baş ve boyun skuamöz

hücreli karsinomları normal popülasyona göre daha erken yaşta izlenmekte, en sık oral kavitede gözlenmekte, ileri evrede saptanmakta ve tedaviye yanıtı zayıf olmaktadır (33).

- ✓ Fanconi anemili olgular cildin ve genitoüriner sistemin ikinci primer kanserleri için artmış risk altındadır (33). İkinci primerlerin paterni, genel popülasyondaki HPV ile ilişkili baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarında gözlenenlere benzemektedir (43).
- ✓ Kemik iliği yetersizliği için androjen tedavisi alan Fanconi anemili olgular ayrıca karaciğer tümörleri için de artmış risk altındadır (33).

2.4.2.2. Moleküler Etiyoloji

Fanconi anemisi otozomal resesif (OR), otozomal dominant (OD) ve X'e bağlı kalıtım gösterebilir (33). Fanconi anemisi şüphesi varlığında diepoksibütan ve mitomisin C'ile uyarılmış lenfositlerde yapılan kromozom analizlerinde kromozom kırıklarında artış ve radyal formların izlenmesi (Şekil 3) tanıda önem taşır (33). Fanconi anemisi ile ilişkilendirilmiş genlerin kalıtım paterni ve moleküler genetik tanı yöntemleri (dizi analizi ve delesyon / duplikasyon analizi) ile varyant saptanma yüzdeleri Tablo 1'de belirtilmiştir (33).



Şekil 3: Fanconi anemisinde sitogenetik bulgular

(A) Diepoksibütan, **(B)** Mitomisin C ile kromozom kırık testinde Fanconi anemili olguda kromozom kırıklarında artış ve radyal formlar izlenmektedir.

HJ Lee, 2012 çalışmasından alıntılanmıştır (44).

Tablo 1: Fanconi anemisi moleküler etiyolojisi

Gen	**Kalıtım paterni**	**OMIM fenotip numarası**	**Komplemen-tasyon grup**	**Gen ilişkili hasta yüzdesi**	**Dizi analizi ile varyant saptanma yüzdesi**	**Delesyon / duplikasyon analizi ile varyant saptanma yüzdesi**
FANCA	OR	#MIM 227650	FA-A	%60-70	%60	%40
FANCC	OR	#MIM 227645	FA-C	%14	>%90	<%10
FANCG	OR	#MIM 614082	FA-G	%10	>%99	Bildirilmemiş
FANCD2	OR	#MIM 227646	FA-D2	%3	>%90	<%10
FANCE	OR	#MIM 600901	FA-E	%3	>%99	Bildirilmemiş
FANCB	X'e bağlı resesif	#MIM 300514	FA-B	%2	%70	%30
FANCF	OR	#MIM 603467	FA-F	%2	%85	%15
BRCA2	OR	#MIM 605724	FA-D1	%2	>%99	Bildirilmemiş
BRIP1	OR	#MIM 609054	FA-J	%2	>%99	Bildirilmemiş
FANCI	OR	#MIM 609053	FA-I	%1	>%95	<%5
FANCL	OR	#MIM 614083	FA-L	<%1	>%90	<%10
*FANCM**	-	-	FA-M	<%1	%75	1 bildirilmiş
PALB2	OR	#MIM 610832	FA-N	<%1	>%95	1 bildirilmiş

BRCA1	OR	#MIM 617883	FA-S	<%1	>%99	Bildirilmemiş
ERCC4	OR	#MIM 615272	FA-Q	<%1	>%99	Bildirilmemiş
SLX4	OR	#MIM 613951	FA-P	<%1	>%90	1 bildirilmiş
UBE2T	OR	#MIM 616435	FA-T	<%1	<%50	>%50
RAD51C	OR	#MIM 613390	FA-O	<%1	>%99	Bildirilmemiş
RAD51	OD	#MIM 617244	FA-R	2 bildirilmiş	>%99	Bildirilmemiş
REV7	OR	#MIM 617243	FA-V	1 bildirilmiş	>%99	Bildirilmemiş
RFWD3	OR	#MIM 617784	FA-W	1 bildirilmiş	>%99	Bildirilmemiş
XRCC2	OR	#MIM 617247	FA-U	1 bildirilmiş	>%99	Bildirilmemiş
*FAAP100**	-	-	FA-Y	1 olguda	>%99	Bildirilmemiş

**FANCM* ve *FAAP100* genleri henüz OMIM veri tabanında Fanconi anemisi ile ilişkilendirilmemiştir.

OMIM veri tabanında Fanconi anemisi ile ilişkili olan ve her biri için farklı fenotipik komplementasyon grubu tanımlanmış en az 21 gen bulunmaktadır (33). Fanconi anemisi ilişkili genlerin kodladığı proteinlerin Fanconi anemisi yolağı veya Fanconi anemisi-BRCA yolağı adı verilen ortak bir yolakta görev aldığı düşünülmektedir ve bu yolak DNA çapraz bağlayıcı ajanlara karşı hücresel direnci düzenlemektedir (45, 46, 47). Bu yolaktaki bozukluklar Fanconi anemisinde sık gözlenen hücresel ve klinik anomalilere yol açmaktadır (47, 48).

Fanconi anemisi proteinlerinin sekizi (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL ve FANCM), FAAP24 ve FAAP100 proteinleri ile birlikte nükleer komplekste (Fanconi anemisi kor kompleksi) toplanmıştır (49, 50). Bu kompleks çok alt üniteli bir ubikuitin ligaz kompleksidir ve iki Fanconi anemisi proteininin (FANCD2 ve FANCI) monoubikuitinasyonu, Fanconi anemisi kor kompleksine bağlıdır (51). DNA hasarına yanıt olarak veya hücre döngüsünün S fazında bu Fanconi anemisi kor kompleksi FANCD2 ve FANCI proteinlerinin monoubikuitinasyonunu aktive eder (33). FANCD2 ve FANCI monoubikuitinlenmiş haldeyken BRCA1, BRCA2, PALB2 ve RAD51 proteinlerini içeren nükleer odaklara translokasyona uğrar (33). FANCI, FANCD2 ile dizi benzerliği gösterir ve birlikte bir protein kompleksi oluştururlar (51). FANCD2 ve FANCI'nın monoubikuitinasyonu birbirine bağımlıdır (51). FAN1 adlı nükleazın, enzimatik aktivitesini yöneten monoubikuitinlenmiş FANCD2'ye bağlandığı gösterilmiştir (52). Ayrıca Fanconi anemisi kor kompleksi, BLM, RPA, ve topoizomeraz IIIa ile BRAFT (BLM, RPA, FA ve topoizomeraz IIIa) adı verilen daha büyük bir kompleks oluşturur (53). FANCM her iki ayrılabilir komplekste de (FA çekirdek kompleksi ve BLM kompleksi) bulunur (54).

BRCA2 (eski adıyla *FANCD1*), meme kanseri yatkınlığı ile ilişkili bir tümör supresördür ve farklı bir klinik fenotipe sahiptir (55). BRCA2 protein stabilitesi ve lokalizasyonu, başka bir meme kanseri yatkınlık geni olan *PALB2* (eski adıyla *FANCN*) tarafından kodlanan PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*) tarafından düzenlenir (56). Başka bir meme kanseri yatkınlık geni *BRIP1* (eski adıyla *BACH1* veya *FANCJ*), Fanconi anemisi ile de ilişkilidir (57, 58). *BRCA2, PALB2* ve *BRIP1*, FANCD2 protein monoubikuitinasyonu veya FANCD2 nükleer odaklarının oluşumu için gerekli değildir, ancak mitomisin C veya diepoksibütana hücresel direnç için gereklidir (33). BRCA2'nin, FANCG ve FANCD2 dahil olmak üzere Fanconi anemisi proteinlerinin çoklu alt komplekslerinde hareket ettiği bulunmuştur (59). FANCD2'nin CHK1 tarafından fosforilasyonunun BRCA2 ile etkileşim için gerekli olduğu gösterilmiştir (60). BRIP1 ve FANCD2'nin ise odakların oluşumunda işlevsel olarak bağlantılı olduğu gösterilmiştir (61).

Fanconi anemisi patolojisinin iyileştirilmesi, homolog olmayan uç birleştirme yolağının elemanlarının aşağı regülasyonunda gösterilmiştir (62). Bu, Fanconi anemisi patofizyolojisinin çoğunun homolog olmayan uç birleştirmenin yanlış onarımından kaynaklandığını göstermektedir (33). Öte yandan, homolog rekombinatoryal onarımda Fanconi anemisinin katılımı, BRCA1, BRCA2 ve RAD51C ile etkileşimlerde iyi bir şekilde gösterilmiştir (33). FANCD2'nin ayrıca

PCNA ve pol K ile etkileşime girdiği gösterilmiştir, bu da homolog rekombinasyonun bir varyantı olan translezyon sentezinin, lezyonun atlanmasında *(bypass)* Fanconi anemisi proteinlerinin doğrudan işlevi olabileceğini düşündürmektedir (63).

2.4.3. TAR Sendromu

TAR (*Thrombocytopenia Absent Radius*) sendromu (#MIM 274000); bilateral radius yokluğu ve trombositopeni ile karakterizedir (64). Prevalansı 100.000 canlı doğumda 1 ile 200.000 canlı doğumda 1 arasında bildirilmiştir (64). İlk olarak 1959 yılında Shaw ve Oliver tarafından trombositopeni ve radius yokluğu saptanan iki kız kardeş tanımlanmış ve Fanconi anemisinden farklı bir antite olduğu düşünülmüşür (65).

2.4.3.1. Klinik Bulgular

Ekstremite anomalileri hem üst hem alt ekstremiteleri etkileyebilir, ancak genelde üst ekstremite tutulumu daha ağırdır (64). TAR sendromlu olgularda her zaman bilateral radius yokluğu veya hipoplazisi izlenir (64). Başparmaklar her zaman mevcuttur ve normale yakın boyuttadır, ancak bazen normalden geniş ve düz olarak izlenebilir (64). Başparmaklar fleksiyonda tutulur ve fonksiyonlarında kısıtlılık izlenir (66). Ayrıca üst ekstremitelerde ulna, humerus ve omuz kuşaklarının yokluğu veya hipoplazisi izlenebilir (64). Sindaktili gözlenebilir ve beşinci parmak klinodaktilisi sıktır (64). Alt ekstremiteler olguların yaklaşık yarısında etkilenir; kalça dislokasyonu, koksa valga, femoral ve/veya tibial torsiyon, genu varum ve patella yokluğu sıktır (64). En ağır ekstremite tutulumu tetrafokomelidir (64). Diğer nadir iskelet bulguları arasında kosta ve vertebra anomalileri yer almaktadır (64).

Trombositopeni konjenital olabilir veya yaşamın ilk haftaları ile ayları içerisinde gelişebilir (64). Çoğu olguda trombosit düzeyleri yaşamın ilk iki yılında düşükken sonrasında artar, ama referans değerin alt sınırından düşük kalır (67, 68). İnek sütü alerjisi sıktır ve trombositopeninin alevlenmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (69). Nadiren bildirilen diğer hematolojik bulgular arasında anemi, lökomoid reaksiyonlar, AML ve akut lenfoblastik lösemi yer almaktadır (68, 70, 71, 72).

Kardiyak anomaliler genelde septal defektler şeklinde izlenir (73). Bir olguda Fallot tetralojisi bildirilmiştir (74).

Genitoüriner anomaliler renal agenezi veya malrotasyon, atnalı böbrek, hidronefroz ve pelviektazi gibi böbrek ve üriner sistemin konjenital malformasyonlarını içerir. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser sendromu izlenen olgular bildirilmiştir (75, 76).

TAR sendromlu olgularda nadiren langerhans hücreli histiyositoz bildirilmiştir (68, 77).

2.4.3.2. Moleküler Etiyoloji

TAR sendromu otozomal resesif kalıtım paterni gösterir. TAR sendromlu olguların çoğunda 1q21 lokusunda yer alan *RBM8A* genini içeren heterozigot delesyon ve *RBM8A* genindeki hipomorfik varyantın trans konumda bulunması sonucu oluşan bileşik heterozigot mutasyonlardan kaynaklanır. Nadiren bazı olgularda *RBM8A* genindeki hipomorfik varyant ve *RBM8A* genindeki *null* allel oluşumuna sebep olan dizi varyantının (çerçeve kayması veya trunke edici varyantlar) bileşik heterozigotluğu saptanır. TAR sendromunda penetransın tam olduğu düşünülmektedir (64).

1q21.1 bölgesinde saptanan minimal delesyon bölgesi *RBM8A* ve diğer 11 bilinen geni içeren 200 kilobazlık bir bölgedir (78). Ancak en sık gözlenen delesyon telomere doğru uzanan ve ek olarak beş geni daha içeren 500 kilobazlık bir delesyondur (78). TAR sendromu ile ilişkili olan hem 200 kilobazlık hem de 500 kilobazlık delesyonlar tipik olarak 1q21.1 delesyon / duplikasyon sendromu bölgesinden farklı ve ayrıdır (64).

RBM8A genini içeren heterozigot delesyonların nadir olması (sıklıkla *de novo* oluşum) ve *RBM8A* genindeki hipomorfik varyantların sık saptanması (toplumda %3-14.8'e kadar yüksek olabilen sıklıkta) nedeniyle TAR sendromunda kalıtım paterni diğer otozomal resesif hastalıklara göre farklılıklar gösterir (64, 79, 80). Bu farklılıklar arasında; kardeşlerde hastalık görülme sıklığının az olması, ebeveynden çocuğa hastalık geçişinin izlenmesi, etkilenmiş ikinci ve üçüncü derece akrabaların bulunması yer almaktadır (64, 79).

RBM8A geni RNA bağlayıcı protein 8A'yı (diğer bir adıyla Y14) kodlar (64). Bu protein daha çok nükleusta bulunmakla birlikte sitoplazmada da bulunmaktadır (64). Y14 korunmuş bir RNA bağlama motifi içerir ve kırpılma sonrası hem nükleer mRNA'lar hem de yeni eksporte edilen sitoplazmik mRNA'lar ile ilişkidedir (64). Bu proteinin intronların nerede bulunduğunu göstermek için kırpılmış mRNA'lar ile bir etiket gibi ilişkide kaldığı ve böylece mRNA kırpılmasının öncesi ile sonrasını birbirine bağladığı düşünülmektedir (64). Y14 ekzon birleşke kompleksinin bir bileşeni olarak mRNA'lar ve snRNA biyogenezinde rol oynar (64). Y14 ayrıca

genetik stabilitede de rol oynar (64). Y14'te azalma / yokluk, DNA hasar onarım faktörlerinin bölgeye gelmesini ve DNA uç birleşiminin verimliliğini tehlikeye atar (81).

TAR sendromunun Y14 haployetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (79). Hayvan deneyleri komplet Y14 yokluğunun (homozigot delesyon varlığı) letal olduğunu göstermektedir (64).

2.4.4. Townes-Brocks Sendromu

Townes-Brocks sendromu (TBS, #MIM 107480); imperfore anüs, displastik kulaklar ve başparmak anomalileri triadı ile karakterizedir (82). Prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte bir çalışmada 250.000 canlı doğumda 1 olarak bildirilmiştir (83). Bu sendrom ilk olarak 1972 yılında Townes ve Brocks tarafından baba ve beş çocuğunda imperfore anüs, trifalangeal başparmak, el-ayak anomalileri, hafif sensörinöral işitme kaybı ve displastik kulaklar izlenen bir ailede tanımlanmıştır (84).

2.4.4.1. Klinik Bulgular

SALL1 geninde patojenik varyant saptanan TBS tanılı 61 olgunun bildirildiği iki yayında olguların %84'ünde anal anomaliler, %87'sinde kulak anomalileri, %89'unda ise el anomalileri bildirilmiştir ve olguların %67'sinde klasik triadın birlikteliği gözlenmiştir (85, 86).

TBS'de görülen gastrointestinal anomaliler arasında imperfore anüs, anal stenoz, kronik konstipasyon, gastroözefageal reflü bulunmaktadır (87).

Displastik kulaklar; katlantılı süperior heliksler, preaurikular *skin tag* ve mikroti olarak gözlenebilir, olguların %65'inde hafiften ağıra değişkenlik gösteren konjenital sensörinöral ve / veya iletim tipi işitme kaybı eşlik eder (82). Hafif işitme kaybı yaşla beraber ilerleyebilir (82).

TBS'de görülen başparmak anomalileri arasında trifalangeal başparmaklar, preaksiyel polidaktili ve nadiren başparmak hipoplazisi yer almaktadır (82). Radius hipoplazisi TBS'de beklenen bir bulgu değildir (82).

Renal yapısal anomaliler arasında hafif malrotasyon, ektopi, atnalı böbrek, renal hipoplazi, renal agenezi, polikistik böbrekler, vezikoüreteral reflü bulunmaktadır. Son dönem böbrek yetmezliğini de içeren renal fonksiyonel etkilenme yapısal anomalilerin varlığından bağımsız olarak olguların %42'sinde mevcuttur (85, 86, 88).

Konjenital kalp anomalileri *SALL1* geninde en sık saptanan p.(Arg276Ter) patojenik varyantını taşıyan olguların %50'sinde bildirilmiştir (89). Ancak *SALL1* genindeki diğer

patojenik varyantları taşıyan olgularda konjenital kalp anomalileri %12-25 gibi daha düşük oranlarda bildirilmiştir (85, 86, 88).

Alt ekstremite anomalileri olguların %52'sinde izlenmiş olup bu anomaliler arasında pes planus, PEV, üst üste binmiş ayak parmakları (ikinci ve dördüncü parmak üçüncü parmağın üzerinde yerleşimli), ayak parmaklarında sindaktili ve ayak üçüncü parmak yokluğu yer almaktadır (85, 86, 88).

Genitoüriner anomaliler olguların %36'sında bildirilmiş olup bu anomaliler arasında hipospadias, vajinal aplazi ile birlikte bifid uterus, bifid skrotum ve kriptoorşidizm bulunmaktadır (85, 86, 88).

Santral sinir sistemi anomalilerinden bilişsel yetersizlik (%10), davranış problemleri, korpus kallozum dorsal kısmının hipoplazisi, altıncı ve yedinci kraniyal sinir paralizileri, Arnold-Chiari malformasyonu tip 1, Duane anomalisi bildirilmiştir (82). Diğer nadir bulguları arasında postnatal büyüme geriliği (%6-29), kosta anomalileri, vertebra anomalileri (%9), göz anomalileri, hemifasyal mikrozomi ve konjenital hipotiroidizm yer almaktadır (88, 90, 91, 92).

2.4.4.2. Moleküler Etiyoloji

TBS otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. 16q12 lokusunda yer alan *SALL1* genindeki heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. TBS'de penetrans tam olmakla beraber, ekspresivite oldukça değişkendir (82). Klasik triadı karşılayan olguların %70'inde *SALL1* geninde dizi analizi ile, %5'inde ise delesyon / duplikasyon analizleri ile patojenik varyantlar saptanmaktadır (91).

SALL1 (Sal-*Like* 1) geni SAL tipi bir C2H2 çinko parmak proteinini kodlar (82). Bu protein üzerinde karakteristik olarak dağılmış dört çift çinko parmak domaini yer almaktadır (82). Ayrıca iki tane tek çinko parmak domaini bulunur (82). *SALL1* hücre çekirdeğinde bulunur, heterokromatin odaklara bağlanır ve baskılayıcı domainler içerir (82).

Ekstremitelerde *csal1* (*SALL1*'in tavuk ortoloğu) ekspresyonu ektopik *SHH* ile aktive edilir (82). Bu aktivasyon apikal ektodermal çıkıntıdan kaynaklanan FGF4/8, Wnt3a ve Wnt7a sinyalleri gerektirir, bu *csal1* ekspresyonunun en az üç farklı yolağın etkisi altında olduğunu göstermektedir (93). Zebra balığında *SALL1* homoloğu *sall1a, tbx5* tarafından düzenlenir ve posterior pektoral yüzgeç tomurcuğunda fgf10 ve fgfr2 ekspresyonu için gereklidir (94). Farede

Sall1'in perisentromerik heterokromatin bölgede bulunarak kanonik Wnt sinyal yolağını uyardığı gösterilmiştir (95).

SALL1 geninde bildirilen patojenik varyantların çoğu erken stop kodon oluşumuna yol açmakta ve ekzon 2 veya intron 2'de yer almaktadır (82). Bilinen *SALL1* patojenik varyantlarının çoğu SALL protein etkileşimlerine aracılık eden glutaminden zengin domaini kodlayan bölgeler ile ilk çift çinko parmak domainini kodlayan bölgenin 3' ucunda yer alan 65 bç'lik bölge arasından kaynaklanmaktadır. Bu *SALL1* genindeki mutasyonel hot spot bölgeyi ekzon 2'de yer alan 802 bç'lik bir bölgeye daraltmaktadır (82).

Fare ve tavukta yapılan çalışmalarda patojenik varyantların anlamsız aracılı yıkımdan (erken dur kodonlarını tanıyan ve trunke proteinlerin translasyonunu önlemek için mRNA bozulmasını destekleyen mekanizma) kaçtığı ve bu nedenle *SALL1* geni tarafından kodlanan proteinin haployetersizliği ile sonuçlanmadığı düşünülmektedir (96, 97). Bununla birlikte, *SALL1*'in kısmi veya komplet delesyonlarının TBS fenotipi ile sonuçlandığı üç aile gösterilmiştir (24). Bu bulgular, *SALL1* haployetersizliğinin fenotipe neden olabileceğini doğrulamaktadır, ancak daha büyük delesyonlarla ilişkili fenotipin en azından p.(Arg276Ter) patojenik varyantındaki fenotipten daha hafif olduğu görülmektedir (82).

2.4.5. Townes-Brocks Sendromu 2

Townes-Brocks sendromu 2 (TBS2, #MIM 107480); İlk kez 2017 yılında Webb ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada TBS benzeri bulguları olan ve üç kuşaktan etkilenmiş altı olgunun olduğu bir ailede tüm ekzom dizileme analizinde etkilenmiş olgularda *DACT1* geninde heterozigot anlamsız bir varyant saptanmasıyla tanımlanmıştır (98). 2023 yılında Christians ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise renal ve üriner sistemin konjenital anomalileri ve TBS2 benzeri klinik bulguları olan sekiz aileden 11 olguda *DACT1* geninde heterozigot yanlış anlamlı patojenik varyantlar saptandığı bildirilmiştir (99).

2.4.5.1. Klinik Bulgular

TBS2 tanılı az sayılı olguda bildirilen bulgular arasında kulak anomalileri, gastrointestinal anomaliler, genitoüriner anomaliler ve iskelet anomalileri yer almaktadır (98, 99). Kulak anomalileri arasında unilateral mikroti, katlantılı heliksler, fincan şeklinde kulaklar; gastrointestinal anomaliler arasında imperfore anüs ve rektovajinal fistül; genitoüriner anomaliler arasında hipospadias, bifid uterus, çapraz birleşmiş ektopik böbrek ve vezikoüreteral reflü; iskelet

anomalileri arasında ise skolyoz, spina bifida okülta ve kaudal regresyon sendromu (bir olguda) yer almaktadır (98, 99).

2.4.5.2. Moleküler Etiyoloji

TBS2 otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. 14q23 lokusunda yer alan *DACT1* genindeki heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. *DACT1* geninde heterozigot patojenik varyant saptanan olgularda inkomplet penetrans ve ekspresivite değişkenliği gözlendiği bildirilmiştir (99).

DACT1 (DAPPER, beta katenin antagonisti, 1); Wnt sinyal yolağının bir elemanıdır. Wnt sinyal yolağında hücre dışı Wnt ligandlarının transmembran reseptörü Frizzled'e bağlanması ile DVL aktivasyonuna yol açar ve bu sinyal yolağı embriyogenez ve böbrek gelişiminde anahtar rol oynar (99). *DACT1 null* alleller için homozigot olan farelerde anal atrezi ve genitoüriner malformasyonları içeren çoklu konjenital anomaliler gözlenmiştir (100, 101).

2.4.6. Cornelia de Lange Sendromu

Cornelia de Lange sendromu (CdLS); dismorfik yüz bulguları, büyüme geriliği, hipertrikoz ve üst ekstremite redüksiyon defektleri ile karakterizedir (102). CdLS, klinik bulguların hafiften ağıra değişkenlik gösterebildiği bir spektrumdur (102). CdLS'nin prevalansını belirlemek zordur, çünkü daha hafif veya değişken özelliklere sahip olgular muhtemelen daha az tanınmaktadır (102). Bildirilmiş prevalanslar 10.000 canlı doğumda 1 ile 100.000 canlı doğumda 1 arasında değişmektedir (103, 104). Bu sendrom ilk olarak 1916 yılında Brachmann tarafından üst ekstremite redüksiyon defekti, büyüme geriliği ve hirşutizm bulguları olan bir fetusta tanımlanmıştır (105).

2.4.6.1. Klinik Bulgular

CdLS genellikle dismorfik yüz bulguları ile tanınabilir. Mikrobrakisefali (>%90), sinofiri (klasik bulguları olan olgularda %98), yay şeklinde ve / veya kalın kaşlar, pitoz (%60), uzun kirpikler (>%90), kalın kirpikler, kısa burun, yukarı dönük burun ucu ve antevert burun delikleri, düz ve / veya uzun filtrum, ince üst dudak vermillonu (>%90), aşağı çekik ağız komissürleri (>%90), yarık damağın eşlik edebildiği yüksek damak (%30), küçük ve aralıklı yerleşimli dişler, mikrognati (klasik bulguları olan olgularda %80) ve mandibular çıkıntılar (%42) CdLS'de görülen dismorfik yüz bulguları arasında yer almaktadır (102).

Prenatal başlangıçlı büyüme kısıtlılığı, CdLS'li olguların çoğunda mevcuttur (102). Orantılı boy kısalığı ile sonuçlanan simetrik yavaş büyüme, altı aylıkken daha belirgin hale gelir (102). Klasik CdLS'li olgularda, ortalama boy ve kilo yaşam boyunca beşinci persentilin altında kalır (106). Genel olarak daha hafif klinik özelliklere ve / veya mozaik patojenik varyantlara sahip olan olgularda büyüme geriliği daha hafif olabilir (102). Sendromda izlenen büyüme geriliğine ek olarak gastroözofageal reflü hastalığına ve beslenmeyle problemlerine sekonder konstitüsyonel büyüme kısıtlılığı da eklenebilir (102). CdLS'ye özgü büyüme grafikleri geliştirilmiştir (102).

CdLS'li çoğu olguda (>%95) gelişim geriliği ve bilişsel yetersizlik izlenir (102). IQ seviyeleri 30'un altından 102'ye kadar değişkenlik gösterebilmekle birlikte, ortalama IQ 53 olarak bulunmuştur (107, 108). Etkilenen olgulardan klasik bulgulara sahip olanlarda genellikle ağır veya çok ağır bilişsel yetersizlik izlenir (102). İfade edici dil genellikle alıcı dile daha kötü etkilenir ve alıcı dil genellikle bilişsel yetilere göre daha kötü etkilenir (109). Çocukların yarısı 24 aylıkken yürür, %95'i on yaşına kadar yürüme becerisini kazanır (107). Çocukların yarısı üç yaşına kadar ve %95'i on yaşına kadar kendilerini besleyebilme becerisini kazanır (107).

CdLS'li olgularda birçok davranış problemi bildirilmiş olup, bunlar genellikle iletişim kuramamaktan kaynaklanır (102). Duyusal işlemedeki zorluklar hiposensitivite, hipersensitivite, oryantasyon bozukluğu ve fiksasyona yol açabilir (102). Otistik davranışlar, sosyal etkileşim ve fiziksel temastan kaçınmaya veya reddetmeye neden olabilir (102). Anksiyete ile şiddetlenebilen tekrarlayıcı davranışlar yaygındır (102). Kendine zarar verme davranışları, CdLS'li olguların %56'sında görülür ve el ile kendine zarar verme davranışı en yaygın olanıdır (102).

CdLS'li olguların yaklaşık %25'inde nöbetler izlenir (102). Parsiyel epilepsi en sık görülen tiptir ve başlangıç yaşı tipik olarak iki yaşından öncedir (102). Etkilenen olguların çoğu standart medikal tedaviye iyi yanıt verir ve birkaç yıl sonra tıbbi tedaviden ayrılabilir (110).

Ciddi üst ekstremite anomalileri CdLS'li olguların %25'inde izlenir (102). Üst ekstremite defektleri ön kolların tamamen yokluğu ile seyreden ciddi redüksiyon defektlerinden, oligodaktilinin çeşitli formlarına kadar değişkenlik gösterir ve klasik bulgulara sahip olan olguların yaklaşık üçte birinde üst ekstremite defektleri mevcuttur (102). Mikromeli (küçük eller), proksimal yerleşimli başparmaklar ve beşinci parmak klinodaktilisi neredeyse tüm olgularda izlenir (102). Radyoulnar sinostoz yaygındır ve dirseklerde fleksiyon kontraktürlerine neden olabilir (102). Alt ekstremiteler üst ekstremitelerden daha az etkilenir, ayaklar genellikle

küçüktür ve ikinci ile üçüncü ayak parmaklarının sindaktilisi etkilenen bireylerin %80'inden fazlasında mevcuttur (111).

Gastroözofageal reflü hastalığı etkilenen olguların %75'inde mevcuttur (102). Olguların yaklaşık üçte birinde aspirasyon izlenir ve %15'i bir beslenme tüpü gerektirir (112). Diğer gastrointestinal anormaliler arasında pilor stenozu (%4), bağırsak malrotasyonu (%2), konjenital diyafragma hernisi (%1) yer almaktadır (102).

Etkilenen olguların %60'ında pitoz, %60'ında miyopi ve %37'sinde nistagmus izlenir (113). Diğer göz anomalileri arasında nazolakrimal kanal darlığı, glokom, mikrokornea, astigmatizma, optik atrofi, optik sinir kolobomu, strabismus, proptozis yer almaktadır.

CdLS'li olguların %40'ında sensörinöral işitme kaybı, %60'ında iletim tipi işitme kaybı bildirilmiştir (114). İşitme kaybının önemli bir kısmı zamanla iyileşir (115).

Vezikoüreteral reflü başta olmak üzere böbrek anomalileri olguların %12'sinde bildirilmiştir (102). CdLS'li erkek olguların %73'ünde kriptoorşidizm, %57'sinde hipoplastik genitalya ve %9'unda hipospadias mevcuttur (111).

CdLS'li olguların yaklaşık %30'unda konjenital kalp hastalığı izlenir (116). En sık anomaliler; pulmonik veya periferal pulmonik stenoz, VSD, ASD, koarktasyon veya hipoplastik aortik ark, aort kapak anomalisi, Fallot tetralojisi, çift çıkışlı sağ ventrikül, atriyoventriküler kanal defektidir (102).

CdLS'si olgularda izlenen diğer bulgular arasında dental problemler (>%90), hipertrikoz (>%80), kutis marmaratus (%60), uyku bozuklukları (%50), yenidoğan döneminde alçak sesli ağlama (%75), hipoplazik meme başı ve umblikus (%50) yer almaktadır.

2.4.6.2. Moleküler Etiyoloji

CdLS otozomal dominant ve X'e bağlı kalıtım gösterebilir (102). CdLS ile ilişkilendirilmiş genlerin kalıtım paterni ve moleküler genetik tanı yöntemleri (dizi analizi ve delesyon / duplikasyon analizi) ile varyant saptanma yüzdeleri Tablo 2'de belirtilmiştir (102).

Tablo 2: CdLS moleküler etiyolojisi

Gen	Kalıtım paterni	OMIM fenotipi ve	Gen ilişkili hasta	Dizi analizi ile varyant saptanma	Delesyon / duplikasyon analizi ile varyant

		numarası	**yüzdesi**	**yüzdesi**	**saptanma yüzdesi**
NIPBL	OD	CdLS1 - #MIM 122470	~%80	~%97	~%3
SMC1A	X'e bağlı dominant	CdLS2 - #MIM 300590	~%5	~%100	-
SMC3	OD	CdLS3 - #MIM 610759	%1-%2	~%97	~%3
RAD21	OD	CdLS4 - #MIM 614701	<%1	20/22	2/22
HDAC8	X'e bağlı dominant	CdLS5 - #MIM 300882	~%4	~%90	~%10
*BRD4**	OD	-	<%1	3/4	1/4

* *BRD4* geni henüz OMIM veri tabanında CdLS ile ilişkilendirilmemiştir.

CdLS ile sonuçlanan patojenik varyantlar kromatini düzenleyen genleri (en yaygın olarak kohezin kompleksini) hasara uğratır (102). Kohezin; kromozom segregasyonu, genomik stabilite, genom organizasyonu ve transkripsiyonel düzenleme dahil olmak üzere kromatin biyolojisinin birçok elemanını düzenleyen bilezik benzeri bir yapıdır (102). Kohezin kompleksinin kor proteinleri SMC1A, SMC3 ve RAD21'i içerir (102). Düzenleyici proteinler olan NIPBL ve MAU2 kohezinin kromatin üzerine yüklenmesinde anahtar rol oynarken, HDAC8 ise kohezinin kromatin üzerine yüklenmesini ve stabilizasyonunu sağlamada önemlidir (102).

Ayrıca, promotörlerin *enhancer* regülasyonunu kolaylaştırmak ve RNA polimeraz aktivitesini desteklemek için kromatinin döngülenmesini sağlayan kohezinin anahtar rollerinden bazıları, ANKRD11, EP300, BRD4 ve AFF4 tarafından da düzenlenmektedir, bu da bu genlerdeki patojenik varyantların CdLS benzeri bulgulara nasıl yol açabileceği konusunda fonksiyonel örtüşmeyi düşündürmektedir (102). Bu nedenlerden dolayı, CdLS "kohezinopati" ve "transkriptomopati" olarak adlandırılmıştır (102).

Gen ile fenotip korelasyonu: Karakteristik yüz bulguları ve ekstremite anomalilerinini içeren klasik CdLS bulguları olan olguların *NIPBL* geninde patojenik bir varyanta sahip olma olasılığı daha yüksektir (102). *NIPBL* geninde patojenik varyant saptanan olgular ile kıyaslandığında, karakteristik yüz bulgularının bazılarını taşıyan, ancak değişken bilişsel ve

ekstremite veya yapısal etkilenime sahip daha hafif fenotipler tanımlanmıştır (117, 118, 119, 120). Bu hafif fenotipe sahip olgularda *BRD4, SMC3*, *RAD21* genlerinde heterozigot patojenik varyant veya *HDAC8, SMC1A* genlerinde hemizigot patojenik varyant saptanabilir (117, 118, 119, 120)

2.4.7. Roberts Sendromu

Roberts sendromu (#MIM 268300); prenatal başlangıçlı büyüme geriliği, ekstremite malformasyonları ve kraniyofasyal anomaliler ile karakterizedir (121). Roberts sendromu nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir (121). Bu sendrom ilk olarak 1919 yılında Roberts tarafından birinci derece kuzen olan ebeveynlerin üç çocuğunda fokomeli, bilateral yarık damak / dudak, intermaksiller protrüzyon bulgularının izlenmesiyle tanımlanmıştır (122).

2.4.7.1. Klinik Bulgular

Prenatal başlangıçlı büyüme kısıtlılığı, etkilenmiş tüm olgularda izlenir (121). Postnatal büyüme kısıtlılığı orta veya ağır derecede olabilir ve ekstremite ile kraniyofasyal anomalilerin ile ağırlığı ile korelasyon gösterir (121).

Ekstremite malformasyonları, uzun kemiklerde simetrik mezomelik kısalık ve anterior-posterior eksen tutulumunu içerir (121). Uzun kemiklerin etkilenme sıklığı ve derecesine göre yüksekten düşüğe sıralandığında, üst ekstremitelerde radius, ulna ve humerus şeklinde, alt ekstremitelerde fibula, tibia ve femur şeklinde izlenir (121). Ekstremite anomalilerinin derecesi sefalo-kaudal patern gösterir; üst ekstremiteler, alta göre daha ağır bir şekilde etkilenir, bazı olgularda sadece üst ekstremite malformasyonları izlenir (121).

El malformasyonları arasında brakidaktili ve oligodaktili yer alır (121). Sık izlenen başparmak anomalileri; proksimal yerleşimli başparmak, başparmak hipoplazisi veya aplazisidir (121). Beşinci parmak ikinci en sık etkilen parmaktır ve beşinci parmak klinodaktilisi, hipoplazisi ve aplazisi şeklinde etkilenim izlenir (121). Şiddetli etkilenen olgularda sadece üç parmak bulunur (121). Hafif fokomelili olgularda belirgin olan ekstremite kemik füzyonları, dizlerde ve ayak bileklerinde daha sık olmakla beraber ellerde de izlenebilir (121).

Kraniyofasyal anomaliler arasında yarık dudak ve / veya yarık damak, premaksiller protrüzyon, mikrognati (%77), mikrosefali, brakisefali (%63), orta yüz kapiller hemanjiyomu (%71), malar hipoplazi (%88), aşağı çekik palpebral fissürler (%57), hipertelorizm (%85), sığ

orbitalardan dolayı ekzoftalmi (%59), kornea opasiteleri (%33), hipoplazik ala naziler (%77), konveks burun sırtı ve kulak malformasyonları (%69) yer almaktadır (121). Hafif etkilenen olgularda damak anomalileri yoktur veya sadece yüksek damak izlenir (121). En ciddi etkilenen olgularda fronto-etmoid-nazal-maksiller ensefalosel mevcuttur (121). Ekstremite ile yüz tutulumunun derecesi arasında korelasyon gözlenmiştir; hafif ekstremite anomalileri olan olgular hafif kraniyofasyal malformasyonlara sahipken, ciddi ekstremite anomalileri olan olgularda daha fazla kraniyofasyal anomali izlenir (121).

Bilişsel yetersizlik, etkilenen olguların çoğunda mevcuttur; normal entellektüel ve sosyal gelişim de bildirilmiştir (123).

Diğer bulgular;

- ✓ Genital anomaliler arasında erkeklerde büyük penis (%30) (kısa ekstremitelere göre rölatif büyük görünüm), kriptoorşidizm ve hipospadias, dişilerde büyük klitoris (%46) yer almaktadır (124).
- ✓ Renal anomaliler arasında polikistik böbrek (%2), atnalı böbrek ve hidronefroz (%2) yer almaktadır (121).
- ✓ Kardiyak defektler arasında ASD, VSD ve PDA bulunmaktadır (121).
- ✓ Göz anomalileri arasında sık olarak kristalin lensin tutulumunun eşlik edebildiği korneal opasiteler izlenir (125). Diğer oküler bulgular arasında mikroftalmi ve glokom bulunur (125).
- ✓ Seyrek saçlar ve gümüş sarısı saç rengi izlenir (121).
- ✓ İki olguda kavernöz anjiyoma bağlı üçüncü kraniyal sinir paralizisi bildirilmiştir (126). Bir olguda malign melanom, bir olguda rabdomiyosarkom olmak üzere ek ekstrakraniyal neoplazmlar bildirilmiştir (127, 128) .
- ✓ Moyamoya hastalığı (%2) ve intrakraniyal anevrizmalara sekonder inme (%4) geç adölesan ve genç yetişkin döneminde olgularda izlenmiştir (129).

2.4.7.2. Moleküler Etiyoloji

Roberts sendromu otozomal resesif kalıtım paterni gösterir. 8p21 lokusunda yer alan *ESCO2* genindeki homozigot veya bileşik heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. Roberts sendromu şüphesi varlığında Giemsa veya C-bantlama teknikleri ile boyanmış standart sitogenetik preparatlarında metafazlardaki çoğu kromozomda erken sentromer ayrışması

(*premature centromere separation*, PCS) şeklindeki karakteristik kromozom anomalisi ve heterokromatik bölgelerin ayrışmasının (*heterochromatin repulsion*, HR) izlenmesi (Şekil 4) tanıda önem taşır (121). Roberts sendromu tanılı olguların tümünde bu sendrom ile ilişkilendirilmiş tek gen olan *ESCO2* geninde dizi analizi ile patojenik varyantlar saptanmaktadır (121). Delesyon / duplikasyon analizleri ile tanı alan olgu bildirilmemiştir (121).



Şekil 4: C-bantlama ile boyanmış metafazlardaki erken sentromer ayrışması

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD. Lab. Arşivinden alınmıştır.

ESCO2 geni bir asetiltransferaz olan ESCO2'yi kodlar (130). ESCO2, MCM helikaz ve PCNA isimli iki farklı kompleksle ilişkilidir (131, 132). ESCO2, DNA replikasyonu sırasında MCM ve PCNA kompleksleri ile seyahat eder ve kardeş kromatit kohezyonu ile gen transkripsiyonunun kontrolünde rol oynayan halka şeklinde bir kompleks olan kohezyon kompleksini asetiller (121). ESCO2, kohezin kompleksi alt ünitesi olan SMC3'ü lizin rezidülerinde asetilleyerek, kohezyon kompleksinin DNA ile bağlanmasının stabilitesine katkıda bulunur ve yeni replike olmuş kardeş kromatitleri bir arada tutar (133).

ESCO2 yokluğunda, metafaz kromozomlarının primer konstriksiyonu yoktur ve bozulmuş sentromerik kohezyon gösterirler (121). Ancak, kardeş kromatitler metafazda hizalanmalarına izin veren kol kohezyonu ile bir arada tutulurlar (121). Hücreler, sentromerik kohezyon eksikliğine rağmen anafaza ilerler (134). Hücre bölünmesi; düşük hücre canlılığı, mikronükleasyonlu anöploidi yüksek sıklığı ve progenitör hücrelerin artmış apoptozu nedeniyle oldukça verimsizdir (130, 135).

2.4.8. Baller-Gerold Sendromu

Baller-Gerold sendromu (BGS, #MIM 218600); kraniyosinostoz ve üst ekstremite anomalileri ile karakterizedir (136). BGS'nin prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte 1.000.000 canlı doğumda 1'den az olduğu düşünülmektedir (137). Bu sendrom ilk olarak Baller tarafından 1950 yılında ebeveynleri arasında akraba evliliği olan bir dişi olguda boy kısalığı, oksisefali ve radius aplazisi / hipoplazisi saptanmasıyla ve 1959 yılında Gerold tarafından bir erkek olgu ve kız kardeşinde koronal sinostoz, radius ve başparmak aplazisi ve ulnada eğrilik saptanması ile tanımlanmıştır (138, 139).

2.4.8.1. Klinik Bulgular

BGS yenidoğanda kraniyosinostoz ve üst ekstremite anomalisi ile prezente olur (136). En sık olarak koronal sütür etkilenir; metopik, lambdoid ve sagital sütürler de tek başına veya kombinasyon halinde etkilenebilir (136).

Kraniyosinostoz ile ilişkili olarak izlenen kraniyofasyal bulgular; brakisefali, proptozis, belirgin alın ve büyük fontanellerdir (136). Diğer kraniyofasyal bulgular ise; konkav burun sırtı, kısa burun, ince üst dudak vermillonu ile birlikte küçük ağız ve yüksek damaktır (136).

Üst ekstremite anomalisi başparmak hipoplazisi / aplazisi ve radyal hipoplazi / aplazi kombinasyonu şeklinde izlenir ve asimetrik olabilir (136). Karpal veya metakarpal kemiklerin malformasyonu veya yokluğu da bildirilmiştir (136).

Patellar hipoplazi veya aplazi çocuklukta belirginleşir (136). Patella yokluğu genu rekürvatum ve diz instabilitesine neden olabilir (136).

Cilt lezyonları doğumdan sonraki ilk birkaç yıl içinde herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir (136). Lezyonlar tipik olarak yüz ve ekstremitelerde eritem ile başlar (136). Bulgular daha sonra poikilodermaya (benekli hipopigmentasyon ve hiperpigmentasyon, atrofi ve telanjiektaziler) dönüşür (136).

Yavaş büyüme, bebeklik döneminde belirgindir ve final boy tipik olarak ortalamanın dört standart deviasyon (SD) altında kalır (136).

Bilişsel yetersizlik bildirilmiştir, ancak etkilenen olguların çoğu normal zekaya sahiptir (140).

İmperfore veya anterior yerleşimli anüs bildirilmiştir (136).

VSD, Fallot tetralojisi ve konjenital portal venöz malformasyonlar gibi kardiyovasküler defektler de bildirilmiştir (136).

BGS'li bir olguda lenfoma bildirilmiştir (141). Bununla birlikte, *RECQL4* genindeki patojenik varyantlarla ilişkili diğer sendromlarda (Rothmund-Thomson sendromu ve RAPADILINO sendromu) osteosarkom, lenfoma ve cilt kanseri için artmış risk bildirilmiştir (136). Bu nedenle, kanseri düşündüren semptomları olan BGS'li olgular hızla değerlendirilmelidir (136).

2.4.8.2. Moleküler Etiyoloji

BGS otozomal resesif kalıtım paterni gösterir. 8q24 lokusunda yer alan *RECQL4* genindeki homozigot veya bileşik heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. BGS tanılı olguların %95'inden fazlasında bu sendrom ile ilişkilendirilmiş tek gen olan *RECQL4* geninde dizi analizi ile patojenik varyantlar saptanmaktadır (136). Delesyon / duplikasyon analizleri ile tanı alan olgu nadir olarak bildirilmiştir (136, 142).

RECQL4 geni, ATP'ye bağımlı DNA helikaz Q4 veya RecQ olarak bilinen helikaz süper aile II'ye ait 1.208 amino asitten oluşan bir proteini kodlar (136). En az beş RecQ insan paraloğunun (*RECQL, BLM, WRN, RECQL4* ve *RECQL5*) farklı ancak kısmen örtüşen rollerde yer aldığı bilinmektedir (136). *BLM*'deki patojenik varyantlar Bloom sendromu ile, *WRN*'deki patojenik varyantlar ise Werner sendromu ile ilişkilidir (136). Her ikisi sendrom da kansere yatkınlık ve / veya erken yaşlanma ile karakterize otozomal resesif kalıtımlı kromozom instabilite sendromlarıdır (136). Bu özellikler *RECQL4* ile ilişkili otozomal resesif Rothmund-Thomson sendromu ve genetik instabilite, büyüme geriliği ve kanser yatkınlığı ile karakterize olan ve fenotipik olarak örtüşen RAPADILINO ve BGS'de de izlenmektedir (136). *RECQL* geni 2022 yılında tanımlanan ve otozomal resesif kalıtımlı RECON progeroid sendromu ile ilişkilendirilmiştir (143). *RECQL5* ise herhangi bir hastalık ile ilişkilendirilmemiştir (136).

RecQ helikazları sadece DNA işlenmesinin bazı aşamalarında (replikasyon, rekombinasyon, onarım, telomer bakımı) değil, aynı zamanda translasyon, RNA işlenmesi, mtDNA bakımı ve kromozom segregasyonunda da temel işlevlere sahiptir (144). DNA metabolizmasının hemen hemen tüm aşamalarında rol aldıkları için, ekspresyonlarının ve biyokimyasal aktivitelerinin bozulması genomik instabiliteye yol açarak hastalık ve kanser yatkınlığına neden olmaktadır (145).

2.4.9. Rothmund-Thomson Sendromu

Rothmund-Thomson sendromu (RTS); poikiloderma, iskelet anomalileri ve özellikle osteosarkom olmak üzere kanser riskinde artış ile karakterizedir (146). RTS nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir (146). Bu sendrom ilk olarak Rothmund tarafından 1868 yılında ebeveynleri arasında akraba evliliği olan iki ayrı aileden beş olguda lentiküler opasiteler ile cilt bulguları saptanmasıyla ve 1936 yılında Thomson tarafından 'poikiloderma konjenitale' adıyla tanımlanmıştır (147, 148).

2.4.9.1. Klinik Bulgular

RTS'li olguların sendromun klinik bulgularının ne kadarını sergileyeceği ve bulguların ağırlığı değişkenlik gösterir (146). *ANAPC1* genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanan olgular RTS tip 1, *RECQL4* genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanan olgular RTS tip 2 olarak adlandırılır.

RTS'li çocuklarda tipik olarak üç ile altı aylıkken karakteristik cilt döküntüsü gelişir, ancak bazı olgularda döküntü başlangıcı iki yaşa kadar olabileceği bildirilmiştir (146). Cilt bulguları yüzde eritem, şişlik ve bazen büllenme olarak başlar, daha sonra kalçalara ve ekstremitelere yayılır (146). Aylar ile yıllar arasında kademeli olarak cilt bulguları kronik hale gelir, yaşam boyu devam eden retiküle hipopigmentasyon ve hiperpigmentasyon, telanjiektaziler ve punktat atrofi (toplu olarak poikiloderma olarak adlandırılır) izlenir (146). Hiperkeratotik lezyonlar olguların yaklaşık üçte birinde görülür (146).

RTS'li birçok olguda rudimenter veya hipoplastik dişler, mikrodonti, gecikmiş diş sürme, fazla veya eksik dişler, ektopik diş sürme ve artmış çürük insidansı gibi diş anomalileri izlenir (149).

RTS'li çocuklarda seyrek saçlar veya total alopesi izlenebilir (146). Kirpikler ve / veya kaşlar da seyrek olabilir veya hiç izlenmeyebilir (146).

RTS'li çoğu olguda doğumda gebelik haftasına göre düşük doğum ağırlığı ve boyu izlenir (146). Yaşamları boyunca genellikle hem ağırlık hem de boy için beşinci persentilin altında kalırlar (146). Büyüme hormonu seviyeleri genellikle normaldir (146).

RTS'li 28 olgunun iskelet incelemelerinin yapıldığı bir çalışmada, olguların %75'inin en az bir majör iskelet anomalisine sahip olduğu bulunmuştur (150). Bulgular arasında longitudinal ve transvers metafiz çizgilenmeleriyle anormal trabekülasyon, falankslarda displastik değişiklikler, kemik yokluğu veya malforme kemikler (radius aplazisi, malforme ulnalar, hipoplastik başparmaklar), füzyona uğramış kemikler, osteopeni ve hipoplazik veya aplazik patella yer almaktadır (146, 150). Bu iskelet bulguları, *RECQL4* genindeki patojenik varyantların neden olduğu RTS tip 2'li olgularda daha sık gözlenir (146).

RTS klinik tanılı 29 olguda metabolik kemik hastalığı üzerine yapılan bir çalışmada, olguların önemli bir kısmında kemik mineral yoğunluğunda azalma ve kırık öyküsü bildirilmiştir (151). Ek olarak, *RECQL4*'te patojenik varyantların varlığı ve düşük kemik mineral yoğunluğu ile kırıklar için artmış risk öyküsü arasında korelasyon gösterilmiştir (151).

RTS'li bazı yenidoğanlar veya küçük çocuklar beslenme güçlüğü veya kronik kusma ya da ishal gibi diğer gastrointestinal problemlere sahiptir (146). Beslenme tüplerine zaman zaman ihtiyaç duyulmasına rağmen, bu sorunların çoğu çocukluk döneminde kendiliğinden düzelir (152).

RTS'li olgularda izole anemi ve nötropeni, miyelodisplazi, aplastik anemi ve lösemi gibi benign ve malign hematolojik anomaliler bildirilmiştir (153, 154, 155).

Juvenil katarakt prevalansı bazı serilerde %50 gibi yüksek oranlarda bildirilmiştir ve başlangıç genellikle üç ile yedi yaş arasındadır (146). RTS'li 41 olgudan oluşan bir kohortta (yaş aralığı 9 ay ila 42 yaş arası), katarakt prevalansının çok daha düşük olduğu (<%10) bulunmuştur (152). Kataraktın daha erken başlangıçlı (yaşamın ilk birkaç ayı) ve daha geç başlangıçlı (gençlik veya erişkinlikte) olduğu olgular da bildirilmiştir (146). Erken başlangıçlı, bilateral juvenil katarakt olgularının çoğu Avrupa'dan gelen çalışmalarda izlenmektedir, bu olguların *ANAPC1* genindeki patojenik varyantların neden olduğu RTS tip 1 olguları olma olasılığı daha yüksektir (156).

RTS'de kanser riskinde artış mevcut olup osteosarkom RTS'li olgularda en sık bildirilen malignitedir (157). RTS'li olguların bir kohortunda, osteosarkom prevalansı %30 bulunmuştur (152). Tanı anındaki ortalama yaş 11 olup bu genel popülasyonda görülenden biraz daha gençtir

(146). Birden fazla kardeşte RTS ve osteosarkom bulunan aileler bildirilmiştir (152, 158). Osteosarkom RTS tip 2 ile ilişkilidir (146).

RTS'li olgular bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom ve melanom dahil olmak üzere cilt kanseri geliştirme riski altındadır (159, 160). RTS'li olgularda cilt kanserlerinin prevalansı literatüre göre %5 olarak tahmin edilmektedir (146). Cilt kanseri her yaşta ortaya çıkabilir, ancak genellikle genel popülasyona göre daha erken yaşta ortaya çıkar (146). Epitelyal tümörler için ortalama yaş 34.4 olarak tahmin edilmektedir (161). Bir aileden etkilenmiş üç kardeşte de yetişkinlikte (35-48 yaş) kutanöz skuamöz hücreli karsinom geliştiği bildirilmiştir (162). Cilt kanseri hem RTS tip 1 hem de RTS tip 2'li olgularda izlenebilir (146).

RTS'li birkaç olguda sekonder malignite gelişimi bildirilmiştir (146). Ayrıca RTS'li olgularda çoklu primer kanserler de bildirilmiştir (146).

RTS'den etkilenen erkek ve kadınlarda infertilite tanımlanmıştır, bununla birlikte fertil olan birkaç kadın ve erkek olgu bildirilmiştir (146).

RTS'li olguların çoğu normal zekaya sahiptir (146).

2.4.9.2. Moleküler Etiyoloji

RTS otozomal resesif kalıtım paterni gösterir. RTS tip 1 2q13 lokusunda yer alan *ANAPC1* genindeki homozigot veya bileşik heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. RTS tip 2 ise 8q24 lokusunda yer alan *RECQL4* genindeki homozigot veya bileşik heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. RTS tanılı olguların %60'ında *RECQL4* geninde patojenik varyantlar saptanır (146). Bu varyantların >%99'u *RECQL4* gen dizi analizi ile saptanmaktadır, delesyon / duplikasyon analizleri ile varyant saptanma oranı bilinmemektedir (146). RTS tanılı olguların %10'unda *ANAPC1* geninde patojenik varyantlar saptanır (146). Bu varyantların >%99'u *ANAPC1* gen dizi analizi ile saptanmaktadır, delesyon / duplikasyon analizleri ile varyant saptanma oranı bilinmemektedir (146, 156). Geri kalan yaklaşık %30'luk kısmında ise bu genlerde patojenik varyant saptanmaması, RTS ile ilişkili henüz bilinmeyen başka genlerin varlığını düşündürmektedir (146).

RECQL4 veya *ANAPC1* genindeki patojenik varyantların sebep olduğu RTS, genellikle bir DNA onarım ve replikasyon bozukluğu olarak sınıflandırılır (146). *RECQL4* geninin fonksiyonlarından Baller-Gerold sendromu başlığı altında bahsedilmiştir.

ANAPC1, anafaz teşvik edici kompleks / siklozomun (*anaphase-promoting complex / cyclosome*) (APC / C) en büyük alt birimi olan APC1 proteinini kodlar (146). APC / C, degradasyon için spesifik proteinleri hedef alan bir E3 ubikuitin ligazdır (146). Hücre döngüsünün farklı aşamalarında hücresel geçişi kontrol etmeye yardımcı olur (146). Bu nedenle RTS tip 1'li olgularda izlenen fenotipler defektif hücre siklusunun bir sonucu olabilir (156). APC / C'nin ayrıca DNA replikasyonu ve onarımı, yaşlanma ve hücre farklılaşmasında rol oynadığı gösterilmiştir (146).

2.4.10. RAPADILINO Sendromu

RAPADILINO sendromu (#MIM 266280); radyal ışın defekti ve patella aplazisi / hipoplazisi ile karakterizedir. RAPADILINO sendromu nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Bu sendrom ilk olarak Kaariainen tarafından 1989 yılında bir erkek ve kız kardeş ile üç sporadik olguda radius aplazisi ve patellar aplazi / hipoplazi saptanmasıyla tanımlanmıştır (163).

2.4.10.1. Klinik Bulgular

Sendromun adı, hastalığın karakteristik bulguları için bir akronimdir: radyal ışın malformasyonları için RA (*radial ray malformations*), patella ve damak anormallikleri için PA (*patella and palate abnormalities*), diyare ve eklem dislokasyonları için DI (*diarrhea and dislocated joints*), ekstremite anomalileri ve boy kısalığı için LI (*limb abnormalities and little size*), ince burun ve normal zeka için NO (*slender nose and normal intelligence*) (163).

Etkilenen olguların çoğunda radius aplazisi / hipoplazisi ve / veya başparmak aplazisi mevcuttur (163). Patella aplazisi veya hipoplazisi izlenir (163). Diğer bulgular arasında yarık veya yüksek damak, uzun-ince bir burun ve eklem dislokasyonları yer almaktadır (163).

RAPADILINO sendromlu birçok yenidoğanda beslenme zorluğu, ishal ve kusma mevcuttur (163). Kemik gelişim bozukluğu ve beslenme problemlerinin kombinasyonu, etkilenen olgularda yavaş büyümeye ve boy kısalığına yol açar (163).

Bazı olgular, *café-au-lait* lekelerine benzeyen zararsız açık kahverengi cilt lekelerine sahiptir.

Etkilenmiş bireylerde, osteosarkom veya lenfoma gelişimi riski biraz artmıştır (164). Bu olgularda, osteosarkom en sık çocukluk veya adölesan dönemde gelişir ve lenfoma tipik olarak genç erişkinlikte gelişir (164).

Sendromun çeşitli bulguları, Baller-Gerold sendromu ve Rothmund-Thomson sendromunun bulguları ile örtüşmektedir. Bu sendromlar da radyal ışın defektleri, iskelet anomalileri ve büyüme geriliği ile karakterizedir. Bu üç sendrom da *RECQL4* genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanmaktadır.

2.4.10.2. Moleküler Etiyoloji

RAPADILINO sendromu otozomal resesif kalıtım paterni gösterir. 8q24 lokusunda yer alan *RECQL4* genindeki homozigot veya bileşik heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. *RECQL4* geninin fonksiyonlarından Baller-Gerold sendromu başlığı altında bahsedilmiştir.

2.4.11. Duane-Radyal Işın Sendromu

Duane-radyal ışın sendromu (*Duane-radial ray syndrome*, DRRS, Okihiro sendromu, #MIM 607323); üst ekstremite anomalileri ve oküler anomaliler ile karakterizedir. DRRS nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Bu sendrom ilk olarak Ferrel ve arkadaşları tarafından 1966 yılında bir baba ve üç çocuğunda radyal ışın defekti saptanmasıyla tanımlanmıştır (165).

2.4.11.1. Klinik Bulgular

DRRS'de izlenen üst ekstremite anomalileri ve göz anomalilerine bazı olgularda renal anomaliler eşlik eder (166). Bu üç bulgunun birlikteliği eskiden 'akro-renal-okuler sendrom' olarak adlandırılırken artık DRRS ile aynı fenotip olduğu düşünülmektedir (166).

Sendromda sıklıkla izlenen radyal ışın defekleri; tenar hipoplazi, başparmak hipoplazisi veya aplazisi, radius hipoplazisi veya aplazisi, ön kolda kısalık ve radyal deviasyon, trifalangeal başparmaklar ve preaksiyel polidaktilidir (166). Diğer bildirilmiş üst ekstremite anomalileri; ulnada kısalık, sindaktili, radyal *clubhand*, karpal kemik anomalileri, humerusta kısalık ve deltoid kaslarda hipoplazidir (166). Alt ekstremite anomalileri arasında PEV, tibial hemimeli ve sindaktili yer almaktadır (166). Vertebra füzyonu bildirilmiştir (166).

En sık izlenen göz anomalisi Duane anomalisidir (166). Bu anomalide unilateral veya bilateral gözde abdüksiyon kısıtlılığı ile birlikte göz küresi retraksiyonu ve addüksiyonda palpebral fissürlerde daralma izlenir (166). Altıncı kraniyal sinir olan nervus abdusensin nükleusu ve siniri yoktur (166). Lateral rektus kası üçüncü kraniyal sinir olan nervus okülomotorun bir dalı

ile innerve edilir, bu aberran göz hareketlerine neden olur (166). Diğer göz anomalileri kolobom (iris, retina ve koroid), katarakt, optik disk hipoplazisi ve mikroftalmidir (166).

Renal anomaliler; hafif malrotasyon, ektopi, çapraz birleşmiş ektopik böbrek, atnalı böbrek, renal hipoplazi, renal agenezi, vezikoüreteral reflü ve mesane divertiküllerini içerir (166).

Kardiyak anomaliler; VSD, ASD ve Fallot tetralojisidir (166).

Sensörinöral ve / veya iletim tipi işitme kaybı izlenebilir (166). Kulak anomalileri arasında anormal pinna, dış kulak meatusunda yarık benzeri açıklık ve küçük kulaklar yer almaktadır (166).

Anal stenoz ve imperfore anüs gibi gastrointestinal anomaliler izlenebilir (166).

Dismorfik yüz bulguları bazı olgularda bildirilmiştir. Bu bulgular arasında epikantus, hipertelorizm, basık burun kökü ve hemifasyal mikrozomi yer almaktadır (166).

Zeka ve gelişim genellikte normaldir (166).

2.4.11.2. Moleküler Etiyoloji

DRRS otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. 20q13 lokusunda yer alan *SALL4* genindeki heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. DRRS'de penetrans yaklaşık olarak %95 olarak bildirilmiştir (166). DRRS tanılı olguların %85-90'ında DRRS ile ilişkilendirilmiş tek gen olan *SALL4* geninde dizi analizi ile, %10-15'inde ise delesyon / duplikasyon analizleri ile patojenik varyantlar saptanmaktadır (166).

SALL4 (sal-like protein 4), SAL tipinde bir C2H2 çinko parmak transkripsiyon faktörü olan sal benzeri protein 4'ü kodlar (167). SALL4'ün önemli bir gelişimsel düzenleyici olduğu düşünülmektedir (166). Sall4 eksikse embriyonik veya ekstraembriyonik endoderm kök hücre hatları oluşturulamaz (166). Sall4, Nanog ile etkileşime girer ve embriyonik kök hücrelerde Nanog genomik bölgelerini birlikte doldurur (168).

Embriyonik ve kök hücre gelişimindeki rolünün yanı sıra, Sall4 malign transformasyonda rol oynar (166). Kök hücrenin kendini yenilemesinde ve kan farklılaşmasında rol oynadığı bilinen birçoğu da dahil olmak üzere 1.000'den fazla olduğu düşünülen Sall4 hedef geni tanımlanmıştır (169) (170). İnsan *SALL4* geni bazı tümör tiplerinde, özellikle hepatosellüler karsinomda yukarı regüle edildiğinden, kanser ilişkili hedefler aranmaktadır (171).

2.4.12. IVIC Sendromu

IVIC sendromu (Okülootoradyal sendrom, #MIM 147750); radyal ışın defektleri, ekstraoküler motor bozukluklar ve işitme kaybı ile karakterizedir. IVIC sendromu nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Bu sendrom ilk olarak Arias ve arkadaşları tarafından 1980 yılında altı nesilden 19 yaşayan olgunun etkilenmiş olduğu bir ailede tanımlanmıştır (172).

2.4.12.1. Klinik Bulgular

Sendromdan etkilenmiş olgularda değişken ağırlıkta radyal ışın defektleri izlenir (173). Üst ekstremite tutulumu genellikle asimetriktir (173). Başparmak tutulumu en tipik bulgudur ve başparmak yokluğu veya hipoplazisi, trifalangeal başparmaklar şeklinde izlenebilir (173). Dirsek, el bileği ve interfalangeal eklemlerde hareket kısıtlılığı ve karpal kemik anomalileri (füzyon, hipoplazi) gözlenebilir (173). Alt ekstremiteler normaldir (172).

Ekstraoküler kasların etkilenmesine bağlı strabismus izlenebilir (172). Değişken şiddette işitme kaybı bildirilmiştir (172). Etkilenen bazı olgularda 50 yaşından önce hafif trombositopeni ve lökositoz izlenir (172). Omuz kuşağı hipoplazisi, böbrek malrotasyonu, imperfore anüs ve rektovajinal fistül sendromda bildirilen bulgular arasında yer almaktadır (173).

2.4.12.2. Moleküler Etiyoloji

IVIC sendromu otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. 20q13 lokusunda yer alan *SALL4* genindeki heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. Bu sendromda penetransın tam olduğu ve ekspresivitenin oldukça değişken olduğu bildirilmiştir (172). *SALL4* geninin fonksiyonlarından Duane-radyal ışın sendromu başlığı altında bahsedilmiştir.

2.4.13. Nager Sendromu

Nager sendromu (Akrofasyal dizostoz 1, Nager tipi, #MIM 154400); kraniyofasyal iskelet malformasyonları ve preaksiyel ekstremite anomalileri ile karakterize bir akrofasyal dizostoztur. Nager sendromu nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Bu sendrom ilk olarak Slingenberg tarafından 1908 yılında bildirilmiş, Nager ve de Reynier tarafından 1948 yılında tanımlanmıştır (174, 175).

2.4.13.1. Klinik Bulgular

Nager sendromunda izlenen malformasyonlar birinci ve ikinci brankiyal arkların ve ekstremite tomurcuklarının gelişimindeki sorunlardan kaynaklanır (176).

Nager sendromunun majör fasyal bulguları; aşağı çekik palpebral fissürler, malar hipoplazi, retrognati ve / veya mikrognati, glossoptozis, yarık damak, düşük yerleşimli ve dismorfik kulaklar, mikroti, dış kulak yolu stenozu / atrezisidir (177). Nager sendromlu olgularda aşağı çekik palpebral fissürlere genellikle kirpik yokluğu ve alt göz kapağı kolobomu eşlik eder (177). Etkilenmiş olguların çoğunda malforme kulaklar izlenir ve orta kulaktaki defektlerin neden olduğu iletim tipi işitme kaybı mevcuttur (177). Nager sendromlu olgularda zeka normaldir, ancak işitme etkilenmesi nedeniyle konuşma gecikmesi izlenebilir (177).

Ciddi akrofasyal dizostoz Nager sendromlu olgularda yenidoğan döneminde beslenme sorunlarına ve solunum problemlerine yol açabilir (176). Bu Nager sendromlu olgularda yenidoğan döneminde ölümle sonuçlanabilir (176). Bazen erken çocukluk döneminde trakeostomi gerekli olabilir (178).

Nager sendromlu olgularda ekstremite anomalileri tipik olarak üst ekstremitelerin anterior (radyal) elemanlarını içerir ve başparmak hipoplazisi veya başparmak aplazisi, triphalangeal başparmaklar, radyal aplazi veya hipoplazi ve radyoulnar sinostoz olarak izlenir (177). Nadiren fokomeli bildirilmiştir (178). Alt ekstremiteler genellikle normaldir (177). Nadiren bildirilen alt ekstremite bulguları arasında PEV, ayak parmaklarının hipoplazisi veya aplazisi, sindaktili, geniş ayak başparmağı yer almaktadır (177).

2.4.13.2. Moleküler Etiyoloji

Nager sendromu otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. 1q21.2 lokusunda yer alan *SF3B4* genindeki heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. Nager sendromu tanılı olguların %61'inde bu sendrom ile ilişkilendirilmiş tek gen olan *SF3B4* geninde patojenik varyantlar saptanmaktadır (178). Çoğu olgu sporadiktir ancak ailevi birkaç olgu da bildirilmiştir (177). Nager sendromlu olgular arasında sendromun klinik bulgularının ağırlığı değişkenlik gösterir (177).

SF3B4 geni SAP49 (*spliceosome-associated protein*) adlı splisozomal bir proteini kodlar (178). Bu protein memeli SF3B kompleksinin yedi çekirdek proteininden biridir ve iki RNA tanıma motifi ile ardından prolin-glisin bakımından zengin bir domain ile yüksek oranda

korunmuştur (178). U2SNP presplisozomal kompleksinin toplanması sırasında, SAP49, dallanma bölgesi dizisinin hemen yukarısındaki pre-mRNA'ya bağlanır, ancak aynı zamanda diğer U2 snRNP'lerle, özellikle de SAP145 ile etkileşime girer, bu da SAP49'un U2 snRNP'yi dallanma bölgesine bağlamada çok önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (178).

2.4.14. Diamond-Blackfan Anemisi

Diamond-Blackfan anemisi (DBA); normokromik makrositer anemi, konjenital anomaliler ve büyüme geriliği ile karakterizedir. Prevalansı 100.000 canlı doğumda 1 ile 200.000 canlı doğumda 1 arasında bildirilmiştir (179). Bu sendrom ilk olarak Diamond ve Blackfan tarafından 1938 yılında hipoplastik anemi saptanan dört olguda tanımlanmıştır (180).

2.4.14.1. Klinik Bulgular

DBA erken başlangıçlı hipoplastik anemi ile karakterizedir (179). Konjenital anomaliler etkilenen olguların yaklaşık %50'sinde mevcuttur (179). Diğer bulguları arasında büyüme geriliği ve maligniteye yatkınlık yer alır (179).

DBA'nın ana hematolojik bulgusu derin normokromik, makrositer anemidir (179). Lökosit ve platelet seviyeleri normaldir (179). Anemi etkilenmiş olguların tümünde mevcuttur, %90'ında yaşamın ilk yılında ortaya çıkar (181, 182, 183). Ortalama başvuru yaşı iki aydır ve ortalama tanı yaşı üç aydır (184). 12 aylıktan büyük çocuklarda kortikosteroidlerle tedavi önerilir (179). Olguların yaklaşık %70'i tedaviye yanıt verir, ancak sonunda %40'ı steroide bağımlı kalır ve %40'ı transfüzyona bağımlı hale gelir, %20'si remisyona girer (183).

Kraniyofasyal bulgular olguların %27'sinde izlenir (181, 182, 183). Bu bulgular arasında mikrosefali, hipertelorizm, epikantus, pitoz, mikroti, düşük yerleşimli kulaklar, geniş ve basık burun kökü, yarık damak / dudak, yüksek damak, mikrognati ve düşük anterior saç çizgisi yer almaktadır (179).

Göz anomalileri; konjenital glokom, konjenital katarakt ve strabismustur (179).

Boyun anomalileri arasında yele boyun, kısa boyun, Klippel-Feil anomalisi, Sprengel deformitesi bulunur (179).

Üst ekstremite anomalileri olguların %16'sında izlenir (181, 182, 183). Bu anomaliler arasında trifalangeal başparmak, bifid başparmak, başparmak aplazisi veya hipoplazisi, radius aplazisi veya hipoplazisi yer almaktadır (179).

Genitoüriner anomaliler olguların %13'ünde mevcuttur (181, 182, 183). Bu anomaliler arasında; renal agenezi, atnalı böbrek ve hipospadias bulunur (179).

Kardiyak anomaliler olguların %11'inde izlenir (181, 182, 183). Bu anomaliler arasında VSD, ASD ve aort koarktasyonu yer almaktadır (179).

Etkilenmiş yenidoğanların %25'inde düşük doğum ağırlığı bildirilmiştir (179). Etkilenmiş olguların %30'unda büyüme geriliği mevcuttur (181, 182, 183). Büyüme geriliğine steroid kullanımı gibi diğer faktörlerde etki edebilir (179).

Etkilenmiş olguların %2-5'inde malignite gelişimi izlenir (181, 182, 183). DBA'lı olgularda AML, MDS ve solid tümör (osteosarkom) gelişimi açısından artmış risk mevcuttur (185).

Gelişim geriliği nadiren bildirilmiştir (186).

2.4.14.2. Moleküler Etiyoloji

DBA otozomal resesif, otozomal dominant ve X'e bağlı kalıtım gösterebilir. OMIM veri tabanında DBA ile ilişkili olan 20 gen bulunmaktadır. DBA ile ilişkilendirilmiş genlerin kalıtım paterni ve moleküler genetik tanı yöntemleri (dizi analizi ve delesyon / duplikasyon analizi) ile varyant saptanma yüzdeleri Tablo 3'de belirtilmiştir (179).

Tablo 3: DBA moleküler etiyolojisi

Gen	**Kalıtım paterni**	**OMIM fenotip numarası**	**Gen ilişkili hasta yüzdesi**	**Dizi analizi ile varyant saptanma yüzdesi**	**Delesyon / duplikasyon analizi ile varyant saptanma yüzdesi**
RPS19	OD	#MIM 105650	%25-30	~%95	~%5
RPL5	OD	#MIM 612561	%7-12	~%95	<%5
RPS26	OD	#MIM 613309	%6.6-9	>%80	<%20
RPL11	OD	#MIM 612562	%5-7	~%90	~%10
RPL35A	OD	#MIM 612528	%2-3	~%50	~%50
RPS24	OD	#MIM 610629	%2-3	~%90	1 bildirilmiş

RPS10	OD	#MIM 613308	%1-3	~%100	Bildirilmemiş
RPS17	OD	#MIM 612527	%1-3	<%35	>%65
RPL15	OD	#MIM 615550	~%1	~%80	~%20
RPS7	OD	#MIM 612563	~%1	~%100	Bildirilmemiş
RPS29	OD	#MIM 615909	~%1	~%80	1 bildirilmiş
*RPL9**	-	-	<%1	~%100	Bildirilmemiş
*GATA1**	X'e bağlı resesif	-	<%1	~%100	Bildirilmemiş
RPL18	OD	#MIM 618310	Nadir	1 aile	Bildirilmemiş
RPL26	OD	#MIM 614900	Nadir	1 bildirilmiş	Bildirilmemiş
RPL27	OD	#MIM 617408	Nadir	2 bildirilmiş	Bildirilmemiş
*RPL31**	-	-	Nadir	1 bildirilmiş	1 bildirilmiş
RPL35	OD	#MIM 618312	Nadir	1 aile	2 bildirilmiş
RPS15A	OD	#MIM 618313	Nadir	1 aile	Bildirilmemiş
RPS27	OD	#MIM 617409	Nadir	1 bildirilmiş	Bildirilmemiş
RPS28	OD	#MIM 606164	Nadir	2 aile	Bildirilmemiş
TSR2	X'e bağlı resesif	#MIM 300946	Nadir	1 aile	Bildirilmemiş
HEATR3	OR	#MIM 620072	Nadir	4 aile	Bildirilmemiş

**RPL9, GATA1, RPL31* henüz OMIM veri tabanında DBA ile ilişkilendirilmemiştir.

Ribozomlar küçük bir 40S alt ünitesi ve büyük bir 60S alt ünitesinden oluşur ve protein sentezini katalizler (179). Küçük ve büyük alt üniteler dört RNA türünden ve yaklaşık 80 yapısal olarak farklı ribozomal proteinden (RP) oluşur (179). *RPS19, RPS24, RPS17, RPS15, RPS7, RPS27A, RPS10* ve *RPS26* tarafından kodlanan proteinler küçük ribozomal alt üniteye aitken, *RPL5, RPL11, RPL26, RPL35A* ve *RPL36* tarafından kodlanan proteinler büyük ribozomal alt birimin bileşenleridir (179). Ribozomal proteinlerin haployetersizliği DBA'nın en sık oluşum mekanizmasıdır (179).

RPS19 proteininin mayada ve insan hücrelerinde 18S rRNA olgunlaşmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (187). Benzer olarak, küçük veya büyük ribozomal protein alt ünite sentezinin pre-RNA işlenmesindeki değişiklikler, sırasıyla RPS24 ve RPS7 eksikliği olan insan hücrelerinde ve RPL35A, RPL5, RPL11 ve RPL26 eksikliği olan insan hücrelerinde gösterilmiştir, bu da DBA'nın ribozomların bir bozukluğu olduğunu göstermektedir (179). RPS19 ve RPL35A eksikliğinin hematopoetik hücre hatlarında ve kemik iliği hücrelerinde artmış apoptoza neden olduğu gösterilmiştir ve zebra balıklarında RPS19 ekspresyonunun bozulması nedeniyle p53 ailesi proteinlerinin dengesizliği anormal embriyogenez ve aneminin bir mekanizması olarak düşünülmüştür (188).

2.4.15. Mandibulofasyal Dizostoz, Guion-Almeida Tip

Mandibulofasyal dizostoz, Guion-Almeida tip (MFDGA, mikrosefali ile birlikte mandibulofasyal dizostoz, #MIM 610536); mikrosefali, malar ve mandibular hipoplazi, kulak anomalileri ve bilişsel yetersizlik ile karakterizedir. MFDGA nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Bu sendrom ilk olarak Guion-Almeida ve arkadaşları tarafından 2000 yılında mikrosefali, kulak anomalileri, mental gerilik olan iki olguda tanımlanmıştır (189).

2.4.15.1. Klinik Bulgular

Mandibulofasyal disostoz, malar ve maksiller hipoplazi ile karakterizedir (190). MFDGA'da eşlik eden bulgular arasında mikrognati / mandibular hipoplazi, yarık damak ve / veya koanal anormali yer almaktadır (190). MFDGA'da yarık damak, yarık dudağa eşlik etmeden orta hat kemik defekti ile karakterize bir Pierre Robin sekansı olarak izlenir (190). Submüköz yarık da tanımlanmıştır (190). Koanal atrezi genellikle osseözdür, tek taraflı veya iki taraflı olabilir, ayrıca koanal stenoz da sıktır (190). Zigomatik ark yarığı, değerlendirilen 19 olgudan onunda tanımlanmıştır (190).

Karakteristik dismorfik yüz bulguları diğer mandibulofasyal ve akrofasyal dizostozlarda görülenlerden farklıdır ve erken çocukluk döneminde tanınabilir (190). Malar ve maksiller hipoplazi, mikrosefali ve tipik kulak anomalilerine ek olarak, metopik çıkıntı, belirgin glabella, geniş burun köprüsü ile birlikte belirgin burun sırtı ve bülböz burun ucu, geniş ağız açıklığı, dışa dönük alt dudak ve / veya yüz asimetrisi izlenebilir (190).

Bildirilen olguların yaklaşık %87'sinde mikrosefali mevcuttur (191). MFDGA için sefalik büyüme eğrileri yayınlanmıştır (191). Bazı olgularda çocuklukta izlenen mikrosefaliye rağmen

normal bir yetişkin baş çevresi ile sonuçlanan, belirgin sefalik yakalama büyümesi izlenmiştir (190). Baş çevresi normal sınırlar içinde olan olgularda da bilişsel yetersizlik olduğu bildirilmiştir (192).

Etkilenmiş olguların neredeyse tümünde dış kulak anomalileri mevcuttur (190). Tipik bulgular mikroti, superior heliks ve antiheliks hipoplazisi, preauriküler *tag*ler ve dış kulak yolu atrezisi / stenozunu içerir (190). Lobülün arka-alt kenarı dik açılı (kare şeklinde) bir görünüme sahip olabilir (190). Bazı olgularda kulak yapıları (kemikçikler, yarım daire kanalları) yoktur ve / veya malformedir (192).

İşitme kaybı tipik olarak iletim tipidir (%60), ancak sensörinöral veya mikst tipte de olabilir (190). Orta kulak kemikçiklerinin malformasyonu veya yokluğundan, dış kulak yolu atrezisinden veya her ikisinden de kaynaklanabilir (190).

Gelişim geriliği ve / veya bilişsel yetersizlik neredeyse tüm olgularda mevcuttur (190). 30 olguluk bir çalışmada bilişsel yetersizlik derecesi olguların %40'ında hafif, %50'sinde orta, %10'unda ağır olarak değerlendirilmiştir (190). Etkilenmiş olgularda motor gelişimde gecikme (ortalama yürüme yaşı 26 ay) izlenir (191). Konuşabilen olgular arasında, ortalama ilk kelime kullanma yaşı 27 ay olarak bildirilmiştir (191). Bazı olgular konuşma becerisini hiç kazanamaz (191).

Kardiyak anomaliler olguların %35'inde mevcuttur (190). En sık ASD ve VSD izlenir, Fallot tetralojisi, PDA ve aortik ark anomalileri de bildirilmiştir (193).

Başparmak anomalileri olguların %35'inde mevcuttur (190). Proksimal yerleşimli, duplike veya hipoplazik başparmak olarak izlenebilir (190).

Etkilenmiş olguların yaklaşık %35'inde özofagus atrezisi / trakeoözofageal fistül mevcuttur (190). Laringotrakeal anomaliler (trakeomalazi, posterior laringotrakeözofageal kleftler) eşlik edebilir (190). Antenatal olarak polihidramniyos varlığı veya mide ekolusensinin olmaması nedeniyle, yenidoğan döneminde ise açıklanamayan solunum sıkıntısı ve / veya başarısız nazogastrik tüp yerleştirilmesi durumlarında şüphelenilebilir (190).

Boy kısalığı etkilenmiş olguların %30'unda mevcuttur (190). MFDGA için boy uzama eğrileri yayınlanmıştır (191).

Spinal anomalilerden skolyoz, kifoz, hemivertebra ve servikal segmentasyon anomalileri izlenebilir (190).

Epilepsi etkilenmiş olguların %26'sında bildirilmiştir (190).

2.4.15.2. Moleküler Etiyoloji

MFDGA otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. 17q21.31 lokusunda yer alan *EFTUD2* genindeki heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. MFDGA'da penetrans yüksektir ancak ekspresivite değişkendir (190). MFDGA tanılı olguların %93'ünde MFDGA ile ilişkilendirilmiş tek gen olan *EFTUD2* geninde dizi analizi ile, %7'sinde ise delesyon / duplikasyon analizleri ile patojenik varyantlar saptanmaktadır (190).

EFTUD2 geni, U5 küçük nükleer ribonükleoprotein (snRNP) parçacığına ait birkaç alt üniteden biri olan küçük bir GTPaz'ı kodlar (194). U5 snRNP, kanonik (U2'ye bağımlı) ve minör (U12-intronlar) intron kırpılmasına aracılık eden iki büyük makromoleküler makine olan majör ve minör splisozomların bir bileşenidir (195). *EFTUD2*'nin *Saccharomyces cerevisiae* homoloğu olan Snu114p, pre-splisozomal aktivasyon sırasında U4 ve U6 RNA'larının ayrışması ve katalitik kırpılma tamamlandıktan sonra alt ünite ayrılması ve geri dönüşümü için gereklidir (194). *EFTUD2* haployetersizliği olan bir zebra balığı modelinde, nöronal apoptoz ile anormal beyin gelişimi izlenmiştir (190). Başka sistem etkilenimi izlenmemiştir (190). RNA dizileme ve fonksiyonel analizler, yetersiz anlamsız aracılı RNA bozunumuna ve p53 yolunun aktivasyonuna yol açan RNA kırpılma eksikliğini göstermiştir (196). MFDGA'nın oluşum mekanizması *EFTUD2* geninin haployetersizliğidir (190).

2.5. Radyal Işın Defekti ile Seyreden Moleküler Etiyolojisi Aydınlatılamamış Sendromlar ve Asosiasyonlar

2.5.1. VACTERL Asosiasyonu

VACTERL asosiasyonu (VA, %MIM 192350); vertebral anomalileri (*vertebral anomalies*), anal atrezi (*anal atresia*), kardiyovasküler anomaliler (*cardiovascular anomalies*), trakeoözofageal fistül (*tracheoesophageal fistula*), özofageal atrezi (*esophageal atresia*), renal anomaliler (*renal anomalies*) ve preaksiyel ekstremite anomalilerini (*preaxial limb anomalies*) içeren bir akronimdir. Prevalansı 10.000 canlı doğumda 1 ile 40.000 canlı doğumda 1 arasında bildirilmiştir (197). VATER asosiasyonu ilk olarak Quan ve arkadaşları tarafından 1972 yılında tanımlanmıştır (198). 1983 yılında ise Khoury ve arkadaşları tarafından VATER asosiasyonuna kardiyak anomaliler ve ekstremite anomalileri eklenerek VACTERL asosiasyonu tanımlanmıştır (199).

2.5.1.1. Klinik Bulgular

VA tanısı akronimi oluşturan yedi kriterden üçünün varlığında klinik olarak koyulur (197). Ayrıca başka bir tanıyı düşündüren klinik veya laboratuvar bulguları olmamalıdır (197). VA'da izlenen malformasyonların tesadüfen beklenenden daha sık birlikte meydana geldiği gözlendiğinden asosiasyon olarak adlandırılmıştır (197).

Vertebral anomaliler etkilenmiş olguların yaklaşık %60-80'inde izlenir (197). Vertebra anomalilerine kosta anomalileri eşlik edebilir (197). Vertebral anomaliler tipik olarak hemivertebra, kelebek vertebra, kama vertebra gibi vertebra segmentasyon kusurlarını ve vertebral füzyonları, fazla sayıda vertebra veya vertebra yokluğunu içerir (197). Vertebra anomalileri olmadan da kosta anomalileri izlenebilir (197).

İmperfore anüs / anal atrezi gibi anorektal malformasyonlar etkilenmiş olguların %55-90'ında izlenir (197).

Genitoüriner anomaliler ise VA tanılı olgularda %25'e kadar bildirilmiştir (197). Bu anomaliler arasında hipospadias, vezikoüreteral reflü, üreteropelvik bileşke darlığı, persistan urakus yer almaktadır (197).

Kardiyak anomaliler etkilenmiş olguların %40-80'inde izlenir (197). Bu anomaliler arasında VSD, Fallot tetralojisi, büyük arterlerin transpozisyonu ve PDA bulunur (197).

Trakeözofageal fistül etkilenmiş olguların %50-80'inde mevcuttur (197). Fistüle özofageal atrezi eşlik edebilir (197).

Renal anomaliler etkilenmiş olguların %50-80'inde bildirilmiştir (197). Bu anomaliler arasında unilateral veya bilateral renal agenezi, atnalı böbrek, kistik ve / veya displastik böbrekler yer almaktadır (197).

Ekstremite anomalileri etkilenmiş olguların %40-50'sinde izlenir (197). Bu anomaliler arasında radyal aplazi / hipoplazi, başparmak anomalileri (başparmak aplazisi / hipoplazisi, preaksiyel polidaktili, trifalangeal başparmak) bulunur (197).

VA'ya hidrosefalinin eşlik ettiği olgular bildirilmiş ve bu fenotip VACTERL-H (%MIM 276950) olarak tanımlanmıştır (200).

VA'ya hidrosefalinin eşlik ettiği veya etmediği ve X'e bağlı kalıtım paterni gösteren fenotip ise VACTERLX (#MIM 314390) olarak adlandırılmıştır (201).

2.5.1.2. Moleküler Etiyoloji

VA'nın moleküler etiyolojisi henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, VA tanılı bir olguda *HOXD13* geninde heterozigot *de novo* bir patojenik varyant bildirilmiştir (202). VACTERL-H'nin moleküler etiyolojisi henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, familyal olguların bildirilmesi otozomal resesif veya X'e bağlı kalıtımı düşündürmektedir. VACTERLX ise Xq26 lokusunda yer alan *ZIC3* genindeki mutasyonlardan veya delesyonlardan kaynaklanmaktadır.

2.5.2. Gershoni-Baruch Sendromu

Gershoni-Baruch sendromu (GBS, MIM 609545); omfalosel, diyafram hernisi ve radyal ışın defektleri ile karakterizedir. GBS nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Bu sendrom ilk olarak Gershoni-Baruch ve arkadaşları tarafından 1990 yılında omfalosel, diyafram hernisi, kardiyak anomaliler ve radyal ışın defektleri olan bir olguda tanımlanmıştır (203).

2.5.2.1. Klinik Bulgular

Valfre ve arkadaşları tarafından literatürde bildirilmiş altı aileden sekiz olgunun klinik bulgularının derlemesinde; yedi olguda omfalosel, yedi olguda diyafram hernisi, yedi olguda dismorfik yüz bulguları, yedi olguda kardiyovasküler anomaliler, altı olguda ekstremite anomalileri (radyoulnar sinostoz, radius aplazisi, başparmak aplazisi, trifalangeal başparmak, oligodaktili), beş olguda mikroti, beş olguda akciğer anomalisi, iki olguda böbrek anomalisi, iki olguda karaciğer anomalisi, iki olguda nöral tüp defekti izlenmiştir (204).

2.5.2.2. Moleküler Etiyoloji

GBS'nin moleküler etiyolojisi henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, bir ailede etkilenmiş kız ve erkek kardeşin bulunması otozomal resesif kalıtımı desteklemektedir (205).

2.5.3. X'e Bağlı Radyal Işın Defektleri

X'e bağlı radyal ışın defektleri (%MIM 300378); ilk olarak 2001 yılında Galjaard ve arkadaşları tarafından bir aileden dört erkek olguda radyal aplazi saptanması ile tanımlanmıştır (206). Bu sendrom nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir.

2.5.3.1. Klinik Bulgular

Galjaard ve arkadaşları tarafından bildirilen bir aileden etkilenmiş dört erkek olgunun; tümünde radyal aplazi, üçte üçünde parmak eklemlerinde kontraktürler, üçte ikisinde boy kısalığı, üçte ikisinde hipoplazik başparmaklar, üçte ikisinde genu varum, üçte ikisinde kardiyak anomali, üçte birinde hipoplazik el ve ayak parmakları, üçte birinde dizlerde kontraktür ve patella aplazisi, üçte birinde Dandy-Walker malformasyonu izlenmiştir (206).

2.5.3.2. Moleküler Etiyoloji

X'e bağlı radyal ışın defektlerinin moleküler etiyolojisi henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, Galjaard ve arkadaşları tarafından bildirilen olgularda yapılan bağlantı ve haplotip analizleri bu klinikten sorumlu genin Xq24-q25 bölgesinde lokalize olduğunu göstermektedir (206).

2.5.4. Radyal-Renal Sendrom

Radyal-Renal sendrom (MIM 179280); radyal ışın defektleri ve renal anomaliler ile karakterizedir. Bu sendrom nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Radyal-Renal sendrom ilk olarak 1980 yılında Siegler ve arkadaşları tarafından iki erkek kardeşte üst ekstremite anomalileri ve renal anomaliler saptanmasıyla tanımlanmıştır (207).

2.5.4.1. Klinik Bulgular

Şimdiye kadar literatürde bildirilen olgular; 1980 yılında Siegler ve arkadaşları tarafından bildirilen iki erkek kardeş ve 1983 yılında Sofer ve arkadaşları tarafından bildirilen bir baba ve oğludur (1, 207). Bu olgularda bildirilen klinik bulgular arasında; bilateral radius ve başparmak aplazisi, renal agenezi, çapraz birleşmiş ektopik böbrek, boy kısalığı, dış kulak malformasyonları yer almaktadır (1, 207).

2.5.4.2. Moleküler Etiyoloji

Radyal-Renal sendromun moleküler etiyolojisi henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, bir ailede etkilenmiş baba ve oğlun bulunması otozomal dominant kalıtımı desteklemektedir (1).

2.5.5. Radyal Işın Defektleri ile Birlikte Hemifasyal Mikrozomi

Radyal ışın defektleri ile birlikte hemifasyal mikrozomi (%MIM 141400); Oküloaurikülovertebral spektrum olarak da adlandırılan Goldenhar sendromuna radyal ışın defektlerinin eşlik etmesiyle karakterize olup, bu spektrumun bir parçası olabileceği de düşünülmektedir. Bu sendrom nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir. Radyal ışın defektleri ile birlikte hemifasyal mikrozomi ilk olarak 1981 yılında Hodes ve arkadaşları tarafından Goldenhar sendromuna radyal ışın defekti eşlik eden bir olguda tanımlanmıştır (208).

2.5.5.1. Klinik Bulgular

Radyal ışın defektleri ile birlikte hemifasyal mikrozomideki klinik bulgular temel olarak unilateral veya bilateral olarak birinci brankiyal ark ve ekstremite tomurcuğunun etkilenmesinden kaynaklanır (209). Klinik bulgular arasında dış, orta ve iç kulak malformasyonları, mikroti, işitme kaybı, fasyal asimetri, orofasyal yarıklar, mandibula hipoplazisi ve radyal defektler yer alır (209).

Sendromda sık izlenen radyal ışın defekleri; radius hipoplazisi / aplazisi, başparmak hipoplazisi / aplazisi, preaksiyel polidaktili ve trifalangeal başparmaklardır (209).

2.5.5.2. Moleküler Etiyoloji

Radyal ışın defektleri ile birlikte hemifasyal mikrozominin moleküler etiyolojisi henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, etkilenmiş ebeveynlerin bulunması otozomal dominant kalıtımı desteklemektedir (210).

2.5.6. İskelet Defektleri, Genital Hipoplazi ve Mental Retardasyon

İskelet defektleri, genital hipoplazi ve mental retardasyon (MIM 612447); ilk olarak 2002 yılında Wieczorek ve arkadaşları tarafından bir erkek olguda iskelet anomalileri, mikrosefali, boy kısalığı, genital hipoplazi ve mental retardasyon saptanmasıyla tanımlanmıştır (211). Bu sendrom nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemektedir.

2.5.6.1. Klinik Bulgular

Wieczorek ve arkadaşları tarafından 2002 yılında bildirilen olgunun 2008 yılında Fischer ve arkadaşları tarafından tekrar değerlendirilmesinde; orantısız boy kısalığı, iskelet anomalileri

(sağ skapula ve klavikula hipoplazisi, sol ulna ve radius hipoplazisi, sağ radius aplazisi, bilateral başparmak aplazisi, kısa humerus-femur-tibia-fibula, hiperelastik diz eklemleri, hipoplazik patella, bifid ayak başparmağı, kemik yaşında gerilik), mikrosefali, ağır mental retardasyon, dismorfik yüz bulguları, genital anomaliler (mikropenis, kriptoorşidizm) izlenmiştir (212). Literatürde bildirilen başka olgu bulunmamaktadır.

2.5.6.2. Moleküler Etiyoloji

Fischer ve arkadaşları tarafından değerlendirilen olguda yapılan çalışmalarda *ZBTB16* geninde p.(Met617Val) varyantı saptanmış, ancak benzer bulguları olan ve bu gende ilişki gösterilen başka bir olgu tanımlanmaması ve indeksteki kliniğe sebep olabilecek nedenlerin sınırlı araştırılması nedeniyle *ZBTB16*'nın bu fenotipteki rolü net olarak bilinememektedir (212). Fischer ve arkadaşları tarafından saptanan mutasyonun resesif formda olması, bu sendromda otozomal resesif kalıtımı desteklemektedir (212).

2.6. Radyal Işın Defekti ile Seyreden Teratojenler

2.6.1. Talidomid

Talidomid 1956 yılında bağımlılık yapmayan ve barbitürat içermeyen bir sedatif olarak piyasaya çıkarılmış, sonrasında antiemetik etkisi fark edilerek gebelikteki sabah bulantılarını tedavi etmek için kullanılmıştır (213). 1957 ve 1962 yılları arasında doğan 10.000'in üzerinde çocukta talidomide bağlı ciddi doğum defektleri izlenmiştir (213). Gebelik sırasında talidomid kullanımına bağlı fetal anomaliler arasında ameli, fokomeli, radyal hipoplazi gibi ekstremite anomalileri, dış kulak anomalileri, fasyal paralizi, göz anomalileri [anoftalmi, mikroftalmi, Duane anomalisi, fasyal sinir paralizisinin bir sonucu olarak "timsah gözyaşları" (yemek yerken ağlama ve / veya duygusal ağlama eksikliği)] ve konjenital kalp defektleri sayılabilir (166). Genitoüriner ve gastrointestinal malformasyonlar da izlenebilir (166). Ancak talidomid embriyopatisi tanısı alan bir olgunun, radyal ışın defektleri ve ek malformasyonları olan bir çocuğu varsa, radyal ışın defektiyle giden sendromlar tanıda düşünülmelidir (166). Talidomid günümüzde multipl miyelom, HIV ve lepra gibi hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (166).

2.6.2. Valproik Asit

Valproik asit epilepsi ve bazı duygudurum bozukluklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (214). Gebelikte valproik asit kullanımına bağlı teratojenik etkiler ilk olarak 1980 yılında bildirilmiştir (215). Gebeliğin ilk trimesterinde valproik asit maruziyeti fetal valproat sendromuna neden olabilir (214). Bu sendromda tipik yüz özellikleri (trigonosefali, epikantus, infraorbital oluklanma, medyalde seyrek kaşlar, geniş burun kökü, kısa burun ve antevert burun delikleri, sığ filtrum, ince üst dudak ve küçük ağız), gelişim geriliği, nöral tüp defektleri, kardiyak anomaliler, genitoüriner malformasyonlar ve ekstremite defektleri gibi çeşitli anomaliler izlenebilir (214). Sendromda bildirilen ekstremite anomalileri oldukça çeşitlidir ve bu anomaliler arasında polidaktili, sindaktili, trifalangeal başparmaklar, radyal ışın defektleri, fokomeli, PEV, geniş ayak başparmakları yer almaktadır (214).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubumuzu; 2016 - 2023 tarihleri arasında prenatal ultrason (US) ile radyal aplazi / hipoplazi ve ek anomaliler saptanan ve tıbbi tahliye sonrasında İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde postmortem değerlendirilen altı aileden altı fetal olgu oluşturmaktadır. Kromozom analizleri normal sonuçlanan altı fetusa tüm ekzom dizileme yöntemi ile trio analiz (indeks-anne-baba) gerçekleştirilmiş ve genetik etiyoloji araştırılmıştır.

Bu çalışma, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 29/07/2022 tarih ve 2022/1307 dosya numarası ile onaylanmıştır.

3.2. Klinik Değerlendirmeler

Postmortem klinik muayene yapılan ve radyal aplazi / hipoplazi saptanan altı fetal olgunun Tıbbi Genetik Anabilim Dalına ait hasta dosya bilgileri geriye dönük olarak incelendi. Bu olguların verileri değerlendirilirken anabilim dalımızın retrospektif etik kurul onamı (2022/1316113) ve projemizin etik kurul onamı (tarih: 29/07/2022, dosya numarası: 2022/1307) kullanıldı. Olguların aile öyküsü, fetal ultrason bulguları, postmortem muayenede saptanan klinik / radyolojik bulguları ve daha önce yapılan genetik analiz sonuçları (fetal karyotipleme, array-CGH ve moleküler analizler) kaydedildi. En az üç kuşağı içerecek şekilde aile ağaçları güncellendi, postmortem fotoğraf ve radyografiler arşivlendi.

3.3. Moleküler Araştırmalara Hazırlık

Tanı amacıyla genetik testler yapılmış fetusların artan DNA örnekleri ve özgün klinik tanısı olmayan fetusların saklanmış DNA örneklerinin miktar ve kalite tayini yapıldı. İleri araştırmalar için uygun ve yeterli DNA örneği bulunan ailelerle iletişim kurularak randevu verildi ve ileri araştırmalar için bilgilendirilmiş onam formları alınarak anne-baba adaylarından periferik kan örneği alındı. Bu örneklerden DNA izole edildi ve uygun koşullarda saklandı.

3.4. Moleküler Yöntemler

3.4.1. DNA İzolasyonu ve Kalitesinin Değerlendirilmesi

2016-2023 yılları arasında prenatal invazif girişimler (koryon villus biyopsisi, amniyosentez, kordosentez, kardiyosentez) ve postmortem fetal deriden elde edilen materyalden manuel / solüsyon / manyetik boncuk bazlı sistemlere özgün kitler (*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche11667327001 / Magnapure Large Volume KIT, Roche03730972001 ve EZ1 DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Qiagen 951054*) ile firma protokollerine uygun şekilde izole edildi ve -20°C'de saklandı. Parental periferik kan örneklerinden DNA izolasyonları, steril 2 ml K3EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon / manyetik boncuk bazlı sistemlere özgün kitler (*MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200,Cat.Op02001-48*) kullanılarak ürün protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi.

Çalışmaya dahil edilen ebeveynlere ait genomik DNA'ların izolasyonunun ardından, konsantrasyonları (ng/µl) ve absorbsiyon ölçümleri (A260/280) spektrofotometre ile ölçülerek kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific).

3.4.2. Tüm Ekzom Dizileme (TED) Islak Laboratuvar Çalışmaları

Tüm ekzom dizilemenin 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 ölçümü için kitin içeriğinde bulunan iki farklı standart örnek kullanıldı. Standart örnek başına 199 µl *Qubit Buffer* ve 2 µl floresan boya kullanılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. On mikrolitre standart örnek 190 µl çalışma solusyonu ile karıştırılarak iki dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra *Qubit* Florometre'de ölçüm yapıldı. Kalibrasyon ölçümü sonrasında, her bir örnek için aynı şekilde hazırlanmış çalışma solusyonu kullanılarak miks (198 µl çalışma solusyonu ve 2 µl seyreltilmiş DNA örneği) hazırlandı. İki dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası ölçüm yapılarak DNA konsantrasyonları belirlendi. *Qubit* ölçümü için gerekli miktarlar Tablo 4'de 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. Merkezimizde yapılan TED analizlerinin iş akışı aşağıda detaylandırıldı.

Tablo 4: *Qubit* ölçümü için gerekli miktarlar

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

3.4.2.1. Kütüphane Hazırlığı

3.4.2.1.1. Birinci Basamak: DNA Fragmantasyonu, Uç Onarımı, dA Kuyruklanması

Buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde enzimatik fragmantasyon miksi Tablo 5'e göre hazırlanıp nazikçe pipetleyerek iyice karıştırıldı.

Tablo 5: Enzimatik fragmantasyon miksi

Fragmantasyon Miksi	**1 Örnek**	**8 Örnek**	**16 Örnek**	**32 Örnek**
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 için her örnek 50 ng saflaştırılmış gDNA içermelidir. Bu gDNA örnekleri NFW ile 10 µL'ye tamamlayarak seyreltildi, 0.2 mL'lik PZR tüplerine alındı.

Fragmantasyon miksi hazırlandıktan sonra buz üzerindeki her 10 µL'lik gDNA örneği üzerine 40 µl eklendi ve pipetleme yapılarak karıştırıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) programında (Tablo 6) ilk basamak olan 4°C'ye gelinceye kadar örnekler buz bloğu üzerinde bekletildi ve 4°C'ye geldiğinde örnekler PZR cihazına konuldu.

Tablo 6: PZR programı

	Sıcaklık (°C)	**Zaman (Dakika)**
Kapak	70	
Aşama 1	4	1
Aşama 2	32	22
Aşama 3	65	30
Aşama 4	4	Bekleme

3.4.2.1.2. İkinci Basamak: Evrensel Adaptörlerin Bağlanması ve Pürifikasyon

Evrensel Adaptörlerin Bağlanması

Ligasyon Miksi Tablo 7'de gösterilen miktarlardaki gibi buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı.

Tablo 7: Ligasyon miksi

Ligasyon Miksi	**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 programı bittiğinde örnekler fazla bekletilmeden buz bloğuna alındı ve üzerlerine 5 µl *twist* evrensel adaptörler eklendi.

Ardından hazırlanan ligasyon miksinden de 45 µl eklendikten sonra (Tablo 8) PZR programında 20°C'de 15 dakika (kapak açık) inkübasyona bırakıldı.

Tablo 8: Fragmantasyon ürünü, adaptörler ve miks 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 ve yaklaşık on kez pipetleme yapılarak karıştırıldı. Oda sıcaklığında beş dakika bekletildi.

Sonrasında örnekler manyetik stand üzerine alındı ve üç dakika bekletildi. Böylece DNA pürifikasyon boncuklarının bir pelet oluşturması sağlandı. Üç dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.

Boncuk peletine 200 µl %80 etanol eklendi, 30 saniye bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

Etanol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı.

Daha sonra boncuk peleti manyetik stand üzerinde beş dakika oda sıcaklığında bekletildi ve kalan alkolün uzaklaşması sağlandı.

Peletin tamamı kuruduktan sonra tüpler manyetik standdan çıkartıldı ve her tüpe 17 µL NFW eklenerek çözüldü ve beş dakika bekletildi.

Daha sonra tüpler manyetik standa yerleştirildi ve üç dakika boyunca veya boncuk yapıları tamamen toplanana kadar bekletildi.

Sonrasında 15 µl süpernatantlar yeni sekizli strip tüpe aktarıldı.

3.4.2.1.3. Üçüncü Basamak: Primerler Kullanılarak PZR Amplifikasyonu, Pürifikasyon ve Kalite Kontrolü

Primerler Kullanılarak PZR Amplifikasyonu

PZR miksi, Tablo 9'da belirtilen miktarlardaki [15 µl ürün üzerine 10 µl *Twist UDI* (*Unique Dual Index*) Primer ve 25 µl *KAPA HiFi HotStart ReadyMix*] gibi buz üzerinde 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı. Nazikçe pipetleme yapılarak Tablo 10'da belirtilen PZR programına koyuldu.

Tablo 9: PZR miksi

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

Tablo 10: PZR programı

	Sıcaklık (°C)	**Zaman (Dakika)**	
Kapak	105		
Başlangıç Aşaması	98	45	
Aşama 1	98	15	7 DÖNGÜ
Aşama 2	60	30	
Aşama 3	72	30	
Final Aşaması	72	60	
	4	Bekleme	

Pürifikasyon

PZR sonrası toplam 50 µl olan ürün üzerine 50 µl DNA pürifikasyon boncukları (*AMPure XP Beads*) eklendi ve yaklaşık on kez pipetleme yapılarak karıştırıldı. Oda sıcaklığında beş dakika bekletildi.

Sonrasında örnekler manyetik stand üzerine alındı ve üç dakika bekletildi. Böylece DNA pürifikasyon boncuklarının bir pelet oluşturması sağlandı. Üç dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.

Boncuk peletine 200 µl %80 etanol eklendi, 30 saniye bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

Etanol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı.

Daha sonra boncuk peleti manyetik stand üzerinde beş dakika oda sıcaklığında bekletildi ve kalan alkolün uzaklaşması sağlandı.

Peletin tamamı kuruduktan sonra tüpler manyetik standdan çıkartıldı ve her tüpe 22 µL NFW eklenerek çözüldü ve beş dakika bekletildi.

Daha sonra tüpler manyetik standa yerleştirildi ve üç dakika boyunca veya boncuk yapıları tamamen toplanana kadar bekletildi.

Sonrasında 20 µl süpernatantlar yeni sekizli strip tüpe aktarıldı.

Kalite Kontrolü

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

3.4.2.2. Hedef Zenginleştirme Protokolü

3.4.2.2.1. Birinci Basamak: Hibridizasyon İçin Kütüphanelerin Hazırlanması

Her hibridizasyon reaksiyonu, eşit havuzda toplanarak yapılan toplam 1500 ng indekslenmiş kütüphaneye ihtiyaç duyar. Bu nedenle örneklerin her birinden 187,5 ng/µL olacak şekilde 8'li havuzlar oluşturuldu.

Ürünler Tablo 11'e uygun olacak şekilde 0,2'lik PZR tüpünde birleştirildi ve pipetleme yapıldı. Havuz boş bir mikrosantrifüj tüpü içine kapağı açık şekilde koyularak vakum altında ısısız veya en düşük ısıda liyofilize edildi.

Tablo 11: Kütüphane hazırlığı

Havuza Giren Örnek Sayısı	8 Örnek

Kütüphane Başı DNA Miktarı (ng)	187,5
Havuzdaki Toplam DNA Miktarı (ng)	1500

3.4.2.2.2. İkinci Basamak: Kütüphanelerin Yakalama Probları ile Hibridizasyonu

Hibridizasyon miksinden havuz başına 20 µl olacak şekilde ependorfa alınıp 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.

Ardından oda ısısında beş dakika bekletildi ve 0,2 mL'lik PZR tüpüne aktarıldı.

Üzerine 4 µl ekzom probu ve 4 µl *Refseq* panel eklenip pipetleme yapıldı. 95°C'de iki dakika inkübe edildi.

Bu arada liyofilize havuzun üzerine 5 µl bloke edici solüsyon ve 7 µl evrensel bloke ediciler eklenip pipetleme yapıldı.

Prob miksi 95°C'de iki dakika bekledikten sonra alındı ve yerine havuzlar koyularak 95°C'de beş dakika inkübe edildi.

Aynı anda prob miksi buz bloğunda beş dakika bekletildi.

Beş dakika sonunda hem prob miksi hem de havuzlar oda sıcaklığına alındı ve beş dakika bekletildi.

Ardından her havuz üzerine prob miksinden 28 µl eklendi ve vortekslendi.

Üzerine 30 hibridizasyon artırıcı eklendi, pipetleme yapıldı.

Sonrasında 70°C'deki PZR cihazında 16 saat inkübasyona bırakıldı.

Tablo 12: 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.

3.4.2.2.3. Üçüncü Basamak: Hibridize Hedeflere Streptavidin Boncuklarının Bağlanması

Boncukların Hazırlanması

Streptavidin boncukları homojenleşene kadar vortekslendi. Temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne havuz başında 100 µL streptavidin boncuğu eklendi.

Tüplere 200 µL bağlama *bufferı* eklendi ve homojenleşene kadar pipetlendi.

Tüpler manyetik standa alındı ve bir dakika bekletilip süpernatant atıldı.

Buffer ile yıkama işlemini üç kere tekrarlandı.

Dördüncü kez 200 µl bağlama bufferı 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

Miks oda ısısında 30 dakika oda ısısında vortekslenerek homojenize edildi.

Manyetik standa alındı ve bir dakika bekletilip süpernatant atıldı.

Tüpler manyetik standdan çıkarılarak 200 µL yıkama bufferı 1 ile pipetlendi.

Tüm hacim 1,5 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve tüp manyetik standa alınıp bir dakika 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 beş dakika inkübe edildi.

Tüpler manyetik standa alınıp bir dakika bekletildi. Sonrasında süpernatant atıldı.

Yıkama işlemini üç kere tekrarlandı.

Yıkama işlemlerinin sonunda tüpler manyetik standdan çıkartılarak 45 µl NFW eklendi ve boncuklar çözüldü.

3.4.2.2.4. 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. Pipetleme yapılarak karıştırıldı ve PZR programına (Tablo 13) konuldu.

Tablo 13: PZR programı

	Sıcaklık (°C)	Zaman (Dakika)	
Kapak	105		
Başlangıç Aşaması	98	45	
Aşama 1	98	15	8 DÖNGÜ
Aşama 2	60	30	
Aşama 3	72	30	
Final Aşaması	72	60	
	4	Bekleme	

Pürifikasyon

DNA pürifikasyon boncukları homojenleşene kadar vortekslendi.

PZR sonrası toplam 50 µl olan ürün üzerine 50 µl DNA pürifikasyon boncukları (*AMPure XP Beads*) eklendi ve yaklaşık 10 kez pipetleme yapıldı. Örnekler oda sıcaklığında beş dakika bekletildi.

Sonrasında manyetik standa alındı ve üç dakika bekletildi. Üç dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.

Boncuk peletine 200 µl %80 etanol ile eklendi, 30 saniye bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

Alkol ile yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı.

Manyetik stand üzerinde beş dakika oda sıcaklığında bekletildi ve kalan alkolün uzaklaşması sağlandı.

Beklenen sürenin sonunda pelet 32 µl NFW ile çözüldü ve beş dakika bekletildi.

Daha sonra manyetik standa alındı ve üç dakika veya 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 çıkarıldı.

3.4.3.Tüm Ekzom Dizileme Verilerinin Biyoinformatik Analizi

TED verilerinin biyoinformatik analizleri için SOPHIA DDM v4.4.6.0 programı kullanıldı. Biyoinformatik analizlere başlamadan önce radyal aplazi / hipoplazi ile ilişkilendirilmiş veya ilişkili olabileceği düşünülen genlerden bir liste oluşturuldu. İlk aşamada bu gen listesinde yer alan genler açısından TED verileri 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 (216). Bu kriterlere göre zararsız veya muhtemel zararsız olan varyantlar dışlandı. Yaygın bulunan tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) dışlanması için filtrelemelerde minör allel frekansı (MAF) <0.05 olarak alındı. Bu varyant sıklıklarının değerlendirilmesinde GnomAD, G1000 ve ESP5400 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 literatürde başka olgularda bildirilmiş olup olmadığı HGMD (*Human Gene Mutation Database*), ClinVar, Franklin ve Varsome veri tabanlarında 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. Kopya sayısı değişimi (CNV, *Copy Number Variation*) analizlerinde saptanan

varyantların değerlendilmesinde, yukarıda bahsedilen veri tabanlarına ek olarak DGV (*Database of Genomic Variants*), DECIPHER vb. veri tabanları kullanıldı. Klinik ile uyumlu bulunan varyantlar için Sanger analizi ile doğrulama ve aile segregasyonları planlandı.

3.4.4. Varyantların Sınıflandırılması

Saptanan varyantların değerlendirilmesinde ACMG'nin varyant değerlendirme sınıflandırması kullanıldı (216). ACMG standartlarına göre varyant etkilerinin belirlenmesinde kullanılan değerlendirme kriterleri Tablo 14, Tablo 15 ve Tablo 16'da gösterilmiştir (216).

Tablo 14: Patojenik varyantların sınıflandırılmasında kullanılan nitelikler

Kanıt niteliği	**Patojenite kriterleri**
Patojenite için çok güçlü kanıt	**PVS1:** Fonksiyon kaybı mekanizması ile hastalığa yol açtığı bilinen genlerdeki *null* varyantlar (anlamsız, çerçeve kayması, kanonik +/- 1 veya 2 kırpılma bölgesi, başlangıç kodonu, tek veya çoklu ekzon delesyonu)
Patojenite için güçlü kanıtlar	**PS1:** Nükleotid değişiminden bağımsız olarak daha önceden bildirilmiş bir patojenik varyantla aynı amino asit değişimi **PS2:** Hastada saptanan *de novo* değişim (paternite ve maternite doğrulanmış) ve aile öyküsü olmaması **PS3:** Gen veya gen ürününün olası zararlı etkisini destekleyen *in vitro* veya *in vivo* fonksiyonel çalışmaların varlığı **PS4:** Etkilenmiş bireylerdeki varyant prevalansının kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olması
Patojenite için orta düzeyde kanıtlar	**PM1:** Mutasyonel *hotspot* noktada ve / veya kritik ve iyi bilinen fonksiyonel domainde lokalize zararsız olmayan değişim **PM2:** Ekzom Dizileme Projesi, 1000 Genom Projesi ve Ekzom Toplama Konsorsiyumu (ExAC) gibi büyük çalışmalarda kontrol gruplarında bulunmaması veya homozigot frekansının çok düşük olması **PM3:** Resesif hastalıklarda patojenik bir varyantın trans allelde gösterilmesi

	PM4: Tekrarlamayan bölgelerdeki çerçeve içindeki delesyonlar / insersiyonlar ya da dur kodonu kaybının proteininin uzunluğunda değişime neden olması **PM5:** *Novel* bir yanlış anlamlı değişimin, daha önce patojenik olduğu tanımlı başka bir yanlış anlamlı değişimin amino asit rezidüsünde görülmesi **PM6:** *De novo* olduğu varsayılan ama paternite ve maternite doğrulanmamış olan değişim
Patojeniteyi destekleyen kanıtlar	**PP1:** Hastalığa neden olduğu bilinen bir gendeki varyantın birden fazla etkilenmiş aile üyesinde gösterilmesi **PP2:** Zararsız yanlış anlamlı varyasyonların düşük sıklıkta görüldüğü ve hastalık mekanizmasında yanlış anlamlı varyantların sık yer aldığı gendeki yanlış anlamlı değişim **PP3:** Gen ya da gen ürününde zararlı etkiye yol açabileceği (korunmuşluk, evrimsel, kırpılma etkisi vb.) çeşitli istatistiksel hesaplamalar ile desteklenmiş varyantlar **PP4:** Hastanın fenotipinin veya aile öyküsünün yüksek oranda tek bir genetik etiyolojiye sahip bir hastalığı işaret etmesi **PP5:** Laboratuvar ortamında bağımsız olarak patojenitesi kanıtlanmamış bir varyantın saygın bir kaynak tarafından patojenik olarak rapor edilmiş olması

PVS, pathogenic very strong; PS, pathogenic strong; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting

Tablo 15: Zararsız varyantların sınıflandırılmasında kullanılan nitelikler

Kanıt niteliği	Patojenite kriterleri
Zararsız etkinin tek başına kanıtı	**BA1:** Ekzom Dizileme Projesi, 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu (ExAC) gibi büyük çalışmalarda allel frekansının %5'den yüksek olması
Zararsız etkinin güçlü kanıtları	**BS1:** Allel frekansının hastalık için beklenenden daha yüksek olması **BS2:** Sağlıklı bir yetişkin bireyde, erken yaşta tam penetrans

	beklenen bir hastalık için; resesif hastalıklar için homozigot, dominant hastalıklar için heterozigot ve X'e bağlı hastalıklar için hemizigot gözlenen değişimler **BS3:** İyi tanımlanmış *in vitro* veya *in vivo* fonksiyonel çalışmalar ile protein fonksiyonunda ya da kırpılma etkisinde zararlı etkinin bulunmadığının gösterilmesi **BS4:** Ailedeki benzer etkilenmiş bireylerde değişimin segrege olmaması
Zararsız etkinin destekleyici kanıtları	**BP1:** Hastalık mekanizmasında esas olarak trunke edici varyantların yer aldığı genlerdeki yanlış anlamlı varyantlar **BP2:** Tam penetrans gösteren dominant bir gen / hastalıkta, patojenik bir varyant ile trans konumda bulunması veya herhangi bir kalıtım paterni durumunda patojenik bir varyant ile cis konumda bulunması **BP3:** Fonksiyonu bilinmeyen tekrar bölgelerindeki çerçeve içi delesyonlar / insersiyonlar **BP4:** Gen veya gen ürününde zararlı etkiye yol açmadığı (korunmuşluk, evrimsel, kırpılma etkisi vb.) çeşitli istatistiksel hesaplamalar ile desteklenmiş olan varyantlar **BP5:** Hastalık için alternatif moleküler temeli olan bir hastada bulunan varyant **BP6:** Laboratuvar ortamında bağımsız olarak kanıtlanmamış ancak saygın bir kaynak tarafından varyantın zararsız olarak rapor edilmesi **BP7:** Kırpılma tahmin algoritmalarına göre kırpılma hatasına yol açmayan ya da yeni kırpılma bölgesi oluşturmayan ve yüksek korunmuş bölgede yer almayan sinonim değişimler

BA, benign stand-alone; BS, benign strong; BP, benign supporting

Tablo 16: Varyant puanlama tablosu

Patojenik	**1.** 1 çok güçlü (PVS1) ve **a.** ≥1 güçlü (PS1-PS4) veya

	b. ≥2 orta (PM1-PM6) veya **c.** 1 orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya **d.** ≥2 destekleyici (PP1-PP5) **2.** ≥2 güçlü (PS1-PS4) **3.** 1 güçlü (PS1-PS4) ve **a.** ≥3 orta (PM1-PM6) veya **b.** 2 orta (PM1-PM6) ve ≥2 destekleyici (PP1-PP5) veya **c.** 1 orta (PM1-PM6) ve ≥4 destekleyici (PP1-PP5)
Olası patojenik	**1.** 1 çok güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya **2.** 1 güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya **3.** 1 güçlü (PS1-PS4) ve ≥2 destekleyici (PP1-PP5) veya **4.** ≥3 orta (PM1-PM6) veya **5.** 2 orta (PM1-PM6) ve ≥2 destekleyici (PP1-PP5) veya **6.** 1 orta (PM1-PM6) ve ≥4 destekleyici (PP1-PP5)
Önemi belirsiz	**1.** Diğer kriterlerin karşılanmaması **2.** Patojenik ve zararsız kriterlerin çelişkili olması
Olası zararsız	**1.** 1 güçlü (BS1-BS4) ve 1 destekleyici (BP1-BP7) veya **2.** ≥2 destekleyici (BP1-BP7)
Zararsız	**1.** 1 tek başına (BA1) veya **2.** ≥2 güçlü (BS1-BS4)

PVS, pathogenic very strong; PS, pathogenic strong; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting, BA, benign stand-alone; BS, benign strong; BP, benign supporting

3.4.5. Varyantların Adlandırılması

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

3.4.6. TED Analizi ile Saptanan Varyantların Sanger Dizileme ile Doğrulanması

TED analizinde saptanan her aday varyant için gen-spesifik ileri ve geri primerler tasarlandı. Bu primerler saptanan varyantı kapsayacak şekilde ve NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) veri tabanında varyantın tespit edildiği transkriptin NM kodu baz

alınarak belirlendi. Primerler tasarlanırken uzunluklarının 17-25 nükleotid arasında olmasına, A-T ve C-G nükleotid dağılımlarının eşite yakın olmasına, primer çiftinin DNA'ya bağlanma ısılarının birbirine yakın olmasına, primerlerdeki oligonükleotidlerin tekrarlayan dizi bölgesinde olmamasına, primerlerdeki oligonükleotidlerin herhangi bir polimorfizm içermemesine ve içermesi kaçınılmaz ise polimorfizmin toplum sıklığının %1'in altında olmasına dikkat edildi. Ensembl veri tabanından elde edilen veriler ile primerler tasarlandı. Primerlerin bağlanma ısıları, dizi uzunlukları ve spesifiteleri USCS Genome Browser *in silico* PZR aracı ile kontrol edildi. Çalışma kapsamında tasarlanan kullanılan primer çiftleri Tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17: Çalışmamız kapsamında tasarlanan primer dizileri

Olgu no	Gen sembolü	NM kodu	Bölge	Primer F/R	Fragman uzunluğu (bç)	TM (^{0}C)
1	*RBM8A*	NM_005105.5	Ekzon 1, intron 1	5'-GCC GCG GTT AAG AGG AA- 3' 5'-CAA AGC CGC GAC CCT T- 3'	675	60-61
2	*RBM8A*	NM_005105.5	Ekzon 1, intron 1	5'-GCC GCG GTT AAG AGG AA- 3' 5'-CAA AGC CGC GAC CCT T- 3'	675	60-61
4	*CCNH*	NM_001239.4	Ekzon 6	5'-GGT TGT ACC TGA ATG TCA CT- 3' 5'-GTG CCT TCT CTG AGT GTG T- 3'	710	52-53
5	*FANCI*	NM_001113378.2	Ekzon 18	5'-GCA TGT GGA GGA AGC TAA- 3' 5'-CTG GTG CTG ACT ACA TCA AGT- 3'	352	54-55
5	*FANCI*	NM_001113378.2	İntron 22	5'-GCA GTG AGC CAA GGT CA-3' 5'-AGG TGA AAC AAG TGA GCC TA- 3'	448	56-55

3.4.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Tasarlanan primerler ve olgulara ait DNA'lar ile termal döngü cihazı kullanılarak PZR çalışması yapıldı. Her bir PZR reaksiyonu için 2.0 mM MgCl2 (*Thermo Scientific*), 1X tampon solüsyonu [10X (NH4)2SO4] (*Thermo Scientific*), %0-10 DMSO (*Biomatik Coorporation*), 200 µM dNTP (*Thermo Scientific*), 0.1-0.2 µM ileri ve geri primerler (*Sentebiolab*), 0.5 U Taq polimeraz enzimi (*Hibrigen*) ve 150-200 ng gDNA kullanıldı. Distile su (dH20) ile son hacim 25

µl'ye tamamlanarak karışım hazırlandı. Tüm çalışmalar soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge, DNA içermeyen negatif kontrol PZR ile birlikte olacak şekilde, Tablo 18'de verilen PZR döngü koşulları altında termal döngü cihazında (*MJ Research PTC-200* ve *DNA Engine-BIORAD-T100*) çalışıldı.

Tablo 18: PZR döngü koşulları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Denatürasyon	94°C	5 dakika	x1 döngü
Denatürasyon	94°C	30 saniye	x10 döngü
Bağlanma	Primer bağlanma ısısı	30 saniye	
Uzama	72°C	45-90 saniye	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	x25-30 döngü
Bağlanma	Primer bağlanma ısısı	30 saniye	
Uzama	72°C	45-90 saniye	
Uzama	72°C	10 dakika	x1 döngü
Bekleme	4°C	1 saat	x1 döngü
Duraklama	10°C	∞	x1 döngü

PZR ile amplifikasyon sonrasında çoğaltılan gen bölgelerinin, hedeflenen bölge olduğunun kontrolü ve deneyin kontamine olup olmadığını tespit etmek amacıyla 5 µl PZR ürünü ile 2 µl *Gel Red* boyası karıştırılarak agaroz jel elektroforezi uygulandı. 50 baz çiftlik merdiven markörü (*Sigma*) paralelinde 1X TBE tamponu içindeki %1,2'lik agaroz (*Sigma*) jelde, 160 Voltta 30 dakika yürütülerek PZR ürünleri baz çifti uzunluğuna göre ayrıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra bantlar ultraviyole ışık altında görüntülenerek kaydedildi.

3.4.6.2. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Özgünlüğü doğrulanmış PZR ürünlerinin saflaştırılmasında enzimatik yöntem kullanıldı. Saflaştırmada için Ekzonükleaz-I (*Lot:00716871-Thermo Scientific*) ve Rapid Alkalin Fosfataz (*04898141001-Roche*) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında sırasıyla 37°C'de 30 dakika,

85°C'de 15 dakika protokolü uygulandı. Saflaştırılmış ürünler bir sonraki işlem için +4°C'de saklandı**.**

3.4.6.3. Dizi PZR Çalışması

PZR için gerekli kimyasalları içeren 5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer, ddNTP ve AmpliTaq DNA polimeraz içeren BigDye v3.1, tek yönlü primer, saflaştırılmış PZR ürünleri ve distile su (dH2O) eklenerek, final hacim 10µl olacak şekilde karışım hazırlandı. 96 örneklik *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* üzerine bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde yüklendi. Tablo 19'da verilen PZR döngü koşulları altında termal döngü cihazında çalışıldı.

Tablo 19: Dizi PZR döngü koşulları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Denatürasyon	96°C	10 saniye	x25
Bağlanma	50°C	5 saniye	
Uzama	60°C	4 dakika	
Sonlanma	4°C	∞	x1

3.4.6.4. Dizi PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Dizi PZR'si tamamlandıktan sonra 4°C'ye gelen cihazdan ürünler alındı. Dizi PZR ürünleri, primer ve diğer reaktiflerin uzaklaştırılması amacıyla alkolle çöktürme yöntemi ile saflaştırıldı. Ürünlerin üzerine her kuyucuğa 1'er µl 125 mM EDTA, 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol ilave edildi. *Plate*, alüminyum koruyucu yapışkan bant ile kapatılarak 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 3.810 rpm'de 45 dakika santrifüj yapıldı. Sonrasında koruyucu bant çıkarılıp *plate* ters çevrilerek 1.100 rpm'de 30 saniye kısa santrifüj yapıldı. Ardından her kuyucuğa 35 µl %70'lik soğuk etanol eklendi ve koruyucu bantla tekrar kapatılarak 3460 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Sonrasında koruyucu bant tekrar açılıp *plate* ters çevrilerek 1170 rpm'de 60 saniye kısa santrifüj yapıldı. Ardından her kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (*Highly Deionized Formamid*) eklendi. Örnekler, termal döngü cihazında 97°C'de beş dakika denatüre edildikten sonra iki dakika soğuk blok üzerinde bekletildi.

3.4.6.5. Elektroforez Cihazına Yükleme

Saflaştırılan ürünlerin dizilenmesi, ABI3500 otomatik sekiz kapillerli elektroforez cihazında (*Applied Biosystem*) gerçekleştirildi. *Plate* ABI3500 cihazına yerleştirilerek yürütme işlemine geçildi. Yürütme işleminde daha önceden kalibre edilmiş dizileme boya seti *Dyeset* kullanıldı. Ön yürütme voltajı 15 kV, yürütme voltajı 13,4 kV, injeksiyon voltajı 1,6 kV; ön yürütme süresi 180 saniye, yürütme süresi 2.520 saniye, injeksiyon zamanı 8 saniye ve veri gecikmesi (*data delay*) 250 saniye olarak ayarlandı ve ürünler yürütüldü.

3.4.6.6. Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller elektroforezden elde edilen dosya, ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v3.0 analiz programlarında analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında analizden önce referans dizi bu programa yüklenerek transkriptin ekzonik ve intronik bölgeleri programa tanıtıldı. Ardından Fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi. Olgu dizisinin hedef gen bölgesindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu, dizilenen baz sayısı, saflaştırma kalitesi, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği değerlendirildi. Bu değerlendirmelerde istenilen sonuçların alınamadığı durumlarda dizileme protokolü PZR aşamasından, ya da yeterli örnek mevcut ise saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. Sonuçlar TED verileri ile karşılaştırıldı.

3.4.7. CNV Analizinde Saptanan Kopya Sayısı Değişiminin Gerçek Zamanlı PZR ile Doğrulanması

CNV analizinde saptanan bir duplikasyonunu doğrulamak amacıyla kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR) çalışması gerçekleştirildi. *TFAP2A* geninin ekzon 6 bölgesi ve normalizatör gen olarak *PERP2* geninin ekzon 2 bölgesi kullanıldı. *PERP2* geninin ekzon 2 bölgesi; *TFAP2A* geni ile aynı kromozomda bulunması, genomik varyant veri tabanlarında bu bölgede yapısal varyantların bulunmaması ve indeks, anne, baba ile kontrol bireyin CNV analizlerinde bu bölgede kopya sayısı gözlenmemesi nedeniyle seçildi. Bu bölgeler için belirli özellikler (primer uzunluklarının 17-25 nükleotid arasında olması, amplikon boyutunun 100-150 nükleotid uzunluğunda olması, primer çiftinin DNA bağlama ısılarının 58-60 derece aralığında olması, primer çiftinin A-T ve C-G nükleotid dağılımlarının eşite yakın olması, amplikonların benzer G-C içeriğine sahip olması, primerlerdeki oligonükleotidlerin tekrarlayan dizi bölgesinde

olmamasına, primerlerdeki oligonükleotidlerin herhangi bir polimorfizm içermemesine ve içermesi kaçınılmaz ise polimorfizmin toplum sıklığının %1'in altında olmasına) gözetilerek tasarlanan primer çiftleri Tablo 20'de gösterilmektedir.

Tablo 20: qPZR için tasarlanan primer çiftleri

Gen sembolü	**NM kodu**	**Hedef ekzon**	**Primer F/R**	**Fragman uzunluğu (bç)**	**TM (ºC)**
TFAP2A	NM_001032280.3	Ekzon 6	5'-GTC CAC CTA GCC AGG GAC- 3' 5'-TGT CAC TTG CTC ATT GGG AT- 3'	108	58-59
PERP2	NM_022121.5	Ekzon 2	5'-GGC TGC CAT GCT CTT CT- 3' 5'-TCA CTC TCA GGA AGA CAA GCA T- 3'	101	58-59

Her bireyde her bir reaksiyon için üç paralel tekrar olacak şekilde hazırlanarak qPZR gerçekleştirildi. qPZR için florasan molekül olarak *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific)* kullanıldı. İndeks, anne, baba ve kontrol için *TFAP2A* ve *PERP2* amplifikasyon reaksiyonları Tablo 21'de belirtilen PZR protokolü ile Biorad cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 21: qPZR döngü koşulları

Aşama	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Denatürasyon	95°C	10 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	x40
Bağlanma	59°C	30 saniye	
Uzama	72°C	30 saniye	

4. BULGULAR

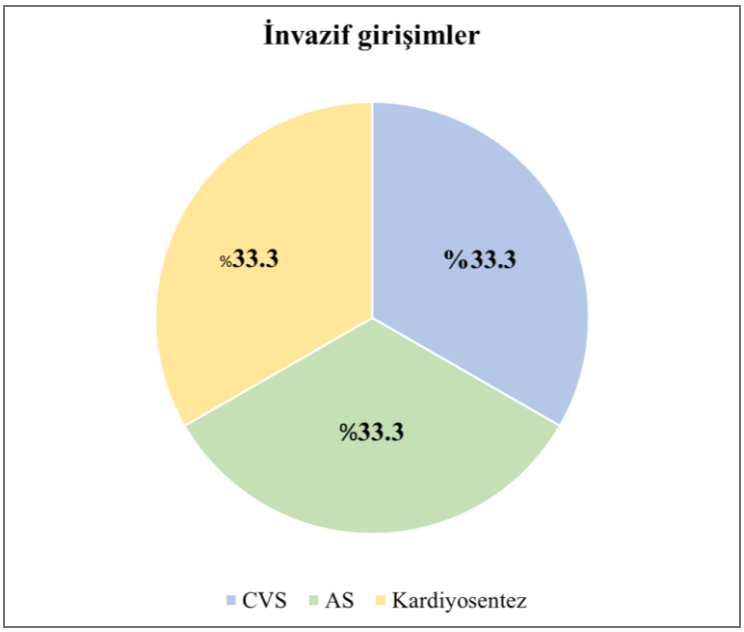
4.1. Antenatal US Bulguları

Antenatal US bulguları retrospektif olarak incelendiğinde altı olgunun beşinde bilateral radyal aplazi / hipoplazi, birinde ise unilateral radyal aplazi / hipoplazi izlendi. Altı olgunun dördünde radyal aplazi / hipoplaziye başparmak aplazisi / hipoplazisi eşlik etmekteydi. Bu dört olgudan üçünde başparmak aplazisi / hipoplazisi bilateral, birinde ise unilateral olarak gözlendi. Üç olguda ek iskelet anomalileri izlendi. Bu iskelet anomalileri arasında vertebra segmentasyon defektleri, skolyoz, ulnar hipoplazi, el yokluğu, oligodaktili ve mikroretrognati yer almaktaydı.

Radyal ışın defektlerine eşlik eden sistemik anomaliler arasında iki olguda saptanan kardiyak anomaliler iki olguda renal anomaliler yer almaktaydı. İki olguda polihidramniyos, bir olguda intrauterin büyüme kısıtlılığı (İUBK) izlendi.

4.2. İnvazif Girişimler

Antenatal dönemde tüm olgulara invazif girişim yapıldı. Girişimlerin %33.3'ü (n=2) koryon villus biyopsisi (CVS), %33.3'ü (n=2) amniyosentez (AS), %33.3'ü (n=2) kardiyosentez idi.



Şekil 5: Prenatal invazif girişimlerin yönteme göre dağılımı

4.3. Postmortem Fetal Değerlendirme

Olgu grubumuzda gebeliğin terminasyonu ve postmortem fetal değerlendirme ortalama 22. gebelik haftasında (GH) gerçekleştirildi. US'de saptanan malformasyonlara ek olarak iki olguda ulna kısalığı, birer olguda; mikrosefali, yarık damak, preauriküler *skin tag*, vertebra segmentasyon defektleri, skolyoz, kot füzyonu, radyoulnar sinostoz, başparmak hipoplazisi, geniş el başparmağı, metakarp füzyonu, *clenched hand* görünümü, kamptodaktili, klinobrakidaktili, PEV, metatarsus adduktus ve anterior yerleşimli anüs izlendi.

4.4. Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Bulgular (Retrospektif)

Tüm olguların kromozom analizi normal sonuçlanmıştı. Array-CGH analizi yapılan iki olguda normal sonuç alınırken, iki olguda 1q21.1 bölgesinde *RBM8A* genini de içeren heterozigot delesyon saptanmıştı. Çalışma grubumuzdaki olgularda saptanan submikroskobik kromozom anomalileri Tablo 22'de gösterilmektedir.

Tablo 22: Çalışma grubumuzdaki olgularda saptanan submikroskobik kromozom anomalileri

Olgu	Array-CGH analizi	Anomali boyutu	ACMG	Anomali bölgesinde yer alan OMIM genleri	Anomali bölgesinde yer alan diğer genler
Olgu 1	46,XY.arr[GRCh37] 1q21.1(145413711_145743499)x1	329.7 kb	Patojenik	*PDZK1, CD160, POLR3C, PIAS3, ITGA10, PEX11B, RBM8A, POLR3GL, TXNIP, HJV, RNF115, GNRHR2*	*ANKRD35, ANKRD34A, MIR6736, LIX1L-AS1, NUDT17, LIX1L*
Olgu 2	46,XY.arr[GRCh37] 1q21.1(145416056_145770706)x1	354.7 kb	Patojenik	*PDZK1, CD160, POLR3C, PIAS3, ITGA10, PEX11B, RBM8A, POLR3GL, TXNIP, HJV, RNF115, GNRHR2, GPR89A*	*ANKRD35, ANKRD34A, MIR6736, LIX1L-AS1, NUDT17, LIX1L*

4.5. Moleküler Bulgular

Altı olgu ve ebeveynlerine trio TED analizi çalışıldı. İki olguda *RBM8A* geninde hemizigot patojenik varyant saptandı. Birer ebeveynlerinin bu varyantlar için heterozigot taşıyıcı olduğu gösterildi. Kopya sayısı değişimi (*Copy number variation*, CNV) analizlerinde bu iki olguda ve birer ebeveynlerinde 1q21.1 bölgesinde *RBM8A* genini içeren heterozigot delesyon gösterildi. Bir olguda kopya sayısı değişimi analizinde *TFAP2A* tüm gen heterozigot duplikasyonu saptandı. Ebeveynlerde duplikasyon saptanmadı. Bir olguda ve babasında *FANCI* geninde heterozigot klinik önemi belirsiz bir varyant saptandı. Çalışma grubumuzdaki olgularda TED analizleri ile saptanan varyantlar Tablo 23'de, CNV analizleri ile saptanan varyantlar Tablo 24'de gösterilmektedir.

Tablo 23: Çalışma grubumuzdaki olgularda TED analizleri ile saptanan varyantlar

Olgu	**Gen Transkript**	**Nükleotid / Peptid**	**Lokasyon**	**Varyant tipi**	**ACMG**	**Konfirmasyon / Segregasyon**	**İlişkili fenotip (OMIM no)**
Olgu 1	*RBM8A* (NM_005105)	c.-21G>A hemizigot	Ekzon 1	5'UTR	Patojenik	İndeks: Hemizigot Anne: Heterozigot Baba: Normal	TAR sendromu (#274000)
Olgu 2	*RBM8A* (NM_005105)	c.67+32G>C hemizigot	İntron 1	İntronik	Patojenik	İndeks: Hemizigot Baba: Heterozigot Anne: Normal	TAR sendromu (#274000)
Olgu 4	*CCNH* (NM_001239)	c.698C>A / p.(Ser233*) heterozigot	Ekzon 6	Anlamsız	Klinik önemi belirsiz	İndeks: Normal Anne: Normal Baba: Normal	-
Olgu 5	*FANCI* (NM_001113378)	c.1751G>A / p.(Cys584Tyr) heterozigot	Ekzon 18	Yanlış anlamlı	Klinik önemi belirsiz	İndeks: Heterozigot Anne: Normal Baba: Heterozigot	Fanconi anemi, komplementasyon grup I (#609053)
Olgu 5	*FANCI* (NM_001113378)	c.2292-19T>C heterozigot	İntron 22	İntronik	Klinik önemi belirsiz	İndeks: Normal Anne: Normal Baba: Normal	Fanconi anemi, komplementasyon grup I (#609053)

Tablo 24: Çalışma grubumuzdaki olgularda CNV analizleri ile saptanan varyantlar

Olgu	Nükleotid (hg19/GRCh37)	Lokasyon	Anomali boyutu	ACMG	İçerdiği genler	Segregasyon
Olgu 1	145,414,757-145,816,745	1q21.1	402 kb	Patojenik	*HJV, TXNIP, POLR3GL, ANKRD34A, LIX1L, RBM8A, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, RNF115, CD160, PDZK1, GPR89A*	Anne: Normal, Baba: Heterozigot delesyon
Olgu 2	145,414,757-145,826,954	1q21.1	412 kb	Patojenik	*HJV, TXNIP, POLR3GL, ANKRD34A, LIX1L, RBM8A, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, RNF115, CD160, PDZK1, GPR89A*	Anne: Heterozigot delesyon, Baba: Normal
Olgu 3	10,398,625-10,415,249	6p24.3	16.6 kb	Klinik önemi belirsiz	*TFAP2A, TFAP2A-AS2, TFAP2A-AS1*	Anne: Normal, Baba: Normal

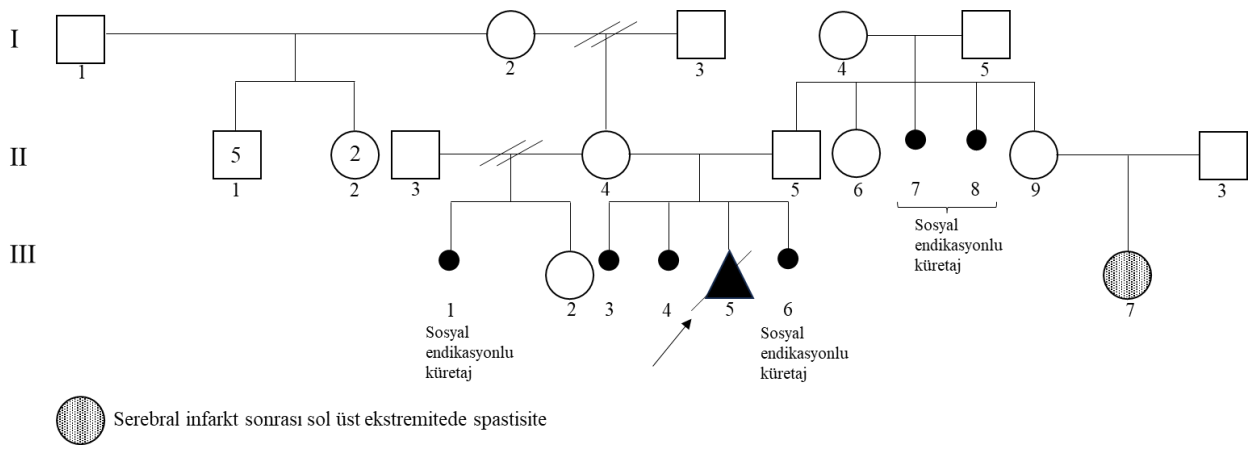
4.6. Olgular

4.6.1. Olgu 1

4.6.1.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları

Aralarında akrabalık olmayan 23 yaşında sağlıklı anne ile 22 yaşında sağlıklı babanın üçüncü gebelik ürünü olan fetus değerlendirildi. Ebeveynlerin ilk iki gebeliği *missed* abortus ile sonuçlanmıştı. Annenin ilk eşinden olan ilk gebeliği ailenin isteğiyle küretaj ile sonlandırılmıştı, ikinci gebeliğinden ise bir sağlıklı kızı vardı (G6 P1 AB2 SEK2 TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi. Annenin 19. GH'de Covid-19 enfeksiyonu nedeniyle hastane yatış öyküsü mevcuttu.

22. GH'de yapılan US'de her iki ön kolda tek kemik, sağ humerusta kısalık, sol humerusta kısalık ve eğrilik, ellerde radyal deviasyon, bilateral ayak sırtı ödemi izlendi.

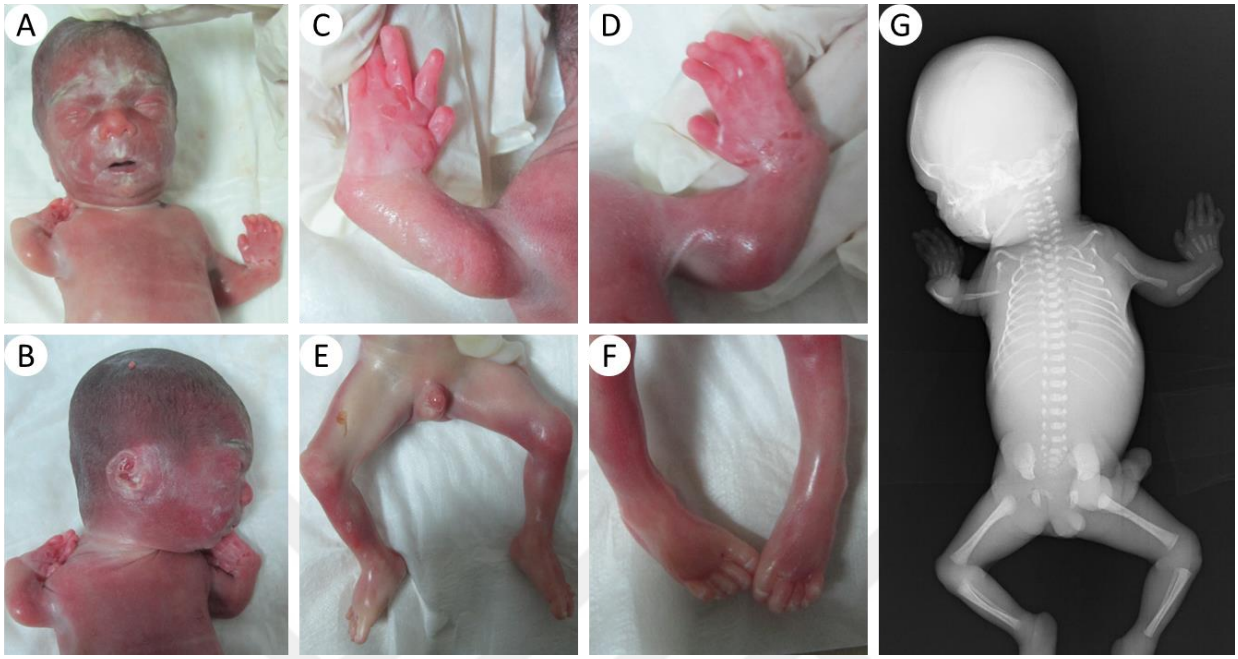


Şekil 6: Olgu 1'e ait aile ağacı

4.6.1.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları

23 haftalık erkek fetusun postmortem değerlendirmesinde tartısı 580 gram (-0.32 SD), boyu 29 cm (-0.64 SD), baş çevresi 20 cm (-1.02 SD), kulaç uzunluğu 17 cm ölçüldü. Medyalde dağınık kaşlar, hipertelorizm, basık burun kökü, bülböz burun ucu, antevert burun delikleri, retromikrognati, sınırda düşük kulaklar izlendi. Dar omuz kemerleri, bilateral üst ekstremitelerde rizomelik özelliği belirgin rizomezomelik kısalık, bilateral kubital pterjiyum, ellerde radyal deviasyon, bilateral hipoplazik başparmaklar, bilateral el beşinci parmaklarında klinodaktili, bilateral el proksimal interfalengeal (PIF) eklemlerinde kamptodaktili gözlendi. Bilateral ayak sırtı ödemi, bilateral altta yerleşimli ayak dördüncü parmakları, sol ayakta PEV deformitesi izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi.

Grafide bilateral humeruslar kısa [sağ humerus:18 mm (<3p), sol humerus: 27 mm (<3p)], sağ humerus proksimalinde belirgin hipoplazi, sol humerus şaftında eğrilik izlendi. Bilateral ulnalar kısa [sağ ulna: 12.3 mm (<3p), sol ulna: 22 mm (<3p)] ve sağ ulnada eğrilik izlendi. Bilateral radyal aplazi saptandı.

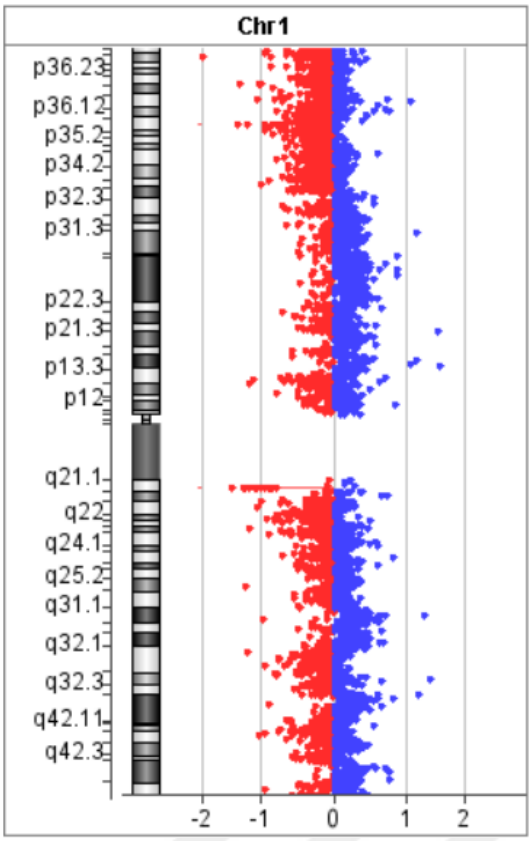


Şekil 7: Olgu 1'e ait fizik muayene ve grafi bulguları

(A, B) Medyalde dağınık kaşlar, hipertelorizm, basık burun kökü, bülböz burun ucu, antevert burun delikleri, retromikrognati, sınırda düşük kulaklar, dar omuz kemerleri, bilateral üst ekstremitelerde rizomelik özelliği belirgin rizomezomelik kısalık, **(C, D)** Bilateral kubital pterjiyum, ellerde radyal deviasyon, bilateral hipoplazik başparmaklar, bilateral el beşinci parmaklarında klinodaktili, **(E, F)** Bilateral ayak sırtı ödemi, bilateral altta yerleşimli ayak dördüncü parmakları, sol ayakta PEV deformitesi, **(G)** Bilateral kısa humeruslar, sağ humerus proksimalinde belirgin hipoplazi, sol humerus şaftında eğrilik, bilateral kısa ulnalar, sağ ulnada eğrilik, bilateral radyal aplazi.

4.6.1.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular

Kardiyosentez ile alınan fetal kan kültüründen elde edilen metafaz kromozomlarının analizi normal sonuçlanırken, array-CGH analizinde birinci kromozomun q21.1 bölgesinde 145,413,711-145,743,499 baz çiftleri arasında *PDZK1, CD160, POLR3C, PIAS3, ITGA10, PEX11B, GNRHR2, RBM8A, POLR3GL, TXNIP, HJV, RNF115, NUDT17, MIR6736, ANKRD35, LIX1L-AS1, LIX1L, ANKRD34A* genlerini içeren yaklaşık 329,7 kb büyüklüğünde bir delesyon saptandı.



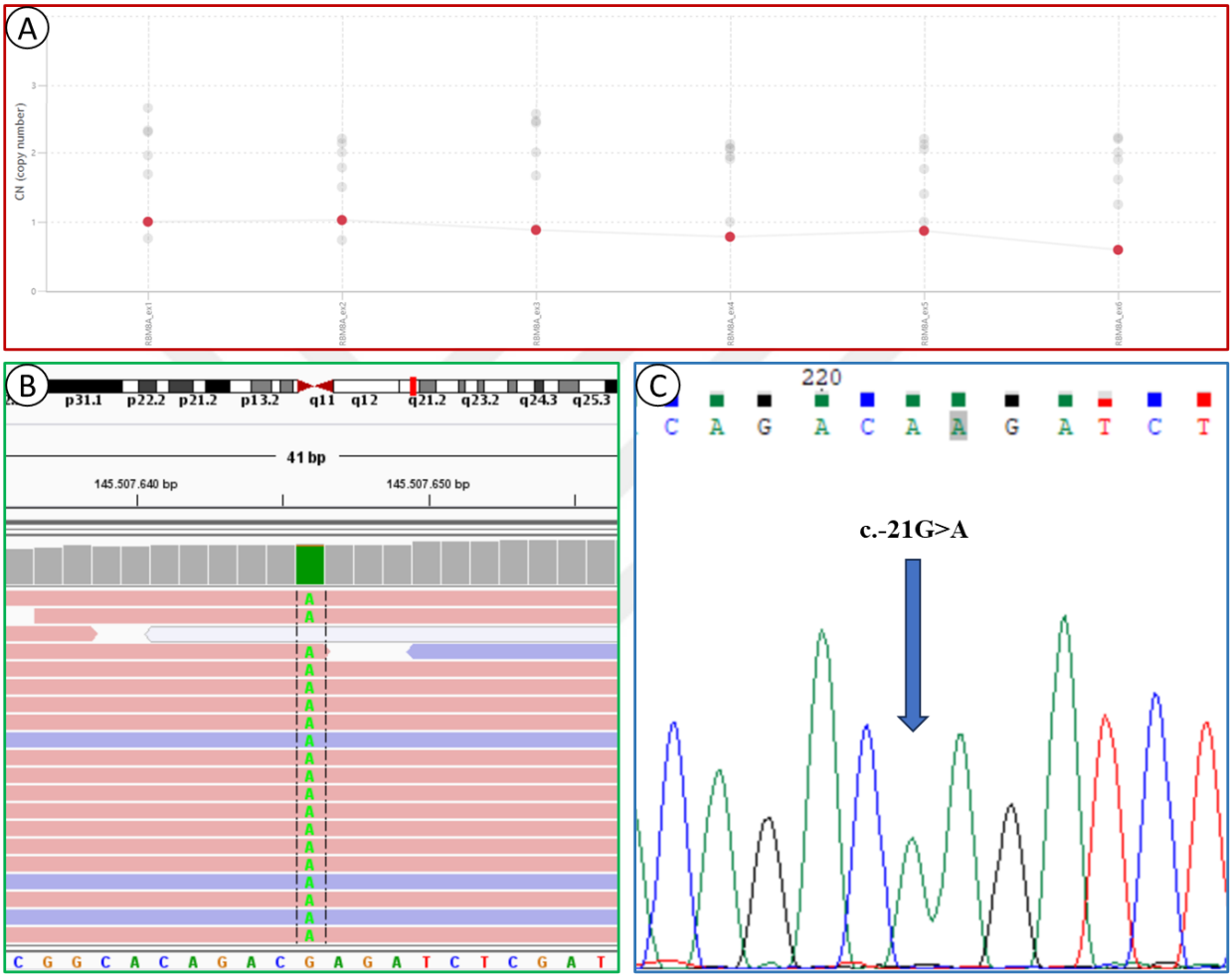
Şekil 8: Olgu 1'de array-CGH çalışmasında 1q21.1 bölgesinde heterozigot delesyon görüntüsü

Trio TED analizinde *RBM8A* geni (1q21.1, *RNA binding motif protein 8A*, NM_005105.5, NP_005096.1) ekzon 1'in 5'UTR bölgesinde indekste hemizigot, annede heterozigot c.-21G>A (rs139428292) değişimi saptandı. Bu değişim indeks ve annede Sanger dizileme ile doğrulandı. Babada ise TED analizinde ve Sanger dizilemede bu değişim saptanmadı.

CNV analizlerinde 1q21.1 bölgesinde 145,414,757-145,816,745 nükleotidleri arasında, *PDZK1, CD160, POLR3C, PIAS3, ITGA10, PEX11B, GNRHR2, RBM8A, POLR3GL, TXNIP, HJV, RNF115, NUDT17, ANKRD35, ANKRD34A, GPR89A* genlerini içeren yaklaşık 402 kb büyüklüğünde heterozigot delesyon indeks ve babada saptandı. Annede delesyon saptanmadı. İndekste saptanan delesyon array-CGH analizinde de gösterilmişti.

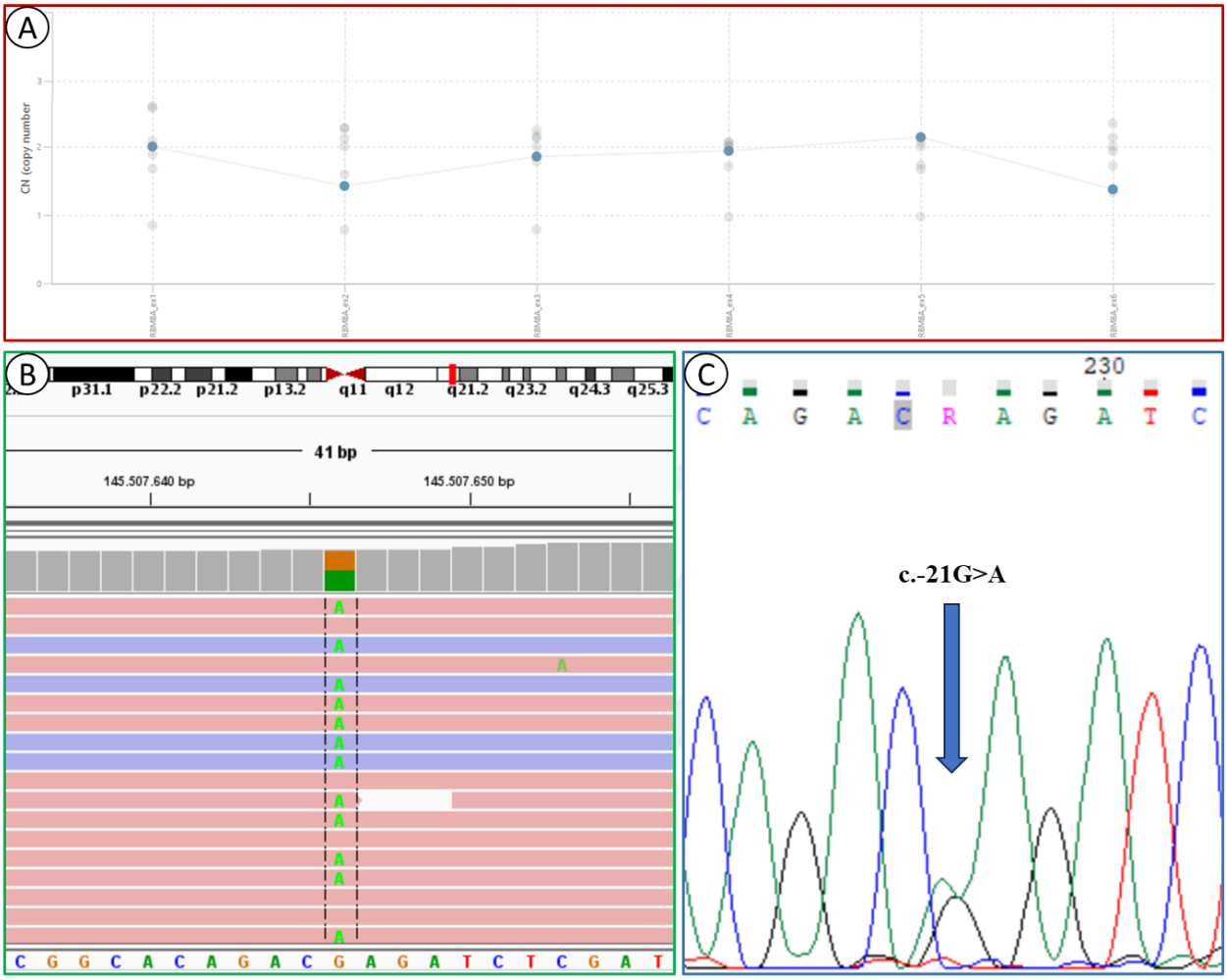
RBM8A genini içeren delesyon ve *RBM8A* genindeki varyantın bileşik heterozigotluğu literatürde TAR sendromu (#MIM 274000) ile ilişkilendirilmiştir. İndekste ve annede saptanan c.-21G>A değişimi daha önce literatürde bildirilmiş olup ACMG sınıflandırmasına göre

patojenik niteliktedir. İndekste ve babada 1q21.1 bölgesinde saptanan delesyon ise daha önce literatürde bildirilmiş olup ACMG sınıflandırmasına göre patojenik niteliktedir.



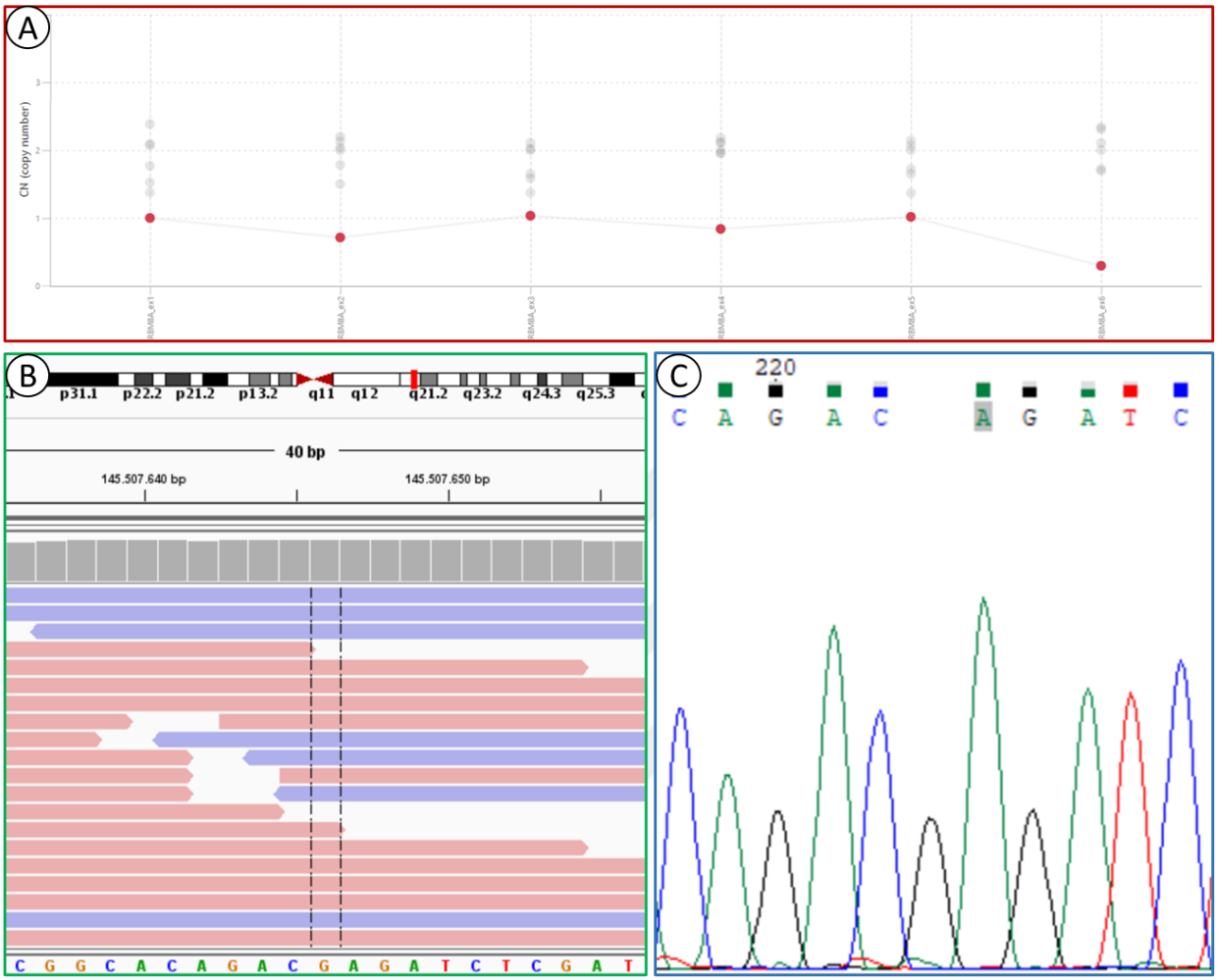
Şekil 9: Olgu 1'e ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndekste CNV analizinde *RBM8A* geni heterozigot delesyonu izlenmektedir. **(B)** İndekste TED analizinde saptanan hemizigot c.-21G>A değişiminin IGV görüntüsü. **(C)** İndekste Sanger dizilemede hemizigot c.-21G>A değişimi izlenmektedir.



Şekil 10: Olgu 1'in annesine ait moleküler analiz sonuçları

(A) Annede CNV analizinde *RBM8A* geni normal olarak iki kopya izlenmektedir. **(B)** Annede TED analizinde saptanan heterozigot c.-21G>A değişiminin IGV görüntüsü. **(C)** Annede Sanger dizilemede heterozigot c.-21G>A değişimi izlenmektedir.



Şekil 11: Olgu 1'in babasına ait moleküler analiz sonuçları

(A) Babada CNV analizinde *RBM8A* geni heterozigot delesyonu izlenmektedir. **(B)** Babada TED analizinin IGV görüntüsünde c.-21 bölgesinde değişim gözlenmemektedir. **(C)** Babada Sanger dizilemede c.-21 bölgesinde değişim izlenmemektedir.

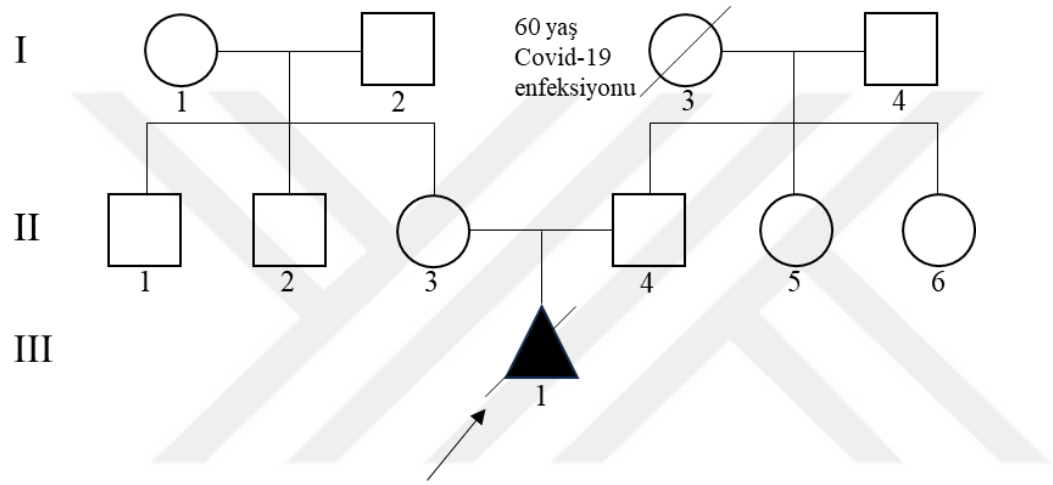
4.6.2. Olgu 2

4.6.2.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları

Aralarında akrabalık olmayan 33 yaşında sağlıklı anne ile 38 yaşında sağlıklı babanın ilk gebelik ürünü olan fetus değerlendirildi (G1 TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu,

bilinen maternal hastalık, enfeksiyon / yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.

23. GH'de yapılan US'de bilateral radyal aplazi, ellerde radyal deviasyon, sağ elde üst üste binmiş parmaklar, her iki başparmakta addüksiyon pozisyonu, beş ile altı atımda bir nadir kardiyak ekstrasistoller izlendi.

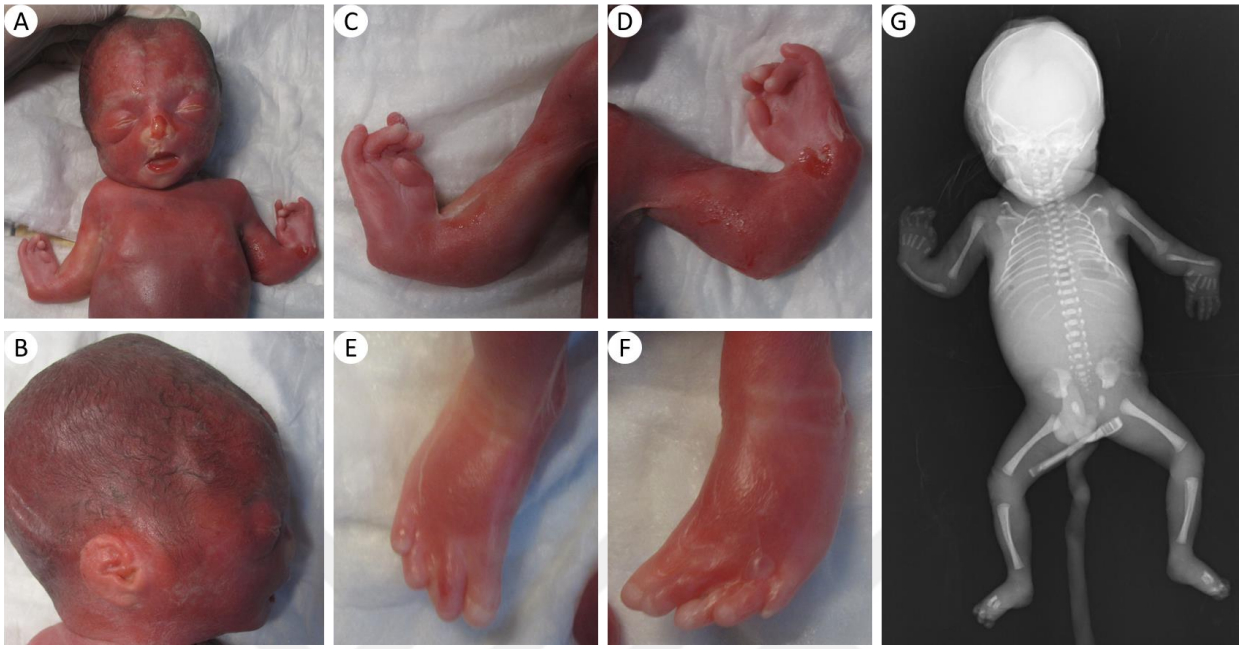


Şekil 12: Olgu 2'ye ait aile ağacı

4.6.2.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları

25 haftalık erkek fetusun postmortem değerlendirmesinde tartısı 760 gram (-0.21 SD), boyu 32 cm (-0.46 SD), baş çevresi 23 cm (-0.16 SD) ölçüldü. Hipertelorizm, basık burun ucu, düşük kulaklar, mikrognati izlendi. Bilateral dirseklerde ekstansiyon kısıtlılığı, bilateral ön kollarda kısalık, ellerde radyal deviasyon, bilateral el başparmaklarında addüksiyon pozisyonu, geniş sol el başparmağı, bilateral *clenched hand* görünümü izlendi. El parmaklarında distal fleksiyon çizgileri izlenmedi. Sol ayakta metatarsus adduktus ve bilateral ayak parmaklarında parmak pozisyon anomalisi (ikinci ve dördüncü parmaklar diğerlerinin üzerinde yerleşimli) izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi.

Grafide bilateral radyal aplazi, bilateral ulnalarda kısalık [28 mm (<3p)], bilateral başparmaklara ait metakarp (birinci metakarp) hafif kısa ve proksimal yerleşimli izlendi.



Şekil 13: Olgu 2'ye ait fizik muayene ve grafi bulguları

(A, B) Hipertelorizm, basık burun ucu, düşük kulaklar, mikrognati, bilateral ön kollarda kısalık, **(C, D)** Ellerde radyal deviasyon, bilateral el başparmaklarında addüksiyon pozisyonu, geniş sol el başparmağı, bilateral *cleched hand* görünümü, el parmaklarında distal fleksiyon çizgileri yokluğu, **(E, F)** Sol ayakta metatarsus adduktus ve bilateral ayak parmaklarında parmak pozisyon anomalisi (ikinci ve dördüncü parmaklar diğerlerinin üzerinde yerleşimli), **(G)** Bilateral radyal aplazi, ulnalarda kısalık, başparmaklara ait metakarp (birinci metakarp) hafif kısa ve proksimal yerleşimli.

4.6.2.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular

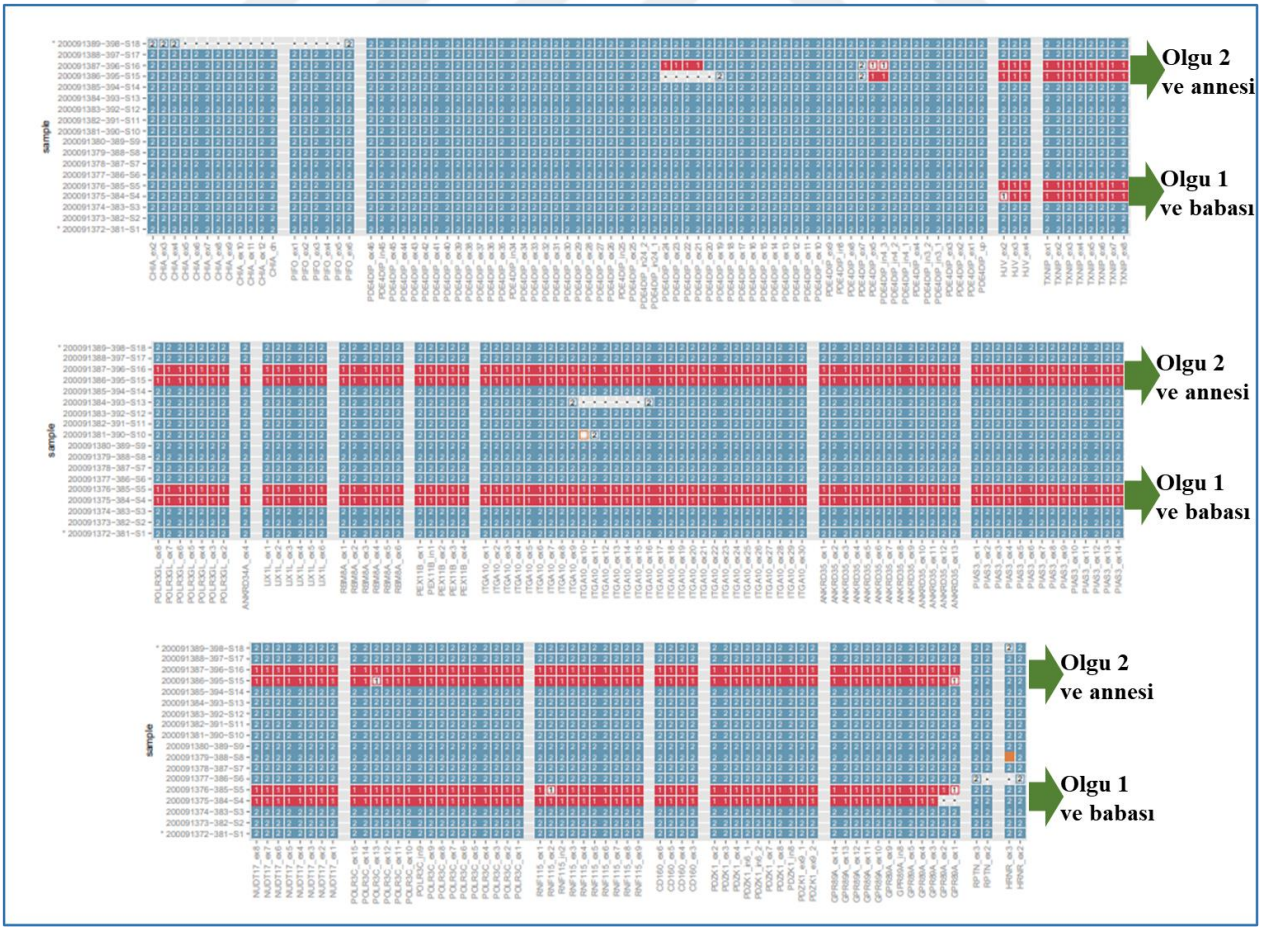
Amniyosentez materyalinden uzun süreli hücre kültürü ile elde edilen metafaz kromozomlarının analizi normal sonuçlanırken, array-CGH analizinde birinci kromozomun q21.1 bölgesinde 145,416,056-145,770,706 baz çiftleri arasında *PDZK1, CD160, POLR3C, PIAS3, ITGA10, PEX11B, GNRHR2, RBM8A, POLR3GL, TXNIP, HJV, RNF115, NUDT17, MIR6736, ANKRD35, LIX1L-AS1, LIX1L, ANKRD34A, GPR89A* genlerini içeren, yaklaşık 354 kb büyüklüğünde bir delesyon saptandı.

Trio TED analizinde *RBM8A* geni (1q21.1, *RNA binding motif protein 8A*, NM_005105.5, NP_005096.1) intron 1'de indekste hemizigot, babada heterozigot c.67+32G>C (rs201779890)

değişimi saptandı. Bu değişim indeks ve babada Sanger dizileme ile doğrulandı. Annede ise TED analizinde ve Sanger dizilemede bu değişim saptanmadı.

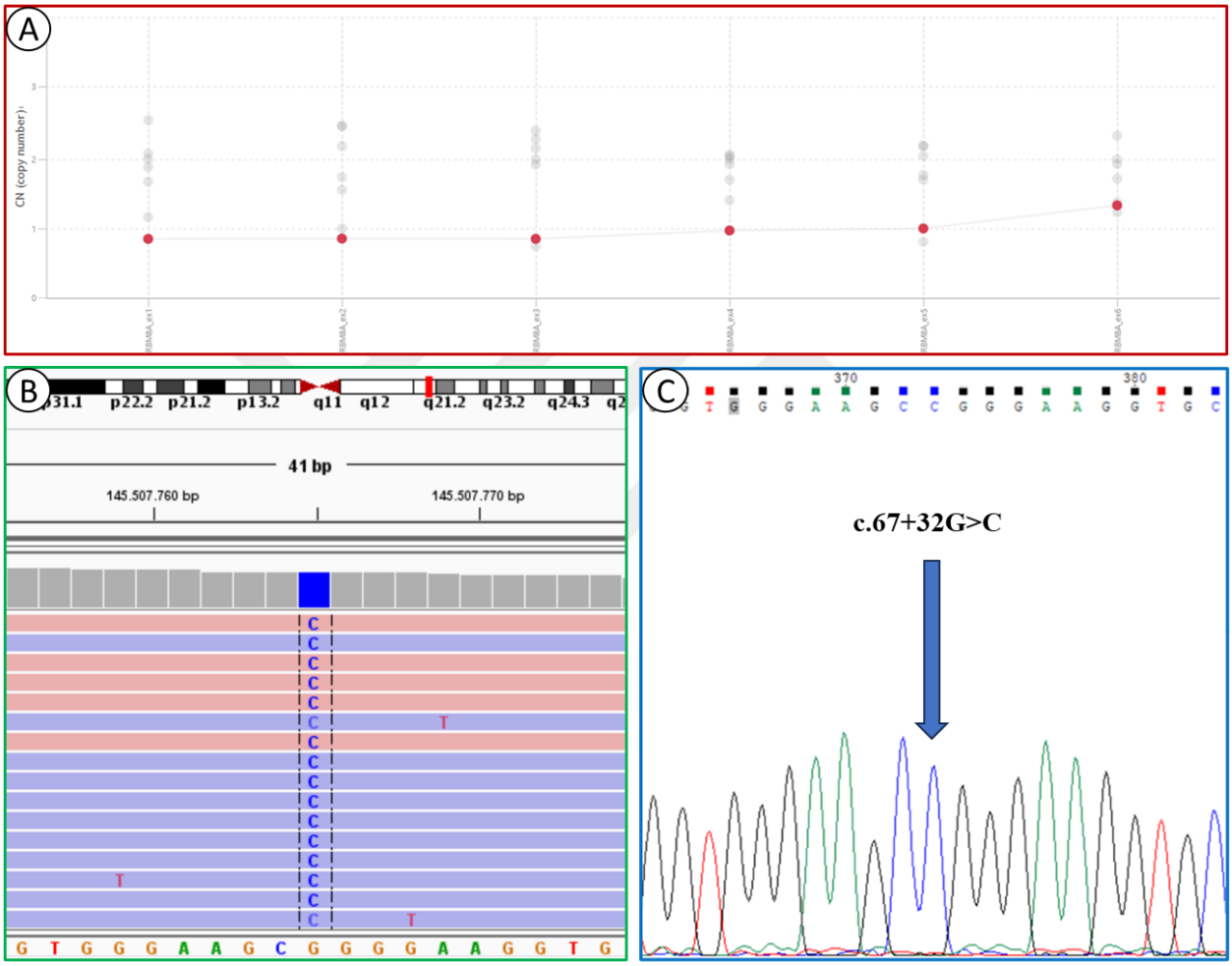
CNV analizlerinde 1q21.1 bölgesinde 145,414,757-145,826,954 nükleotidleri arasında, *HJV, TXNIP, POLR3GL, ANKRD34A, LIX1L, RBM8A, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, RNF115, CD160, PDZK1, GPR89A* genlerini içeren, yaklaşık 412 kb büyüklüğünde heterozigot delesyon indeks ve annede saptandı. Babada delesyon saptanmadı. İndekste ve annede saptanan delesyon array-CGH analizinde de gösterilmişti.

RBM8A genini içeren delesyon ve *RBM8A* genindeki varyantın bileşik heterozigotluğu literatürde TAR sendromu (#MIM 274000) ile ilişkilendirilmiştir. İndekste ve babada saptanan c.67+32G>C değişimi daha önce literatürde bildirilmiş olup ACMG sınıflandırmasına göre patojenik niteliktedir. İndekste ve babada 1q21.1 bölgesinde saptanan delesyon ise daha önce literatürde bildirilmiş olup ACMG sınıflandırmasına göre patojenik niteliktedir.



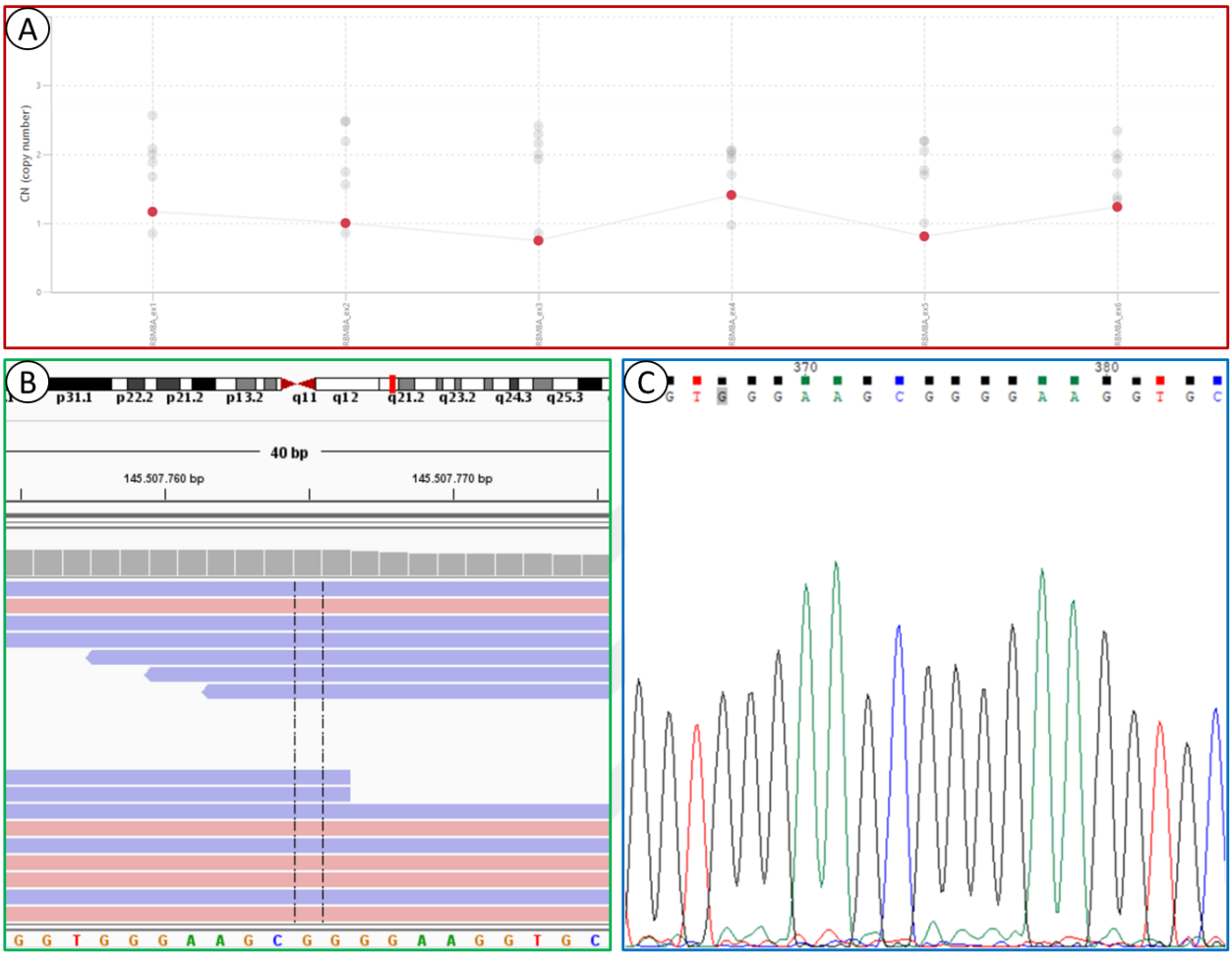
Şekil 14: CNV analizlerinde olgu 1, 2 ve ebeveynlerinde saptanan 1q21 delesyonu

CNV analizlerinde Olgu 1 ve babası ile Olgu 2 ve annesinde saptanan delesyon bölgesinde yer alan genler ve çalışmamızdaki diğer 14 bireyde bu genlerde normal kopya sayısı izlenmektedir.



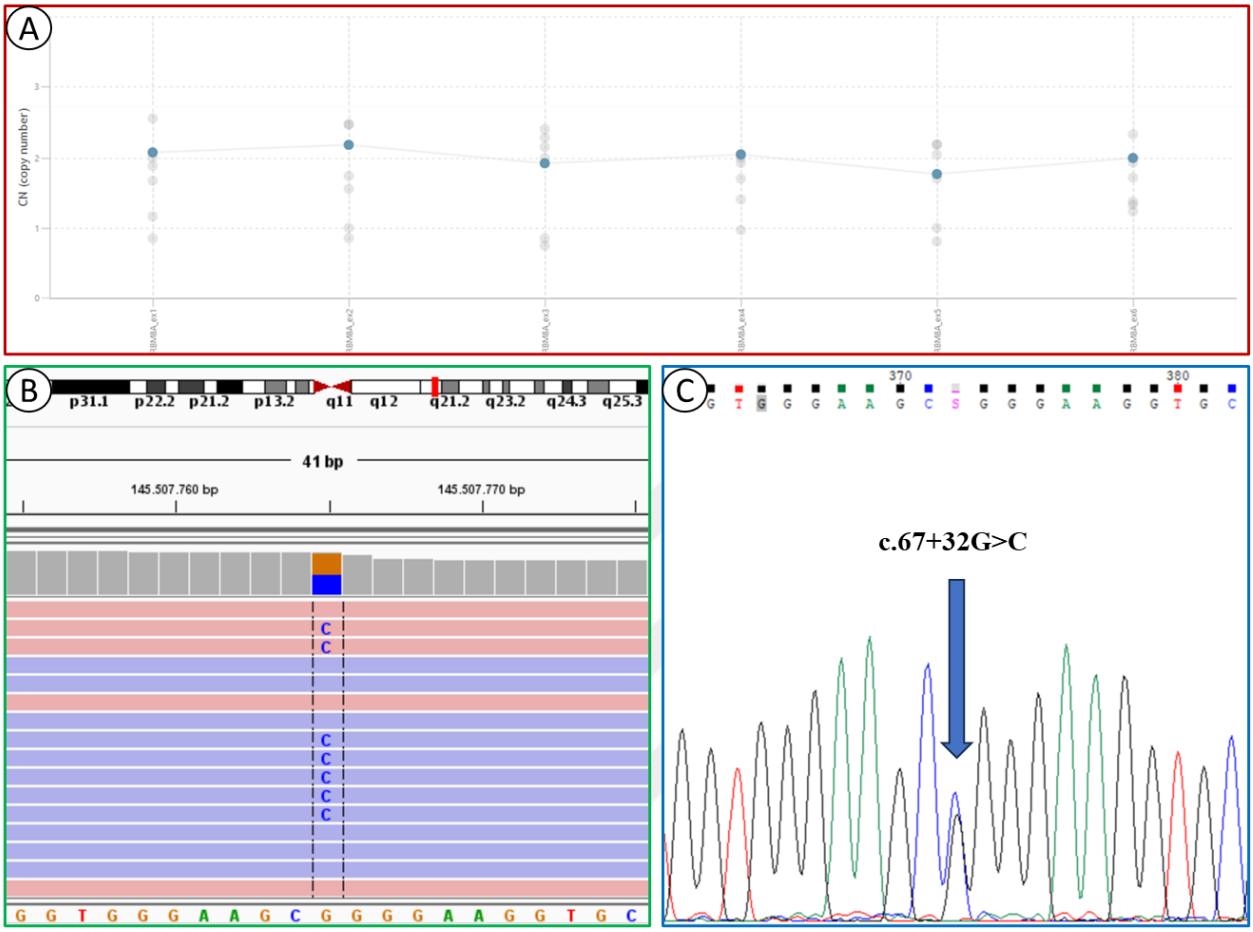
Şekil 15: Olgu 2'ye ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndekste CNV analizinde *RBM8A* geni heterozigot delesyonu izlenmektedir. **(B)** İndekste TED analizinde *RBM8A* geninde saptanan hemizigot c.67+32G>C değişiminin IGV görüntüsü. **(C)** İndekste Sanger dizilemede *RBM8A* geninde hemizigot c.67+32G>C değişimi izlenmektedir.



Şekil 16: Olgu 2'nin annesine ait moleküler analiz sonuçları

(A) Annede CNV analizinde *RBM8A* geni heterozigot delesyonu izlenmektedir. **(B)** Annede TED analizinin IGV görüntüsünde *RBM8A* geni c.67+32 bölgesinde değişim gözlenmemektedir. **(C)** Annede Sanger dizilemede *RBM8A* geni c.67+32 bölgesinde değişim izlenmemektedir.



Şekil 17: Olgu 2'nin babasına ait moleküler analiz sonuçları

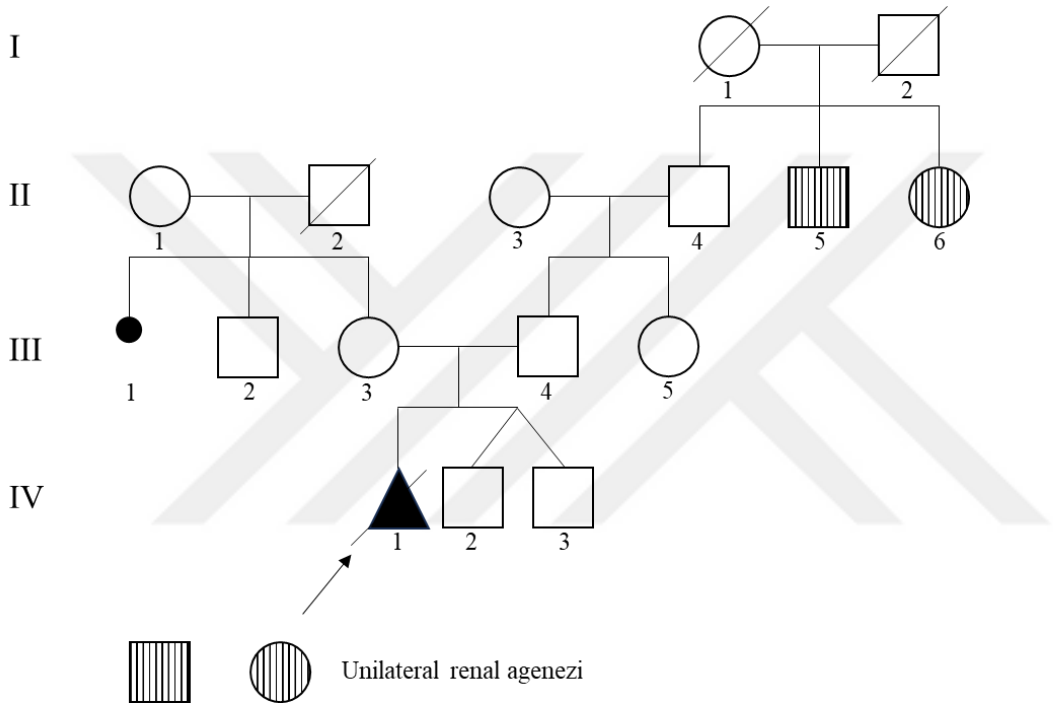
(A) Babada CNV analizinde *RBM8A* geni normal olarak iki kopya izlenmektedir. **(B)** Babada TED analizinde *RBM8A* geninde saptanan heterozigot c.67+32G>C değişiminin IGV görüntüsü. **(C)** Babada Sanger dizilemede *RBM8A* geninde heterozigot c.67+32G>C değişimi izlenmektedir.

4.6.3. Olgu 3

4.6.3.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları

Aralarında akrabalık olmayan 26 yaşında sağlıklı anne ile 32 yaşında sağlıklı babanın ilk gebelik ürünü olan fetus değerlendirildi (G2 P3 TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon / yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.

21. GH'de yapılan US'de polihidramniyos, retromikrognati, bilateral radius ve ulnalarda kısalık, bilateral başparmak aplazisi, ellerde radyal deviasyon, servikal vertebralarda düzensizlikler, skolyoz, sol renal agenezi veya pelvik böbrek şüphesi (sol renal fossa boş izlenmesi ve adrenal *lying down* bulgusu nedeniyle) izlendi.



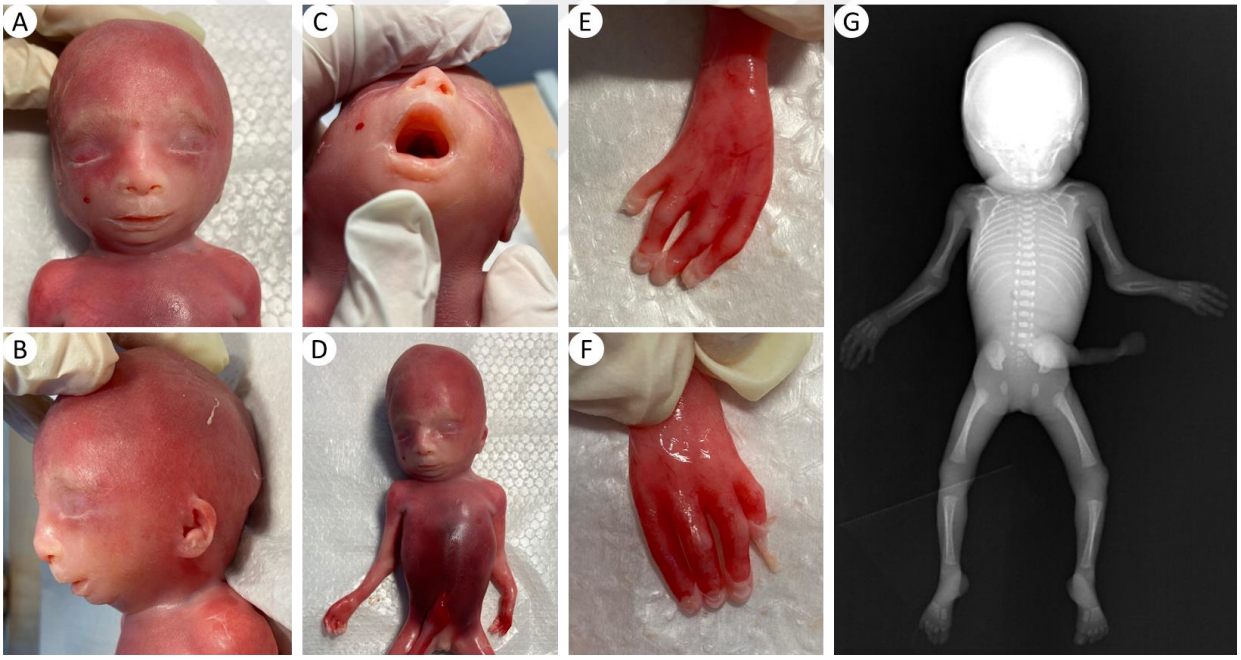
Şekil 18: Olgu 3'e ait aile ağacı

4.6.3.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları

22 haftalık dişi fetusun postmortem değerlendirmesinde tartısı 340 gram (<3p), boyu 26 cm (3-10p), baş çevresi 17.5 cm (<3p, <-3 SD), kulaç uzunluğu 22 cm ölçüldü. Skalp ve ense derisi ödemli görünümde izlendi. Hipertelorizm, medyalde seyrek kaşlar, aşağı çekik palpebral fissürler, malar hipoplazi, uzun filtrum, mikroretrognati, düşük ve posteriora dönük kulaklar, horizontal ve aşırı katlantılı kulak heliksleri gözlendi. Orofarenks muayenesinde yarık damak saptandı. Dirseklerde 20 derece ekstansiyon kısıtlılığı, solda daha belirgin olmak üzere bilateral ön kollarda kısalık, ellerde radyal deviasyon, bilateral ön kollarda pronasyon / supinasyon kısıtlılığı, bilateral el başparmak aplazisi, bilateral el ilk üç parmak PIF eklemlerinde

psödokamptodaktili, dördüncü parmaklarında klinobrakidaktili saptandı. Sol ayak ikinci parmakta parmak pozisyon anomalisi (birinci parmağın üzerinde yerleşimli) izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi.

Grafide servikal vertebra korpuslarında düzensizlik, torakal yedinci vertebra korpusunda hemivertebra izlendi. Bilateral ön kollarda proksimalde radioulnar sinostoz, solda daha belirgin olmakla birlikte bilateral radius ve ulnalarda kısalık saptandı. Bilateral başparmaklara ait ossifikasyon izlenmedi. Ellerde bilateral dört adet metakarpal kemik izlendi, sol elde birinci ile ikinci ve üçüncü ile dördüncü parmağa ait metakarpal kemiklerin proksimalinde füzyon izlendi. Bilateral el dördüncü parmaklara ait orta ve distal falanks ileri derecede hipoplazik saptandı.



Şekil 19: Olgu 3'e ait fizik muayene ve grafi bulguları

(A, B) Hipertelorizm, medyalde seyrek kaşlar, aşağı çekik palpebral fissürler, malar hipoplazi, uzun filtrum, mikroretrognati, düşük ve posteriora dönük kulaklar, horizontal ve aşırı katlantılı kulak heliksleri **(C)** Yarık damak, **(D)** Solda daha belirgin olmak üzere bilateral ön kollarda kısalık, ellerde radyal deviasyon, **(E, F)** Bilateral el başparmak agenezisi, bilateral el ilk üç parmak PIF eklemlerinde psödokamptodaktili, dördüncü parmaklarında klinobrakidaktili, **(G)** Servikal vertebra korpuslarında düzensizlik, torakal yedinci vertebra korpusunda hemivertebra, bilateral ön kollarda proksimalde radioulnar sinostoz, solda daha belirgin olmakla birlikte bilateral radius ve ulnalarda kısalık, bilateral

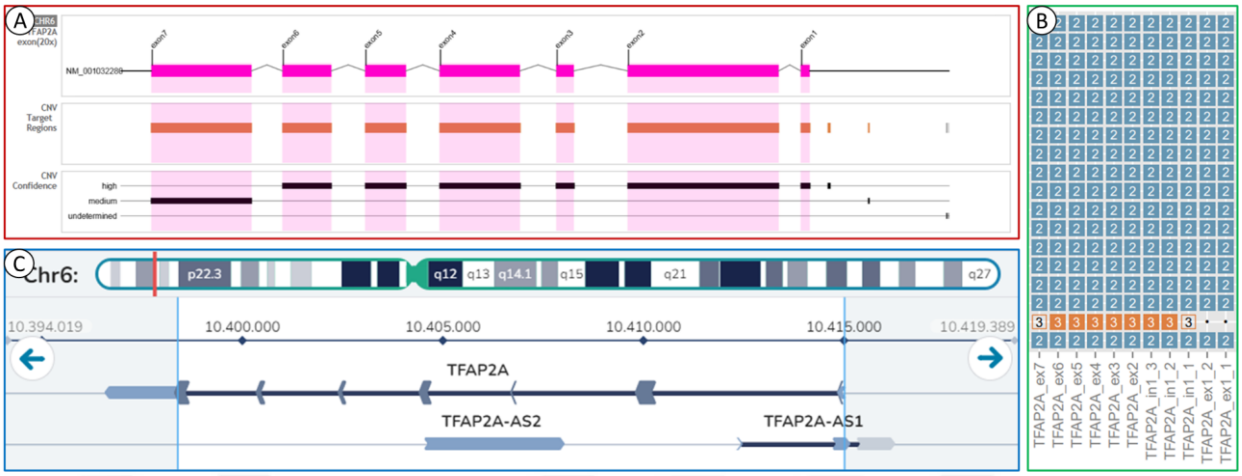
başparmaklara ait ossifikasyon yokluğu, ellerde bilateral dört adet metakarpal kemik, sol elde birinci ile ikinci ve üçüncü ile dördüncü parmağa ait metakarpal kemiklerin proksimalinde füzyon, bilateral el dördüncü parmaklara ait orta ve distal falanks ileri derecede hipoplazik.

4.6.3.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular

Kardiyosentez ile alınan fetal kan kültüründen elde edilen metafaz kromozomlarının analizi normal sonuçlandı. Trio TED analizinde endikasyon ve kalıtım modeli ile uyumlu hastalık yapıcı bir dizi varyantı (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmadı. Ek olarak trio TED analizinde aday gen yaklaşımı ile olgunun kliniği ile ilişkili olabileceği düşünülen dizi varyantı (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmadı.

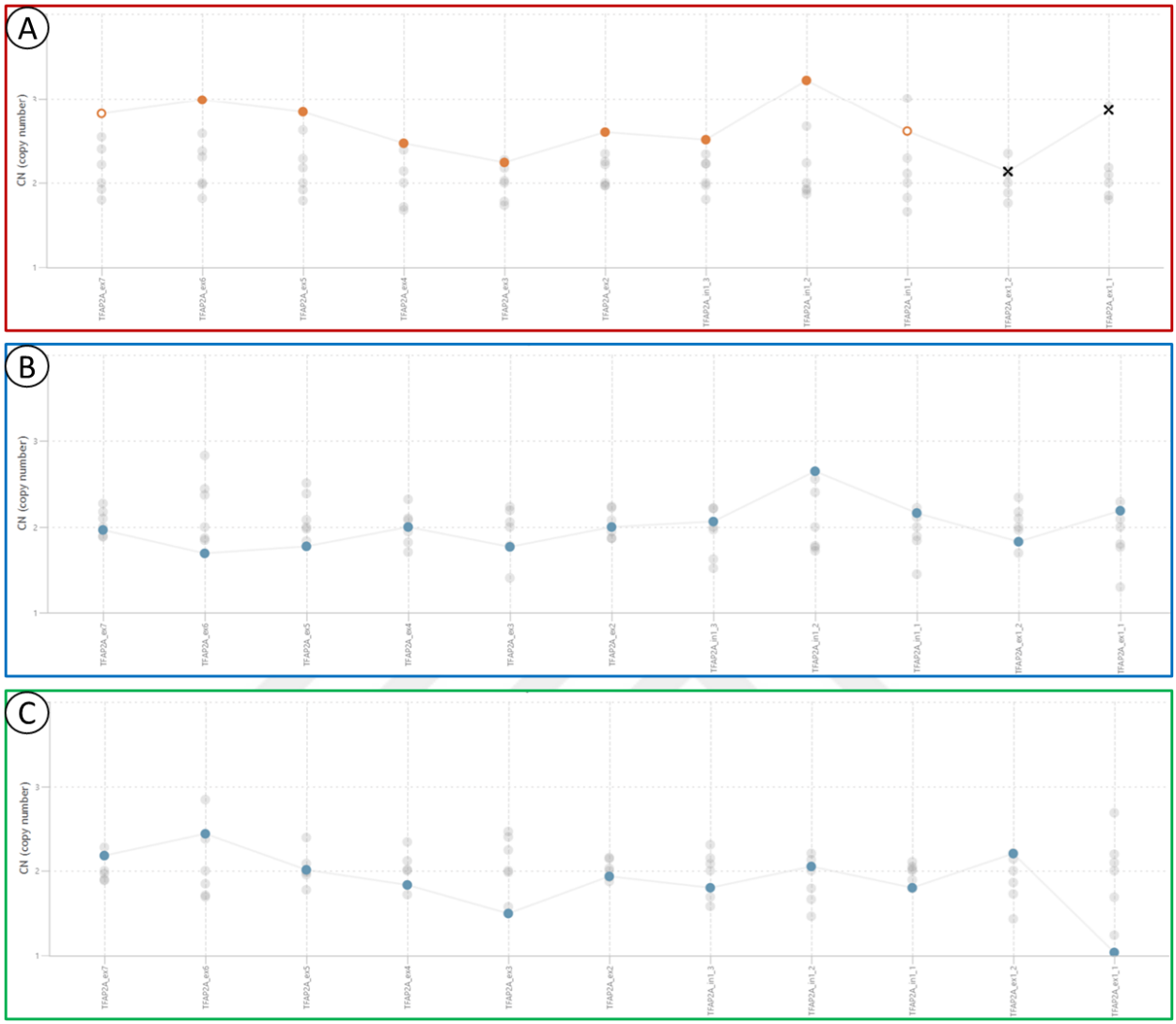
CNV analizlerinde indekste 6p24.3 bölgesinde 10,398,625-10,415,249 nükleotidleri arasında, *TFAP2A* (NM_001032280), *TFAP2A-AS2, TFAP2A-AS1* (ekzon 1'in tamamı, ekzon 2'nin bir kısmı) genlerini içeren 16.6 kb büyüklüğünde heterozigot duplikasyon saptandı. Anne ve babada bu bölge için normal kopya sayısı izlendi. İndekste saptanan duplikasyon ve ebeveynlerde bu bölge için normal kopya sayısı, ekzon 6 bölgesi için gerçekleştirilen gerçek zamanlı kantitatif PZR ile doğrulandı. İndeksteki kopya sayısı değişiminin *de novo* oluştuğu belirlendi.

TFAP2A genindeki heterozigot patojenik varyantlar literatürde Brankiyo-okülo-fasyal sendrom (#MIM 113620) ile ilişkilendirilmiştir. İndekste saptanan duplikasyon değişimi daha önce literatürde bildirilmemiş olup ACMG sınıflandırmasına göre klinik önemi belirsiz niteliktedir.



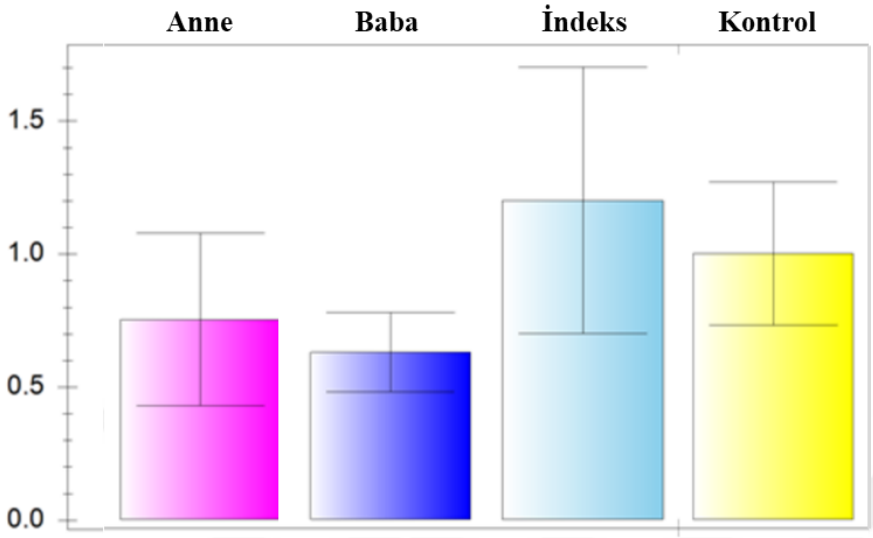
Şekil 20: Olgu 3'e ait *TFAP2A* geni duplikasyonu görüntüsü

(A) Olgu 3'de saptanan *TFAP2A* tüm gen duplikasyonu gözlenmektedir. **(B)** Olgu 3'teki *TFAP2A* gen duplikasyonu ve çalışmamızdaki diğer 17 bireyde bu gende normal kopya sayısı izlenmektedir. **(C)** Duplikasyon bölgesinde yer alan genler ve ekzonlar Franklin veri tabanından alınan görüntüde izlenmektedir.



Şekil 21: Olgu 3 ve ebeveynlerine ait CNV analizlerinin görüntüsü

(A) Olgu 3'te CNV analizinde saptanan *TFAP2A* duplikasyonuna ait görüntü izlenmektedir. **(B, C)** Sırasıyla anne ve babada CNV analizlerinde *TFAP2A* geninde normal kopya sayısı gözlenmektedir.



Şekil 22: qPZR'de indeksteki *TFAP2A* geni ekzon 6 duplikasyonuna ait görüntü

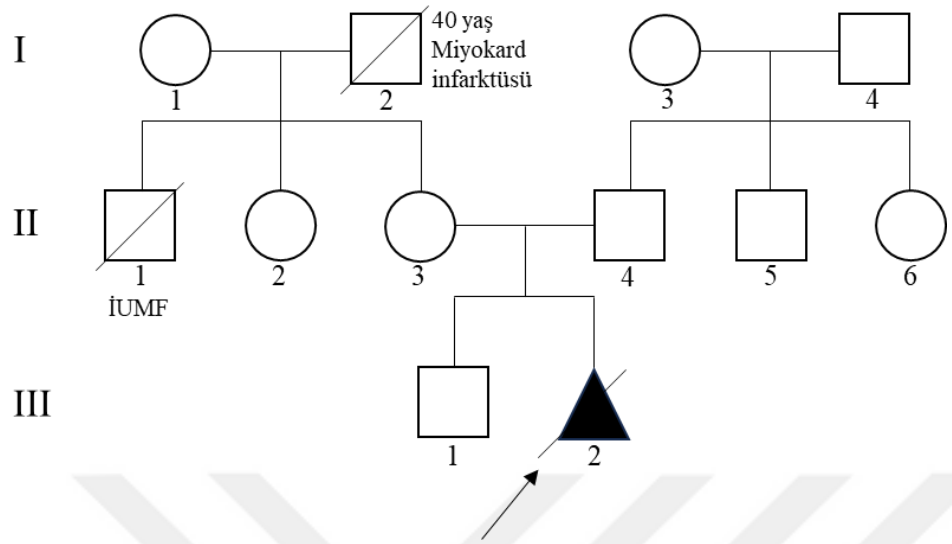
Anne, baba ve kontrolde *TFAP2A* geni ekzon 6 bölgesi için normal kopya sayısı, indekste ise duplikasyon ile uyumlu görünüm izlenmektedir.

4.6.4. Olgu 4

4.6.4.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları

Aralarında akrabalık olmayan 34 yaşında astım hastası anne ile 33 yaşında sağlıklı babanın ikinci gebelik ürünü olan fetus değerlendirildi (G2 P1 TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, enfeksiyon / yüksek ateş öyküsü, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi. Gebelikte astım nedenli salbutamol kullanım öyküsü mevcuttu.

22. GH'de yapılan US'de sağ ön kolda tek tübüler kemik, sağ elde tek parmak, sol ön kolda distale doğru incelen tek tübüler kemik izlendi. Sol el izlenmedi.

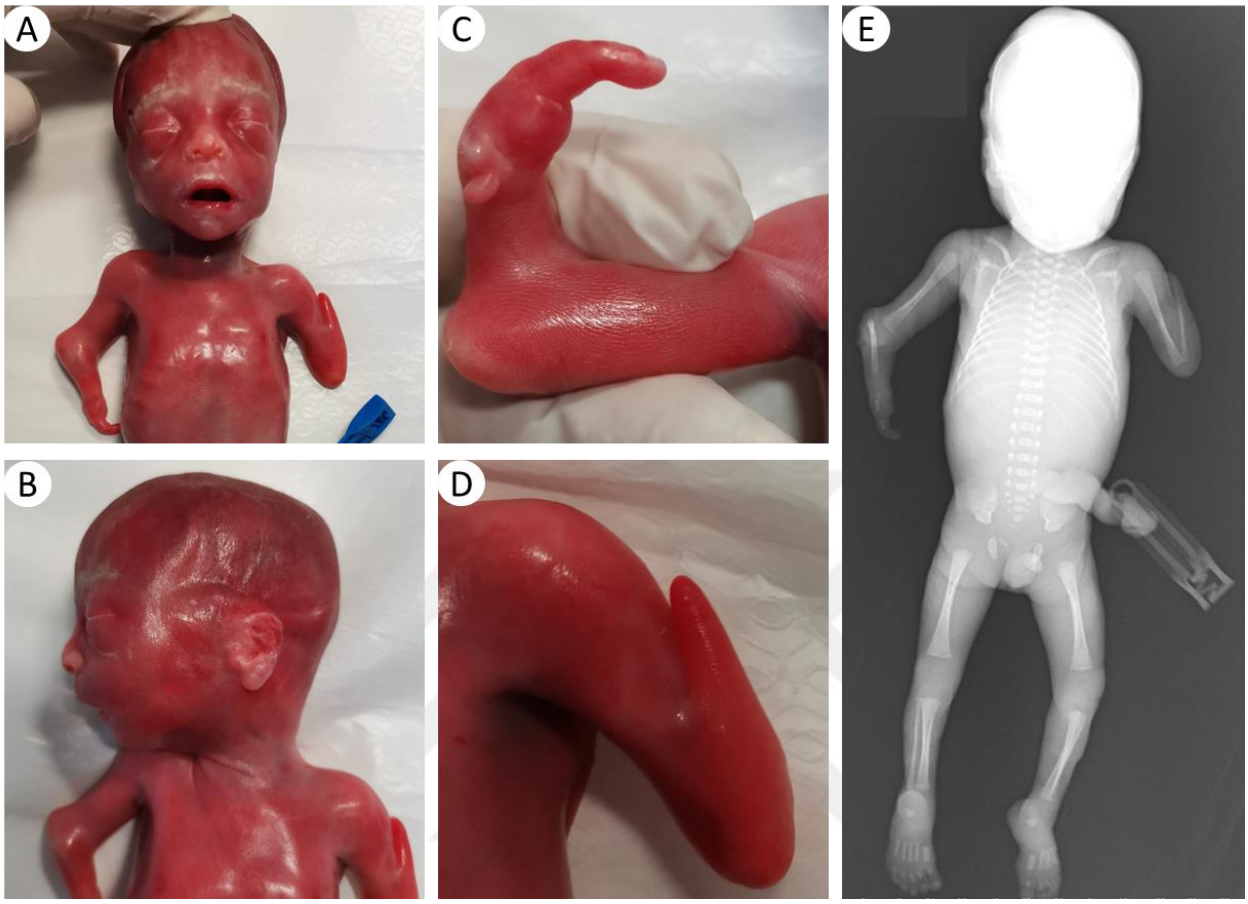


Şekil 23: Olgu 4'e ait aile ağacı

4.6.4.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları

22 haftalık erkek fetusun postmortem değerlendirmesinde tartısı 460 gram (-1.03 SD), boyu 28 cm (10-50p), baş çevresi 18.5 cm (3-10p) ölçüldü. Hafif hipertelorizm ve sınırda düşük kulaklar izlendi. Sağ ön kolda palpasyonla ele gelen hipoplastik ve eğri tek tübüler kemik, sağ önekstansiyon kısıtlılığı, hafif supinasyon kısıtlılığı, hipoplazik sağ el ayası gözlendi. Sağ başparmak izlenmedi, sağ el ayasının ortasından başlayan, tek interfalangeal fleksiyon çizgisi ve tek eklem hareketi olan, tırnak yapısı korunmuş, radyale deviye bir adet parmak yapısı izlendi. Sağ el ulnar tarafta biri daha iyi forme olmak üzere iki adet tomurcuk şeklinde parmak benzeri çıkıntı saptandı. Sol ön kol antekubital pterjiyum nedeniyle yaklaşık 150 derece fleksiyonda izlendi. Sol ön kol güdük şeklinde sonlanmakta, solda el ayası ve parmak yapısı gözlenmedi. Sakral *dimple* izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi.

Grafide sağ ön kolda ulna olduğu düşünülen ve üst 1/3 hizasından posteriora eğrilik gösteren hipoplazik tek kemik yapısı izlendi (radyal aplazi). Sağ elde biri hipoplazik ve proksimalde olmak üzere iki adet metakarp ossifikasyonu ve iyi forme olan metakarpal kemiğin devamında iki adet falanks gözlendi. Sol ön kolda ulna olduğu düşünülen ince ve güdük şeklinde sonlanan tek tübüler kemik izlendi.



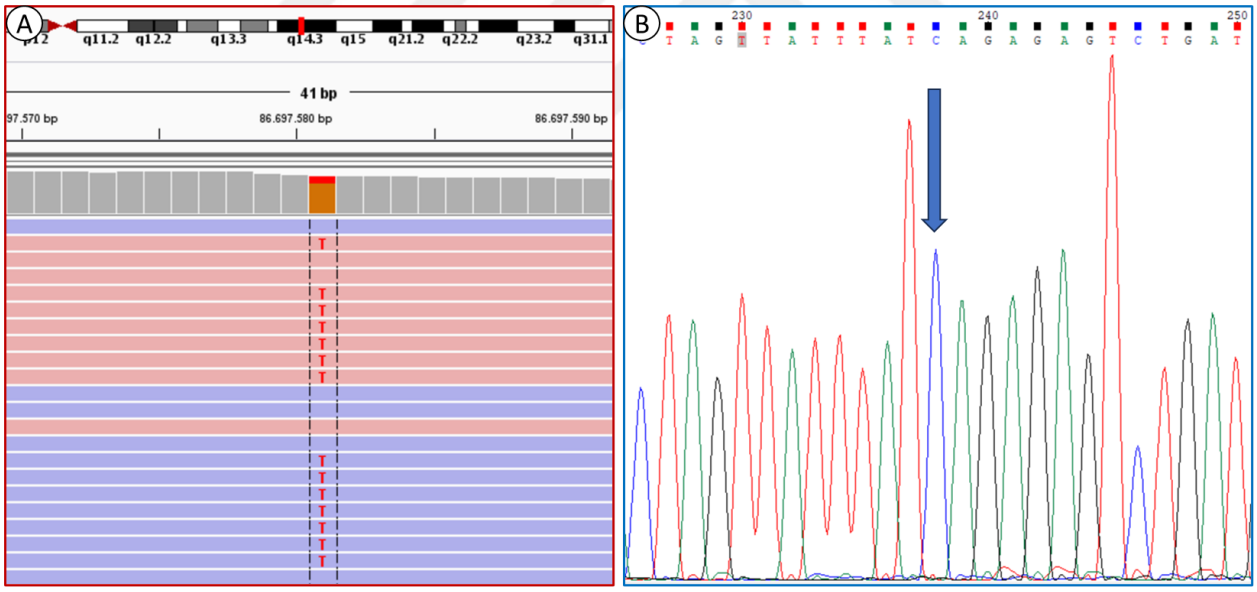
Şekil 24: Olgu 4'e ait fizik muayene ve grafi bulguları

(A, B) Hafif hipertelorizm, sınırda düşük kulaklar, **(C, D)** Sağ ön kolda hipoplastik ve eğri tek tübüler kemik, hipoplazik sağ el ayası, sağ başparmak aplazisi, sağ el ayasının ortasından başlayan, tek interfalangeal fleksiyon çizgisi ve tek eklem hareketi olan, tırnak yapısı korunmuş, radyale deviye bir adet parmak yapısı, sağ el ulnar tarafta biri daha iyi forme olmak üzere iki adet tomurcuk şeklinde parmak benzeri çıkıntı, sol ön kolda antekubital pterjiyum nedeniyle yaklaşık 150 derece fleksiyon, sol ön kol güdük şeklinde sonlanımı, solda el ayası ve parmak yapısı yokluğu, **(E)** Sağ ön kolda ulna olduğu düşünülen ve üst 1/3 hizasından posteriora eğrilik gösteren hipoplazik tek kemik yapısı, sağ elde biri hipoplazik ve proksimalde olmak üzere iki adet metakarp ossifikasyonu ve iyi forme olan metakarpal kemiğin devamında iki adet falanks, sol ön kolda ulna olduğu düşünülen ince ve güdük şeklinde sonlanan tek tübüler kemik.

4.6.4.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular

Amniyosentez materyalinden uzun süreli hücre kültürü ile elde edilen metafaz kromozomlarının analizi ve fetal deriden izole edilen DNA örneğinden çalışılan array-CGH analizi normal sonuçlandı.

Trio TED analizinde ve CNV analizlerinde hastalıkla ilişkisi bilinen genlerde, endikasyon ve kalıtım modeli ile uyumlu hastalık yapıcı bir varyant (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmadı. Ek olarak trio TED analizinde aday gen yaklaşımı ile olguda *de novo* oluşan dizi varyantları (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) değerlendirildi. İndekste *CCNH* geni (5q14.3, *cyclin H*, NM_001239.4, NP_001230.1) ekzon 6'da heterozigot (varyant fraksiyonu %21) c.698C>A / (p.(Ser233*) değişimi saptandı. Ebeveynlerde ise TED analizinde bu değişim saptanmadı. Konfirmasyon amaçlı yapılan Sanger dizilemede bu değişim indekste saptanmadı.



Şekil 25: Olgu 4'e ait moleküler analiz sonuçları

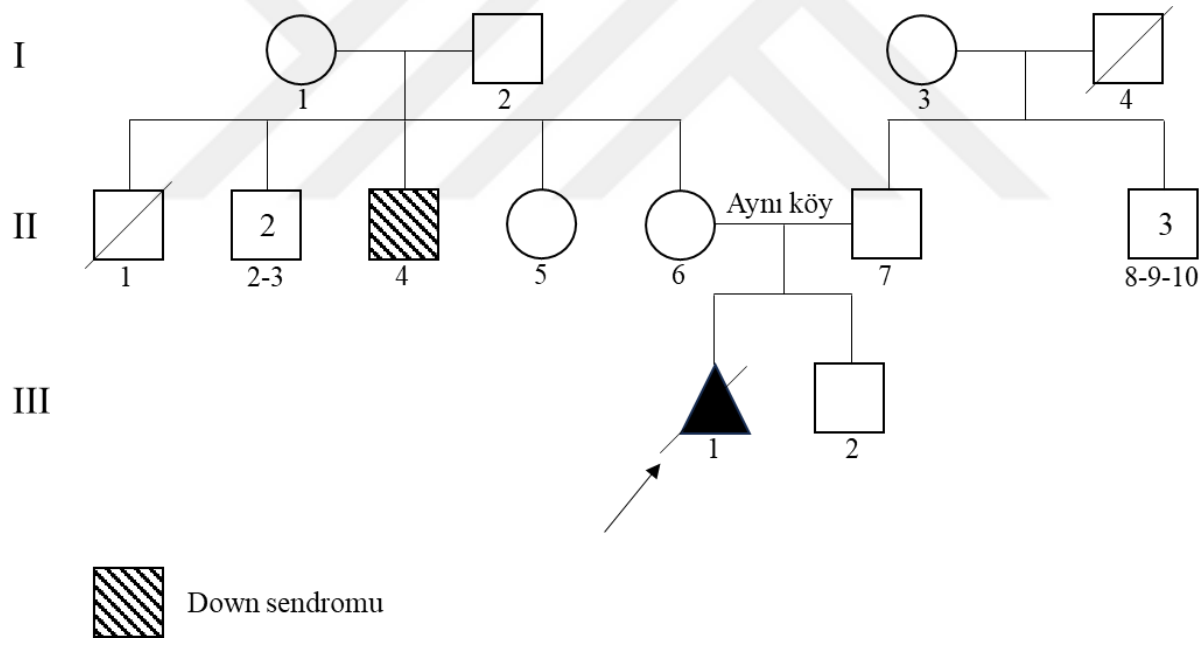
(A) İndekste TED analizinde *CCNH* geninde saptanan heterozigot c.698C>A değişiminin IGV görüntüsü. **(B)** İndekste Sanger dizilemede *CCNH* geni c.698 bölgesinde değişim izlenmemektedir.

4.6.5. Olgu 5

4.6.5.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları

Aralarında akrabalık olmayan aynı köylü 31 yaşında sağlıklı anne ile 35 yaşında sağlıklı babanın ilk gebelik ürünü olan fetus değerlendirildi (G2 P1 TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon / yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.

26. GH'de yapılan US'de simetrik İUBK (fetal ölçüler 23+5 hafta ile uyumlu), polihidramniyos, bilateral pelvik böbrek, bilateral adrenal *lying down* bulgusu, her iki ön kolda tek tübüler kemik, bilateral başparmak aplazisi ve ellerde radyal deviasyon izlendi.



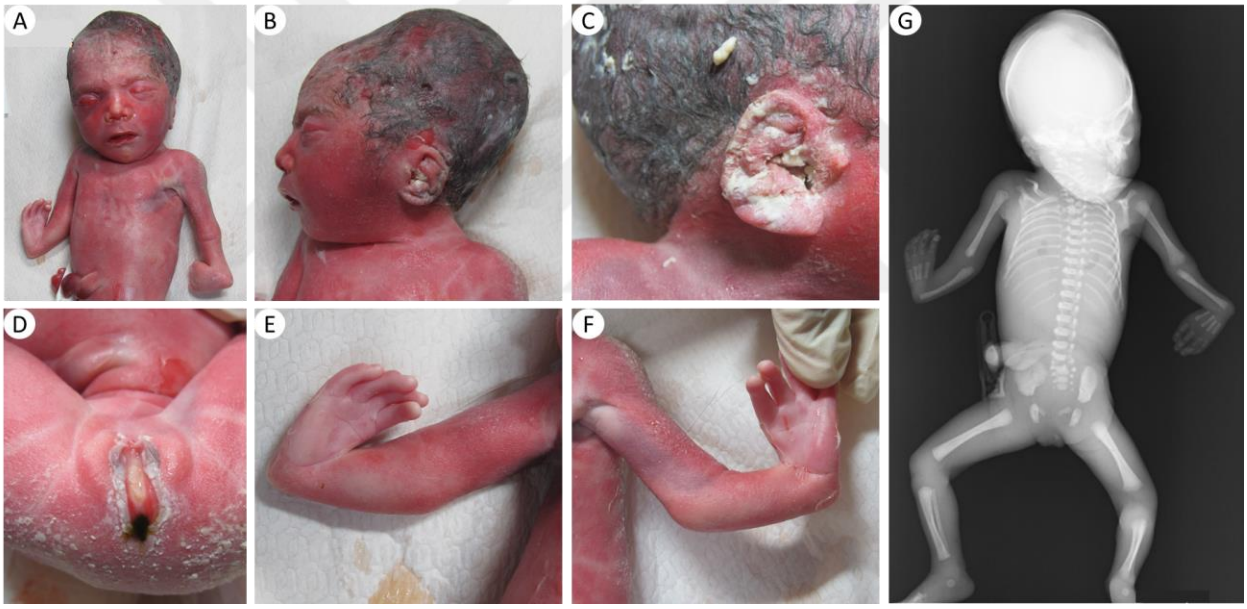
Şekil 26: Olgu 5'e ait aile ağacı

4.6.5.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları

30 haftalık dişi fetusun postmortem değerlendirmesinde tartısı 1200 gram (-0.59 SD), boyu 38 cm (-0.45 SD), baş çevresi 27 cm (-0.29 SD) ölçüldü. Dolikosefali, hafif hipertelorizm, belirgin burun kökü, düşük kulaklar, sağda preauriküler *skin tag* (tragus ile birleşik), antevert sağ

kulak lobülü izlendi. Bilateral dirseklerde ekstansiyon kısıtlılığı, bilateral ön kollarda kısalık, ellerde radyal deviasyon ve bilateral başparmak aplazisi saptandı. Bilateral el içi çizgiler ve parmak fleksiyon çizgileri silik, parmak ekstansiyonu kısıtlı izlendi. Anüs anterior yerleşimli gözlendi.

Grafide bilateral radyal aplazi, bilateral ulnalarda kısalık [38 mm <3p], bilateral başparmak aplazisi, ellerde dört adet metakarp ve bu metakarplara ait falanks yapıları saptandı. Servikal bölge ve torakal 1-4 vertebra korpuslarında segmentasyon anomalileri, sağda ilk dört kostada düzensizlik (füzyon?) izlendi.



Şekil 27: Olgu 5'e ait fizik muayene ve grafi bulguları

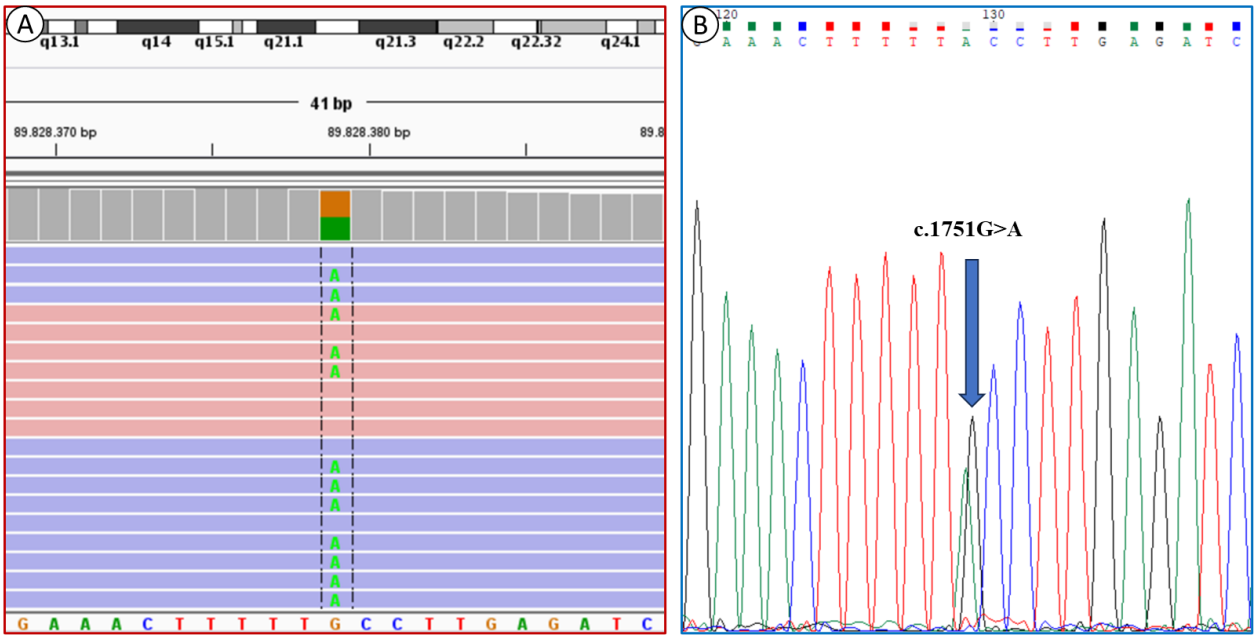
(A, B) Dolikosefali, hafif hipertelorizm, belirgin burun kökü, düşük kulaklar, bilateral ön kollarda kısalık, **(C)** Sağda preauriküler *skin tag* (tragus ile birleşik), antevert sağ kulak lobülü, **(D)** Anterior yerleşinli anüs, **(E, F)** Ellerde radyal deviasyon, bilateral başparmak aplazisi, el içi çizgiler ve parmak fleksiyon çizgileri silik, **(G)** Bilateral radyal aplazi, bilateral ulnalarda kısalık, bilateral başparmak aplazisi, ellerde dört adet metakarp ve bu metakarplara ait falankslar, servikal bölge ve torakal 1-4 vertebra korpuslarında segmentasyon anomalileri, sağda ilk dört kostada düzensizlik (füzyon?).

4.6.5.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular

CVS materyalinden direkt preparasyon ve uzun süreli hücre kültürü ile elde edilen metafaz kromozomlarının analizi normal sonuçlandı.

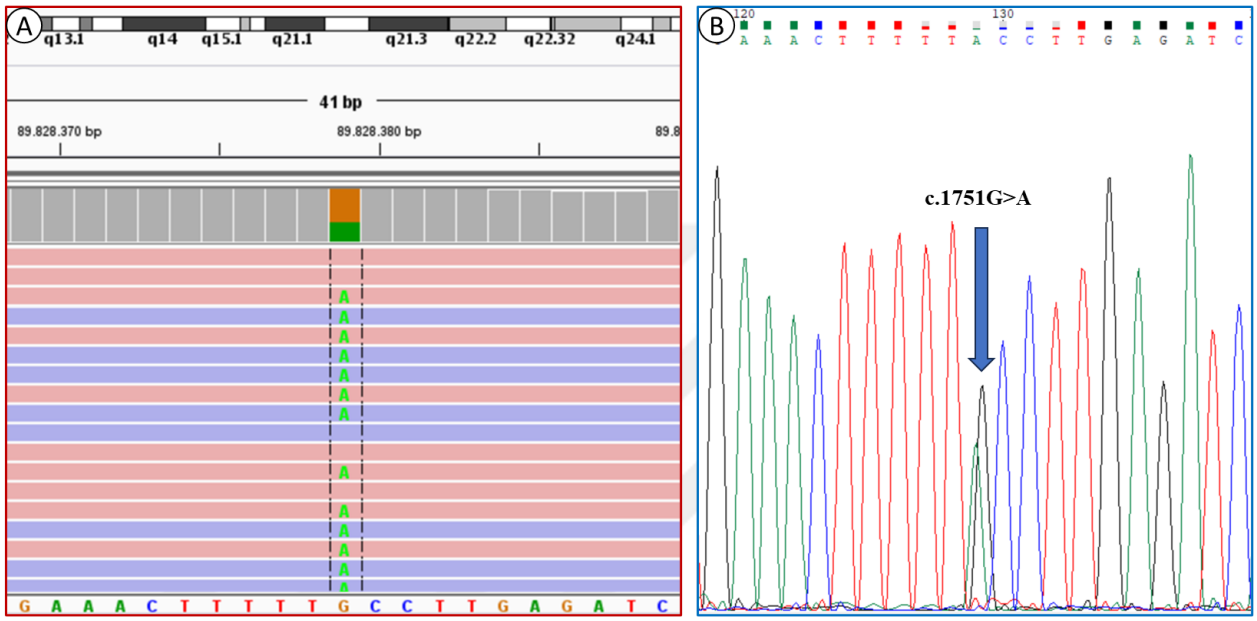
Trio TED analizinde *FANCI* geni (15q26.1, *FA complementation group I*, NM_001113378.2, NP_001106849.1) ekzon 18'de indekste ve babada heterozigot c.1751G>A/ p.(Cys584Tyr) (rs759583609) değişimi, intron 22'de indekste heterozigot (varyant fraksiyonu %26) c.2292-19T>C değişimi saptandı. Konfirmasyon amaçlı yapılan Sanger dizilemede c.1751G>A değişimi indeks ve babada saptandı. Annede bu değişim TED ve Sanger dizilemede saptanmadı. c.2292-19T>C değişimi ise indekste Sanger dizilemede doğrulanamadı.

Trio TED analizinde ve CNV analizlerinde hastalıkla ilişkisi bilinen genlerde, endikasyon ve kalıtım modeli ile uyumlu hastalık yapıcı bir varyant (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmadı. Ek olarak trio TED analizinde aday gen yaklaşımı ile olguda *de novo* oluşan dizi varyantlarının (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) değerlendirilmesinde indeksteki klinik bulguları açıklayabilecek aday gen / varyant saptanmadı.



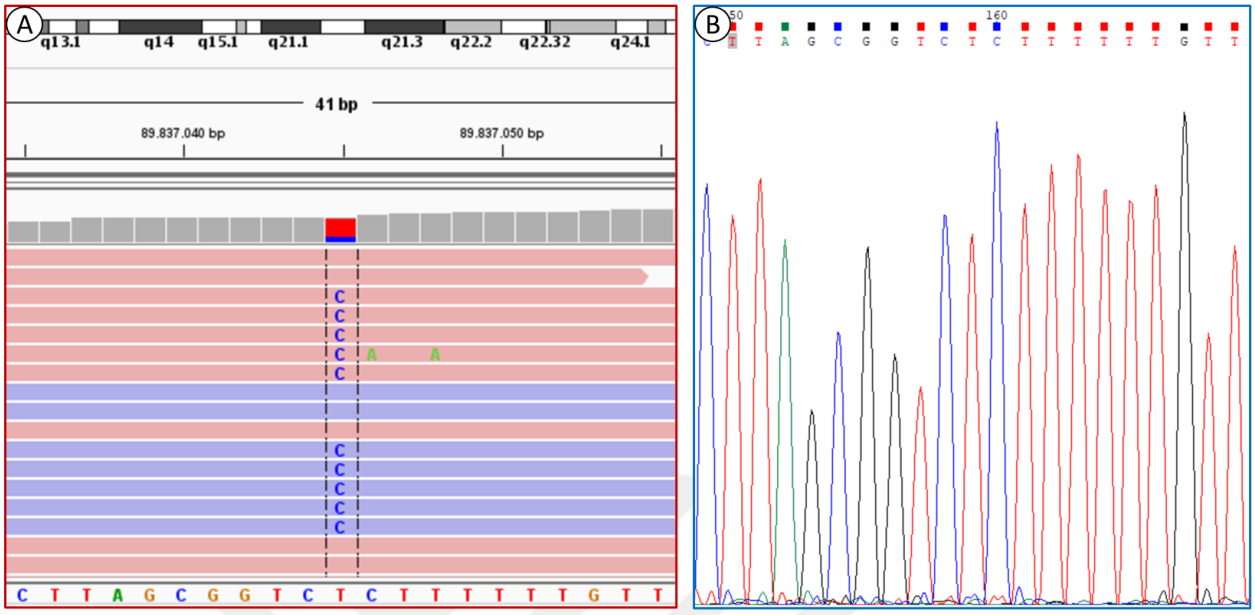
Şekil 28: Olgu 5'e ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndekste TED analizinde *FANCI* geninde saptanan heterozigot c.1751G>A değişiminin IGV görüntüsü. **(B)** İndekste Sanger dizilemede *FANCI* geninde heterozigot c.1751G>A değişimi izlenmektedir.



Şekil 29: Olgu 5'in babasına ait moleküler analiz sonuçları

(A) Babada TED analizinde *FANCI* geninde saptanan heterozigot c.1751G>A değişiminin IGV görüntüsü. **(B)** Babada Sanger dizilemede *FANCI* geninde heterozigot c.1751G>A değişimi izlenmektedir.



Şekil 30: Olgu 5'e ait moleküler analiz sonuçları

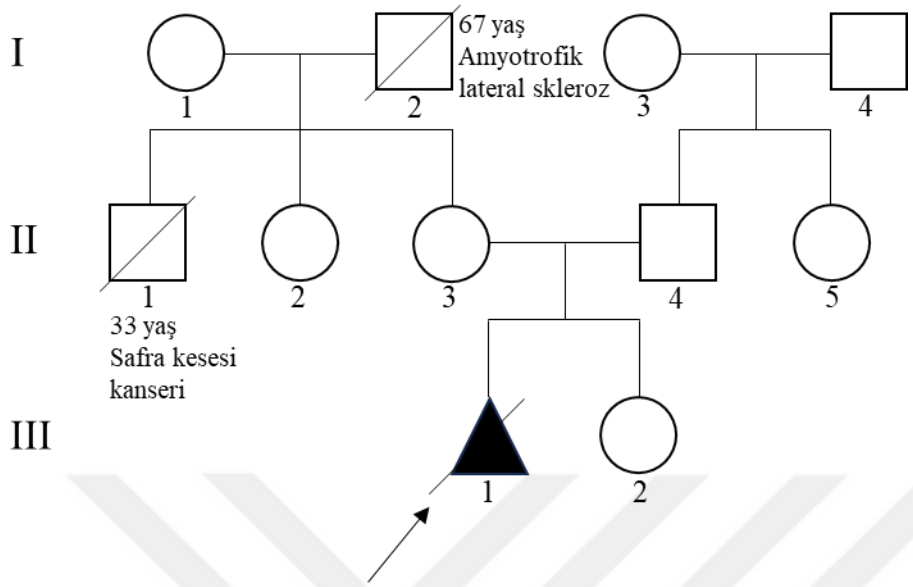
(A) İndekste TED analizinde *FANCI* geninde saptanan heterozigot c.2292-19T>C değişiminin IGV görüntüsü. **(B)** İndekste Sanger dizilemede *FANCI* geni c.2292-19 bölgesinde değişim izlenmemektedir.

4.6.6. Olgu 6

4.6.6.1. Aile Öyküsü ve Prenatal US Bulguları

Aralarında akrabalık olmayan 29 yaşında sağlıklı anne ile 29 yaşında sağlıklı babanın ilk gebelik ürünü olan fetus değerlendirildi (G2 P1 TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon / yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.

13. GH'de yapılan US'de sağ ön kolda tek tübüler kemik, sağ elde radyal deviasyon, sağ başparmak aplazisi, musküler VSD izlendi.

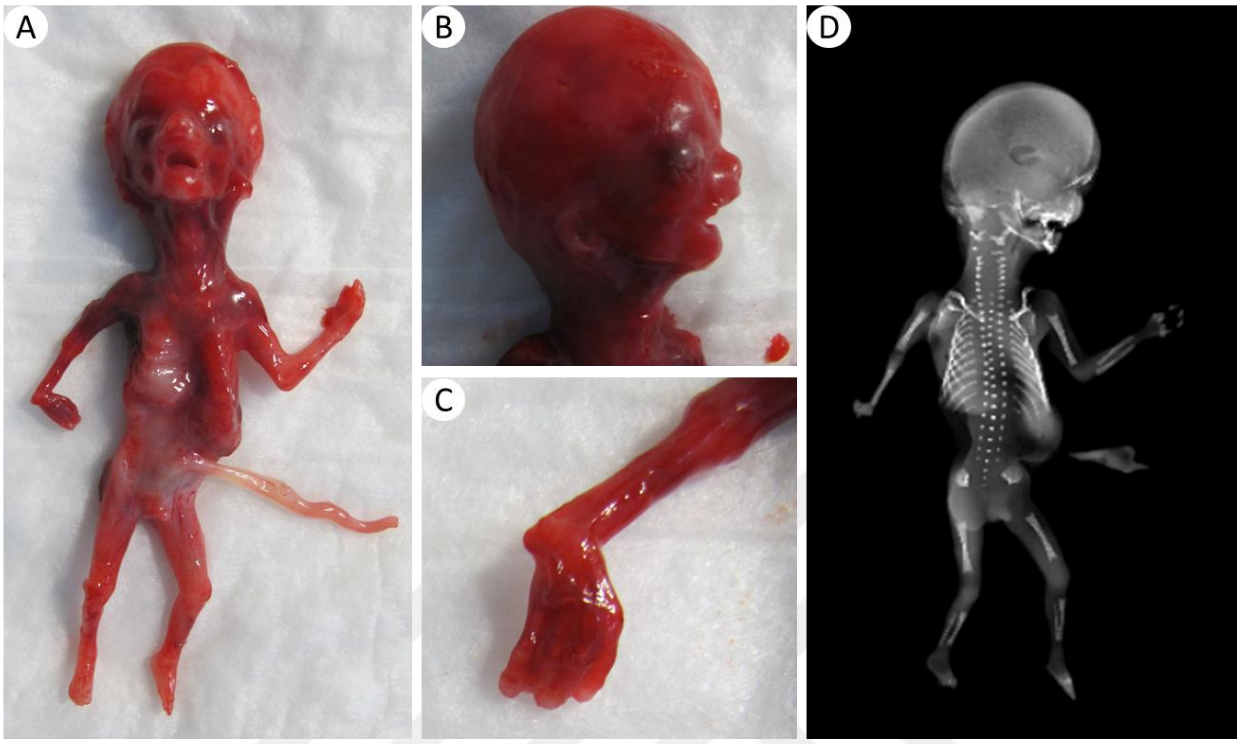


Şekil 31: Olgu 6'ya ait aile ağacı

4.6.6.2. Postmortem Değerlendirme Bulguları

13 haftalık erkek fetusun postmortem değerlendirmesinde tartısı 40 gram, boyu 12.5 cm, baş çevresi 8 cm, kulaç uzunluğu 10 cm ölçüldü. Retrognati izlendi. Sağ toraks yarımı sola göre hipoplazik gözlendi. Sol orta aksiller hatta kosta arkı alt hizasında posttravmatik olduğu düşünülen minimal laserasyon izlendi. Sağ kol ve ön kol hipoplazisi, sağ elde radyal deviasyon, sağ başparmak aplazisi saptandı. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi.

Grafide açıklığı sağa bakan torakolomber skolyoz izlendi. Sağ radius aplazisi saptandı. Sağ ele ait dört adet, sol ele ait beş adet metakarpal kemik yapısı gözlendi. Falankslar fetal hafta nedeniyle net değerlendirilemedi.



Şekil 32: Olgu 6'ya ait fizik muayene ve grafi bulguları

(A) Sağ toraks yarımı sola göre hipoplazik**,** sağ kol ve ön kol hipoplazisi, **(B)** Retrognati, **(C)** Sağ elde radyal deviasyon, sağ başparmak aplazisi, **(D)** Açıklığı sağa bakan torakolomber skolyoz, sağ radius aplazisi, sağ ele ait dört adet, sol ele ait beş adet metakarpal kemik yapısı.

4.6.6.3. Sitogenetik (Retrospektif) ve Moleküler Bulgular

CVS materyalinden uzun süreli hücre kültürü ile elde edilen metafaz kromozomlarının analizi ve array-CGH analizi normal sonuçlandı.

Trio TED analizinde ve CNV analizlerinde hastalıkla ilişkisi bilinen genlerde, endikasyon ve kalıtım modeli ile uyumlu olası bir varyant (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmadı. Ek olarak trio TED analizinde aday gen yaklaşımı ile olguda *de novo* oluşan dizi varyantlarının (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) değerlendirilmesinde indeksteki klinik bulguları açıklayabilecek aday gen / varyant saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Radyal ışın defektleri, radiusun, radyal karpal kemiklerin veya başparmağın aplazisi veya hipoplazisi ile karakterizedir ve üst ekstremitenin en sık konjenital anomalileridir. Prenatal ultrasonda ön kolda tek tübüler kemik izlenmesi ve elde radyal deviasyon ile karakterizedir. Etiyolojide kromozom anomalileri, tek gen hastalıkları, teratojen maruziyetleri yer almaktadır. Radyal ışın defektlerinde en sık saptanan kromozom anomalisi trizomi 18'dir. Teratojenlerden talidomid ve valproik asit maruziyeti radyal ışın defektleri ile ilişkilendirilmiştir. Tek gen hastalıklarından Holt-Oram sendromu, Fanconi anemisi ve TAR sendromu etiyolojide sık olarak saptanmaktadır. Radyal ışın defekti ile ilişkili diğer tek gen hastalıkları arasında ise Cornelia de Lange sendromu, Roberts sendromu, Nager sendromu, Duane-radyal ışın sendromu, Townes-Brocks sendromu, RAPADILINO sendromu, Baller-Gerold sendromu, Rothmund-Thomson sendromu, Diamond-Blackfan anemisi, IVIC sendromu, Mandibulofasyal dizostoz, Guion-Almeida tipi başta olmak üzere birçok sendrom yer almaktadır. Radyal ışın defekti ile ilişkili ancak moleküler etiyolojisi aydınlatılamamış sendromlar / asosiasyonlar arasında en sık olanı ise VACTERL asosiasyonudur.

Radyal ışın defektleri olguların 1/3'ünde izole, olguların 2/3'ünde ise sendromik veya ek anomaliler ile birlikte izlenmektedir (3). Ek anomaliler arasında sıklıkla kardiyak anomaliler, kas-iskelet anomalileri, spinal anomaliler, hematolojik anomaliler, gastrointestinal ve genitoüriner anomaliler yer almaktadır. Radyal ışın defekti olgularında infantil dönemde ölüm oranının %35 kadar yüksek olabileceği bildirilmiştir (2). Radyal ışın defekti bilateral olan olgularda altta yatan genetik etiyoloji olasılığı daha yüksektir.

Üst ekstremite oluşumu fertilizasyon sonrası 24. günde lateral plak mezoderminin 9 ve 12. somitler arasında göç etmesi ile başlar ve 26. günde ekstremite tomurcuğunun oluşumu ile devam eder. Üst ekstremite embriyolojisinde görevleri iyi bilinen moleküler etkenler arasında *HOX, WNT* ve *FGF* gen aileleri, *TBX5, SHH* ve *GLI3* genleri yer almaktadır (5). Üst ekstremitenin büyümesi üç eksende izlenir. Proksimalden distale büyümenin (uzunlamasına büyüme) sinyal merkezi AER'dir (*apical ectodermal ridge*) ve AER proksimodistal büyümeyi FGF sinyali ile düzenler. Anteroposterior eksenin (radyoulnar farklılaşma) sinyal merkezi ZPA'dır (*zone of polarizing activity*) ve ZPA anteroposterior farklılaşmayı SHH sinyali ile düzenler. Dorsoventral eksenin (eldeki dorsal-palmar bölgeler) sinyal merkezi dorsal ektodermdir ve dorsal ektoderm dorsoventral farklılaşmayı WNT7A sinyali ile düzenler.

Radyal ışın defektlerinde etiyolojinin kompleks olması, klinik bulguların aileler arası ve aile içi değişkenlik göstermesi, radyal ışın defekti ile seyreden ancak henüz moleküler etiyolojisi aydınlatılamamış sendromlar / asosiasyonların varlığı moleküler tanı sürecini zorlaştırmaktadır. Günümüzde TED analizlerinin yaygın olarak kullanımı radyal ışın defektlerindeki moleküler etiyolojinin aydınlatılmasında katkı sağlamaktadır. Çalışmamızda prenatal izlemleri ve postmortem değerlendirmeleri merkezimizde yapılarak radyal ışın defekti saptanan altı fetusa ve sağlıklı ebeveynlerine, genetik etiyopatogenezin aydınlatılması amacıyla trio TED analizleri gerçekleştirildi. Ek olarak kopya sayısı değişimleri analizleri yapıldı. Üç olguda fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde beş varyant (ikisi dizi varyantı, üçü kopya sayısı varyantı) tespit edildi. İki olguda *RBM8A* geninde bileşik heterozigot formda dizi varyantı ve kopya sayısı değişimi varyantı, bir olguda *TFAP2A* geninde heterozigot formda kopya sayısı değişimi varyantı saptandı. İki olguda *RBM8A* genindeki varyantlar için ebeveynlerde taşıyıcılık saptanırken, *TFAP2A* genindeki varyantı *de novo* oluştuğu gözlendi. *RBM8A* geninde saptanan varyantlar daha önce literatürde hastalıkla ilişkilendirilmiş ve ACMG kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırılmıştır. *TFAP2A* geninde saptanan varyant ise daha önce literatürde bildirilmemiştir. *Novel* nitelikteki bu varyant ACMG kriterlerine göre klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılmıştır. Üç olguda ise klinik bulguları açıklayabilecek varyant saptanmadı. Bu üç olgudan birinde *FANCI* geninde heterozigot klinik önemi belirsiz bir varyant indeks ve babada saptandı. Ancak bu gende ikinci bir değişim saptanmadığı için Fanconi anemisi taşıyıcılığı ile uyumlu bulundu.

Antenatal US'de bilateral radius aplazisi, bilateral humeruslarda kısalık, sol humerusta eğrilik ve bilateral ayak sırtı ödemi saptanarak termine edilen, postmortem değerlendirmede ek olarak fasyal dismorfik bulgular, sağ humerus proksimal hipoplazisi, bilateral ulnalarda kısalık, sağ ulnada eğrilik, bilateral başparmak hipoplazisi, bilateral el PIF eklemlerinde kamptodaktili, sol ayakta PEV saptanan **olgu 1**'de ayırıcı tanıda fasyal dismorfik bulguları nedeniyle Roberts sendromu, array-CGH analizinde 1q21.1 bölgesinde *RBM8A* genini içeren heterozigot delesyon nedeniyle TAR sendromu düşünüldü. Olgu ve ebeveynlerine yapılan trio TED analizlerinde *RBM8A* geninde c.-21G>A değişimi (rs139428292) olgu ve annede, CNV analizlerinde 1q21.1 delesyonu olgu ve babada saptandı. TED analizinde saptanan dizi değişimi olgu ve annede Sanger dizileme ile doğrulandı. CNV analizlerinde saptanan delesyon ise olguda array-CGH analizi ile gösterilmişti.

Antenatal US'de bilateral radius aplazisi, sağ elde üst üste binmiş parmaklar, bilateral başparmaklarda addüksiyon pozisyonu, kardiyak ekstrasistoller saptanarak termine edilen, postmortem değerlendirmede ek olarak fasyal dismorfik bulgular, bilateral ulnalarda kısalık, geniş sol el başparmağı, bilateral hafif kısa ve proksimal yerleşimli birinci metakarp, bilateral *clenched hand* görünümü, sol ayakta metatarsus adduktus saptanan **olgu 2**'de ayırıcı tanıda kardiyak aritmi nedeniyle Holt-Oram sendromu, fasyal dismorfik bulgular nedeniyle Roberts sendromu, array-CGH analizinde 1q21.1 bölgesinde *RBM8A* genini içeren heterozigot delesyon nedeniyle TAR sendromu düşünüldü. Olgu ve ebeveynlerine yapılan trio TED analizlerinde *RBM8A* geninde c.67+32G>C değişimi (rs201779890) olgu ve babada, CNV analizlerinde 1q21.1 delesyonu olgu ve annede saptandı. TED analizinde saptanan dizi değişimi olgu ve babada Sanger dizileme ile doğrulandı. CNV analizlerinde saptanan delesyon ise olgu ve annede array-CGH analizi ile gösterilmişti.

Bir allelde *RBM8A* genini içeren *null* mutasyon ve diğer allelde *RBM8A* genindeki hipomorfik varyantın bileşik heterozigotluğu literatürde TAR sendromu (#MIM 274000) ile ilişkilendirilmiştir. Olgu 1 ve Olgu 2'de *RBM8A* genini içeren 1q21.1 delesyonu ile *RBM8A* genindeki hipomorfik varyantın trans konumda bulunması ve uyumlu klinik bulgular ile olgular TAR sendromu tanısı aldı.

TAR sendromu bilateral radius aplazisi / hipoplazisi ve genellikle geçici olan trombositopeni ile karakterizedir. Diğer radyal ışın defekti ile seyreden sendromlardan farklı olarak TAR sendromlu olgularda her zaman başparmak mevcuttur. Ancak çeşitli başparmak anomalileri (geniş ve düz başparmaklar, addükte başparmaklar) izlenebilir. Diğer üst ekstremite anomalileri arasında humerus, ulna ve omuz kuşağı hipoplazisi / aplazisi yer almaktadır. Diz ve kalça anomalileri gibi alt ekstremite anomalileri gözlenebilir. İnek sütü alerjisi, kardiyak ve genitoüriner anomaliler izlenebilir. TAR sendromu tanılı olguların %7'sinde bilişsel yetersizlik bildirilmiş, bunun trombositopeni nedeniyle oluşan intrakraniyal hemorajinin sekeli olduğu düşünülmüştür (217). TAR sendromu radyal ışın defektlerinin etiyolojisinde sık saptanan bir tek gen hastalığıdır ve prevalansı 100.000 canlı doğumda 1 ile 200.000 canlı doğumda 1 arasında bildirilmiştir (64). TAR sendromunun genetik etiyolojisinin aydınlatılmaya başlandığı 2007 yılından 2022 yılına kadar, *RBM8A* geninde TAR sendromu ilişkili varyant saptanan 150'den fazla olgu bildirilmiştir (64).

TAR sendromu uzun zamandır otozomal resesif bir sendrom olarak kabul edilmiştir. Ancak akraba evliliklerinde hastalık sıklığının artmaması ve vertikal geçişin izlenmesi gibi bazı özelliklerinin otozomal resesif kalıtım ile tutarsız olduğu düşünülmüştür. Klopocki ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan çalışmada TAR sendromundan etkilenmiş 30 olgunun tümünde ve etkilenmemiş aile üyelerinin %32'sinde array-CGH analizinde 1q21.1 bölgesinde minimal delesyon bölgesi 200 kb olan delesyonlar saptanmıştır (78). Bu sonuç ile 1q21.1 delesyonun TAR sendromu fenotipine neden olmak için gerekli olduğu, ancak etkilenmemiş aile bireylerinde de delesyon saptandığı için fenotipi açıklamada yeterli olmadığı düşünülmüştür. Albers ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada TAR sendromundan etkilenmiş 55 olgunun 51'inde 1q21.1 bölgesinde minimal delesyon bölgesi 200 kb olan delesyonlar, ikisinde *null* mutasyonlar (biri çerçeve kayması biri trunke edici olmak üzere) saptanmıştır (79). Bu 53 olguda da *null* allele eşlik eden ve *RBM8A* geninin regülatör bölgelerinde yer alan iki tek nükleotid polimorfizminden (SNP, *single nucleotide polymorphism*) biri saptanmış ve böylelikle TAR sendromundaki otozomal resesif kalıtım açıklanmıştır (79). Bu iki SNP'den biri 5'UTR bölgesinde yer alan c.-21G>A değişimi (rs139428292), diğeri ise intron 1'de yer alan c.67+32G>C değişimidir (rs201779890) (79). Literatürde TAR sendromlu olgularda en sık saptanan bu değişimlerden c.-21G>A değişimi Olgu 1'de, c.67+32G>C değişimi ise Olgu 2'de saptanmıştır. Albers ve arkadaşları tarafından bildirilen bu iki değişime ek olarak 2019 yılında Brodie ve arkadaşları tarafından iki kardeşte g.145919695T>C (rs61746197) değişimi ile 2020 yılında Boussion ve arkadaşları tarafından 11 olguda c.Ter6C>G (rs12079762) değişimi ve bir olguda c.-19G>T değişimi bildirilmiştir (80, 218). *RBM8A* geninde saptanan *null* alleller Tablo 25'de ve hipomorfik alleller Tablo 26'da, bu allellerin gen üzerindeki lokasyonları Şekil 33'de belirtilmiştir (64, 219).

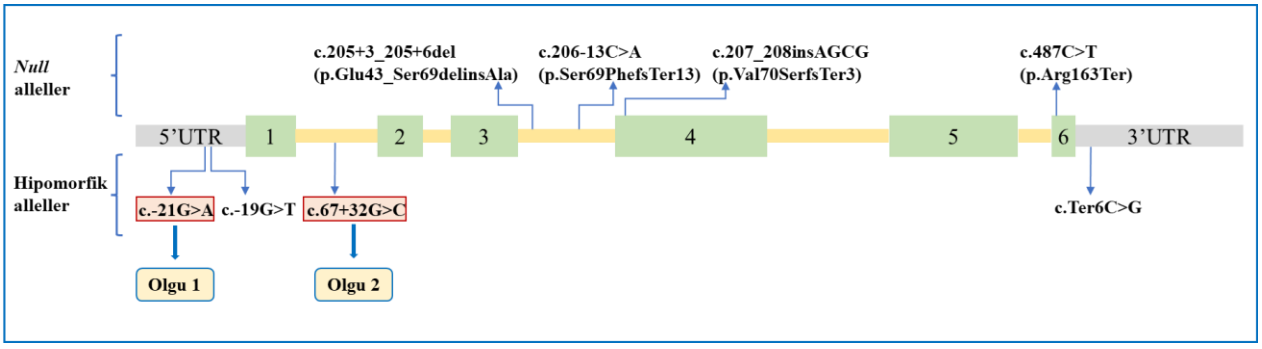
Tablo 25: *RBM8A* geninde literatürde bildirilen hipomorfik alleller ve popülasyon frekansları

Transkript	Nükleotid	Peptid	dbSNP	Allel tipi / Hipomorfik allel frekansı
	c.-21G>A	-	rs139428292	Hipomorfik allel, genel popülasyon frekansı %3.05 (79)

NM_005105.5	c.Ter6C>G	-	rs12079762	Hipomorfik allel, Afrika popülasyonu frekansı %14.8 (80)
	c.67+32G>C	-	rs201779890	Hipomorfik allel, genel popülasyon frekansı %0.41 (79)
	c.-19G>T	-	-	Hipomorfik allel (80)
NC_000001.11	g.145919695T>C	-	rs61746197	Hipomorfik allel, genel popülasyon frekansı %0.5 (218)

Tablo 26: *RBM8A* geninde literatürde bildirilen *null* alleller

Transkript	Nükleotid	Peptid	dbSNP	Allel tipi
NM_005105.5 NP_005096.1	c.207_208insAGCG	p.Val70SerfsTer3	-	*Null* allel (79)
	c.487C>T	p.Arg163Ter	-	
	c.206-13C>A	p.Ser69PhefsTer13	-	*Null* allel (80)
	c.205+3_205+6delGAGT	p.Glu43_Ser69delinsAla	-	

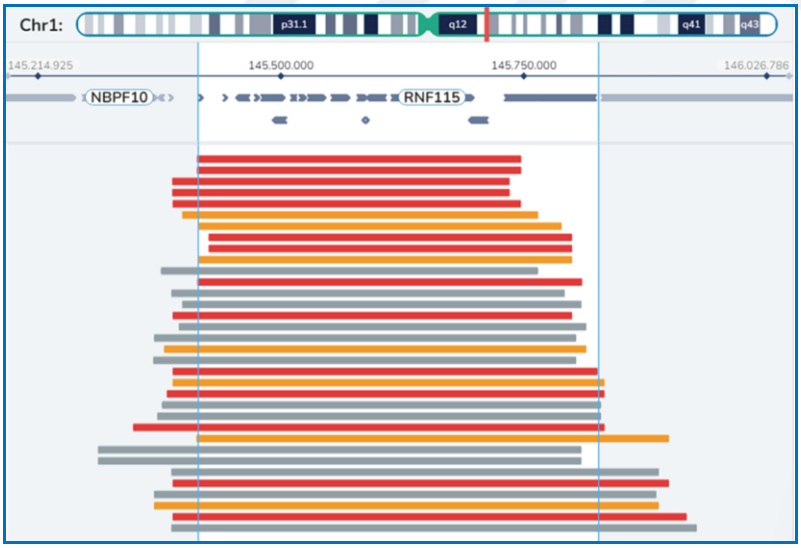


Şekil 33: *RBM8A* geninde bildirilen *null* ve hipomorfik alleller

ClinVar veri tabanında *RBM8A* geninde patojenik olan bildirilen varyantlar gösterilmektedir.

Monteiro ve arkadaşları, 2022 çalışmasından uyarlanmıştır (219).

Klopocki ve arkadaşları tarafından TAR sendromlu 30 olguda 1q21.1 bölgesinde minimal delesyon bölgesi 200 kb olan ve 12 gen [*HJV (HFE2), TXNIP, POLR3GL, ANKRD34, LIX1L, RBM8A, GNRHR2, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17*] içeren delesyonlar saptanmıştır (78). Ancak bu 30 olgunun 28'inde delesyon boyutunun yaklaşık 500 kb olduğu ve ek olarak beş gen [*POLR3C, RNF115 (ZNF364), CD160, PDZK1, GPR89*] daha içerdiği belirlenmiştir (78). Albers ve arkadaşları tarafından TAR sendromlu 51 olguda 1q21.1 bölgesinde minimal delesyon bölgesi 200 kb olan, farklı boyutlarda delesyonlar saptanmış ve bu minimal delesyon bölgesinin genomik koordinatları 145,399,075-145,594,214 nükleotidleri arasında olduğu belirtilmiştir (79). Olgu 1 ve Olgu 2'de CNV analizlerinde 1q21.1 bölgesindeki delesyon boyutu sırasıyla 402 ile 412 kb olarak belirlenmiş ve literatürde en sık bildirilmiş olan 500 kb'lık delesyon bölgesiyle aynı genleri içerdiği gözlenmiştir. Literatürde benzer bölgede delesyon saptanan olgular Şekil 34'de gösterilmiştir.



Şekil 34: Olgu 1 ve 2'deki delesyon bölgesi ve literatürde benzer bölgede delesyon saptanan olgular

Franklin veri tabanından alınan görüntüde iki dikey çizginin arasındaki bölge Olgu 1 ve 2'deki delesyon bölgesini göstermektedir. Kırmızı ile gösterilen delesyonlar patojenik, turuncu ile gösterilen delesyonlar olası patojenik, gri ile gösterilen delesyonlar ise klinik önemi belirsiz olarak çeşitli veri tabanlarında bildirilmiştir.

Kaminsky ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 15.749 olgu ve 10.118 kontrolde 14 kopya sayısı değişimi bölgesindeki rekürren delesyon ve duplikasyonlar incelenmiştir (220). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 14 delesyon ve 7 duplikasyonun olgularda anlamlı derecede artmış olduğu saptanmıştır (220). Bu delesyonlardan biri olan TAR bölgesini içeren 1q21.1 delesyonu, olgu grubunda 17 bireyde ve kontrol grubunda bir bireyde tespit edilmiş, olgu grubunda delesyon sıklığı 926'da bir olarak belirlenmiştir (220). *RBM8A* genindeki *null* varyantlar nadirken, hipomorfik varyantların popülasyon frekansları %3 veya %14.8 kadar yüksek olabilir (79). Günümüzde TED analizlerinde yapılan filtrelemelerde, yaygın bulunan SNP'lerin dışlanması için genellikle minör allel frekansı (MAF) %1'in altındaki varyantlar değerlendirilmektedir. Ancak *RBM8A* genindeki hipomorfik allellerin popülasyon frekansları %14.8 kadar yüksek olabileceğinden, standart filtrelemelerde bu varyantlar gözden kaçabilmektedir. Bu nedenle radyal ışın defekti kliniğine sahip olgularda *RBM8A* genindeki SNP'ler açısından bu gen filtresiz olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca TAR sendromu tanısı *null* allel ile hipomorfik allelin bileşik heterozigot olarak bulunması ile koyulabildiğinden, TED analizinde saptanan dizi varyantına eşlik eden delesyonun da saptanabilmesi için CNV'li TED analizi veya TED analizi öncesinde array-CGH analizi gerçekleştirilmelidir.

RBM8A geni 6 ekzondan oluşur. *RBM8A* geninin kodladığı Y14 proteini (diğer bir adıyla RNA bağlayıcı protein 8A), ekzon birleşke kompleksinin [*exon junction complex* (EJC)] dört komponentinden biridir ve RNA matürasyonunda görev alır (80). Bu protein 174 amino asitten oluşur ve RNA tanıma motifi içerir (80). EJC, mRNA kırpılması ve nükleer eksportu ile anlamsız aracılı yıkımın aktivasyonu gibi temel hücresel fonksiyonlarda görev alır (80). Albers ve arkadaşları iki regülatör SNP'nin (c.-21G>A ve c.67+32G>C) *in vitro* olarak *RBM8A* transkripsiyonunda azalmaya yol açtığını ve TAR olgularında trombositlerde Y14 ekspresyonunda azalmaya sebep olduğunu göstermiştir (79). Bu nedenle Y14 haployetersizliğinin ve muhtemelen EJC defektinin TAR sendromuna yol açtığı düşünülmektedir (79). Ayrıca zebra balığındaki ortoloğu *knockdown* edildiğinde ağır malformasyonlar ve ölümle sonuçlandığı, meyve sineği ortoloğu *knockdown* edildiğinde ise ağır malformasyonlar gözlenmesi nedeniyle, Y14 komplet yokluğunun insanlarda yaşamla bağdaşmayacağı düşünülmektedir (79).

TAR sendromlu olgularda bir *null* allel ile hipomorfik allel trans pozisyonda saptanır. Hipomorfik allel 5'UTR, intron 1 veya 3'UTR bölgesinde bulunur. TAR sendromunda genotip-fenotip korelasyonu iki varyant için bildirilmiştir. Olgu 1'de saptanan c.-21G>A hipomorfik alleli

düşük trombosit seviyeleri ve düşük referans değerin altındaki hemoglobin seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (68). Bu düşük hemoglobin seviyelerinin nedeni, trombositopeninin sonucu olarak artmış kanamaya tam olarak bağlanamamıştır. Bu alleli taşıyan TAR sendromlu olgularda transfüzyon gerektiren ağır anemi bildirilmiştir (68). Olgu 2'de saptanan c.67+32G>C intronik hipomorfik alleline sahip olgularda yaşamın ilk aylarında bile daha yüksek trombosit seviyeleri ve ilerleyen dönemde trombosit seviyelerinin referans aralığa ulaştığı bildirilmiştir (64). Ayrıca bu allele sahip olgularda hemoglobin değerleri de normal izlenmiştir (64). Olgularımızda da bu iki varyant saptanmış olmakla birlikte, fetal olgular olmaları nedeniyle hematolojik bulguları hakkında yorum yapılamamıştır.

Antenatal US'de bilateral radius ve ulnalarda kısalık, bilateral başparmak aplazisi, servikal vertebralarda düzensizlikler, skolyoz, sol renal agenezi veya pelvik böbrek şüphesi saptanarak termine edilen, postmortem değerlendirmede ek olarak fasyal dismorfik bulgular, yarık damak, skalp ve ense derisi ödemi, mikrosefali, hemivertebra, radyoulnar sinostoz, metakarpal füzyon, falanks hipoplazisi, psödokamptodaktili, klinobrakidaktili saptanan **olgu 3**'de ayırıcı tanıda akrofasiyal dizostoz spektrumundan Nager sendromu düşünüldü. Trio TED analizinde olgunun kliniği ile ilişkili olabileceği düşünülen dizi varyantı (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmadı. CNV analizlerinde indekste 6p24.3 bölgesinde 10,398,625-10,415,249 nükleotidleri arasında, *TFAP2A*, *TFAP2A-AS2*, *TFAP2A-AS1* genlerini içeren 16.6 kb büyüklüğünde heterozigot duplikasyon saptandı. Ebeveynlerde bu bölge için normal kopya sayısı izlendi. Duplikasyon qPZR ile doğrulandı.

TFAP2A genindeki heterozigot patojenik varyantlar literatürde Brankiyo-okülo-fasyal sendrom (#MIM 113620) ile ilişkilendirilmiştir. İndekste saptanan *TFAP2A* tüm gen duplikasyonu daha önce literatürde bildirilmemiş olup ACMG sınıflandırmasına göre klinik önemi belirsiz niteliktedir.

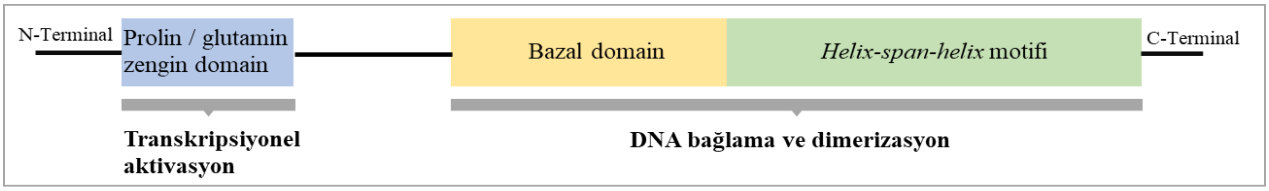
Brankiyo-okülo-fasyal sendrom (BOF sendromu); brankiyal cilt defektleri (belli belirsiz anlaşılabilen ince deri veya saç yamalarından, eritematöz hemanjiyomatöz lezyonlara ve büyük akıntılı erozyonlara kadar değişkenlik gösteren), göz anomalileri (mikroftalmi, anoftalmi, kolobom, katarakt, nazolakrimal kanal darlığı / atrezisi) ve fasyal anomaliler [dolikosefali, hipertelorizm veya telekantus, geniş burun ucu, yukarı çekik palpebral fissürler, yarık dudak veya onarılmış yarık dudak görünümü veren belirgin filtrum katlantıları (psödoyarık dudak), yarık damak, üst dudak çukurcukları, alt yüz güçsüzlüğü (asimetrik ağlayan yüz veya yedinci kraniyal

sinirin parsiyel güçsüzlüğü)] ile karakterizedir (221). Kulak anomalileri (malforme ve belirgin pinna, iç kulak ve petröz kemik anomalileri) ve işitme kaybı sıktır. İmmün sistem anomalileri (timik anomaliler), renal anomaliler (renal agenezi, multikistik böbrekler), ektodermal bulgular (erken saç beyazlaması, diş hipoplazisi, tırnak displazisi, subkutanöz skalp kistleri) izlenebilir. Prenatal ve postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, konjenital kalp anomalileri, iskelet anomalileri (malar hipoplazi, mastoid hipoplazi, kifoz, lordoz, polidaktili, klinodaktili, hipoplazik başparmaklar) bildirilmiştir. Zeka genellikle normaldir (221). BOF sendromu nadir bir sendrom olup prevalansı tam olarak bilinmemekle birlikte, klinik ve / veya moleküler tanılı 150'den az olgu olduğu bilinmektedir (221).

BOF sendromu otozomal dominant kalıtım paterni gösterir. 6p24 lokusunda yer alan *TFAP2A* genindeki heterozigot patojenik varyantlardan kaynaklanır. BOF sendromu tanılı olguların >%95'inde *TFAP2A* geninde dizi analizi ile, <%5'inde ise delesyon / duplikasyon analizleri ile patojenik varyantlar saptanmaktadır (221). Olguların %50-60'ında patojenik varyantlar *de novo* olarak saptanır (221).

TFAP2A geni 1988 yılında Williams ve arkadaşları tarafından klonlanmış ve AP-2 proteininin gen ekspresyonlarının kontrolünde yer alan bir transkripsiyon faktörü olabileceği öne sürülmüştür (222). Davies ve arkadaşları 1999 yılındaki çalışmasında 6p25-p24 bölgesinde *TFAP2A*'yı da içeren interstisyel delesyon saptanan bir olguda fasyal dismorfizm, göz anomalileri ve ekstremite anomalileri bildirmiştir (223). Milunsky ve arkadaşları 2008 yılındaki çalışmasında BOF sendromu klinik tanılı olgu ve annesinde 6p24.3 bölgesinde 3.2 Mb bir delesyon saptamış, sonrasında dört BOF sendromu klinik tanılı olguda bu delesyon bölgesinde yer alan aday genlerin dizilenmesiyle olguların tümünde *TFAP2A* geninde *de novo* yanlış anlamlı varyantlar saptanarak BOF sendromunun *TFAP2A* genindeki mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (224).

TFAP2A geni 7 ekzondan oluşur ve AP-2α proteinini kodlar. Bu proteinin C-terminal yarımında, benzersiz ve yüksek oranda korunmuş *helix-span-helix* dimerizasyon motifi, santralde bazal domain ve N-terminalde daha az korunmuş prolin ve glutamin zengin domain yer alır (Şekil 35). *Helix-span-helix* motifi ve bazal domain DNA bağlanmasına ve dimerizasyona aracılık eder. Prolin ve glutamin zengin domain ise transkripsiyonel aktivasyondan sorumludur.



Şekil 35: TFAP2A proteinin yapısı

F. Orso ve D. Taverna, 2009 çalışmasından uyarlanmıştır.

TFAP2A genindeki patojenik varyantlar genin herhangi bir yerinde saptanabilir. Ancak BOF sendromu tanılı olguların / ailelerin yaklaşık %90'ında ekzon dört ve beşte yanlış anlamlı varyantların saptandığı bir *hot spot* bölge tanımlanmıştır (225). Bu ekzonlardaki yanlış anlamlı varyantlar AP-2α proteininin DNA bağlama domainindeki korunmuş amino ait rezidülerinde değişime sebep olarak etki gösterir (226).

AP-2α; göz, kulak, yüz, vücut duvarı, ekstremiteler ve nöral tüpün embriyogenezi sırasında gen ekspresyonunu düzenleyen AP-2 transkripsiyon faktörleri ailesinin retinoik aside duyarlı bir üyesidir (227). Fare ve tavuk embriyogenezinde AP-2α'nın premigratuar nöral krest hücrelerinde eksprese olduğu, bu hücrelerin ise gövde ve kraniyal bölgelere göç ederek frontonazal bölge, brankiyal arklar ve periferik sinir sistemi morfogenezinde görevli olduğu gösterilmiştir (228). AP-2α ekspresyonunun belirgin olduğu diğer bir bölge ise ekstremite tomurcuğudur. AP-2α ekspresyonu üst ekstremite tomurcuğu ortaya çıktıktan hemen sonra tespit edilebilir ve ekspresyon ekstremite büyümesi sırasında ilerleme bölgesinin (*progress zone*, PZ) mezenkiminde devam eder (228). Belirgin AP-2α ekspresyonu gelişen epidermis, böbrek, serebellum, spinal kord ve gözde de saptanmıştır (228). TFAP2A'nın premigratuar ve migratuar nöral krest hücrelerinde eksprese olduğu ve lensin erken morfogenezinde gerekli olduğu bilinmektedir (229, 230). Ayrıca, TFAP2A hücre transformasyonunu, tümör büyümesini, metastazı ve sağkalımı etkileyerek tümörogenezde de rol oynar (231).

BOF sendromunda penetransın neredeyse tam olduğu ve ekspresivitenin değişken olduğu bildirilmiştir (221). *TFAP2A* gen mutasyonlarında fenotipte gözlenen değişkenliğin çok sayıda gen etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (221). DNA bağlama domainindeki çeşitli patojenik varyantların, yabanıl tip AP-2α proteini üzerinde dominant negatif etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (226). Bu nedenle, *null*, hipomorfik veya antimorfik allellere bağlı

aktivite farklılıkları, BOF sendromunda karakteristik olan fenotipik değişkenliğe yol açabilir (221).

Olgu 3'de saptanan klinik bulgulardan mikrosefali, malar hipoplazi, malforme kulaklar, yarık damak, renal anomali bulgularının BOF sendromu ile açıklanabileceği düşünüldü. Olgu 3'de başparmak aplazisi saptanmış, BOF sendromunda ise başparmak hipoplazisi bildirilmiştir (232). Olguda saptanan radius ve ulnada kısalık açısından literatür incelendiğinde, BOF sendromu tanılı olgularda bu bulguların bildirilmemiş olduğu gözlendi. Ancak birçok çalışmada *TFAP2A null* farelerde radius yokluğu ile karakterize ön kol fokomelisi bildirilmiştir (228). Ayrıca TFAP2A'nın üst ekstremite tomurcuğunda eksprese olması ve üst ekstremite büyümesi sırasında ekspresyonunun ilerleme bölgesinde devam etmesi, bu gendeki patojenik varyantların üst ekstremite anomalilerine neden olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde BOF sendromlu olgularda *TFAP2A* tüm gen delesyonu bildirilmiş, ancak Olgu 3'deki gibi tüm gen duplikasyonu saptanan olgu bildirilmemiştir (224, 230). *TFAP2A* geninde yanlış anlamlı varyant saptanan olgularda, *TFAP2A* tüm gen heterozigot delesyonu saptanan olgulara göre klinik bulguların daha ağır olduğu gözlenmiş ve bu durum antimorf bir allel oluşumuna sebep olan dominant negatif etkiyi düşündürmüştür (226).

BOF sendromunda hastalık mekanizması fonksiyon kaybı olarak bilinmektedir. Ancak Ahituv ve arkadaşlarının çalışmasında *TFAP2A* geninde fonksiyon kazanımı yapan yanlış anlamlı bir varyantın heterozigotluğunda farelerde kulak kemikçiklerinde anomali ve işitme kaybı, homozigotluğunda ise farelerde fasyal defektler, ağır göz anomalileri ve perinatal dönemde ölüm bildirilmiştir (233). Lin ve arkadaşlarının çalışmasında TFAP2A aşırı ekspresyonunun fare oositleri üzerine etkisi incelenmiştir. TFAP2A aşırı ekspresyonunun bir histon asetil transferaz olan p300'ün yukarı regülasyonuna sebep olduğu, transkripsiyonel aktivasyonda rol oynayan histon asetilasyon ve laktilasyon seviyelerini artırdığı, iğ birleşmesini ve kromozom hizalanmasını engellediği ve sonuç olarak oosit mayozunu engellediği gösterilmiştir (234). Ayrıca çeşitli çalışmalarda TFAP2A aşırı ekspresyonu malign epitelyal ovaryen tümörler, nazafarinks karsinomu ve akciğer karsinomunda saptanmış ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (234).

Sonuç olarak bir çalışmada *TFAP2A* genindeki fonksiyon kazanımı yapan bir varyantın farelerde malformasyonlara yol açması, başka bir çalışmada TFAP2A aşırı ekspresyonunun farelerde oosit mayozunu engellediğinin gözlenmesi ve çeşitli çalışmalarda TFAP2A aşırı

ekspresyonunun çeşitli malignitelerle ilişkilendirilmesi olgu 3'deki *TFAP2A* tüm gen duplikasyonun da klinik bulgulara yol açabileceğini düşündürmektedir. Olgudaki klinik bulguların bir kısmı BOF sendromunda gözlenmektedir. BOF sendromuna göre daha ağır olan ekstremite bulgularının ise, *TFAP2A* geninin üst ekstremite embriyolojisinde rol oynaması nedeniyle bu gen duplikasyonu ile açıklanabileceği düşünüldü. Ancak BOF sendromunda henüz *TFAP2A* tüm gen duplikasyonu bildirilmiş olgu bulunmaması nedeniyle bu kopya sayısı değişimi varyantı klinik önemi belirsiz niteliğini korumakta ve hastalıkla ilişkisinin kesinleştirilmesi için *TFAP2A* gen duplikasyonu saptanan başka olguların varlığı veya fonksiyonel çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca, duplikasyonun lokasyonunun bilinmemesi, *TFAP2A*'nın kendi fonksiyonunu kaybetme potansiyeli veya başka bir gen bölgesinde fonksiyon kaybına yol açabilecek değişikliklerin göz ardı edilmemesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bu tür olayların tam olarak anlaşılabilmesi için TFAP2A'nın ekspresyon gösterdiği dokuda detaylı incelemelerin yapılması veya kesintisiz uzun okumalar aracılığıyla duplikasyonun genomda nereye yerleştiğinin belirlenmesi yol gösterici olabilirdi. Ancak, bu olgumuzda elimizde taze doku bulunmaması ve uzun dizi analizi imkanının olmaması nedenleriyle görüşlerimiz şu anda teorik düzeyde kalmıştır.

Antenatal US'de sol ön kolda distale doğru incelen tek tübüler kemik, sol el yokluğu, sağ ön kolda tek tübüler kemik, sağ elde tek parmak saptanarak termine edilen, postmortem değerlendirmede ek olarak sağ ulnada eğrilik, hipoplazik sağ el ayası, sağ el ulnar tarafta iki adet tomurcuk şeklinde parmak benzeri çıkıntı, sol ön kolda antekubital pterjiyum saptanan **olgu 4**'de ayırıcı tanıda radyal ışın defekti ile seyreden sendromlar düşünüldü. Trio TED analizlerinde ve CNV analizlerinde hastalıkla ilişkisi bilinen genlerde, endikasyon ve kalıtım modeli ile uyumlu hastalık yapıcı bir varyant (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmazken, aday gen yaklaşımı ile olguda *de novo* oluşan dizi varyantlarının (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) değerlendirilmesinde indekste *CCNH* geninde varyant fraksiyonu %21 olan heterozigot c.698C>A / (p.(Ser233*) değişimi saptandı. Ebeveynlerde saptanmaması varyantın *de novo* oluştuğunu düşündürdü.

CCNH geni OMIM veri tabanında herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. İndekste *CCNH* geninde saptanan değişimin *de novo* oluşması, yanlış anlamlı olması, GnomAD, G1000 ve ESP5400 veri tabanlarında ve *in-house* veri tabanında bulunmaması, korunmuşluk skorunun yüksek olması, *in silico* tahmin araçların çoğunlukla zarar verici tahmini vermesi, CCNH

proteinin üst ekstremite embriyolojisinde önemli rol oynayan retinoik asidin reseptörlerinin aktivasyonunda görev alması bulguları ile olgudaki ekstremite anomalilerinin genetik etiyolojisi açısından aday bir varyant olduğu düşünüldü. Ancak Sanger dizilemede bu varyant doğrulanamadı. Bu nedenle TED analizinde *CCNH* geninde izlenen değişimin, TED'in yanlış pozitifliğinden kaynaklandığı düşünüldü.

Antenatal US'de simetrik İUBK, bilateral pelvik böbrek, her iki ön kolda tek tübüler kemik, bilateral başparmak aplazisi ve ellerde radyal deviasyon saptanarak termine edilen, postmortem değerlendirmede ek olarak fasyal dismorfik bulgular, preauriküler *skin tag*, servikal vertebralarda segmentasyon anomalileri ve kostalarda düzensizlik (füzyon?), bilateral ulnalarda kısalık, bilateral silik el içi ve parmak fleksiyon çizgileri, anterior yerleşimli anüs saptanan **olgu 5**'de ayırıcı tanıda Townes-Brocks sendromu, Radyal ışın defektleri ile birlikte hemifasyal mikrozomi, VACTERL asosiasyonu düşünüldü. Trio TED analizlerinde *FANCI* geni ekzon 18'de indekste ve babada heterozigot c.1751G>A değişimi (rs759583609), intron 22'de indekste heterozigot c.2292-19T>C değişimi saptandı. Sanger dizilemede c.1751G>A değişimi indeks ve babada gösterilirken, c.2292-19T>C değişimi indekste doğrulanamadı. Bu nedenle TED analizinde izlenen c.2292-19T>C değişiminin, TED'in yanlış pozitifliğinden kaynaklandığı düşünüldü. İndekste ve babada heterozigot c.1751G>A değişimi saptanması Fanconi anemisi taşıyıcılığı ile uyumlu bulundu. Trio TED analizlerinde ve CNV analizlerinde hastalıkla ilişkisi bilinen genlerde, endikasyon ve kalıtım modeli ile uyumlu hastalık yapıcı varyant (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmadı. Ek olarak trio TED analizlerinde aday gen yaklaşımı ile olguda *de novo* oluşan dizi varyantlarının (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) değerlendirilmesinde indeksteki klinik bulguları açıklayabilecek aday gen / varyant saptanmadı.

İndekste ve babada heterozigot olarak saptanan yanlış anlamlı c.1751G>A değişimi, daha önce literatürde bildirilmemiş ve ACMG sınıflandırmasına göre klinik önemi belirsiz nitelikte bir varyant olmakla birlikte; G1000, ESP5400 veri tabanlarında ve *in-house* veri tabanında bulunmamakta, GnomAD veri tabanında ise oldukça nadir olarak bulunmaktadır. Ek olarak korunmuşluk skoru yüksek ve *in silico* tahmin araçları çoğunlukla patojenik benzeri tahmini vermektedir. Ancak olguda bu gende ikinci bir varyant saptanmaması nedeniyle Fanconi anemisi taşıyıcılığı ile uyumlu bulunmuştur. Fanconi anemisi taşıyıcılık sıklığı genel popülasyonda %0.3 olarak bildirilmekle birlikte, akraba evliliği oranının yüksek olduğu popülasyonlarda taşıyıcı

sıklığı daha yüksektir (235). Ülkemizde de akraba evliliği oranının yüksek olması taşıyıcı sıklığının yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

FANCI genindeki homozigot veya bileşik heterozigot patojenik varyantlar literatürde Fanconi anemisi, komplementasyon grup I (#MIM 609053) ile ilişkilendirilmiştir. Fanconi anemisi fiziksel anomaliler, erken başlangıçlı kemik iliği yetmezliği ve malignite riskinde artış ile karakterizedir. Fiziksel anomaliler arasında sıklıkla büyüme geriliği, anormal cilt pigmentasyonu, üst ekstremite anomalileri, mikrosefali, göz anomalileri, genitoüriner anomaliler, endokrin hastalıklar bulunmaktadır. Fanconi anemili olgularda risk artışı gözlenen maligniteler arasında AML, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomları, cilt ve genitoüriner sistemin ikinci primer kanserleri yer almaktadır.

OMIM veri tabanında Fanconi anemisi ile ilişkilendirilmiş 21 gen bulunmaktadır. Bu genlerden *FANCB* X'e bağlı resesif, *RAD51* otozomal dominant kalıtım gösterirken, geri kalan 19 gen otozomal resesif kalıtım gösterir. Fanconi anemili olgularda en sık patojenik varyant saptanan genler arasında ilk sırada %60-70 sıklıkla *FANCA* geni, ikinci sırada %14 sıklıkla *FANCC* geni ve üçüncü sırada %10 sıklıkla *FANCG* geni yer almaktadır (33). *FANCI* geninde ise patojenik varyant saptanma oranı %1 olup, bu olguların %95'ten fazlasında dizi analizi ile, %5'den azında ise delesyon / duplikasyon analizleri ile varyant saptanmaktadır (33).

Levitus ve arkadaşları tarafından 2004 yılında Fanconi anemisi komplementasyon grup I (FANCI) tanımlanmıştır (236). 2004-2015 yılları arasında *FANCI* geninde patojenik varyant saptanan 13 olgu bildirilmiştir. Savage ve arkadaşlarının 2015 yılındaki çalışmasında VACTERL asosiasyonu (VA) ile uyumlu klinik bulguları olan üç yeni olguda *FANCI* geninde patojenik varyantlar saptanmış ve o yıla kadar bildirilen olguların %44'ünün (7/16) VA bulgularının en az üçünü taşıdığı gözlenmiştir (237). VA klinik tanısı yedi kriterden üçünün varlığı ile koyulur. Fanconi anemili 245 olgunun değerlendirildiği bir çalışmada, olguların %5,3'ünün VA tanı kriterlerini karşıladığı, 2245 olgunun değerlendirildiği bir çalışmada ise olguların %4.8'inin VA tanı kriterlerini karşıladığı bildirilmiştir (238, 239). Bu bulgularla *FANCI* genindeki patojenik varyantların, diğer Fanconi anemisi genlerine göre VA ile daha sıklıkla ilişkide olduğu düşünülmektedir (237). *FANCI* geninde heterozigot varyant saptanan olgu 5, VA bulgularından üçünün (vertebral anomaliler, renal anomaliler, ekstremite anomalileri) varlığı ile VA tanı kriterlerini karşılamaktadır. Bu bulgularla olgudaki klinik tanı VACTERL asosiasyonu olarak kalmakla birlikte, *FANCI* geninde patojenik varyant saptanan Fanconi anemisi tanılı olguların

önemli bir kısmının VA klinik tanı kriterlerini karşılaması ve olguda *FANCI* geninde heterozigot varyant saptanması nedeniyle, fenotipten sorumlu ikinci varyantın TED ile saptanamayacak bölgelerde (promoter, derin intronik bölgeler vb.) yer alabileceği veya CNV analizinde saptanamayan kopya sayısı değişimlerinin olabileceği düşünüldü. Bu nedenle ileri moleküler sitogenetik ve moleküler analizler (*FANCI* gen MLPA analizi veya yüksek çözünürlüklü mikroarray, tüm genom dizileme) planlanabilir.

Antenatal US'de sağ ön kolda tek tübüler kemik, sağ elde radyal deviasyon, sağ başparmak aplazisi, musküler VSD saptanarak termine edilen, postmortem değerlendirmede ek olarak retrognati, toraks asimetrisi, torakolomber skolyoz, sağ başparmak aplazisi saptanan **olgu 6**'da ayırıcı tanıda Holt-Oram sendromu düşünüldü. Trio TED analizlerinde ve CNV analizlerinde hastalıkla ilişkisi bilinen genlerde, endikasyon ve kalıtım modeli ile uyumlu hastalık yapıcı varyant (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) saptanmadı. Ek olarak trio TED analizlerinde aday gen yaklaşımı ile olguda *de novo* oluşan dizi varyantlarının (patojenik, olası patojenik, klinik önemi belirsiz) değerlendirilmesinde indeksteki klinik bulguları açıklayabilecek aday gen / varyant saptanmadı.

Çalışmamızda prenatal ultrasonda ve postmortem değerlendirmede radyal aplazi / hipoplazi saptanan fetal olgulara ve sağlıklı ebeveynlerine yapılan trio TED analizlerinde ve CNV analizlerinde üç olguda hastalık ilişkili veya ilişkili olduğu düşünülen beş varyant saptandı. Bu varyantlardan biri intronik, biri 5'UTR, üçü kopya sayısı değişimi idi. Saptanan bir kopya sayısı değişimi ilk kez bu çalışmada tanımlanan *novel* nitelikte bir değişimdi. *TFAP2A* tüm gen duplikasyonunun *novel* ve *de novo* bir değişim olmasının yanı sıra, olguda BOF sendromunda bildirilenden daha ağır iskelet bulgularının varlığı, BOF sendromunda fenotipik spektrumun daha geniş olabileceğini düşündürmekte ve BOF sendromunun klinik bulguları açısından literatüre katkı sağlamaktadır. İki olguda *RBM8A* genini içeren delesyon ve *RBM8A* geninde regülatör bölgelerdeki (5'UTR ve intronik) hipomorfik varyantın bileşik heterozigotluğu saptandı ve olgular TAR sendromu tanısı aldı. Ebeveynlerde taşıyıcılık saptandı. Literatür ile uyumlu olarak TAR sendromunun radyal ışın defektlerinin etiyolojisinde sık olarak saptandığı gözlendi. Ayrıca fetal olgularda TAR sendromunun klinik bulgularının detaylandırılması ile literatüre katkı sağlanmaktadır. Trio TED ve CNV analizleri ile kliniği açıklayabilecek varyant saptanmayan üç olgudan birinde *FANCI* geninde heterozigot klinik önemi belirsiz ve *novel* bir varyant saptanarak Fanconi anemisi taşıyıcılığı ile uyumlu bulundu. Kısıtlı sayıda örnek ile yapılan çalışmamızda,

CNV analizinin eşlik ettiği trio TED analizinin tanıdaki katkısı %50 (3/6) olarak bulundu. Üç olguda hastalığın moleküler etiyopatogenezi CNV analizinin de yapıldığı trio TED analizi ile aydınlatılamadı. Literatürde radyal ışın defekti etyolojisinin araştırılmasında TED analizinin tanısal verimliliği ile ilgili bir çalışma bulunamadı. Bu açıdan çalışmamız radyal ışın defekti olgularında CNV analizinin de eşlik ettiği trio TED analizinin verimliliğini araştırmada ilk çalışma olarak önem taşımaktadır.

Literatür incelendiğinde Avcı ve arkadaşları tarafından radyal ışın defekti tanılı postnatal olguların değerlendirildiği bir çalışmada, 31 indeks olguya yapılan ve 14 fenotipten sorumlu 43 geni içeren yeni nesil dizileme (YND) panelinde, tanı oranı %16 (5/31) olarak bulunmuştur (240). Aynı çalışmada yeni nesil dizileme paneli öncesi olguların %5.4'üne (2/37) kromozom analizleri ile, olguların %10.8'ine (4/37) ise klinik tanıya yönelik hedef gen dizi analizleri ile tanı koyulmuş, bu olgularla birlikte tüm serideki tanı oranı %29.7 (11/37) olarak bulunmuştur (240). Tanılar arasında, dört olguda Fanconi anemisi, bir olguda Holt-Oram sendromu, bir olguda Roberts sendromu, bir olguda Cornelia de Lange sendromu, bir olguda Nager sendromu, bir olguda Duane-radyal ışın sendromu, bir olguda trizomi 18, bir olguda resiprokal translokasyon [t(2;12)(q31;q24.3)] yer almaktadır (240).

Literatürde Rocha ve arkadaşları tarafından konjenital longitudinal ekstremite defektlerinin değerlendirildiği bir çalışmada radius ve / veya başparmak etkilenimi gözlenen 26 olgunun 16'sına (%61.5) çeşitli moleküler ve moleküler sitogenetik yöntemler (beş olguda klinik tanıya yönelik hedef gen dizi analizleri, beş olguda YND paneli, üç olguda TED, iki olguda array-CGH ve YND paneli, bir olguda YND paneli ve CNV analizi) ile tanı koyulmuş, 10'una (%38.5) ise uygulanan çeşitli moleküler ve moleküler sitogenetik yöntemler (beş olguda array-CGH ve trio TED, iki olguda array-CGH ve TED, iki olguda TED, bir olguda trio TED) ile tanı koyulamamıştır (241). Ek olarak sendromik olgular grubunda tanı oranının %75 (15/20), non-sendromik olgular grubunda ise tanı oranının %17 (1/6) olduğu saptanmıştır (241). Tanılar arasında, dört olguda Rothmund-Thomson sendromu 2, üç olguda Holt-Oram sendromu, üç olguda TAR sendromu, bir olguda Roberts sendromu, bir olguda Richieri-Costa-Pereira sendromu, bir olguda Akrofasyal dizostoz, Cincinnati tipi, bir olguda Coats Plus sendromu, bir olguda Verheij sendromu, bir olguda Fuhrmann sendromu yer almaktadır (241).

Daha önce radyal ışın defektlerinde TED'in tanısal verimliliği ile ilgili net bir veri olmamakla birlikte, çalışmamızda radyal ışın defekti olgularında CNV analizinin de uygulandığı

trio TED analizinin tanısal verimliliği %50 (3/6) olarak saptanmıştır. Tanı alan üç olguda da CNV analizlerinde varyant saptanması radyal ışın defekti grubunda TED analizinin CNV'li olarak gerçekleştirilmesini veya TED analizi öncesinde array-CGH analizinin yapılması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca radyal ışın defekti ile seyreden ancak henüz moleküler etiyolojisi aydınlatılamamış sendromların / asosiasyonların varlığı nedeniyle, CNV'li TED veya array-CGH ve TED analizleri normal sonuçlanan olgularda aday genlerin araştırılması amacıyla trio TED analizleri planlanabilir. İki olguda TED analizinde fraksiyonu düşük olarak saptanan değişimlerin Sanger dizileme ile doğrulanamadığı gözlenmiştir. Bu nedenle TED analizinde saptanan değişimlerin ailelere genetik danışmanlık verilmeden önce Sanger dizileme ile doğrulanmış olması önemlidir. Ancak, düşük mozaik oluşumların (varyant fraksiyonu %15'in altı) Sanger dizi ile doğrulanamayabileceği veya Sanger dizisinde *allel-drop-out* gibi teknik kısıtlılıklar nedeniyle varyantların doğrulanamayabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. *Allel-drop-out* sorunu genellikle PZR için tasarlanan primerlerin değiştirilmesi ile aşılabilmektedir. Bu testteki iki olguda, allel fraksiyonunun düşük olması nedeniyle teknik sınırın TED analizi ile ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda CNV'li TED analizi ile üç olguda (olgu 4, olgu 5 ve olgu 6) moleküler etiyoloji saptanamamasının nedeni, fenotipten sorumlu varyantın TED ile saptanamayacak bölgelerde yer alması (promoter, derin intronik bölgeler vb.), fenotipten sorumlu genin henüz tanımlanmamış olma ihtimali, mozaisizm olasılığı gibi durumlar olabilir. TED analizinde varyant saptanmayan olgu 4'de radyal ışın defektine ek olarak iskelet anomalileri izlendi. Ancak diğer sistem anomalileri veya fasyal dismorfizm izlenmedi. TED analizinde varyant saptanmayan diğer bir olgu olan olgu 6'da ise radyal ışın defektine ek olarak skolyoz ve muskuler VSD izlendi. Bu olgu radyal ışın defektinin unilateral olarak izlendiği tek örnek idi. Literatürde radyal ışın defektlerinde sendromik olgularda ve radyal ışın defektinin bilateral olarak izlendiği olgularda altta yatan genetik etiyolojinin saptanma ihtimalinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (6, 241). Çalışmamızda olgu 4'de varyant saptanmamasının nedeninin olguda izole ekstremite anomalileri izlenmesine, olgu 6'da varyant saptanmamasının nedeninin ise olguda radyal ışın defektinin unilateral olarak izlenmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca olgu 4 ve olgu 5 VA tanı kriterlerinin üçünü karşılamaktadır ve TED analizinde varyant saptanmamış olmasının, VA'nın genetik etiyolojisinin henüz aydınlatılamamış olmasına bağlı olabileceği de düşünülmektedir. Bu bulgular ile, literatür ile uyumlu olarak radyal ışın defektlerinde özellikle ek sistemik anomalilere

sahip sendromik olgularda ve radyal ışın defektinin bilateral olarak saptandığı olgularda altta yatan genetik etiyolojinin saptanma ihtimalinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu olgularda gros / submikroskobik kromozom anomalileri dışlandıktan sonra ileri moleküler analizler (YND paneli, TED vb.) planlanmalıdır. Radyal ışın defektlerinde etiyoloji daha fazla aydınlatıldıkça, genetik tanı varlığı olguların prognozlarının belirlenmesi, hastalığa uygun olarak takiplerinin gerçekleştirilmesi, tedavi seçenekleri ve aileye genetik danışmanlık verilerek gerektiğinde prenatal tanı / preimplantasyon genetik tanı seçeneklerinin sunulması ve gerektiğinde aile bireylerinde taşıyıcılıkların araştırılmasına katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında prenatal dönemde radyal aplazi / hipoplazi saptanan altı olgunun klinik bulguları ve TED analizi sonuçları sunulmuştur. Çalışma ayrıca, prenatal dönemde saptanan radyal ışın defektlerinde CNV analizinin de eşlik ettiği trio TED analizinin tanı verimliliği üzerine ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Genetik tanı koyulan olgularla birlikte radyal ışın defekti etiyopatogenezinin aydınlatılması ve fetal dönemdeki klinik bulgularının literatüre katkı sağlaması amacı gütmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sofer S, Bar-Ziv J, Abeliovich D. Radial ray aplasia and renal anomalies in father and son: a new syndrome. American Journal of Medical Genetics. 1983;14(1):151-7.
2. Pakkasjärvi N, Koskimies E, Ritvanen A, Nietosvaara Y, Mäkitie O. Characteristics and associated anomalies in radial ray deficiencies in Finland--a population-based study. Am J Med Genet A. 2013;161a(2):261-7.
3. Goldfarb CA, Wall L, Manske PR. Radial longitudinal deficiency: the incidence of associated medical and musculoskeletal conditions. The Journal of hand surgery. 2006;31(7):1176-82.
4. Gandhi M, Rac MW, McKinney J. Radial ray malformation. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 2019;221(6):B16-B8.
5. Guéro S. Developmental biology of the upper limb. Hand Surg Rehabil. 2018;37(5):265-74.
6. Yang P-Y, Yeh G-P, Hsieh CT-C. Prenatal diagnosis of radial ray defects by ultrasound: a report of 6 cases. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology. 2018;57(4):598-600.
7. Rojnueangnit K, Robin NH. Craniosynostosis and radial ray defect: a rare presentation of 22q11. 2 deletion syndrome. American Journal of Medical Genetics Part A. 2013;161(8):2024-6.
8. Donovan KA, An J, Nowak RP, Yuan JC, Fink EC, Berry BC, et al. Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane Radial Ray syndrome. Elife. 2018;7:e38430.
9. Langer B, Haddad J, Gasser B, Maubert M, Schlaeder G. Isolated fetal bilateral radial ray reduction associated with valproic acid usage. Fetal diagnosis and therapy. 1994;9(3):155-8.
10. Elmakky A, Stanghellini I, Landi A, Percesepe A. Role of Genetic Factors in the Pathogenesis of Radial Deficiencies in Humans. Curr Genomics. 2015;16(4):264-78.
11. Laub DR. Congenital anomalies of the upper extremity: Springer; 2016.
12. Ekblom AG, Laurell T, Arner M. Epidemiology of congenital upper limb anomalies in 562 children born in 1997 to 2007: a total population study from Stockholm, Sweden. The Journal of hand surgery. 2010;35(11):1742-54.
13. Rogala E, Wynne-Davies R, Littlejohn A, Gormley J. Congenital limb anomalies: frequency and aetiological factors: data from the Edinburgh Register of the Newborn (1964-68). Journal of medical genetics. 1974;11(3):221-33.

14. Goldfarb CA, Ezaki M, Wall LB, Lam WL, Oberg KC. The Oberg-Manske-Tonkin (OMT) Classification of Congenital Upper Extremities: Update for 2020. J Hand Surg Am. 2020;45(6):542-7.

15. Vergult S, Hoogeboom AJM, Bijlsma EK, Sante T, Klopocki E, De Wilde B, et al. Complex genetics of radial ray deficiencies: screening of a cohort of 54 patients. Genetics in Medicine. 2013;15(3):195-202.

16. McDermott DA, Fong JC, Basson CT. Holt-Oram Syndrome. 2019.

17. Elek C, Vitéz M, Czeizel E. [Holt-Oram syndrome]. Orv Hetil. 1991;132(2):73-4, 7-8.

18. Barisic I, Boban L, Greenlees R, Garne E, Wellesley D, Calzolari E, et al. Holt Oram syndrome: a registry-based study in Europe. Orphanet J Rare Dis. 2014;9:156.

19. Holt M, Oram S. Familial heart disease with skeletal malformations. Br Heart J. 1960;22(2):236-42.

20. Poznanski AK, Gall JC, Jr., Stern AM. Skeletal manifestations of the Holt-Oram syndrome. Radiology. 1970;94(1):45-53.

21. Basson CT, Cowley GS, Solomon SD, Weissman B, Poznanski AK, Traill TA, et al. The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). N Engl J Med. 1994;330(13):885-91.

22. Baban A, Pitto L, Pulignani S, Cresci M, Mariani L, Gambacciani C, et al. Holt-Oram syndrome with intermediate atrioventricular canal defect, and aortic coarctation: functional characterization of a de novo TBX5 mutation. Am J Med Genet A. 2014;164a(6):1419-24.

23. McDermott DA, Bressan MC, He J, Lee JS, Aftimos S, Brueckner M, et al. TBX5 genetic testing validates strict clinical criteria for Holt-Oram syndrome. Pediatr Res. 2005;58(5):981-6.

24. Borozdin W, Bravo Ferrer Acosta AM, Bamshad MJ, Botzenhart EM, Froster UG, Lemke J, et al. Expanding the spectrum of TBX5 mutations in Holt-Oram syndrome: detection of two intragenic deletions by quantitative real time PCR, and report of eight novel point mutations. Hum Mutat. 2006;27(9):975-6.

25. Debeer P, Race V, Gewillig M, Devriendt K, Frijns JP. Novel TBX5 mutations in patients with Holt-Oram syndrome. Clin Orthop Relat Res. 2007;462:20-6.

26. Ghosh TK, Song FF, Packham EA, Buxton S, Robinson TE, Ronksley J, et al. Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development. Mol Cell Biol. 2009;29(8):2205-18.

27. Maitra M, Schluterman MK, Nichols HA, Richardson JA, Lo CW, Srivastava D, et al. Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development. Dev Biol. 2009;326(2):368-77.

28. Nadeau M, Georges RO, Laforest B, Yamak A, Lefebvre C, Beauregard J, et al. An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4, and Nos3 required for atrial septum formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(45):19356-61.

29. Hatcher CJ, Basson CT. Getting the T-box dose right. Nat Med. 2001;7(11):1185-6.

30. Böhm J, Heinritz W, Craig A, Vujic M, Ekman-Joelsson BM, Kohlhase J, et al. Functional analysis of the novel TBX5 c.1333delC mutation resulting in an extended TBX5 protein. BMC Med Genet. 2008;9:88.

31. Patel C, Silcock L, McMullan D, Brueton L, Cox H. TBX5 intragenic duplication: a family with an atypical Holt-Oram syndrome phenotype. Eur J Hum Genet. 2012;20(8):863-9.

32. Stirnimann CU, Ptchelkine D, Grimm C, Müller CW. Structural basis of TBX5-DNA recognition: the T-box domain in its DNA-bound and -unbound form. J Mol Biol. 2010;400(1):71-81.

33. Mehta PA, Ebens C. Fanconi anemia. 2021.

34. Che R, Zhang J, Nepal M, Han B, Fei P. Multifaceted Fanconi Anemia Signaling. Trends Genet. 2018;34(3):171-83.

35. Rosenberg PS, Tamary H, Alter BP. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. Am J Med Genet A. 2011;155a(8):1877-83.

36. Fanconi G. Familiare infantile perniziosaartige Anamie (pernizioses Blutbild und Konstitution). Jahrbuch Kinderheilk. 1927;117:257-80.

37. Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. Blood Rev. 2010;24(3):101-22.

38. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). Blood. 2003;101(4):1249-56.

39. Giulino L, Guinan EC, Gillio AP, Drachtman RA, Teruya-Feldstein J, Boulad F. Sweet syndrome in patients with Fanconi anaemia: association with extracutaneous manifestations and progression of haematological disease. Br J Haematol. 2011;154(2):278-81.

40. Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. Haematologica. 2008;93(4):511-7.

41. Alter BP, Giri N, Savage SA, Peters JA, Loud JT, Leathwood L, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. Br J Haematol. 2010;150(2):179-88.

42. Mehta PA, Harris RE, Davies SM, Kim MO, Mueller R, Lampkin B, et al. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome--acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. Cancer Genet Cytogenet. 2010;203(2):180-6.

43. Morris LG, Sikora AG, Patel SG, Hayes RB, Ganly I. Second primary cancers after an index head and neck cancer: subsite-specific trends in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. J Clin Oncol. 2011;29(6):739-46.

44. Lee HJ, Park S, Kang HJ, Jun JK, Lee JA, Lee DS, et al. A case report of Fanconi anemia diagnosed by genetic testing followed by prenatal diagnosis. Ann Lab Med. 2012;32(5):380-4.

45. Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. Nat Rev Cancer. 2011;11(7):467-80.

46. Kee Y, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. J Clin Invest. 2012;122(11):3799-806.

47. D'Andrea AD. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. N Engl J Med. 2010;362(20):1909-19.

48. Nakanishi K, Cavallo F, Perrouault L, Giovannangeli C, Moynahan ME, Barchi M, et al. Homology-directed Fanconi anemia pathway cross-link repair is dependent on DNA replication. Nat Struct Mol Biol. 2011;18(4):500-3.

49. Ciccia A, Ling C, Coulthard R, Yan Z, Xue Y, Meetei AR, et al. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. Mol Cell. 2007;25(3):331-43.

50. Ling C, Ishiai M, Ali AM, Medhurst AL, Neveling K, Kalb R, et al. FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. Embo j. 2007;26(8):2104-14.

51. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. Cell. 2007;129(2):289-301.

52. Huang M, D'Andrea AD. A new nuclease member of the FAN club. Nat Struct Mol Biol. 2010;17(8):926-8.

53. Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, et al. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. Mol Cell Biol. 2003;23(10):3417-26.

54. Deans AJ, West SC. FANCM connects the genome instability disorders Bloom's Syndrome and Fanconi Anemia. Mol Cell. 2009;36(6):943-53.

55. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. Science. 2002;297(5581):606-9.

56. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. Mol Cell. 2006;22(6):719-29.

57. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. Nat Genet. 2006;38(11):1239-41.

58. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, de Vries Y, Hussain S, Wiegant WW, et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. Nat Genet. 2005;37(9):934-5.

59. Wilson JB, Blom E, Cunningham R, Xiao Y, Kupfer GM, Jones NJ. Several tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of FANCG are required for assembly of the BRCA2/D1-D2-G-X3 complex, FANCD2 monoubiquitylation and phleomycin resistance. Mutat Res. 2010;689(1-2):12-20.

60. Zhi G, Wilson JB, Chen X, Krause DS, Xiao Y, Jones NJ, et al. Fanconi anemia complementation group FANCD2 protein serine 331 phosphorylation is important for fanconi anemia pathway function and BRCA2 interaction. Cancer Res. 2009;69(22):8775-83.

61. Zhang F, Fan Q, Ren K, Auerbach AD, Andreassen PR. FANCJ/BRIP1 recruitment and regulation of FANCD2 in DNA damage responses. Chromosoma. 2010;119(6):637-49.

62. Adamo A, Collis SJ, Adelman CA, Silva N, Horejsi Z, Ward JD, et al. Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. Mol Cell. 2010;39(1):25-35.

63. Ho TV, Schärer OD. Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. Environ Mol Mutagen. 2010;51(6):552-66.

64. Petit F, Boussion S. Thrombocytopenia Absent Radius Syndrome. GeneReviews®[Internet]: University of Washington, Seattle; 2022.
65. Shaw S, Oliver RA. Congenital hypoplastic thrombocytopenia with skeletal deformaties in siblings. Blood. 1959;14(4):374-7.
66. Goldfarb CA, Wustrack R, Pratt JA, Mender A, Manske PR. Thumb function and appearance in thrombocytopenia: absent radius syndrome. J Hand Surg Am. 2007;32(2):157-61.
67. Fiedler J, Strauss G, Wannack M, Schwiebert S, Seidel K, Henning K, et al. Two patterns of thrombopoietin signaling suggest no coupling between platelet production and thrombopoietin reactivity in thrombocytopenia-absent radii syndrome. Haematologica. 2012;97(1):73-81.
68. Manukjan G, Bösing H, Schmugge M, Strauß G, Schulze H. Impact of genetic variants on haematopoiesis in patients with thrombocytopenia absent radii (TAR) syndrome. Br J Haematol. 2017;179(4):606-17.
69. Farlett R, Kulkarni A, Thomas B, Mydam J. Thrombocytopenia With Absent Radii Syndrome With an Unusual Urological Pathology: A Case Report. Cureus. 2022;14(4):e23991.
70. Jameson-Lee M, Chen K, Ritchie E, Shore T, Al-Khattab O, Gergis U. Acute myeloid leukemia in a patient with thrombocytopenia with absent radii: A case report and review of the literature. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2018;11(4):245-7.
71. Go RS, Johnston KL. Acute myelogenous leukemia in an adult with thrombocytopenia with absent radii syndrome. Eur J Haematol. 2003;70(4):246-8.
72. Camitta BM, Rock A. Acute lymphoidic leukemia in a patient with thrombocytopenia/absent radii (Tar) syndrome. Am J Pediatr Hematol Oncol. 1993;15(3):335-7.
73. Greenhalgh KL, Howell RT, Bottani A, Ancliff PJ, Brunner HG, Verschuuren-Bemelmans CC, et al. Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study. J Med Genet. 2002;39(12):876-81.
74. Kumar C, Sharma D, Pandita A, Bhalerao S. Thrombocytopenia absent radius syndrome with Tetralogy of Fallot: a rare association. Int Med Case Rep J. 2015;8:81-5.
75. Griesinger G, Dafopoulos K, Schultze-Mosgau A, Schroder A, Felberbaum R, Diedrich K. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome associated with thrombocytopenia-absent radius syndrome. Fertil Steril. 2005;83(2):452-4.

76. Ahmad R, Pope S. Association of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome with Thrombocytopenia Absent Radii syndrome: a rare presentation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008;139(2):257-8.
77. Hipólito LN, Mendoza-Cembranos MD, Villaescusa MT, Jo-Velasco M, Requena L, Alegría-Landa V. Langerhans cell histiocytosis and multiple reticulohistiocytomas in a patient with TAR syndrome: An association not previously described. J Cutan Pathol. 2019;46(8):609-12.
78. Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, et al. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. Am J Hum Genet. 2007;80(2):232-40.
79. Albers CA, Paul DS, Schulze H, Freson K, Stephens JC, Smethurst PA, et al. Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. Nat Genet. 2012;44(4):435-9, s1-2.
80. Boussion S, Escande F, Jourdain AS, Smol T, Brunelle P, Duhamel C, et al. TAR syndrome: Clinical and molecular characterization of a cohort of 26 patients and description of novel noncoding variants of RBM8A. Hum Mutat. 2020;41(7):1220-5.
81. Chuang TW, Lu CC, Su CH, Wu PY, Easwvaran S, Lee CC, et al. The RNA Processing Factor Y14 Participates in DNA Damage Response and Repair. iScience. 2019;13:402-15.
82. Kohlhase J. Townes-brocks syndrome. GeneReviews®[Internet]. 2016.
83. Martínez-Frías ML, Bermejo Sánchez E, Arroyo Carrera I, Pérez Fernández JL, Pardo Romero M, Burón Martínez E, et al. [The Townes-Brocks syndrome in Spain: the epidemiological aspects in a consecutive series of cases]. An Esp Pediatr. 1999;50(1):57-60.
84. Townes PL, Brocks ER. Hereditary syndrome of imperforate anus with hand, foot, and ear anomalies. J Pediatr. 1972;81(2):321-6.
85. Botzenhart EM, Green A, Ilyina H, König R, Lowry RB, Lo IF, et al. SALL1 mutation analysis in Townes-Brocks syndrome: twelve novel mutations and expansion of the phenotype. Hum Mutat. 2005;26(3):282.
86. Botzenhart EM, Bartalini G, Blair E, Brady AF, Elmslie F, Chong KL, et al. Townes-Brocks syndrome: twenty novel SALL1 mutations in sporadic and familial cases and refinement of the SALL1 hot spot region. Hum Mutat. 2007;28(2):204-5.

87. Engels S, Kohlhase J, McGaughran J. A SALL1 mutation causes a branchio-oto-renal syndrome-like phenotype. J Med Genet. 2000;37(6):458-60.

88. Surka WS, Kohlhase J, Neunert CE, Schneider DS, Proud VK. Unique family with Townes-Brocks syndrome, SALL1 mutation, and cardiac defects. Am J Med Genet. 2001;102(3):250-7.

89. Kohlhase J, Liebers M, Backe J, Baumann-Müller A, Bembea M, Destrée A, et al. High incidence of the R276X SALL1 mutation in sporadic but not familial Townes-Brocks syndrome and report of the first familial case. J Med Genet. 2003;40(11):e127.

90. Lawrence C, Hong-McAtee I, Hall B, Hartsfield J, Rutherford A, Bonilla T, et al. Endocrine abnormalities in Townes-Brocks syndrome. Am J Med Genet A. 2013;161a(9):2266-73.

91. Kohlhase J, Taschner PE, Burfeind P, Pasche B, Newman B, Blanck C, et al. Molecular analysis of SALL1 mutations in Townes-Brocks syndrome. Am J Hum Genet. 1999;64(2):435-45.

92. Keegan CE, Mulliken JB, Wu BL, Korf BR. Townes-Brocks syndrome versus expanded spectrum hemifacial microsomia: review of eight patients and further evidence of a "hot spot" for mutation in the SALL1 gene. Genet Med. 2001;3(4):310-3.

93. Farrell ER, Münsterberg AE. csal1 is controlled by a combination of FGF and Wnt signals in developing limb buds. Dev Biol. 2000;225(2):447-58.

94. Harvey SA, Logan MP. sall4 acts downstream of tbx5 and is required for pectoral fin outgrowth. Development. 2006;133(6):1165-73.

95. Sato A, Kishida S, Tanaka T, Kikuchi A, Kodama T, Asashima M, et al. Sall1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. Biochem Biophys Res Commun. 2004;319(1):103-13.

96. Kiefer SM, Ohlemiller KK, Yang J, McDill BW, Kohlhase J, Rauchman M. Expression of a truncated Sall1 transcriptional repressor is responsible for Townes-Brocks syndrome birth defects. Hum Mol Genet. 2003;12(17):2221-7.

97. Sweetman D, Smith T, Farrell ER, Chantry A, Munsterberg A. The conserved glutamine-rich region of chick csal1 and csal3 mediates protein interactions with other spalt family members. Implications for Townes-Brocks syndrome. J Biol Chem. 2003;278(8):6560-6.

98. Webb BD, Metikala S, Wheeler PG, Sherpa MD, Houten SM, Horb ME, et al. Heterozygous Pathogenic Variant in DACT1 Causes an Autosomal-Dominant Syndrome with Features Overlapping Townes-Brocks Syndrome. Hum Mutat. 2017;38(4):373-7.
99. Christians A, Kesdiren E, Hennies I, Hofmann A, Trowe MO, Brand F, et al. Heterozygous variants in the DVL2 interaction region of DACT1 cause CAKUT and features of Townes-Brocks syndrome 2. Hum Genet. 2023;142(1):73-88.
100. Suriben R, Kivimäe S, Fisher DA, Moon RT, Cheyette BN. Posterior malformations in Dact1 mutant mice arise through misregulated Vangl2 at the primitive streak. Nat Genet. 2009;41(9):977-85.
101. Wen J, Chiang YJ, Gao C, Xue H, Xu J, Ning Y, et al. Loss of Dact1 disrupts planar cell polarity signaling by altering dishevelled activity and leads to posterior malformation in mice. J Biol Chem. 2010;285(14):11023-30.
102. Deardorff MA, Noon SE, Krantz ID. Cornelia de Lange syndrome. 2020.
103. Pearce PM, Pitt DB. Six cases of de Lange's syndrome; parental consanguinity in two. Med J Aust. 1967;1(10):502-6.
104. Opitz JM. The Brachmann-de Lange syndrome. Am J Med Genet. 1985;22(1):89-102.
105. Brachmann W. Ein fall von symmetrischer monodaktylie durch Ulnadefekt, mit symmetrischer flughautbildung in den ellenbeugen, sowie anderen abnormitaten (zwerghaftogkeit, halsrippen, behaarung). Jarb Kinder Phys Erzie. 1916;84:225-35.
106. Boog G, Sagot F, Winer N, David A, Nomballais MF. Brachmann-de Lange syndrome: a cause of early symmetric fetal growth delay. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1999;85(2):173-7.
107. Kline AD, Stanley C, Belevich J, Brodsky K, Barr M, Jackson LG. Developmental data on individuals with the Brachmann-de Lange syndrome. Am J Med Genet. 1993;47(7):1053-8.
108. Saal HM, Samango-Sprouse CA, Rodnan LA, Rosenbaum KN, Custer DA. Brachmann-de Lange syndrome with normal IQ. Am J Med Genet. 1993;47(7):995-8.
109. Ajmone PF, Rigamonti C, Dall'Ara F, Monti F, Vizziello P, Milani D, et al. Communication, cognitive development and behavior in children with Cornelia de Lange Syndrome (CdLS): preliminary results. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2014;165b(3):223-9.

110. Verrotti A, Agostinelli S, Prezioso G, Coppola G, Capovilla G, Romeo A, et al. Epilepsy in patients with Cornelia de Lange syndrome: a clinical series. Seizure. 2013;22(5):356-9.
111. Jackson L, Kline AD, Barr MA, Koch S. de Lange syndrome: a clinical review of 310 individuals. Am J Med Genet. 1993;47(7):940-6.
112. Luzzani S, Macchini F, Valadè A, Milani D, Selicorni A. Gastroesophageal reflux and Cornelia de Lange syndrome: typical and atypical symptoms. Am J Med Genet A. 2003;119a(3):283-7.
113. Levin AV, Seidman DJ, Nelson LB, Jackson LG. Ophthalmologic findings in the Cornelia de Lange syndrome. J Pediatr Ophthalmol Strabismus. 1990;27(2):94-102.
114. Marchisio P, Selicorni A, Bianchini S, Milani D, Baggi E, Cerutti M, et al. Audiological findings, genotype and clinical severity score in Cornelia de Lange syndrome. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2014;78(7):1045-8.
115. Janek KC, Smith DF, Kline AD, Benke JR, Chen ML, Kimball A, et al. Improvement in hearing loss over time in Cornelia de Lange syndrome. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2016;87:203-7.
116. Chatfield KC, Schrier SA, Li J, Clark D, Kaur M, Kline AD, et al. Congenital heart disease in Cornelia de Lange syndrome: phenotype and genotype analysis. Am J Med Genet A. 2012;158a(10):2499-505.
117. Deardorff MA, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, et al. Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. Am J Hum Genet. 2007;80(3):485-94.
118. Kaiser FJ, Ansari M, Braunholz D, Concepción Gil-Rodríguez M, Decroos C, Wilde JJ, et al. Loss-of-function HDAC8 mutations cause a phenotypic spectrum of Cornelia de Lange syndrome-like features, ocular hypertelorism, large fontanelle and X-linked inheritance. Hum Mol Genet. 2014;23(11):2888-900.
119. Minor A, Shinawi M, Hogue JS, Vineyard M, Hamlin DR, Tan C, et al. Two novel RAD21 mutations in patients with mild Cornelia de Lange syndrome-like presentation and report of the first familial case. Gene. 2014;537(2):279-84.
120. Olley G, Ansari M, Bengani H, Grimes GR, Rhodes J, von Kriegsheim A, et al. BRD4 interacts with NIPBL and BRD4 is mutated in a Cornelia de Lange-like syndrome. Nat Genet. 2018;50(3):329-32.

121. Vega H, Gordillo M, Jabs EW. ESCO2 spectrum disorder. 2020.
122. Robert J. A child with double cleft of lip and palate, protrusion of the intermaxillary portion of the upper jaw and imperfect development of the bones of the four extremities. Ann Surg. 1919;70:252-3.
123. Holden KR, Jabs EW, Sponseller PD. Roberts/pseudothalidomide syndrome and normal intelligence: approaches to diagnosis and management. Dev Med Child Neurol. 1992;34(6):534-9.
124. Satar M, Atici A, Bişak U, Tunali N. Roberts-SC phocomelia syndrome: a case with additional anomalies. Clin Genet. 1994;45(2):107-8.
125. Ismail S, Essawi M, Sedky N, Hassan H, Fayez A, Helmy N, et al. ROBERTS SYNDROME: CLINICAL AND CYTOGENETIC STUDIES IN 8 EGYPTIAN PATIENTS AND MOLECULAR STUDIES IN 4 PATIENTS WITH GENOTYPE/PHENOTYPE CORRELATION. Genet Couns. 2016;27(3):305-23.
126. Ogilvy CS, Pakzaban P, Lee JM. Oculomotor nerve cavernous angioma in a patient with Roberts syndrome. Surg Neurol. 1993;40(1):39-42.
127. Parry DM, Mulvihill JJ, Tsai SE, Kaiser-Kupfer MI, Cowan JM. SC phocomelia syndrome, premature centromere separation, and congenital cranial nerve paralysis in two sisters, one with malignant melanoma. Am J Med Genet. 1986;24(4):653-72.
128. Wenger SL, Blatt J, Steele MW, Lloyd DA, Bellinger M, Phebus CK, et al. Rhabdomyosarcoma in Roberts syndrome. Cancer Genet Cytogenet. 1988;31(2):285-9.
129. Vega H, Trainer AH, Gordillo M, Crosier M, Kayserili H, Skovby F, et al. Phenotypic variability in 49 cases of ESCO2 mutations, including novel missense and codon deletion in the acetyltransferase domain, correlates with ESCO2 expression and establishes the clinical criteria for Roberts syndrome. J Med Genet. 2010;47(1):30-7.
130. Gordillo M, Vega H, Trainer AH, Hou F, Sakai N, Luque R, et al. The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity. Hum Mol Genet. 2008;17(14):2172-80.
131. Ivanov MP, Ladurner R, Poser I, Beveridge R, Rampler E, Hudecz O, et al. The replicative helicase MCM recruits cohesin acetyltransferase ESCO2 to mediate centromeric sister chromatid cohesion. Embo j. 2018;37(15).

132. Bender D, Da Silva EML, Chen J, Poss A, Gawey L, Rulon Z, et al. Multivalent interaction of ESCO2 with the replication machinery is required for sister chromatid cohesion in vertebrates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(2):1081-9.
133. Yatskevich S, Rhodes J, Nasmyth K. Organization of Chromosomal DNA by SMC Complexes. Annu Rev Genet. 2019;53:445-82.
134. Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, et al. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. Nat Genet. 2005;37(5):468-70.
135. Mönnich M, Kuriger Z, Print CG, Horsfield JA. A zebrafish model of Roberts syndrome reveals that Esco2 depletion interferes with development by disrupting the cell cycle. PLoS One. 2011;6(5):e20051.
136. Lionel Van Maldergem M, Piard J, Larizza L, Wang LL. Baller-Gerold Syndrome. 1993.
137. Mo D, Zhao Y, Balajee AS. Human RecQL4 helicase plays multifaceted roles in the genomic stability of normal and cancer cells. Cancer Lett. 2018;413:1-10.
138. Baller F. Radiusaplasie und Inzucht. Z Menschl Vererb Konstitutionsl. 1950;29:782-90.
139. Gerold M. [Healing of a fracture in an unusual case of congenital anomaly of the upper extremities]. Zentralbl Chir. 1959;84(21):831-4.
140. Ramos Fuentes FJ, Nicholson L, Scott CI, Jr. Phenotypic variability in the Baller-Gerold syndrome: report of a mildly affected patient and review of the literature. Eur J Pediatr. 1994;153(7):483-7.
141. Debeljak M, Zver A, Jazbec J. A patient with Baller-Gerold syndrome and midline NK/T lymphoma. Am J Med Genet A. 2009;149a(4):755-9.
142. Kaneko H, Izumi R, Oda H, Ohara O, Sameshima K, Ohnishi H, et al. Nationwide survey of Baller-Gerold syndrome in Japanese population. Mol Med Rep. 2017;15(5):3222-4.
143. Abu-Libdeh B, Jhujh SS, Dhar S, Sommers JA, Datta A, Longo GM, et al. RECON syndrome is a genome instability disorder caused by mutations in the DNA helicase RECQL1. The Journal of Clinical Investigation. 2022;132(5).
144. Croteau DL, Popuri V, Opresko PL, Bohr VA. Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication. Annu Rev Biochem. 2014;83:519-52.
145. Bochman ML. Roles of DNA helicases in the maintenance of genome integrity. Mol Cell Oncol. 2014;1(3):e963429.

146. Wang LL, Plon SE. Rothmund-Thomson Syndrome. GeneReviews®[Internet]. 2020.
147. THOMSON MS. Poikiloderma congexitale. British Journal of Dermatology. 1936;48(5):221-34.
148. Rothmund A. Über Cataracten in Verbindung mit einer eigenthümlichen Hautdegeneration. Archiv für Ophthalmologie. 1868;14(1):159-82.
149. Haytaç MC, Oztunç H, Mete UO, Kaya M. Rothmund-Thomson syndrome: a case report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94(4):479-84.
150. Mehollin-Ray AR, Kozinetz CA, Schlesinger AE, Guillerman RP, Wang LL. Radiographic abnormalities in Rothmund-Thomson syndrome and genotype-phenotype correlation with RECQL4 mutation status. AJR Am J Roentgenol. 2008;191(2):W62-6.
151. Cao F, Lu L, Abrams SA, Hawthorne KM, Tam A, Jin W, et al. Generalized metabolic bone disease and fracture risk in Rothmund-Thomson syndrome. Hum Mol Genet. 2017;26(16):3046-55.
152. Wang LL, Levy ML, Lewis RA, Chintagumpala MM, Lev D, Rogers M, et al. Clinical manifestations in a cohort of 41 Rothmund-Thomson syndrome patients. Am J Med Genet. 2001;102(1):11-7.
153. Knoell KA, Sidhu-Malik NK, Malik RK. Aplastic anemia in a patient with Rothmund-Thomson syndrome. J Pediatr Hematol Oncol. 1999;21(5):444-6.
154. Porter WM, Hardman CM, Abdalla SH, Powles AV. Haematological disease in siblings with Rothmund-Thomson syndrome. Clin Exp Dermatol. 1999;24(6):452-4.
155. Narayan S, Fleming C, Trainer AH, Craig JA. Rothmund-Thomson syndrome with myelodysplasia. Pediatr Dermatol. 2001;18(3):210-2.
156. Ajeawung NF, Nguyen TTM, Lu L, Kucharski TJ, Rousseau J, Molidperee S, et al. Mutations in ANAPC1, Encoding a Scaffold Subunit of the Anaphase-Promoting Complex, Cause Rothmund-Thomson Syndrome Type 1. Am J Hum Genet. 2019;105(3):625-30.
157. Wang LL, Gannavarapu A, Kozinetz CA, Levy ML, Lewis RA, Chintagumpala MM, et al. Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund-Thomson syndrome. J Natl Cancer Inst. 2003;95(9):669-74.
158. Lindor NM, Furuichi Y, Kitao S, Shimamoto A, Arndt C, Jalal S. Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations: report and clinical and molecular comparisons with Bloom syndrome and Werner syndrome. Am J Med Genet. 2000;90(3):223-8.

159. Borg MF, Olver IN, Hill MP. Rothmund-Thomson syndrome and tolerance of chemoradiotherapy. Australas Radiol. 1998;42(3):216-8.
160. Howell SM, Bray DW. Amelanotic melanoma in a patient with Rothmund-Thomson syndrome. Arch Dermatol. 2008;144(3):416-7.
161. Stinco G, Governatori G, Mattighello P, Patrone P. Multiple cutaneous neoplasms in a patient with Rothmund-Thomson syndrome: case report and published work review. J Dermatol. 2008;35(3):154-61.
162. Piquero-Casals J, Okubo AY, Nico MM. Rothmund-thomson syndrome in three siblings and development of cutaneous squamous cell carcinoma. Pediatr Dermatol. 2002;19(4):312-6.
163. Kääriäinen H, Ryöppy S, Norio R. RAPADILINO syndrome with radial and patellar aplasia/hypoplasia as main manifestations. American journal of medical genetics. 1989;33(3):346-51.
164. Siitonen HA, Sotkasiira J, Biervliet M, Benmansour A, Capri Y, Cormier-Daire V, et al. The mutation spectrum in RECQL4 diseases. European journal of human genetics. 2009;17(2):151-8.
165. Ferrel R, Jones B, Lucas R. Simultaneous occurrence of the Holt-Oram and the Duane syndrome. J Pediatr. 1966;69:630-4.
166. Kohlhase J. SALL4-related disorders. 2022.
167. Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L, Liebers M, Kispert A, Laccone F, et al. Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. Hum Mol Genet. 2002;11(23):2979-87.
168. Wu Q, Chen X, Zhang J, Loh YH, Low TY, Zhang W, et al. Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. J Biol Chem. 2006;281(34):24090-4.
169. Yang J, Chai L, Gao C, Fowles TC, Alipio Z, Dang H, et al. SALL4 is a key regulator of survival and apoptosis in human leukemic cells. Blood. 2008;112(3):805-13.
170. Gao C, Dimitrov T, Yong KJ, Tatetsu H, Jeong HW, Luo HR, et al. Targeting transcription factor SALL4 in acute myeloid leukemia by interrupting its interaction with an epigenetic complex. Blood. 2013;121(8):1413-21.
171. Yong KJ, Gao C, Lim JS, Yan B, Yang H, Dimitrov T, et al. Oncofetal gene SALL4 in aggressive hepatocellular carcinoma. N Engl J Med. 2013;368(24):2266-76.

172. Arias S, Penchaszadeh VB, Pinto-Cisternas J, Larrauri S, Opitz JM, Opitz JM. The IVIC syndrome: a new autosomal dominant complex pleiotropic syndrome with radial ray hypoplasia, hearing impairment, external ophthalmoplegia, and thrombocytopenia. American journal of medical genetics. 1980;6(1):25-59.
173. Sammito V, Motta D, Capodieci G, Sanfilippo S, Neri G, Optiz JM, et al. IVIC Syndrome. Report of a second family. American journal of medical genetics. 1988;29(4):875-81.
174. Nager FR, de Reynier JP. Das Gehörorgan bei den angeborenen Kopfmissbildungen: S. Karger Basel, New York; 1948.
175. Slingenberg B. Missbildungen von extremitäten. Virchows archiv für pathologische anatomie und physiologie und für klinische medizin. 1908;193(1):1-92.
176. Zhao J, Yang L. Broad-spectrum next-generation sequencing-based diagnosis of a case of Nager syndrome. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2020;34(9):e23426.
177. Tkemaladze T, Bregvadze K, Kvaratskhelia E, Kapoor MA, Orjonikidze N, Abzianidze E. First case report of Nager syndrome patient from Georgia. SAGE Open Medical Case Reports. 2022;10:2050313X221144219.
178. Bernier FP, Caluseriu O, Ng S, Schwartzentruber J, Buckingham KJ, Innes AM, et al. Haploinsufficiency of SF3B4, a component of the pre-mRNA spliceosomal complex, causes Nager syndrome. The American Journal of Human Genetics. 2012;90(5):925-33.
179. Sieff C. Diamond-Blackfan Anemia. 2021.
180. Diamond LK. Hypoplastic anemia. Am J Dis Child. 1938;56:464.
181. Ball SE, McGuckin CP, Jenkins G, Gordon-Smith EC. Diamond-Blackfan anaemia in the U.K.: analysis of 80 cases from a 20-year birth cohort. Br J Haematol. 1996;94(4):645-53.
182. Ramenghi U, Campagnoli MF, Garelli E, Carando A, Brusco A, Bagnara GP, et al. Diamond-Blackfan anemia: report of seven further mutations in the RPS19 gene and evidence of mutation heterogeneity in the Italian population. Blood Cells Mol Dis. 2000;26(5):417-22.
183. Lipton JM, Atsidaftos E, Zyskind I, Vlachos A. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. Pediatr Blood Cancer. 2006;46(5):558-64.
184. Ohga S, Mugishima H, Ohara A, Kojima S, Fujisawa K, Yagi K, et al. Diamond-Blackfan anemia in Japan: clinical outcomes of prednisolone therapy and hematopoietic stem cell transplantation. Int J Hematol. 2004;79(1):22-30.

185. Vlachos A, Rosenberg PS, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. Blood. 2012;119(16):3815-9.
186. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, et al. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. Blood. 2012;119(10):2376-84.
187. Léger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, Alvarez-Arias DA, Gas N, Bertolone SJ, et al. Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. J Biol Chem. 2005;280(46):38177-85.
188. Danilova N, Sakamoto KM, Lin S. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. Blood. 2008;112(13):5228-37.
189. Guion-Almeida ML, Zechi-Ceide RM, Vendramini S, Ju AT. A new syndrome with growth and mental retardation, mandibulofacial dysostosis, microcephaly, and cleft palate. Clinical dysmorphology. 2006;15(3):171-4.
190. Lines M, Hartley T, MacDonald SK, Boycott KM. Mandibulofacial dysostosis with microcephaly. 2020.
191. Huang L, Vanstone MR, Hartley T, Osmond M, Barrowman N, Allanson J, et al. Mandibulofacial Dysostosis with Microcephaly: Mutation and Database Update. Hum Mutat. 2016;37(2):148-54.
192. Luquetti DV, Hing AV, Rieder MJ, Nickerson DA, Turner EH, Smith J, et al. "Mandibulofacial dysostosis with microcephaly" caused by EFTUD2 mutations: expanding the phenotype. Am J Med Genet A. 2013;161a(1):108-13.
193. Lehalle D, Gordon CT, Oufadem M, Goudefroye G, Boutaud L, Alessandri JL, et al. Delineation of EFTUD2 haploinsufficiency-related phenotypes through a series of 36 patients. Hum Mutat. 2014;35(4):478-85.
194. Fabrizio P, Laggerbauer B, Lauber J, Lane WS, Lührmann R. An evolutionarily conserved U5 snRNP-specific protein is a GTP-binding factor closely related to the ribosomal translocase EF-2. Embo j. 1997;16(13):4092-106.
195. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. Cell. 2009;136(4):701-18.

196. Lei L, Yan SY, Yang R, Chen JY, Li Y, Bu Y, et al. Spliceosomal protein eftud2 mutation leads to p53-dependent apoptosis in zebrafish neural progenitors. Nucleic Acids Res. 2017;45(6):3422-36.
197. Solomon BD. VACTERL/VATER Association. Orphanet J Rare Dis. 2011;6:56.
198. Quan L. The VATER association: vertebral defects, anal atresia, tracheoesophageal fistula with esophageal atresia, radial dysplasia. Birth Defects. 1972;8:75-8.
199. Khoury MJ, Cordero JF, Greenberg F, James LM, Erickson JD. A population study of the VACTERL association: evidence for its etiologic heterogeneity. Pediatrics. 1983;71(5):815-20.
200. Sujansky E, Leonard B, editors. VACTERL association with hydrocephalus-a new recessive syndrome. AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS; 1983: UNIV CHICAGO PRESS 5720 S WOODLAWN AVE, CHICAGO, IL 60637.
201. Froster U, Wallner S, Reusche E, Schwinger E, Rehder H. VACTERL with hydrocephalus and branchial arch defects: prenatal, clinical, and autopsy findings in two brothers. American journal of medical genetics. 1996;62(2):169-72.
202. Garcia-Barceló MM, Wong KKy, Lui VCh, Yuan Zw, So Mt, Ngan ESw, et al. Identification of a HOXD13 mutation in a VACTERL patient. American Journal of Medical Genetics Part A. 2008;146(24):3181-5.
203. Gershoni-Baruch R, Machoul I, Weiss Y, Blazer S. Unknown syndrome: radial ray defects, omphalocele, diaphragmatic hernia, and hepatic cyst. Journal of medical genetics. 1990;27(6):403.
204. Valfrè L, Baban A, Digilio MC, Bevilacqua F, Bagolan P, Conforti A. Gershoni-Baruch syndrome: First report of a surviving child. American Journal of Medical Genetics Part A. 2016;170(3):707-11.
205. Franceschini P, Guala A, Licata D, Botta G, Flora F, Angeli G, et al. Gershoni–Baruch syndrome: report of a new family confirming autosomal recessive inheritance. American Journal of Medical Genetics Part A. 2003;122(2):174-9.
206. Galjaard R-JH, Kostakoglu N, Hoogeboom JJ, Breedveld GJ, van der Linde HC, Hovius SE, et al. X-linked recessive inheritance of radial ray deficiencies in a family with four affected males. European Journal of Human Genetics. 2001;9(9):653-8.
207. Siegler RL, Larsen P, Buehler BA. Upper limb anomalies and renal disease. Clinical Genetics. 1980;17(2):117-9.

208. Hodes M, Gleiser S, DeRosa G, Yune H, Girod D, Weaver D, et al. Trisomy 7 mosaicism and manifestations of Goldenhar syndrome with unilateral radial hypoplasia. Journal of craniofacial genetics and developmental biology. 1981;1(1):49-55.
209. Vendramini S, Richieri-Costa A, Guion-Almeida ML. Oculoauriculovertebral spectrum with radial defects: a new syndrome or an extension of the oculoauriculovertebral spectrum? Report of fourteen Brazilian cases and review of the literature. European Journal of Human Genetics. 2007;15(4):411-21.
210. Moeschler J, Clarren SK, Opitz JM. Familial occurrence of hemifacial microsomia with radial limb defects. American journal of medical genetics. 1982;12(4):371-5.
211. Wieczorek D, Köster B, Gillessen-Kaesbach G. Absence of thumbs, A/hypoplasia of radius, hypoplasia of ulnae, retarded bone age, short stature, microcephaly, hypoplastic genitalia, and mental retardation. American journal of medical genetics. 2002;108(3):209-13.
212. Fischer S, Kohlhase J, Böhm D, Schweiger B, Hoffmann D, Heitmann M, et al. Biallelic loss of function of the promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) gene causes severe skeletal defects and genital hypoplasia. Journal of medical genetics. 2008;45(11):731-7.
213. Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews. 2015;105(2):140-56.
214. Goyal M, Gupta A, Sharma M, Mathur P, Bansal N. Fetal valproate syndrome with limb defects: an Indian case report. Case Reports in Pediatrics. 2016;2016.
215. Verloes A, Frikiche A, Gremillet C, Paquay T, Decortis T, Rigo J, et al. Proximal phocomelia and radial ray aplasia in fetal valproic syndrome. European journal of pediatrics. 1990;149:266-7.
216. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. 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(5):405-24.
217. Alagbe OA, Alagbe AE, Onifade EO, Bello TO. Thrombocytopenia with absent radii (TAR) syndrome in a female neonate: a case report. Pan Afr Med J. 2019;33:181.
218. Brodie SA, Rodriguez-Aulet JP, Giri N, Dai J, Steinberg M, Waterfall JJ, et al. 1q21. 1 deletion and a rare functional polymorphism in siblings with thrombocytopenia-absent radius–like phenotypes. Molecular Case Studies. 2019;5(6):a004564.

219. Monteiro C, Gonçalves A, Oliveira J, Salvado R, Tomaz J, Morais S, et al. Thrombocytopenia-absent radius syndrome: descriptions of three new cases and a novel splicing variant in rbm8a that expands the spectrum of null alleles. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(17):9621.
220. Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. Genetics in medicine. 2011;13(9):777-84.
221. Lin AE, Haldeman-Englert CR, Milunsky JM. Branchiooculofacial syndrome. 2018.
222. Williams T, Admon A, Lüscher B, Tjian R. Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. Genes & development. 1988;2(12a):1557-69.
223. Davies AF, Mirza G, Flinter F, Ragoussis J. An interstitial deletion of 6p24-p25 proximal to theFKHL7 locus and includingAP-2α that affects anterior eye chamber development. Journal of medical genetics. 1999;36(9):708-10.
224. Milunsky JM, Maher TA, Zhao G, Roberts AE, Stalker HJ, Zori RT, et al. TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. The American Journal of Human Genetics. 2008;82(5):1171-7.
225. Milunsky JM, Maher TM, Zhao G, Wang Z, Mulliken JB, Chitayat D, et al. Genotype-phenotype analysis of the branchio-oculo-facial syndrome. Am J Med Genet A. 2011;155a(1):22-32.
226. Li H, Sheridan R, Williams T. Analysis of TFAP2A mutations in Branchio-Oculo-Facial Syndrome indicates functional complexity within the AP-2α DNA-binding domain. Hum Mol Genet. 2013;22(16):3195-206.
227. Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, et al. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. Nature. 1996;381(6579):238-41.
228. Zhang J, Williams T. Identification and regulation of tissue-specific cis-acting elements associated with the human AP-2α gene. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 2003;228(2):194-207.

229. Li W, Cornell RA. Redundant activities of Tfap2a and Tfap2c are required for neural crest induction and development of other non-neural ectoderm derivatives in zebrafish embryos. Dev Biol. 2007;304(1):338-54.
230. Gestri G, Osborne RJ, Wyatt AW, Gerrelli D, Gribble S, Stewart H, et al. Reduced TFAP2A function causes variable optic fissure closure and retinal defects and sensitizes eye development to mutations in other morphogenetic regulators. Hum Genet. 2009;126(6):791-803.
231. Orso F, Fassetta M, Penna E, Solero A, Filippo KD, Sismondi P, et al., editors. The AP-2a transcription factor regulates tumor cell migration and apoptosis. Advances in Molecular Oncology: Edited under the auspices of the European Institute of Oncology (IEO) and The FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation (IFOM); 2007: Springer.
232. Galliani E, Burglen L, Kadlub N, Just W, Sznajer Y, de Villemeur TB, et al. Craniofacial phenotype in the branchio-oculo-facial syndrome: four case reports. Cleft Palate Craniofac J. 2012;49(3):357-64.
233. Ahituv N, Erven A, Fuchs H, Guy K, Ashery-Padan R, Williams T, et al. An ENU-induced mutation in AP-2alpha leads to middle ear and ocular defects in Doarad mice. Mamm Genome. 2004;15(6):424-32.
234. Lin J, Ji Z, Di Z, Zhang Y, Yan C, Zeng S. Overexpression of Tfap2a in Mouse Oocytes Impaired Spindle and Chromosome Organization. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(22):14376.
235. Toksoy G, Uludağ Alkaya D, Bagirova G, Avcı Ş, Aghayev A, Günes N, et al. Clinical and molecular characterization of Fanconi Anemia patients in Turkey. Molecular syndromology. 2020;11(4):183-96.
236. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, et al. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. Blood. 2004;103(7):2498-503.
237. Savage SA, Ballew BJ, Giri N, Laboratory NDCGR, Chandrasekharappa SC, Ameziane N, et al. Novel FANCI mutations in Fanconi anemia with VACTERL association. American Journal of Medical Genetics Part A. 2016;170(2):386-91.
238. Faivre L, Portnoï MF, Pals G, Stoppa-Lyonnet D, Le Merrer M, Thauvin-Robinet C, et al. Should chromosome breakage studies be performed in patients with VACTERL association? Am J Med Genet A. 2005;137(1):55-8.

239. Alter BP, Rosenberg PS. VACTERL-H Association and Fanconi Anemia. Mol Syndromol. 2013;4(1-2):87-93.
240. Şahin A, Toksoy G, BAĞIROVA G, Altunoğlu U, Karaman B, Başaran S, et al. Clinical classification of radial ray defects and research into etiopathogenesis. Journal of Istanbul Faculty of Medicine. 2018;81(4):127-38.
241. da Rocha LA, Pires LVL, Yamamoto GL, Magliocco Ceroni JR, Honjo RS, de Novaes França Bisneto E, et al. Congenital limb deficiency: Genetic investigation of 44 individuals presenting mainly longitudinal defects in isolated or syndromic forms. Clinical Genetics. 2021;100(5):615-23.

EKLER

EK-1: Etik Kurul Onay Belgesi

EK-2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İstanbul Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067-32347)

MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Proje Adı: Fetal Radyal Aplazi / Hipoplazi Olgularının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması

Bu proje kapsamında, prenatal ultrasonografi veya postmortem fizik muayene ile radyal aplazi/ hipoplazi saptanan fetal olgularda tüm ekzom dizileme yöntemi ile patogenezde rol oynayan genlerin ve mutasyonların belirlenmesi hedeflenmektedir.

Radyal aplazi/hipoplazi tablosunun etiyopatogenezinde çok sayıda gen yer almakta olup etkilenmiş olgularda sorumlu gen ve mutasyonların belirlenmesi, ailelerin olası ileri gebeliklerinde benzer etkilenmiş gebelik ürünü riskinin netleştirilmesi ve bu yönde prenatal/preimplantasyon genetik tanı olanaklarına katkı sağlaması açısından önemlidir. Bu amaçla, çalışmamız kapsamında, radyal aplazi/hipoplazi saptanan fetuslara ait dokulardan ve anne baba adaylarından alınacak periferik kan örneklerinden DNA eldesi yapılarak genetik tetkikler yapmayı planlıyoruz. Size ve ailenize yardımcı olmak amacıyla bu hastalıkların tanısında kullanılan ileri aşama laboratuar tetkiklerini kendi laboratuarımızda yaparak çalışmaya katılan ailelere kolaylıkla uygulanmasını sağlamak istiyoruz.

Bu çalışmaya katılmaya davet edildiniz; ancak karar vermeden önce çalışmanın riskleri ve yararları konusunda sizleri bilgilendirmek istiyoruz. **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu** okuduktan sonra katılmayı kabul ediyorsanız formu imzalamanız gerekmektedir.

1. Projeye Katılım için Gerekli Kriterler:
Projemize prenatal ultrasonografi veya postmortem klinik muayene ile radyal aplazi/hipoplazi saptanan gebelik ürünlerinin dahil edilmesi planlanmıştır.

2. Yapılacak işlemin tanımı:
Prenatal ultrasonografi veya tarafımızca yapılmış olan postmortem fetal klinik genetik değerlendirmede **radyal aplazi/hipoplazi saptanan olgularımızdan, 4mm çapında fetal deri örneklerinden DNA bankalama prosedürü daha önce onamınız dahilinde gerçekleştirilmişti.** TED yapılabilmesi amacıyla biyolojik örnek olarak fetal deri örneklerinin kullanılması planlanmıştır. Moleküler analizlerde indekste bir varyant saptanması durumunda, aile içi segregasyon analizlerinin yapılabilmesi amacıyla, sizlerden 2 ml kan örneği alınması gerekecektir. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır.

3. Örnek Alımının Olası riskleri:
Kan Örneği alımı sırasında oluşabilecek riskler; Kan örnekleri alınırken K_3EDTA'lı mor kapaklı tüpe alınan örnek bu çalışma amacıyla kullanılacaktır. Bu işleme bağlı; (1) İğne-batması sırasında hafif bir acı duyulabilir, (2) iğne batması sonrasında çok nadiren de olsa enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:
Yapılacak testler, sizin ve ailenizdeki diğer bireylerin, olası gebeliklerinde bu genetik hastalık açısından tekrar riski olduğunu ortaya çıkarabilir ve bu bilgi sizde psikolojik sorun yaratabilir. Elde edilen sonuçlar sizinle

paylaşılacaktır. Bu bilgiyi öğrenmeyi tamamen reddedebilirsiniz. Bu çalışma ile elde edilecek genetik bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır ve başkaları ile paylaşılmayacaktır, bilginin paylaşımı sadece sizin izninize bağlı olacaktır.

Size ve gebelik ürünlerinize ait kan ve doku örnekleri sadece bu çalışma için kullanılacaktır.

Bu tip çalışmalarda, polimorfizm veya nadir genetik varyantlar ya da teknik sorunlar gibi yanlış tanıya yol açabilecek potansiyel tanı hatalarının olabileceği daima göz önünde tutulmalıdır. Ailelerin, bütün bu nedenlerle nadir de olsa tanı hatalarının olabileceğinin bilincinde olmaları önemlidir.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı, ailenizde görülen hastalığa neden olan genetik faktörlerin araştırılmasıdır. Biz bu aşamada henüz yapılacak testlerin, size ve ailenize doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını bilmiyoruz. Fakat bu çalışmalar tamamlandığında, testlerde sonuç elde edilebilmesi durumunda, olası gebeliklerinizde tekrar riski ve yönde prenatal/preimplantasyon genetik tanı seçeneklerinin sunulabilme ihtimali olduğunu belirtmek istiyoruz. Ayrıca, kesin olan bir diğer nokta da araştırma tamamlandıktan sonra bu klinik tablonun nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece hem sizlere hem de gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizdir.

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

Hastanın/Katılımcının Beyanı

Sayın Dr..... tarafından .....(kurum adı)..... (anabilim dalı adı, ünite adı vb.)'da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle oluşabilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi (bu tıbbi girişimler ile ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; mesai saatleri içinde, +902124142000/32564 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda olmadığımı biliyorum. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yapılacak testlerin önerilme nedenleri, riskleri, testlerin anlamı ve doğruluk oranları hakkında ayrıntılı bilgi verildi.

Yapılması önerilen testler ile ilgili bilgileri okudum ve anladım.

□ Testlerin yapılmasına izin veriyorum.
□ Sonuçlarımın……ile paylaşılmasına izin veriyorum.
□ Sonuçların isim belirtilmeden bilimsel yayınlarda kullanılmasına izin veriyorum.

Hastalığımla ilgili yapılacak araştırma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

□ Biyolojik örneklerimin sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
□ Biyolojik örneklerimin saklanarak, ileride yapılacak tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
□ Biyolojik örneklerimin hiçbir koşulda saklanmasına ve kullanılmasına izin vermiyorum.

Tarih:
Genetik Danışmanın adı ve imzası

İncelenecek kişi/kişilerin ad(lan) ve imza(lar)ı:

İncelenecek kişinin (18 yaş altı ise) velisinin adı ve imzası:

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı

*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

EK-3: Hasta Takip Formu

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Fetal Radyal Aplazi / Hipoplazi Olgularının Genetik Etiyolojisinin Araştırılması

Hasta Takip Formu

T.C.Kimlik No:
Tarih:
Olgu No:

Ad Soyad:
Protokol No:
Gestasyon Haftası:
DNA No:
Anne Adı Soyadı:
Cinsiyet:
Adres Bilgileri:
Tel:

Akrabalık:

Prenatal Öykü:

Perinatoloji - Tıbbi Genetik konsey değerlendirmesi / II. Düzey US:

Aile ağacı:

Postmortem fetal fizik muayene:

Postmortem radyolojik bulgular:

Fetal karyotip ve array analizi:

Ek genetik tetkikler:

ÖZGEÇMİŞ