T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

RADİYAL IŞIN DEFEKTLERİNİN KLİNİK SINIFLANDIRMASI VE ETYOPATOGENEZİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Şahin Avcı

Tıpta Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner

İstanbul

2015

Ailem'e…

Tez çalışmam boyunca en yoğun zamanlarında bile güler yüzünü ve yardımlarını esirgemeyen, tez danışman hocam sayın *Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner*'e,

Tezimi büyük bir özveri ve sabır ile okuyarak yol gösteren ve fikirlerini esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim sayın *Prof.Dr. Seher Başaran*'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca kendisiyle çalışabilme, bilgi ve tecrübelerinden yararlanabilme şansını yakaladığım, bana çok şey öğreten, zekasına çalışkanlığına hayran olduğum sayın *Prof. Dr. Hülya Kayserili Karabey*'e,

Özellikle sitogenetik ve moleküler sitogenetik konusunda tezime destek veren, bana çok şey öğreten sayın *Doç.Dr. Birsen Karaman*'a,

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve tecribelerinden yararlandığım sayın hocalarım *Prof.Dr. Şükrü Palandüz*, *Prof. Dr. Şükrü Öztürk* ve *Prof. Dr. Kıvanç Çefle*'ye

Yeni nesil dizileme çalışmalarında yol gösteren ve bana çok şey öğreten, abim olarak bildiğim, sayın *Dr. Güven Toksoy*'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana destek olan sayın *Gülendam Bagirova* ve tüm moleküler laboratuvarı çalışanlarına,

Eğitimim sırasında klinik anlamda kendisinden birçok şey öğrendiğim sayın *Uzm.Dr. Umut Altunoğlu*'na ve tüm Tıbbi Genetik poliklinik ve laboratuvar çalışanlarına,

Bana her zaman destek olan, moral ve neşe kaynağım, sevgili eşim *Zeynep*'e,

Beni bu günlere getiren, üzerimde çok emekleri olan sevgili *aileme*,

En içten teşekkürlerimle.

Dr. Şahin Avcı, 2015.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir [Proje No: 53123].

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ……I

İÇİNDEKİLER…….II

TABLO LİSTESİ…….VII

ŞEKİL LİSTESİ……..VIII

KISALTMALAR……..IX

ÖZET……..X

ABSTRACT……XII

1. GİRİŞ VE AMAÇ…….....1

2. GENEL BİLGİLER……...3

2.1. Üst Ekstremite Anomalilerinin Sınıflandırması…….3

2.1.1. Oluşum Bozuklukları……...3

2.1.2. Farklılaşma bozuklukları……5

2.1.3. Duplikasyonlar…….5

2.1.4. Aşırı büyüme……6

2.2. Üst Ekstremitenin Embriyolojisi……..6

2.3. Radiyal Işın Defekti ile Giden Tek Gen Sendromları……9

2.3.1. Holt-Oram Sendromu……....10

2.3.1.1. Holt-Oram Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez……..11

2.3.2 Fanconi Anemisi……...11

2.3.2.1. Fanconi anemisi'nde tanı……..13

2.3.2.2. Fanconi Anemisi'nde Moleküler Etyopatogenez……....15

2.3.2.3. Fanconi Anemisi'nde Tedavi…….17

2.3.3. TAR Sendromu……20

2.3.3.1. TAR Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez……..21

2.3.3.2. TAR sendromu'nda Tedavi……...22

2.3.4. Cornelia de Lange Sendromu…….23

2.3.4.1. Cornelia de Lange Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez……..25

2.3.5. Roberts Sendromu……...26

2.3.5.1. Roberts Sendromu'nda Tanı: Erken Sentromer Ayrışması……28

2.3.5.2. Roberts Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez…….28

2.3.6. *SALL4* İlişkili Fenotipler…….29

2.3.6.1. DRRS'de Moleküler Etyopatogenez…….30

2.3.7. Townes-Brocks Sendromu……...31

2.3.7.1. Townes-Brocks Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez…….33

2.3.8. *RECQL4* İlişkili Fenotipler……..34

2.3.8.1. Baller-Gerold Sendromu…….34

2.3.8.2. Rothmund-Thomson Sendromu…….36

2.3.8.3. RAPADILINO Sendromu……...38

2.3.8.4. *RECQL4* İlişkili Fenotiplerde Moleküler Etyopatogenez…….39

2.3.9. Nager sendromu (Akrofasiyal Dizostoz, Nager Tip)……...40

2.3.9.1 Nager sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez……41

2.3.10. Mandibulofasiyal Dizostoz, Guion-Almeida Tip…….....42

2.3.10.1. MFDGA'da Moleküler Etyopatogenez…….43

2.3.11. Diamond-Blackfan Anemisi……44

2.3.11.1. Diamond-Blackfan Anemisinde Moleküler Etyopatogenez……45

2.3.12. İskelet Anomalileri-Genital Hipoplazi-Mental Retardasyon……....47

2.4. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri……...48

3. GEREÇ VE YÖNTEM……....53

3.1. Çalışma Grubu……53

3.2. Yöntemler……53

3.2.1. Klinik değerlendirmeler……53

3.2.2. Sitogenetik yöntemler……...53

3.2.2.1. HRBT (*High Resolution Banding Techniques*) ile kromozom analizi…….53

3.2.2.1.1. Periferik Kan Lenfosit Kültürü……..53

3.2.2.1.2. Kromozom Eldesi……....54

3.2.3. Moleküler yöntemler…….54

3.2.3.1. DNA eldesi…….54

3.2.3.2. DNA Kalite Araştırması ve Seyreltme İşlemleri…….55

3.2.3.3. Qubit® 3.0 Florometre İle DNA Yoğunluklarının Ölçümü……...55

3.2.3.4. Yeni Nesil Dizileme (YND)……...55

3.2.3.4.1. YND Paneli İçin Hedef Bölgelerin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı…..55

3.2.3.4.2. Hedef Bölgelere Ait *Hotspot* Dosyasının Oluşturulması……56

3.2.3.4.3. Kütüphane hazırlanması…….56

3.2.3.4.3.1. Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması……....58

3.2.3.4.3.2. Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi……..59

3.2.3.4.3.3. Barkod ve Adaptörlerin Bağlanması……59

3.2.3.4.3.4. Çoğaltılmamış Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması……60

3.2.3.4.3.5. Çoğaltılmamış Kütüphane Ürünlerinin Kantitatif PZR ile Yoğunluk Tayini……..61

3.2.3.4.4. Taslak (*Template*) Hazırlanması……..62

3.2.3.4.4.1. Emülsiyon PZR……....63

3.2.3.4.5. Emülsiyon PZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi…….64

3.2.3.4.5.1 *Melt-Off* Çözeltisinin Hazırlanması……..64

3.2.3.4.5.2. Streptavidin C1 Boncuklarının Yıkanması……64

3.2.3.4.5.3. Sekiz Kuyulu Levhanın Doldurulması……64

3.2.3.4.6. Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi……..65

3.2.3.4.7. Veri Analizi……66

3.2.3.5 YND İle Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme İle Konfirmasyonu……66

3.2.3.5.1. Primerlerin Tasarlanması…….66

3.2.3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)……67

3.2.3.5.3 PZR Saflaştırması (Enzimatik Yöntem İle)……..67

3.2.3.5.4. Dizi Analizi……..67

3.2.3.5.4.1. DNA Dizi Analizi……...67

3.2.3.5.4.2. Dizi PZR Reaksiyonu……67

3.2.3.5.4.3. Dizi Reaksiyon Ürünlerinin Saflaştırılması……68

3.2.3.5.4.4. Elektroforez Cihazına Yükleme……..68

3.2.3.5.4.5. Elektroforez Sonuçları ve Değerlendirilmesi……..68

4. BULGULAR……70

4.1.1. Aile RID-1: Klinik bulgular……71

4.1.2. Aile RID-1: Moleküler bulgular…….....72

4.2.1.Aile RID-2: Klinik bulgular……..74

4.2.2. Aile RID-2: Moleküler bulgular……..76

4.3.1. Aile RID-3: Klinik bulgular……77

4.3.2. Aile RID-3: Moleküler bulgular……..78

4.4.1. Aile RID-4: Klinik bulgular……79

4.4.2. Aile RID-4: Moleküler bulgular……..81

4.5.1. Aile RID-5: Klinik bulgular……82

4.5.2. Aile RID-5: Moleküler bulgular……..83

4.6.1. Aile RID-6: Klinik bulgular……84

4.6.2. Aile RID-6: Moleküler bulgular……..87

4.7.1. Aile RID-7: Klinik bulgular……87

4.7.2. Aile RID-7: Moleküler bulgular……..89

4.8.1. Aile RID-8: Klinik bulgular……90

4.8.2. Aile RID-8: Moleküler sonuçlar……..91

4.9.1. Aile RID-9: Klinik bulgular……92

4.9.2. Aile RID-9: Moleküler sonuçlar……..93

4.10.1. Aile RID-10: Klinik bulgular…….94

4.10.2. Aile RID-10: Sitogenetik sonuçlar…….96

4.11.1. Aile RID-11: Klinik bulgular…….97

4.11.2. Aile RID-11: Sitogenetik sonuçlar…….99

5.TARTIŞMA……103

6.KAYNAKLAR……...115

7.EKLER……126

8.ÖZGEÇMİŞ……133

TABLO LİSTESİ

Tablo 2-1: Konjenital Ekstremite Anomalilerinin Embriyolojik Sınıflandırması…….4
Tablo 2-2: Fanconi anemisinde gözlenen fiziksel anomaliler……...14
Tablo 2-3: Fanconi Anemisi İle İlişkili Genler……16
Tablo 2-4: *RECQL4* İlişkili Fenotiplerin Klinik Karşılaştırması……..38
Tablo 2-5: MFDGA ve Nager sendromunda Gözlenen Klinik Bulgular……..42
Tablo 2-6: DBA'da Gözlenen Fiziksel Anomaliler……..45
Tablo 2-7: DBA'da İlişkili Genler, Mutasyon Oranları ve Kalıtım Modelleri…….46
Tablo 2-8: Ion Torrent Platformunda Kullanılan Çipler ve Özellikleri……51
Tablo 2-9: Farklı yeni nesil dizileme platformlarının karşılaştırılması……52
Tablo 3-1: RID İle Giden Sendromlar İçin Oluşturulan YND Panelinde Yer Alan Genler ve İlişkili Fenotipler……...57
Tablo 3-2: 2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks……....58
Tablo 3-3: PZR solusyonları…….58
Tablo 3-4: Hedef Bölgelerin Çoğaltılmasında Kullanılan Termal Döngü Programı……59
Tablo 3-5: Primer Dizilerinin Kesimi İçin Kullanılan Termal Döngü Programı……..59
Tablo 3-6: Örnek Barkod Adaptör Karışımı…….59
Tablo 3-7: Barkod-Adaptör Ligasyon Solusyonu……...60
Tablo 3-8: Ligasyon İçin Kullanılan Termal Döngü Programı…….60
Tablo 3-9: Kantitatif PZR İçin Örnek Başına Hazırlanan Karışım……...62
Tablo 3-10: Gerçek Zamanlı PZR İçin Kullanılan Termal Döngü Programı…….....62
Tablo 3-11: Taslak Hazırlanmasında Kullanılan Kitler ve İçerikleri……...62
Tablo 3-12: Emülsiyon PZR İçin Hazırlanan Amplifikasyon Çözeltisi……..63
Tablo 3-13: Sekiz Kuyulu Levhanın Doldurulması……64
Tablo 3-14: Dizileme Planı…….65
Tablo 4.1: Çalışma grubunda değerlendirilen olgulardaki moleküler ve sitogenetik bulgular……...70
Tablo 4.2.: Yeni Nesil Dizileme İle Mutasyon Saptanmayan Olgular……..100

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2-1: Ekstremite Büyümesinin Pozitif ve Negatif Geri-besleme İle Kontrolü……8
Şekil 2-2: FA yolağı……..19
Şekil 2-3: Kohezin Kompleksi ve İlişkili Proteinler……26
Şekil 2-4: Roberts sendromlu bir olgunun metafaz kromozomlarında C-bantlama……28
Şekil 2-5: *SALL1* proteininin üç boyutlu görüntüsü……33
Şekil 2-6: Tipik bir RTS olgusu……36
Şekil 2-7: İskelet Anomalileri-Genital Hipoplazi-Mental Retardasyonlu bir olgu……...47
Şekil 2-8: Ion Torrent ve Miseq platformlarında taslak hazırlama aşamaları……..50
Şekil 2-9: Ion Torrent Ion Chip'in yapısı ve uygun bazın diziye girmesi sonucu H^+ salınımı.....51
Şekil 4.1: Aile RID-1, fotoğraflar ve aile ağacı……...73
Şekil 4.2: Aile RID-1, moleküler sonuçlar……74
Şekil 4.3: Aile RID-2, fotoğraflar ve aile ağacı……...75
Şekil 4.4: Aile RID-2, moleküler sonuçlar……76
Şekil 4.5: Aile RID-3, fotoğraflar ve aile ağacı……..78
Şekil 4.6: Aile RID-3, moleküler sonuçlar……79
Şekil. 4.7:Aile RID-4, fotoğraflar ve aile ağacı……..80
Şekil 4.8: Aile RID-4, moleküler sonuçlar……81
Şekil 4.9: Aile RID-5, fotoğraflar ve aile ağacı……..83
Şekil 4.10: Aile RID-5, moleküler sonuçlar……...84
Şekil 4.11: Aile RID-6, fotoğraflar ve aile ağacı……86
Şekil 4.12: Aile RID-6, moleküler sonuçlar……...87
Şekil 4.13: Aile RID-7, fotoğraflar ve aile ağacı……89
Şekil 4.14: Aile RID-7, moleküler sonuçlar ……..90
Şekil 4.15: Aile RID-8, fotoğraflar ve aile ağacı……92
Şekil 4.16: Aile RID-9, fotoğraflar ve grafiler……93
Şekil 4.17: Aile RID-9, moleküler sonuçlar……94
Şekil 4.18: Aile RID-10, fotoğraflar ve aile ağacı……96
Şekil 4.19: Aile RID-10, karyotip görüntüsü……...97
Şekil 4.20: Aile RID-11, fotoğraflar ve aile ağacı……....98
Şekil 4.21: Aile RID-11, karyotip görüntüsü……...99

KISALTMALAR

AFD: Akrofasiyal dizostozlar
AML: Akut myeloid lösemi
Array-CGH: Array-comparative genomic hybridisation
ASD: Atriyal septal defekt
AVSD: Atriyoventriküler septal defect
BMPs: bone morphogenetic proteins
BGS: Baller Gerold sendromu
cDNA: Complementary (tamamlayıcı) DNA
DBA: Diamond-Blackfan anemisi
ddNTP: dideoxynucleoside triphosphate
DEB: Diepoksibütan
EKG: Elektrokardiyografi
EKO: Ekokardiyografi
FGFs: Fibroblast growth factors
GH: Gebelik haftası
HGMD: Human Gene Mutation Database
HRBT: High Resolution Banding Techniques
IUBG: İntrauterin büyüme geriliği
MDS: Miyelodisplastik sendrom
MFDGA: Mandibulofasiyal Dizostoz, Guion-Almeida Tip
NTM: Nitrojen Mustard
PDA: Patent duktus arteriozus
PEV: Pes ekinovarus
PFO: Patent foramen ovale
PTHrP: Parathyroid hormone-related peptide
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
RID: Radiyal ışın defektleri
RP: Ribozomal protein
RTS: Rothmund-Thomson sendromu
SD: Standart deviasyon
SGA: Small for gestational age
SHH: Sonic hedgehog
SNP: Single nucleotide polymorphism
US: Ultrasonografi
VSD: Ventriküler septal defekt
YND: Yeni Nesil Dizileme

ÖZET

RADİYAL IŞIN DEFEKTLERİNİN KLİNİK SINIFLANDIRMASI VE ETYOPATOGENEZİNİN ARAŞTIRILMASI

Yenidoğanların %1-2'sinde gözlenen konjenital anomalilerin % 10'unu üst ekstremite anomalileri oluşturur. Radiyal ışın defektleri, radius, el bileğinde yer alan skafoid ve trapezium kemiği, birinci metakarpal kemik ve el başparmağının hipo- veya aplazisine neden olan gelişimsel defekt ile karakterizedir ve 1/30.000 prevalansı ile üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalisidir. Radiyal ışın defektleri; izole, sendromik veya eşlik eden ek anomaliler ile birlikte gözlenebilir. İzole radiyal ışın defektleri olguların yaklaşık % 30'unu oluştururken, radiyal ışın defektlerinin 2/3'ü sendromlar veya eşlik eden ek anomaliler ile birlikte gözlenir. Holt-Oram sendromu, VACTERL birlikteliği, Fanconi anemisi, TAR sendromu ve trizomi 18 radiyal ışın defektlerinin sendromik formları içerisinde en sık gözlenenleridir. Bununla birlikte, Okihiro sendromu, Cornelia de Lange sendromu, Townes-Brocks sendromu, Roberts sendromu gibi radiyal ışın defektlerinin gözlendiği daha birçok sendrom mevcuttur.

Bu çalışmada, 2004-2014 yılları arasında kliniğimizde radiyal ışın defekti bulgusu ile değerlendirilen 37 aileden 48 etkilenmiş olgu klinik, moleküler ve sitogenetik bulguları ile incelendi. Olgu grubundan 2 ailede sitogenetik analizde kromozom anomalisi (trizomi 18 ve ailevi t(2;12)(q31;q24.3)) saptanmıştı. Dört ailede ise ilişkili genlerdeki (*SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*, *FANCA*) mutasyonlar çalışma öncesinde yapılan moleküler analizlerde belirlenmişti. Çalışma kapsamında 31 ailenin indeks olgularında, radiyal ışın defektleri için tasarladığımız hedefe yönelik yeni nesil dizileme paneli ile 14 farklı fenotip ile ilişkili 43 gen dizilenerek analiz edildi. Beş ailede, 4 farklı gende (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*) 6 farklı mutasyon saptandı. Sonuç olarak, radiyal ışın defekti nedeniyle değerlendirilen 37 ailenin 2'sinde (% 5.4) kromozom anomalisi ve 9'unda (% 24.3) 7 farklı gende (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*, *SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*) 9 farklı mutasyon saptandı. Saptanan mutasyonlar yanlış anlamlı mutasyon (n:2), kırpılma bölgesi mutasyonu (n:3) ve çerçeve kayması mutasyonu (n:4) idi. Bu mutasyonlardan beşi daha önce tanımlanmış bilinen, dördü ise ilk kez bu çalışmada tanımlanan yeni mutasyonlardı.

Bulgularımız, radiyal ışın defektleri ile giden sendromlar içerisinde en sık Holt-Oram sendromu, Fanconi anemisi ve VACTERL birlikteliğinin gözlendiğini; radiyal ışın defekti saptanan olgularda 42 gen içeren yeni nesil dizileme panelimizin olguların moleküler

tanılarına önemli oranda katkı sağlayabileceğini; bununla birlikte, radiyal ışın defektleri ile ilişkili bilinen gen sayısının artması ve panele eklenmesi ile bu katkının önemli oranda artabileceğini; radiyal ışın defektlerinin etyopatogenezinde kromozom anomalilerinin de mutlaka akılda bulundurulması ve panel çalışmadan önce dışlanması gerektiğini gösterdi.

ABSTRACT

CLINICAL CLASSIFICATION OF RADIAL RAY DEFECTS AND RESEARCHING OF ETIOPATHOGENESIS

Congenital anomalies affect 1-2 % of newborns, and within this group 10 % occupies the newborns with upper extremity abnormalities. Radial ray defect is characterized by a developmental defect leading to hypo- or aplasia of radius, within the carpus the scaphoid bone and the trapezium bone, the first metacarpal bone and the thumb, and is the most common congenital abnormality of the upper extremities with a prevalence of 1:30,000. Radial ray defects might be seen as isolated, syndromic or with additional abnormalities. Two third of the cases are syndromic or with additional abnormalities while about 30 % of the cases are isolated. Holt-Oram syndrome, VACTERL association, Fanconi anemia, TAR syndrome and trisomy 18 are the most common syndromes with radial ray defects. There are further other syndromes with radial ray defects such as Okihiro syndrome, Cornelia de Lange syndrome, Townes-Brocks syndrome and Robets syndrome.

In this study, 48 affected cases, from 37 families, that were referred for genetic consultation due to radial ray defects, between the years of 2004-2014, were evaluated with clinical, molecular and cytogenetics findings. In this study group, chromosomal abnormalities (a trisomy 18 and a familial t(2;12)(q31;q24.3)) in two families, and mutations in related genes (*SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*, *FANCA*) in four families were previously identified before this study. 31 index cases were screened for 43 associated genes of 14 syndromes, with radial ray defects, by designed targeted panel for Next Generation Sequencing method. Five different mutations in four genes (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*) in this study, and four different mutations in previous tests, adding up to the identification of nine different mutations in nine different families. Our study presented, chromosome abnormalities in 2 of 37 families (5.4 %), and DNA mutations in 9 of 37 families (24.3 %), showing the mutation detection rate of our selected genes. The mutations were missense mutations (n:2), splice-site mutations (n:3), and frame-shift mutations (n:4). Five mutations were known, and 4 mutations were novel.

Our findings showed that the most frequent syndromes with radial ray defects were Holt-Oram syndrome, Fanconi anemia and VACTERL association; our targeted next generation sequencing panel could contribute for molecular diagnosis of cases with radial ray defects; however, updating the panel, by adding further novel genes related to radial ray defects, will

be able to increase this contribution, and chromosomal abnormalities should always be considered and excluded before panel gene screening.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğanların %1-2'sinde gözlenen konjenital anomalilerin % 10'unu üst ekstremite anomalileri oluşturur (1). Diğer bir ifadeyle, konjenital üst ekstremite anomalilerinin sıklığı yaklaşık 600 yenidoğanda 1'dir ve konjenital kalp anomalilerinden sonra ikinci sırada yer alır (1, 2). Konjenital ekstremite anomalilerinin etiyolojisinde tek gen hastalıkları (Fanconi anemisi, TAR sendromu, Holt-Oram sendromu vd.), kromozom anomalileri (trizomi 18), teratojen maruziyetleri (talidomid, mizoprostol), 9. gebelik haftasından önce uygulanan koryon villus örneklemesi) yer alır (3).

Konjenital ekstremite anomalilerinin birçok sınıflandırması yapılmış olmakla birlikte en çok kabul gören ve kullanılanı, embriyolojik gelişim ve klinik tanı temellerine dayalı Swanson sınıflamasıdır (1). Bu sınıflamaya göre konjenital ekstremite anomalileri; (i) oluşum bozuklukları, (ii) farklılaşma bozuklukları, (iii) duplikasyonlar, (iv) aşırı büyümeler, (v) yetersiz büyümeler, (vi) konstrüksiyon bant sendromu (vii) generalize iskelet anomalileri olmak üzere 7 ana gruba ayrılmıştır. Fertilizasyondan sonraki 26-28. günde başlayan ve 4 haftada tamamlanan ekstremite oluşumu sürecindeki sorunlar, oluşum bozuklukları grubunda yer alan ekstremite anomalilerine (transvers defektler, longitudinal defektler) yol açarken; oluşum aşamasını takip eden farklılaşma ve büyüme aşamasında oluşan sorunlar farklılaşma bozuklukları (sinostoz, semfalanjizim, sindaktili vs.) veya büyüme defektlerine (aşırı büyüme, yetersiz büyüme) yol açar (4).

Swanson sınıflamasına göre üst ekstremitenin farklılaşma bozuklukları arasında yer alan radiyal ışın defektleri, radius, el bileğinde yer alan skafoid ve trapezium kemiği, birinci metakarpal kemik ve el başparmağının hipo- veya aplazisine neden olan gelişimsel defekt ile karakterizedir ve 1/30.000 prevalansı ile üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalisidir (5). Radiyal ışın defektlerinin ağırlığı, hafif başparmak hipoplazisinden radius ve başparmağın tam yokluğuna kadar değişen derecelerde olabilir.

Radiyal ışın defektleri; izole, sendromik veya eşlik eden ek anomaliler ile birlikte gözlenebilir. İzole radiyal ışın defektleri olguların yaklaşık % 30'unu oluştururken, büyük çoğunluğu sendromlar veya eşlik eden ek anomaliler ile birlikte gözlenir (5, 6). Radiyal ışın defektleri ile sık birlikteliği gözlenen sendromlar arasında trombositopeni-radius yokluğu (TAR) sendromu, VACTERL birlikteliği, (vertebral anomaliler, anal atrezi, kardiyak anomaliler, trakeoözofageal fistül, renal anomaliler ve ekstremite anomalileri), Holt-Oram

sendromu ve Fanconi anemisi yer alır (7). Bunlar dışında Duane-radiyal ışın sendromu (Okihiro sendromu), Townes-Brockes sendromu, Rothmund-Thomson sendromu, RAPADILINO sendromu, Baller-Gerold sendromu, Cornelia de Lange sendromu, Nager sendromu, Roberts sendromu ve Diamond-Blackfan anemisi gibi sendromların da radiyal ışın defektleri ile birlikte gözlenebildikleri bilinmektedir. Ek olarak, radiyal ışın defektleri trizomi 18, trizomi 21, trizomi 13 gibi çeşitli kromozom anomalileri ile birlikte de gözlenmiştir (5, 6). Ayrıca; Gershoni-Baruch sendromu (OMIM 609545), X'e bağlı radiyal ışın defektleri (OMIM %300378), radiyal-renal sendrom (OMIM 179280) hemifasiyal mikrozomi-radiyal ışın defektleri (OMIM %141400) gibi radiyal ışın defektleri ile ilişkisi bilinen, ancak ilişkili geni/genleri henüz tanımlanmamış birçok nadir sendrom da mevcuttur.

Bu bilgiler ışığında, radiyal ışın defekti saptanan bir olguda eşlik edebilecek ek anomaliler açısından tüm sistemlerin gözden geçirilmesi, özellikle kardiyovasküler sistem, ürogenital sistem ve hematopoetik sistemin taranması son derece önemlidir. Ayrıca, prenatal dönemde radiyal ışın defekti saptanan bir fetusun, doğru klinik ve moleküler tanı alması çiftlere verilecek genetik danışma açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, 2004-2014 yılları arasında kliniğimizde radiyal ışın defekti bulgusu ile değerlendirilen 37 aileden 48 etkilenmiş olgunun klinik olarak sınıflandırılması ve moleküler etyopatogenezinin araştırılması amaçlandı. Radiyal ışın defektleri ile giden 14 farklı fenotip ile ilişkisi bilinen 42 büyük genin klasik Sanger dizileme yöntemi ile çalışılması uzun zaman alacağından ve maliyeti çok arttıracağından, ilk aşamada, bilinen tüm genleri ve ilişkili ekzonları içeren yeni nesil dizileme paneli oluşturulması planlandı. İki olguda sitogenetik anomali saptanması ve üç olguda Sanger dizileme ve bir olguda yurt dışında yeni nesil dizileme ile mutasyon saptanması nedeniyle serimizdeki moleküler/sitogenetik tanı almamış 31 indeks olgu hazırlanan bu panel ile incelendi. Saptanan mutasyonlar ve tanımlanmamış değişimler Sanger dizileme ile doğrulandı. Kalıtım modeli ile uyumunu ve segregasyon modelini incelemek amacıyla ailedeki ulaşılabilen diğer etkilenmiş/etkilenmemiş aile bireyleri de çalışmaya dahil edildi. Mutasyon saptanan ailelere özgün genetik danışma verildi. Çalışma sonuçlarının, ülkemizde radiyal ışın defekti ile giden sendromların ve ilişkili mutasyonlarının sıklığı konusunda bilgi verici olması beklendi. Ayrıca, tanıda kullanılmak üzere hazırlanan özgün gen panelinin moleküler genetik tanıya olan katkısının değerlendirilmesi amaçlandı. İkinci aşamada ise bu çalışmada etyopatogenezi belirlenemeyen olguların, radiyal ışın defektleri ile ilişkili yeni genlerin araştırılmasını amaçlayan yeni projeler için bir çalışma grubu oluşturması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Konjenital ekstremite anomalileri, üst veya alt ekstremitelerin bir kısmı veya tamamının intrauterin gelişimleri sırasındaki bozukluklardan kaynaklanır ve tüm konjenital anomalilerin % 10'unu üst ekstremite anomalileri oluşturur (1).

2.1. Üst Ekstremite Anomalilerinin Sınıflandırması

Konjenital üst ekstremite anomalilerinin birçok sınıflaması yapılmış olmakla birlikte en çok kabul göreni, Swanson'un 1968 yılında embriyolojik gelişim süreçlerini temel alarak yaptığı sınıflamadır (8). En son yapılan sınıflandırmalarda konjenital üst ekstremite anomalileri 7 genel gruba ayrılmıştır: (i) oluşum bozuklukları, (ii) farklılaşma bozuklukları, (iii) duplikasyonlar, (iv) aşırı büyümeler, (v) yetersiz büyümeler, (vi) konstrüksiyon bant sendromu (vii) generalize iskelet anomalileri (1, 2, 9). (Tablo. 2-1).

2.1.1. Oluşum Bozuklukları

Oluşum bozuklukları, transvers redüksiyon anomalileri ve longitudinal redüksiyon anomalileri olarak iki grupta değerlendirilir.

Transvers redüksiyon anomalileri, ekstremitelerin proksimodistal büyümelerindeki yetersizlik sonucunda oluşurlar ve ameliadan, adaktili veya afalanjiye kadar değişen ağırlıkta olabilirler. Embriyolojik süreçte üst ekstremite tomurcuğunun uzunlamasına büyümesi için esansiyel olan *apikal ektodermal çıkıntı* ve buradan salgılanan büyüme faktörü olan *fibroblast büyüme faktörü* ile ilgili patolojilerin, transvers redüksiyon anomalilerinin etyopatogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (8, 10).

Longitudinal redüksiyon anomalileri, üst ekstremiteyi oluşturan kemiklerin bir veya daha fazlasının kısmi ya da tam eksikliği ile karakterize olup, eksikliği gözlenen kemiğe göre alt gruplara ayrılır: fokomeli, ulnar ışın defekti, santral defekt ve radiyal ışın defekti.

Tablo 2-1. Konjenital Ekstremite Anomalilerinin Embriyolojik Sınıflandırması	
I.Oluşum Bozuklukları	f. Konjenital kilit başparmak
A. Transvers defektler	g. *Retrofleksible* başparmak
B. Longitudinal defektler	h. Kamptodaktili
1. Fokomeli	i. Konjenital savruk el (El parmaklarında konjenital ulnar *drift*)
2. Radial	2. İskelet kontraktürleri
3. Ulnar	a. Klinodaktili
4. Santral	b. Kirner deformitesi
II.Farklılaşma Bozuklukları	c. Delta kemik
A. Sinostozlar	**III. Duplikasyonlar**
B. Radius başı çıkıkları	A. Başparmak duplikasyonları
C. Simfalanjizm	B. Trifalangizm/hiperfalanjizm
D. Sindaktili	C. Polidaktili
E. Kontraktürler	D. Ayna el anomalisi
1. Yumuşak doku kontraktürleri	**IV. Aşırı Büyümeler**
a. Artrogripozis	A. Ekstremite aşırı büyümeleri
b. Pterijyumlar	B. Makrodaktili
c. Tetik başparmak	**V. Yetersiz Büyümeler**
d. Ekstensör tendonların yokluğu	**VI. Konjenital Konstrüksiyon Band sendromu**
e. Hipoplastik başparmak	**VII. Generalize İskelet Anomalileri**

Fokomeli, üst ekstremitenin bir veya daha fazla segmentinin olmaması ile karakterizedir. En ağır formunda kol ve ön kol kemiklerinin olmamasına bağlı olarak eller direkt olarak gövdeden çıkar. Fokomeli, teratojen (talidomid) ile ilişkisi gösterilmiş ilk doğumsal anomalilerden biridir (8, 11).

Radiyal ışın defekti; radius, radiyal karpal kemikler (skafoid kemik ve trapezium kemiği), birinci metakarpal kemik ve baş parmağa ait falanks yapılarının hipo- veya aplazisi ile karakterizedir (5). Radiyal ışın defektleri, radiusta ve/veya baş parmakta hafif hipoplaziden, radius ve baş parmağa ait yapıların tam yokluğuna kadar değişen ağırlıklarda gözlenebilir. Radiyal ışın defektleri izole olabilirler; ancak sıklıkla ekstremite dışı anomalilerle birlikte ya da bir sendromun bileşeni olarak gözlenirler. Radiyal ışın defektleri ile en sık birliktelik gösteren sendromlar arasında Trizomi 18, Holt-Oram sendromu, TAR sendromu, Fanconi anemisi, VACTERL birlikteliği, Baller-Gerold sendromu, RAPADILINO sendromu ve Nager sendromu yer alır. Cornelia de Lange sendromu, Roberts sendromu, Diamond-Blackfan anemisi radiyal ışın defektlerinin gözlenebildiği diğer nadir sendromlardır.

Ulnar ışın defektleri, üst ekstremitenin ulnar kısmını (postaksiyel) oluşturan ulna ve 5. parmağa ait kemiklerinin hipo-/aplazisi ile karakterizedir. Radiyal ışın defeklerine göre daha

az sıklıkta gözlenirler. Ulnar ışın defektleri sıklıkla sporadik olarak gözlenirler ve yumru ayak, spina bifida, femoral anomaliler gibi ek anomaliler ulnar defektlere eşlik edebilir (12, 13).

Santral defektler, elin santral kısmınında yer alan işaret parmağı, orta parmak ve yüzük parmağını oluşturan kemik yapıların defekti ile karakterizedir (8). Ektrodaktili veya yarık el olarak da adlandırılır. Santral defektler, izole ya da sendromlarla birlikte gözlenebilirler. EEC sendromu (***E**ctrodactyly-**E**ctodermal dyspalsia-**C**left lip/palate*) [OMIM %129900], otozomal dominant, otozomal resesif ve X'e bağlı kalıtılan yarık el-ayak malformasyonları [OMIM #183600], Ekstremite-meme sendromu [OMIM #603543], Hartsfield sendromu [OMIM #615465] ve EEM (**E**ktrodaktili-**E**ktodermal displazi-**M**aküler distrofi) [OMIM #225280] santral defektlerin gözlendiği sendromlar arasında yer alır.

2.1.2. Farklılaşma bozuklukları

Farklılaşma bozuklukları ya da ayrışma bozukluları, üst ekstremite anomalileri arasında geniş bir grubu temsil eder. Bu grupta, sindaktili, artrogripozis, kamptodaktili, radioulnar sinostoz, simfalanjizm, klinodaktili gibi anomaliler yer alır. Sindaktili bu grupta en sık gözlenen anomali olup, izole ya da sendromik olabilir. Apert sendromu [OMIM #101200], Saethre-Chotzen sendromu [OMIM #101400] gibi kraniyosinostoz sendromları, Poland sendromu, amniyotik band sendromu [OMIM %217100] sindaktilinin gözlendiği bazı sendromlardır.

2.1.3. Duplikasyonlar

Polidaktili (preaksiyel, santral, postaksiyel), trifalangeal başparmak, hiperfalanjizm ve ayna el deformitesi bu grupta yer alır (8).

Preaksiyel (radiyal) polidaktili grubu içerisinde duplike başparmak, trifalangeal başparmak ve işaret parmağının duplikasyonu yer alır (1). Duplike başparmağın en sık (> % 50) gözlenen formunda, başparmağın duplike olmuş proksimal ve distal falanksları bifid sonlanan ortak bir metakarpal kemikle eklem yaparlar (1). Trifalangeal başparmak, başparmakta fazladan bir falanksın bulunması ile karakterize olup, normal opozisyona elverişli olan uzun başparmak şeklinde olabileceği gibi, elin diğer dört parmağına benzer şekilde de olabilir (*the 5 fingered hand*) (8). Trifalangeal başparmak ve başparmak duplikasyonu birlikte gözlenebilir. Trifalangeal başparmak/duplike başparmak anomalileri Fanconi anemisi [OMIM #227650], Holt-Oram sendromu [OMIM #142900], Townes-

Brockes sendromu [OMIM #107480] gibi sendromlar dahilinde veya izole olarak gözlenebilir.

Santral polidaktili, orta parmak ve/veya yüzük parmağının duplikasyonu ile karakterize olup, sıklıkla sindaktili de bu anomaliye eşlik eder. Yüzük parmağının polisindaktilisi en sık görülen tipi olup, *HOXD13* mutasyonları ya da bazı sendromlarla birlikte gözlenebilir (8).

Postaksiyel (ulnar) polidaktili 5. parmağın duplikasyonu ya da elin lateralinden çıkan ekstra bir parmak yapısı ile karakterize olup, bu grupta en sık gözlenen anomalidir. Ailevi otozomal dominant formları olduğu gibi, iyi bilinen sendromlarla da gözlenebilmektedir.

Ayna el deformitesi oldukça nadir bir anomali olup, elin ve ön kolun ulnar kısmının duplikasyonu ile karakterizedir. Etkilenmiş ekstremitede 7 ya da 8 parmak ve iki ulna bulunurken, radius yoktur. *Sonic hedgehog* aktivitesinin artışına bağlı oluştuğu düşünülmektedir (8).

2.1.4. Aşırı büyüme

Aşırı büyüme tüm ekstremiteyi, ön kolu, eli ya da parmakları ilgilendirebilir. Parmakların aşırı büyümesi makrodaktili olarak adlandırılır ve bu durum statik ya da ilerleyici olabilir. Makrodaktili izole ya da Proteus sendromu [OMIM #176920], Klippel-Trenaunay-Weber sendromu [OMIM%149000], Bannayan-Riley-Ruvalcaba sendromu [OMIM #153480] gibi sendromlarla birlikte gözlenebilir.

2.2. Üst Ekstremitenin Embriyolojisi

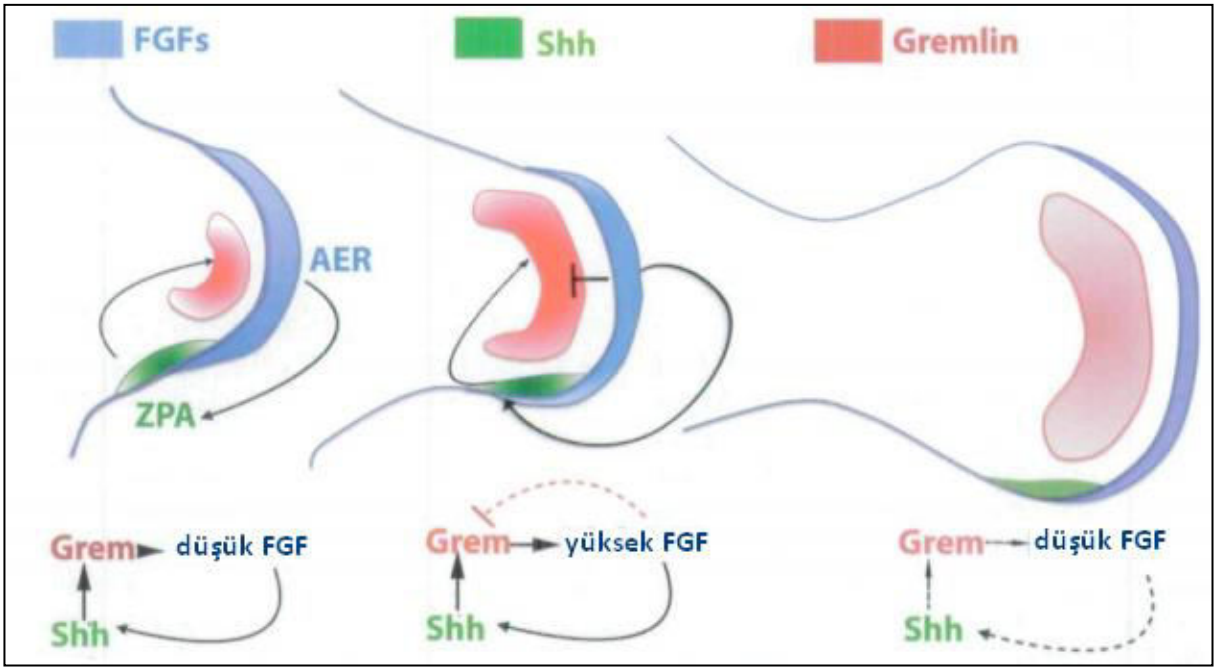
İnsan embriyosunda üst ekstremite tomurcuğu fertilizasyondan sonraki 28. günde ortaya çıkar. ‘‘*Wolff krest’’* olarak bilinen simetrik lateral mezodermal plakta oluşmaya başlayan erken ekstremite tomurcuğunda iki majör bileşen mevcuttur; lateral plak mezoderminden köken alan ve gevşek mezenkimal hücrelerden oluşan bir çekirdek tabaka ve bu tabakanın etrafını kuşatan, ektoderm kökenli epitel hücre tabakası (14). Kıkırdak, kemik, tendon ve damarlardan oluşan iskelet ve bağ dokusu elemanları, ekstremite tomurcuğunun mezenkimal çekirdeğinden gelişir. Ekstremiteye ait kas ve sinirlerin ise embriyolojik kökenleri farklıdır. Kas dokusu, mezodermal somitlerden köken alan miyojenik öncü hücrelerden gelişir ve daha sonra ekstremite tomurcuğuna göç eder. Ekstremiteye ait periferik sinirler ise nöral krestten köken alır ve bağ dokusu ve kas dokusu tarafından üretilen çeşitli

trofik ajanların etkisiyle ekstremite tomurcuğuna göç ederek aksonları boyunca uzamaya başlarlar (15).

Esktremite tomurcuğunda yer alan farklılaşmamış hücrelerin proliferasyonu, distal uçta yer alan *ilerleme zonu* tarafından kontrol edilir. Ekstremite tomurcuğu, farklılaşmamış hücrelerin çoğalması ile büyüdükçe, distal uçtaki ilerleme zonuna uzak kalan proksimaldeki hücreler yoğunlaşarak farklılaşmaya başlarlar. Bu yoğunlaşma, ileride oluşacak kemik dokunun ilk kıkırdak taslaklarını oluşturur. Ekstremite tomurcuğunda hücrelerin yoğunlaşmasıyla başlayan bu farklılaşmanın proksimalden başlaması, büyüyen ekstremite tomurcuğunun distal ucundaki ektodermin kalınlaşması ile oluşmuş ‘‘*apikal ektodermal kabartı’’* tarafından kontrol edilir. Apikal ektodermal kabartıdan salgılanan FGFs (*fibroblast growth factors*), yakınında yer alan mezenkimal hücrelerin çoğalmasını uyarırken, farklılaşmasını baskılar. Ekstremite tomurcuğu proksimalden distale doğru büyüdükçe, apikal ektodermal kabartıdan, dolayısıyla FGFs etkisinden uzakta kalan hücreler yoğunlaşarak farklılaşmaya başlarlar.

Ekstremite, bir taraftan proksimal-distal eksende büyümeye devam ederken, diğer taraftan anterior-posterior eksende (üst ekstremitede radial-ulnar aks, alt ekstremitede tibial-fibular aks) büyümeye başlar. Bu eksendeki büyüme, ‘‘*polarize edici aktivasyon zonu’’* tarafından kontrol edilir. Polarize edici aktivasyon zonundan *Sonic hedgehog (Shh) proteini* salgılanır. Shh, ekstremitenin radial-ulnar/tibial-fibular eksendeki büyümesinde ve parmakların sayı ve kimliklerinin belirlenmesinde önemli rol oynar (16). Shh proteini bu fonksiyonlarını, hücre içi bir transkripsiyon faktörü olan Gli3’ü inaktif formundan aktif formuna dönüştürerek yapar. Shh sinyalinin yokluğunda parmak oluşumunu baskılayan Gli3, Shh uyarısı ile aktive olur (14). Bu nedenle ektopik Shh salgılanmasına yol açan ya da Gli3’teki aktive edici mutasyonlar bazı polidaktili formları ile ilişkilidir.

Shh geni susturulmuş farelerde (*shh knockout*) ekstremitelerin proksimal-distal eksendeki büyümelerinin de durduğu gözlenmiştir. Bu da Shh’nin proksimal-distal eksendeki büyümede de etkin bir rol aldığını göstermektedir. Nitekim apikal ektodermal kabartıdan FGFs salgılanmasının devamı Shh uyarısı ile olmaktadır (14). Bu nedenle ekstremite tomurcuğunda Shh ya da FGF uyarısının kaybı transvers redüksiyon defektlerine yol açmaktadır.



Şekil 2-1. Ekstremite Büyümesinin Pozitif ve Negatif Geri-besleme İle Kontrolü[1].
Oklar aktivasyonu, T şeklindeki kırmızı çizgi inhibisyonu, kesikli çizgilerle belirtilen oklar azaltılmış regülasyonu göstermektedir. FGFs salınımını baskılayan BMPs için antagonist etkiye sahip Gremlin salınımı Shh tarafından uyarılır. Shh'nin bu etkisi FGFs salınımında artışa yol açarken, düşük FGFs düzeyleri Shh salımı için uyarıcı etki yapar. Böylece FGFs düzeyi giderek artar ve mezenkimal proliferasyon uyarılarak ekstremite uzamaya başlar. FGFs düzeyi artarak kritik bir seviyeye gelince Gremlin üzerinde baskılayıcı etki oluşturmaya başlar. Gremlinin baskılanması, BMPs'nin aktifleşerek FGFs salınımını baskılamasına yol açar. FGFs'nin yokluğunda, Shh salınımı da baskılanır ve ekstremite büyümesi durur. ZPA: *Zone of polarizing activity*, AER: *Apical ectodermal ridge*, FGFs: *Fibroblast growth factors*, BMPs: *Bone morphogenetic proteins*.
1: (14) numaralı yayından değiştirilerek alınmıştır.

Kemik morfogenetik proteinler (*bone morphogenetic proteins*, BMPs) ekstremite mezenkimi ve apikal ektodermal kabartı tarafından üretilirler ve apikal ektodermal kabartıdan FGF üretimini baskılarlar. Shh ise, BMPs inhibitörü olarak görev yapan Gremlin ekspresyonunu aktifleştirir. Yani Shh ekspresyonu, dolaylı yoldan FGFs üretiminin devamını sağlar. Düşük düzeylerdeki FGFs ise Shh ekspresyonunu uyarır. Ekstremite yeterli büyüklüğe ulaştığında ve FGFs seviyesi kritik bir düzeye eriştiğinde, mezenkimden Gremlin salgılanması baskılanır. Gremlinin baskılanması ile birlikte BMPs aktifleşerek FGFs salgılanmasını baskılar (şekil 2-1). FGFs uyarısının ortadan kalkması ile Shh ekspresyonu da baskılanır ve ekstremite büyümesi durur (14).

Endokondral kemikleşmenin en erken bulgusu, mezenkimal hücrelerin yoğunlaşarak prekartilaj dokuya dönüşmesidir. BMPs, bu dokuda bulunan kıkırdak öncüsü hücrelerin (prekondrojenik hücreler) kıkırdak hücrelerine (kondrositler) dönüşmesi için gerekli uyarıyı sağlar. BMPs'nin bu etkisi, prekartilaj dokuda BMP 1a ve 1b reseptörlerinin olmadığı homozigot mutant farelerde prekartilaj dokunun iskelet sistemine dönüşememesine bağlı ağır ve generalize kondrodisplazinin gözlendiği bir çalışma ile desteklenmiştir (17). Ayrıca interdigital mezenkimden salgılanan BMPs, Shh ile birlikte parmakların kimliklerinin belirlenmesinde rol alır (18). Kıkırdak dokusunun majör ekstraselüler matriks proteinlerini oluşturan tip II kollajen ve agrekan üretimi için gerekli bir transkripsiyon faktörü olan Sox9 ekspresyonu da BMPs tarafından uyarılır. İnsanda *SOX9* mutasyonları iskelet anomalileri ve genital anomaliler ile seyreden kampomelik displazi'ye (OMIM #114290) neden olur. Prekondrojenik hücrelerin, endokondral kemikleşmenin bir sonraki basamağı olan büyüme plağını oluşturmaları için BMPs ve Sox9 kontrolünde farklılaşmaları gereklidir. Büyüme plağındaki kondrositlerin proliferasyonu, *paratiroidhormon-ilişkili protein (PTHrP)* ve *Indian hedgehog (Ihh)* proteinden oluşan bir mekanizma tarafından kontrol edilir. Büyüme plağı, yavaş bölünen ve az miktarda ekstraselüler matriks proteini üreten bir ''*dinlenme zonu*'' ve bunu takip eden ve daha hızlı bölünen hücrelerden oluşan bir ''*proliferasyon zonu*'' içerir. En distalde kalan epifizyel kondrositler ise bilinmeyen bazı sinyallerin etkisiyle hipertrofik hale gelerek kondrosit kolonlarından oluşan ''*kolumnar zonu*'' oluştururlar. Bu zonda bulunan hücreler, büyüme plağında biyosentez açısından en aktif olan ve en hızlı bölünen hücrelerdir. PTHrP, bu bölgede yer alan hücrelerin proliferatif evrede kalmasını sağlar ve Ihh üretimini baskılar. Hücre kolonu uzadıkça, en distalde kalan hücreler PTHrP etkisinden kurtularak hücre döngüsünün dışında kalır, prehipertrofik hale dönüşür ve Ihh eksprese etmeye başlar. Ihh, büyüme plağı boyunca diffüze olarak PTHrP ekspresyonunu uyarır. Büyüme plağı bu döngü içinde büyüyerek endokondral kemikleşme oluşur (14).

2.3. Radiyal Işın Defekti ile Giden Tek Gen Sendromları

LMD (*London Medical Databases*)'de, radiyal ışın defekti (radiyal aplazi/hipoplazi veya el başparmağında aplazi/hipoplazi) bulguları ile tarama yapıldığında, 265 sendromun yer aldığı gözlenmektedir. Bu sendromların birçoğu nadir ve ilişkili geni henüz tanımlanmamış veya teratojen maruziyeti ile ilişkili sendromlardan (fetal talidomid, fetal valproat, fetal kokain, fetal vitamin A sendromu vd.) oluşmaktadır. Bu bölümde, iyi tanımlanmış ve ilişkili geni/genleri bilinen, radiyal ışın defektleri ile seyreden 14 farklı sendrom ile ilişkili klinik ve moleküler bilgiler yer almaktadır.

2.3.1. Holt-Oram Sendromu (OMIM #142900)

Holt-Oram sendromu, üst ekstremite ve konjenital kalp anomalileri ile karakterizedir. Sıklığı canlı doğumlarda 1/100.000 olarak bildirilmektedir (19). Olgularda gözlenen karakteristik anomaliler, başparmak anomalileri ve atriyal septal defekt (ASD) olmasına rağmen; üst ekstremite anomalileri sadece anormal bir karpal kemik varlığından (20, 21) fokomeliye kadar değişen ağırlıklarda olabilir. Konjenital kalp anomalileri ise sıklıkla ostium sekundum tip ASD veya VSD (ventriküler septal defekt) şeklinde gözlenirken, kalpte yapısal anomali olmaksızın ileti defektleri de gözlenebilir.

Holt-Oram sendromu ilk kez 1960 yılında Holt ve Oram tarafından 4 kuşakta ASD ve başparmak anomalileri olan etkilenmiş bireylerin bulunduğu bir ailede tanımlanmıştır. *McKusick*, 1961 yılında sendroma *Holt-Oram sendromu* ve *atriyodijital displazi* isimlerini önermiş ve *Holt-Oram sendromu* kabul görmüştür.

Holt-Oram sendromu'nda gözlenen üst ekstremite anomalileri, aynı aileden etkilenmiş olgular arasında dahi çok çeşitlilik gösterir. Olgularda gözlenen üst ekstremite anomalileri unilateral, bilateral / simetrik veya bilateral / asimetrik olabilir. Ekstremite anomalileri genellikle sol üst ekstremitede sağa göre daha ağırdır. Karpal kemik deformitesi sıktır ve olgularda gözlenen tek bulgu olabilir (21). Olgularda gözlenen diğer üst ekstremite anomalileri arasında trifalangeal başparmak, başparmak yokluğu, aplastik / hipoplastik radius, fokomeli, karpal ve tenar kemiklerin füzyonu veya anormal gelişimi, ön kolda pronasyon / supinasyon kısıtlılığı, başparmağın anormal opozisyonu, klavikulalarda hipoplazi ve buna bağlı düşük omuzlar yer alır.

Holt-Oram sendromlu olguların % 75'inde konjenital kalp anomalileri gözlenir. Kalp anomalileri genellikle ostium sekundum tip ASD veya VSD şeklindedir. ASD, olgularda gözlenen kalp anomalilerinin % 60.3'ünü oluşturur ve en sık kalp anomalisidir. Olguların % 17.5'inde ağır kalp anomalileri gözlenir (22). Patent duktus arteriozus, koroner arter anomalileri, mitral valv prolapsusu, persistan sol superior vena kava, Fallot tetralojisi, çift çıkışlı sağ ventrikül ve total pulmoner venöz dönüş anomalisi Holt-Oram sendromlu olgularda bildirilen diğer kalp anomalileridir (23-25).

Holt-Oram sendromlu olgular, yapısal kalp anomalisi olsun ya da olmasın kardiyak ileti defektlerine karşı risk altındadır. Kardiyak ileti bozuklukları sıklıkla atriyoventriküler (AV) bloklar şeklindedir. Özellikle yenidoğan döneminde sinüs bradikardisi ve birinci derece AV blok gözlenebilir ve AV blok ilerleyerek tam kalp bloğuna dönüşebilir. Bradikardi, atriyal

fibrilasyon, AV blok, sağ dal bloğu, Wolf-Parkinson-White sendromu ve ani kardiyak ölüm olgularda bildirilen kardiyak ileti bozuklukları arasında yer alır (26).

2.3.1.1. Holt-Oram Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez

Holt-Oram sendromu otozomal dominant olarak kalıtılmakta olup, *TBX5* genindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (27, 28). Holt-Oram sendromu tanı kriterlerini tam olarak taşıyan (aile öyküsünde veya kendinde kardiyak septal defektler ve/veya ileti defektlerine eşlik eden radiyal ışın defektleri) olguların % 74'ünde *TBX5* geninde mutasyon saptanmıştır (29).

T-box transkripsiyon faktörleri, organogenezde hücrelerin farklılaşması ve kaderinin belirlenmesinde önemli rol üstlenen, korunmuş bir protein ailesine aittir (30). T-box ailesine ait transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar Holt-Oram sendromu (*TBX5*), ulnar-meme sendromu (*TBX3*), X'e bağlı yarık damak ve ankiloglossi (*TBX22*) ve DiGeorge sendromu (*TBX1*) gibi genetik sendromlara neden olurlar. *TBX5* geni 12q24'de lokalize olup, 518 aminoasitten oluşan bir proteini kodlar ve yüksek oranda korunmuş bir DNA bağlanma bölgesi ve bir T-box bölgesi içerir. *TBX5,* embriyonik kalp ve ekstremite dokularında ifade edilir. *Tbx5* geni homozigot olarak susturulmuş fareler erken embriyogenezde ölürken, heterozigot olanlarda kalp ve ön kol anomalileri saptanmıştır (31).

Biyokimyasal çalışmalarda, *TBX5*'in bir başka transkripsiyon faktörü olan *NKX2.5* ile etkileşime girdiği ve bu etkileşimin, hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmada sinerjik etki gösterdiği saptanmıştır (30). Holt-Oram sendromu ile ilişkili olduğu bildirilen mutasyonlar genellikle, anlamsız, çerçeve kayması, kırpılma hatası mutasyonları ve kromozomal yeniden düzenlenmeler (delesyon, translokasyon) gibi eksik ya da fonksiyonel olmayan protein ürününe yol açan mutasyonlardır. Ayrıca artmış *TBX5* dozunun da (12q2 duplikasyonu gibi) Holt-Oram sendromu fenotipine neden olduğu gösterilmiştir (32). Bazı olgularda bildirilen yanlış anlamlı mutasyonların ise *TBX5'*in hedef DNA bölgesine bağlanmasını azaltarak, *TBX5-NKX2.5* etkileşimini ve *TBX5'*in hücresel lokalizasyonunu bozarak hedef genlerdeki transkripsiyonu azalttığı fonksiyonel çalışmalar ile gösterilmiştir (30).

TBX5 geninin 5' yönündeki yanlış anlamlı mutasyonlarının daha ağır kalp anomalileri ile, 3' yönündeki yanlış anlamlı mutasyonların ise daha ağır ekstremite anomalileri ile ilişkili olduğu bildirilmişse de (33) daha geniş bir olgu serisinde yapılan çalışmada *TBX5* genotipi ile fenotipi arasında böyle bir ilişkinin kurulamayacağı bildirilmiştir (34).

2.3.2 Fanconi Anemisi (OMIM #227650)

Fanconi anemisi, fiziksel anomaliler, kemik iliği yetmezliği ve artmış malignite riski ile karakterize, klinik ve genetik olarak heterojen bir tablodur. Fiziksel anomaliler, olguların % 60-75'inde gözlenirken; tipik olarak ilk dekatta ortaya çıkan, genellikle trombositopeni veya lökopeni ile başlayarak pansitopeniye ilerleyen kemik iliği yetmezliğinin 40-50 yaşlarına kadar kümülatif insidansı % 90'dır. Ayrıca olguların % 10- % 30'unda hematolojik maligniteler (özellikle akut myeloid lösemi), % 25- 30'unda ise diğer organlara ait solid tümörler gözlenir.

Fanconi anemisi, ilk kez 1927 yılında Guido Fanconi tarafından, konjenital fiziksel anomalileri ve ilerleyici aplastik anemileri olan üç kardeşte tanımlanmıştır. O tarihten itibaren Fanconi anemisi tanılı çok sayıda olgu bildirilmiş olup; prevalansı 1:360.000, taşıyıcı sıklığı ise 1:300 olarak bildirilmektedir (35). Ülkemizdeki sıklığı tam olarak bilinmemekle birlikte, Fanconi anemisinin otozomal resesif kalıtım modeli ve akraba evliliği oranının yüksek olması nedeniyle, ülkemizdeki sıklığının daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Olgularda gözlenen fiziksel anomaliler arasında boy kısalığı, ciltte anormal pigmentasyonlar (sütlü kahverengi lekeler, hipopigmente maküller), başparmak ve ön kol anomalileri (hipoplastik/aplastik veya trifalangeal başparmak, hipoplastik/aplastik radius, displastik ulna), mikrosefali, kalp anomalileri ve diğer sistemlerle (genitoüriner sistem, gastrointestinal sistem, merkezi sinir sistemi) ilgili anomaliler gözlenir (Tablo 2-2). Fanconi anemili olguların % 25'inde fiziksel anomaliler gözlenmez. Bu nedenle, fiziksel anomalilerin olmaması Fanconi anemisi'ni dışlayamaz (36).

Fanconi anemisi'nde hematolojik olarak; aplastik anemi, MDS (miyelodisplastik sendrom), AML (akut miyeloid lösemi), açıklanamayan monositopeni veya eritrositlerde makrositoz gözlenebilir. Kemik iliği yetmezliği genellikle 7-8 yaşlarında ortaya çıkar. Ancak yenidoğan döneminde pansitopeni saptanan olgular da bildirilmiştir (37, 38). Trombositopeni veya lökopeni ile başlayan kemik iliği yetmezliği, ilerleyici bir seyir gösterir ve pansitopeni tablosu ortaya çıkar. Başlangıçta normoselüler olan kemik iliği giderek hipoplastik bir hal alır. Bu nedenle, açıklanamayan sitopeni saptanan tüm çocuk ve genç erişkinlerde Fanconi anemisi mutlaka ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Bazı olgularda ise aplastik anemi erişkin yaşta ortaya çıkabilir ve ilk bulgusu eritrositlerde makrositoz ve artmış hemoglobin F düzeyleri olabilir. Hematopoetik kök hücre nakli gerektiren ve ölümcül olabilen ağır kemik iliği yetmezliği riski, 10 yaşında belirgin bir artış gösterir ve her yıl % 5 oranında artarak, 50 yaşında bu risk % 50'ye çıkar (38).

Fanconi anemisi'nde AML riski normal populasyona göre yaklaşık 800 kat artmıştır ve ortalama tanı yaşı 13'tür (36). Bu olgularda 50 yaşında kümülatif risk AML için % 10, MDS için % 40 olarak bildirilmiştir (38). Ayrıca baş, boyun, özofagus ve jinekolojik skuamöz hücre karsinomları ve karaciğer tümörleri için de risk artmıştır (39, 40). Fanconi anemisi'nde solid tümör riski normal populasyona göre yaklaşık 40 kat artmış olup, 50 yaşında solid tümörler için kümülatif risk % 30'dur. Kanserlerin ortalama ortaya çıkış yaşı AML için 14, karaciğer tümörleri için 13 ve diğer tüm solid tümörler için 26 yaştır (41). Bu olgular, DNA hasarı oluşturan radyoterapi ve kemoterapi ajanlarına duyarlı olduklarından, kanser tedavisinde güçlükler yaşanmaktadır. Bu nedenle, Fanconi anemili olgularda saptanan solid tümörlerin tedavisinde cerrahi tedaviler öncelikli uygulamalardır.

2.3.2.1. Fanconi anemisi'nde tanı

Fanconi anemisi'nde tanı, karakteristik fiziksel anomaliler, ilerleyici kemik iliği yetmezliği, MDS veya AML gibi hematolojik bulgular, bilinen bir risk faktörü olmaksızın genç yaşta ortaya çıkan solid tümörler gibi yönlendirici klinik bulguların bir veya birkaçının varlığında laboratuvar testleri ile konur.

Tanıda en çok kullanılan laboratuvar testi kromozom kırık çalışmalarıdır. Fanconi anemili hücreler, çapraz bağ yapıcı ajanlara karşı özel bir hassasiyet gösterirler. Mitomisin-C (MMC) ve diepoksibütan (DEB) gibi zincirler arası çapraz bağ yapıcı ajanlara maruziyet sonrası Fanconi anemili hücrelerde, normal hücrelere kıyasla kromozom kırıkları ve yeniden düzenlenmelerde önemli ölçüde artış gözlenir. Bu nedenle, lenfositlerde DEB maruziyeti sonrası artmış kromozom kırıkları veya yeniden düzenlenmeler veya MMC maruziyeti sonrası oluşan karakteristik radiyal figürler, Fanconi anemisi tanısında kullanılmaktadır (42, 43).

Fanconi anemisi tanısında kullanılan başka bir yöntem ise FANCD2 proteininin monoubikuitinasyonunun immünoblot yöntemi ile saptanması esasına dayanır. DNA hasarı ya da hücrenin S fazına girmesine yanıt olarak sekiz FA proteini (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM) bir kompleks oluştururlar. Bu kompleks, FANCD2'nin monoubikuitinasyonunu sağlar. FANCD2 monoubikuitinasyonu, hücre çekirdeğinde DNA tamir yolaklarını aktive eden kritik bir olaydır. Fanconi anemili olgularda, mitojen bir ajan olan fitohemaglutinin uyarısını takiben, periferik lenfositlerdeki monoubikuitine-FAND2 düzeyinde beklenen artışın olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle FANCD2 immunoblot yöntemi, Fanconi anemisinde yeni ve hızlı bir tanı testi olarak bildirilmiştir (44). Ancak bu yöntemin duyarlılığı, kromozom kırık çalışmalarına göre daha

düşüktür. Çünkü FAND2'den sonra gelen basamaklardaki (FANCD1, FANCJ, FANCN) patoloji ile seyreden nadir Fanconi anemi tipleri bu yöntem ile saptanamaz.

Tablo 2-2. Fanconi anemisinde gözlenen fiziksel anomaliler (38)

Mikrozomi (% 40)	Kısa boy
Cilt bulguları (% 40)	Generalize hiperpigmentasyon, sütlü kahverengi lekeler, hipopigmente maküller
Üst ekstremite bulguları, unilateral / bilateral (% 35)	
- El başparmak anomalileri (% 35)	Agenezi, hipoplazi, bifid, duplike, rudimenter, trifalangeal, uzun, proksimal yerleşimli
- Radius anomalileri (% 7)	Hipoplazi / aplazi, zayıf veya alınamayan radial nabız
- El anomalileri (% 5)	Tenar hipoplazi, birinci metakarp yokluğu, klinodaktili, polidaktili
- Ulna anomalileri (% 1)	Kısa, displastik ulna
İskelet bulguları	
Kraniyum (% 20)	Mikrosefali, hidrosefali
Yüz (% 2)	Üçgen yüz, kuş benzeri yüz görünümü, mikrognati, midfasiyal hipoplazi
Boyun (% 1)	Sprengel deformitesi, Klippel-Feil anomalisi, kısa boyun, yele boyun, düşük ense saç çizgisi
Omurga (% 2)	Spina bifida, skolyoz, hemivertebra, kosta anomalileri, koksigeal aplazi
Göz (% 20)	Mikroftalmi, strabismus, epikantuslar, hipotelorizm, hipertelorizm, katarakt, astigmatizm, ptozis
Böbrek (% 20)	At nalı böbrek, ektopik veya pelvik yerleşimli böbrek, hipoplazi, displazi veya agenezi, hidronefroz veya hidroüreter
Genital anomaliler	
- Erkek (% 25)	Hipogenitalya, inmemiş testisler, hipospadiyas, mikropenis, testis yokluğu
- Dişi (% 2)	Hipogenitalya, bikornuat uterus, malpozisyon, küçük overler
Gelişme geriliği (% 10)	Psikomotor gerilik, mental retardasyon
Kulak anomalileri (% 10)	Sağırlık (genellikle iletim tipi), displastik / anormal şekilli kulaklar, atretik / dar kulak dış yolu, orta kulak anomalileri
Kardiyopulmoner (% 6)	Patent duktus arteriozus, atriyal septal defekt, ventriküler septal defekt, koarktasyon, situs inversus, trunkus arteriozus
Düşük doğum ağırlığı (% 5)	
Alt ekstremite anomalileri (% 5)	Sindaktili, anormal ayak parmakları, yumru ayak, gelişimsel kalça displazisi
Gastrointestinal anomaliler (% 5)	Atrezi (özofagus, duodenum, jejunum), imperfore anüs, trakeoözofageal fistül, anuler pankreas, malrotasyon
Merkezi sinir sistemi anomalileri (% 3)	Küçük hipofiz bezi, hipofiz sapı kesilme sendromu, korpus kallozum agenezisi, serebellar hipoplazi, hidrosefali, geniş ventriküller

2.3.2.2. Fanconi Anemisi'nde Moleküler Etyopatogenez

Fanconi anemili hastalar cisplatin, mitomisin-C (MMC), diepoksibütan (DEB) gibi DNA zincirleri arasında çapraz bağ oluşturan ajanlara karşı hassasiyet gösterirler. Fanconi anemili hastalardan elde edilen hücre serilerinde, bu ajanlara maruziyet sonucunda normal kontrol grubuna göre artmış oranda kromozom kırıkları saptanması moleküler patogenezde DNA tamir mekanizmasındaki bir defektin rol oynadığını düşündürmüştür.

Nitekim son yıllarda DNA tamir yolaklarından biri olan ve meme kanseri yatkınlık genlerinin (*BRCA1*/*BRCA2*) de rol oynadığı ''*FA yolağı*'' veya ''*FA-BRCA yolağı*'' olarak adlandırılan ortak bir yolakta görevli Fanconi anemisi ile ilişkili 15 gen tanımlanmıştır (Şekil 2-2, Tablo 2-3). Bu yolaktaki en kritik aşamalardan biri, FA-çekirdek kompleksinin oluşmasıdır. DNA hasarı, DNA'da zincirler arası çapraz bağ oluşumu ya da hücrenin S-fazına girmesine yanıt olarak sekiz FA proteini (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM), FAAP24 ve FAAP100 proteinleri ile birlikte FA-çekirdek kompleksini oluştururlar (45-47). Bu kompleks, birçok alt üniteden oluşan bir ubikuitin ligaz kompleksi oluşturup, FANCD2 ve FANCI proteinlerinin monoubikuitinasyonunu sağlar. FANCD2 ve FANCI proteinlerinin monoubikuitinasyonu, DNA tamirinde önemli rol alan bir protein kompleksini (ID kompleks) oluşturur (48). ID kompleks oluştuktan sonra hücre çekirdeğine gider ve direkt olarak DNA'ya bağlanmak suretiyle DNA tamir yolaklarını aktive eder. Böylece DNA'daki hasar onarılır, çapraz bağlar uzaklaştırılır, DNA replikasyonu tamamlanır ve hücre yaşamına devam edebilir.

FA-çekirdek kompleksini oluşturan proteinlerden FANCL, ubikuitin ligaz aktivitesine sahip olup, FANCD2'nin monoubikuitinasyonunda rol almaktadır. FANCM proteininin DNA-bağımlı ATPaz aktivitesinin olduğu gösterilmiş olup, bu protein DNA triplekslerinin açılmasını sağlayan bir DNA translokaz gibi fonksiyon gösterir (49). Ayrıca FANCM proteininin normal fonksiyon gösterebilmesi için FAAP24 proteini ile etkileşime girmesi gerekmektedir. FAAP24 proteininin baskılandığı durumda, FANCM'in stabilizasyonunun ve kromatin ile etkileşiminin bozularak, FA-çekirdek kompleksinin kromatin yerleşiminin bozulduğu gösterilmiştir (50).

FANCD1 geni ailevi meme-over kanserine yatkınlık geni olan *BRCA2* ile aynı gen olup; biallelik mutasyonları Fanconi anemisine, monoallelik mutasyonları ise meme ve over kanserine yatkınlığa yol açmaktadır. *FANCD1* (*BRCA2*), *RAD51* aktivitesini kontrol etmek suretiyle homolog rekombinasyonun düzenlenmesinde etkin bir rol almaktadır. *RAD51*, tek zincirli DNA molekülüne bağlanan bir rekombinaz olup, homolog rekombinasyonda görev

alır (51). DSS1 proteini ise FANCD1(BRCA2) proteini ile etkileşime girerek onun stabilizasyonunu sağlar.

Tablo 2-3. Fanconi Anemisi İle İlişkili Genler[1]

Komplementasyon Grup	Gen	Fanconi anemisinde bu gende saptanan mutasyonların oranı[1]	Test Yöntemi	Saptanan Mutasyonlar
FA-A	*FANCA*	60%-70%	Dizi analizi	Dizi varyantları
			Delesyon/duplikasyon analizi	Ekzonik delesyon veya tüm gen delesyonu
FA-B	*FANCB*	~2%	Dizi analizi	Dizi varyantları
			Delesyon/duplikasyon analizi	Ekzonik delesyon veya tüm gen delesyonu
FA-C	*FANCC*	~14%	Bilinen mutasyon analizi	c.456+4A>T, 67delG
			Dizi analizi	Dizi varyantları
			Delesyon/duplikasyon analizi	Ekzonik delesyon veya tüm gen delesyonu
FA-D1	*BRCA2*	~3%	Dizi analizi	Dizi varyantları
FA-D2	*FANCD2*	~3%		
FA-E	*FANCE*	~3%		
FA-F	*FANCF*	~2%		
FA-G	*FANCG*	~10%		
FA-I	*FANCI*	~1%		
FA-J	*BRIP1*	~2%		
FA-L	*FANCL*	~0.2%		
FA-M	*FANCM*	~0.2%		
FA-N	*PALB2*	~0.7%	Delesyon/duplikasyon analizi	Ekzonik delesyon veya tüm gen delesyonu
FA-O	*RAD51C*	~0.2%	Dizi analizi	Dizi varyantları
FA-P	*SLX4*	~0.2%		

1: Shimamura&Alter [2010]

FANCJ geni *BRIP1* (*BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1*) ve *BACH1* (*BRCA1 associated carboxyl terminal helicase 1*) genleri ile özdeştir. FANCJ proteini direkt olarak BRCA1'in BRCT domainine bağlanır. BRCT, BRCA1'in fosfoprotein bağlanma domainidir. FANCJ, 990. pozisyondaki serin rezidüsünden fosforillendikten sonra bu bölgeye bağlanır ve DNA bağımlı ATPaz ve 5'→3' DNA helikaz fonksiyonlarını görür (52).

FANCN geni, *PALB2* geni olarak da bilinir ve *BRCA2* geni ile etkileşime girerek DNA çift zincir kırıklarının tamirine ve homolog rekombinasyon fonksiyonuna katkıda bulunur (53). *BRCA1* ve *BRCA2* ile olan bu etkileşimleri nedeniyle *FANCN*/*PALB2* ve *FANCJ*/*BRIP1*/*BACH1* genlerindeki biallelik mutasyonlar Fanconi anemisi'ne neden olurken; monoallelik mutasyonlar, ailevi meme kanserlerine yol açmaktadır (54).

USP1, deubikuitinasyon yapıcı bir enzimdir. Tek ubikuitin ile bağlı FANCD2'den ubikuitini uzaklaştırmak suretiyle kofaktörü UAF1 ile birlikte FA yolağına negatif yönde etki eder (55, 56). *USP1* ayrıca, tek ubikuitin ile bağlı PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) proteininden de ubikuitini uzaklaştırır. FANCD2 ve PCNA'nın birbirleriyle ilişkili olduğu ve PCNA'nın FANCD2 ubikuitinasyonunu kolaylaştırıcı etki gösterdiği saptanmıştır (57).

Son yıllarda Fanconi anemisi ile ilişkisi gösterilen bir diğer gen *SLX4*'tür (58, 59). Birden fazla domaine sahip yapısal bir protein olan SLX4, üç farklı nükleaz ile etkileşime girer: SLX1, ERCC4/XPF-ERCC1 ve MUS81-EME1. SLX4-SLX1 etkileşimi, Holliday birleşke rezolvazı aktivitesi gösterir. SLX4'ün ERCC4/XPF ve MUS81 nükleazları üzerindeki uyarıcı etkisi ise DNA'da oluşan zincirler arası çapraz bağların tamirinde önemli bir rol oynar (60). SLX4'ü baskılanmış hücrelerin, çapraz bağ yapıcı ajanlara karşı hassasiyet gösterdiği saptanmıştır (61). Bu bulgu, bilinen genlerde mutasyon saptanmayan Fanconi anemili olgularda, *SLX4*'ün aday gen olarak düşünülmesine neden olmuş ve Fanconi anemili olgularda *SLX4* homozigot mutasyonları gösterilerek desteklenmiştir (58, 59).

2.3.2.3. Fanconi Anemisi'nde Tedavi

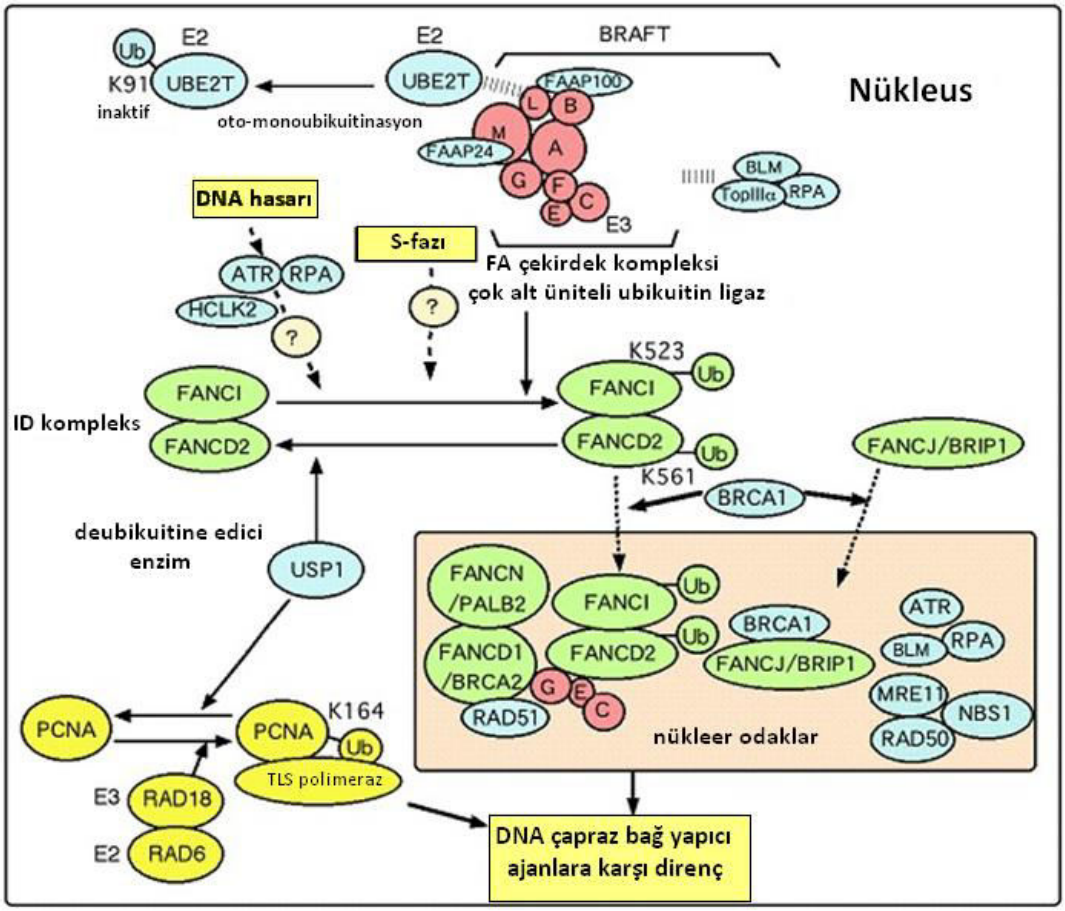
Fanconi anemisi'nin tedavisi, androjenler, hematopoetik büyüme faktörleri, hematopoetik kök hücre nakli ve ortaya çıkan kanserlerin tedavilerini içerir.

Androjenlerin tedavideki yararı sınırlıdır ve potansiyel yan etkileri, tedavide kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Fanconi anemisinde kullanımı önerilen androjen oksimetolon olup, başlangıç dozu 2-5 mg/kg/gün'dür. Androjenler, olguların % 50'sinde kan sayımında düzelme sağlar. En belirgin yararları eritrosit sayısı üzerinde görülür ve bu etki en erken 1-2 ayda ortaya çıkar. Trombosit ve lökosit sayıları üzerinde ise androjenlerin yararı oldukça sınırlıdır. Ayrıca zamanla androjenlerin etkisine direnç gelişebilmektedir. Karaciğer enzimlerinde yükselme, kolestaz, peliozis hepatis ve karaciğer tümörleri, androjenlerin potansiyel yan etkileridir (38).

Hematopoetik büyüme faktörlerinden Granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF), nötropenik olgularda nötrofil sayısını artırmak amacıyla subkutan yolla kullanılabilmektedir.

Ancak koloni uyarıcı faktörleri kullanmadan önce mutlaka kemik iliği aspirasyonu ya da biyopsisi yapılmalı ve hematolojik maligniteler dışlanmalıdır.

Hematopoetik kök hücre nakli, Fanconi anemisinde gözlenen aplastik anemi, AML ve MDS risk artışı gibi hematolojik bulguların tek küratif tedavi seçeneğidir. Bu olgularda kök hücre nakli ideal olarak, MDS/AML gibi komplikasyonlar çıkmadan ve çok sayıda transfüzyon yapılmadan önce uygulanmalıdır (62).



Şekil 2-2. FA yolağı[1]. Sekiz FA proteini (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL ve FANCM) FAAP100 ve FAAP24 ile birlikte E3 ubikuitin ligaz aktivitesine sahip FA çekirdek kompleksini oluşturur. FANCL, bu kompleksin katalitik alt ünitesi olup, direkt olarak E2-ubikuitin konjuge edici enzim olan UBE2T ile etkileşime girer. UBE2T, lizin-91 rezidüsünden (K91) oto-monoubikuitinasyon yoluyla inaktive edilebilir. FA-çekirdek kompleksi, BLM, RPA ve topoizomeraz III birlikte 'BRAFT' isminde bir süper kompleks oluştururlar. FANCI ve FANCD2 ise ID kompleks olarak bilinen başka bir kompleks oluşturur. Bir nükleaz olan FAN1'in FANCD2 ile etkileşime girdiği düşünülmektedir. DNA hasarına ya da hücrenin S fazına girmesine yanıt olarak, FANCD2 ve FANCI'nın özgün lizin rezidülerinden (FANCD2 lizin 561 (K561), FANCI lizin 523 (K523) rezidülerinden) FA-çekirdek kompleksi-, UBE2T- ve ID kompleks bağımlı yolak vasıtasıyla monoubikuitinasyonu gerçekleşir. DNA hasarı ile uyarılan FANCD2 monoubikuitinasyonunda ATR, RPA ve HCLK2 proteinleri de rol alır. Monoubikuitinasyonu gerçekleşen FANCD2 ve FANCI, çekirdeğe transloke olur ve burada BRCA1, FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, RAD51, FANCJ/BRIP1 ve diğer proteinlerle birlikte bulunur. BRCA1, DNA hasarına yanıt olarak gerçekleşen FANCD2'nin çekirdekteki formasyonu için gereklidir. FA-çekirdek kompleksi de ayrıca nükleer fokus oluşturur.Tüm bu faktörler DNA'nın çapraz bağ yapan ajanlara karşı direnci için gereklidir.

PCNA'nın monoubikuitinasyonu, E2 olarak RAD6 ve E3 olarak RAD18 gerektirir; ancak FA-çekirdek kompleksine bağımlı değildir. PCNA'nın monoubikuitinasyonu, durmuş replikasyon çatallarında translezyon sentez (TLS) DNA polimerazlarını aktive eder. USP1 ve kofaktörü UAF1, PCNA ve FANCD2'nin ve muhtemelen FANCI'nın deubikuitinasyonuna neden olur.

1: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1401/figure/fa.F1/?report=objectonly internet adresinden değiştirilerek alınmıştır.

2.3.3. TAR SENDROMU (OMIM #274000)

TAR (*Thrombocytopenia absent radius*) sendromu, bilateral radius yokluğu ve trombositopeni ile karakterizedir. Prevalansının 1/100.000-1/200.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir. TAR sendromu'nda el başparmakları korunur. Bu özellik onu, Fanconi anemisi gibi radiyal ışın defekti ve hematolojik bulgularla seyreden diğer sendromlardan ayırt eden en önemli bulgulardan biridir.

TAR sendromu'nda hemen her zaman bilateral radius yokluğu gözlenir. Ancak el başparmakları her zaman korunur. TAR sendromlu olgularda el başparmakları normale göre biraz daha geniş ve yassı olabilir. Ayrıca metakarpofalangeal eklemden hafif fleksiyon postüründe olup, özellikle büyük objeleri kavrama fonksiyonunda yetersizlik olabilir (63).

Ekstremite anomalileri hem üst hem de alt ekstremiteyi tutabilir. Bununla birlikte üst ekstremite tutulumu daha ağırdır. Üst ekstremitelerde radius yokluğuna ek olarak ulna / humerus aplazisi / hipoplazisi ve omuz kuşağı kaslarının hipoplazisi eşlik edebilir. Olguların yaklaşık yarısında alt ekstremite anomalileri de gözlenir. Kalça çıkığı, koksa valga, femoral / tibial torsiyon, genu varum ve patellar agenezi sık gözlenen alt ekstremite anomalileri arasındadır. Olgularda bildirilen en ağır ekstremite tutulumu tetrafokomelidir (64).

Trombositopeni, konjenital olabilir veya yaşamın ilk birkaç haftası ile birkaç ayında ortaya çıkabilir. Bu olgularda trombosit sayısı genellikle 50.000/µl düzeyinin altına düşer. Yüz olguluk bir seride, olguların % 59'unda trombositopeninin ilk bir hafta içinde ortaya çıktığı gözlenmiştir (65). Genellikle trombositopeni atakları yaşla birlikte azalır ve okul çağında olguların çoğu normal trombosit sayısına sahiptir.

TAR sendromlu olgularda zeka gelişimi genellikle normaldir. Ancak iskelet sistemi, kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistem ile ilgili ek anomaliler gözlenebilir.

Kardiyak anomaliler, olguların % 15-22'sinde gözlenir (65, 66). ASD, VSD, AVSD ve PDA bu olgularda bildirilen kalp anomalileri arasında yer almaktadır.

Gastrointestinal bulgular arasında yaşla birlikte düzelme eğilimi gösteren inek sütü alerjisi (olguların % 47'sinde) ve gastroenterit yer alır (66). Olgulardaki alerji ve gastroenterit atakları, semptomatik trombositopeni epizotlarını arttırabilir.

Genitoüriner sistem anomalileri olguların % 23'ünde gözlenir. Çift üreter, at nalı böbrek, hafif renal pelvis dilatasyonu gibi yapısal, üretovezikal reflü, tekrarlayan piyelonefrit atakları gibi fonksiyonel genitoüriner anomaliler gözlenebilir (66). Ayrıca Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser sendromu da nadir olarak bildirilmiştir (67, 68).

TAR sendromu kesin klinik tanısı için bilateral radius yokluğu, başparmakların korunmuş olması ve trombositopeni varlığı yeterlidir.

2.3.3.1. TAR Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez

TAR sendromu'nun kalıtım modelinin kesin olarak bilinmemesi ve olguların genellikle sporadik olarak gözlenmesi nedeniyle; 2007 yılında *Klopocki* ve arkadaşları tarafından, TAR sendromlu 30 olguda mikroarray temelli karşılaştırmalı hibridizasyon tekniği ile delesyon ve duplikasyonlar araştırılmış ve etkilenmiş olguların tümünde 1. kromozomun uzun kolunda (1q21.1) 200-kb büyüklüğünde bir delesyon saptanmıştır (69). Aynı zamanda, etkilenmiş olguların 78 sağlıklı aile bireyinin 25'inde (% 32) de aynı delesyon gösterilmiştir. Bu sonuçlar, 1q21.1 mikrodelesyonunun TAR sendromunun etyopatogenezinde rol oynadığını; ancak fenotipin ortaya çıkması için tek başına yeterli olmadığını göstermiştir.

Daha sonra *Albers* ve arkadaşları tarafından (2012), 53 TAR sendromlu olgudan; 1q21.1 bölgesinde 200-kb delesyon saptanan Avrupa kökenli 51 olgunun 5'inde tüm ekzom dizileme yapılmış ve 4 olguda delesyon bölgesi içinde yer alan genlerden *RBM8A* geninin 5'-UTR bölgesinde düşük frekanslı bir SNP ve 1 olguda ise aynı genin 1. intronunda daha önce bildirilmemiş bir SNP saptanmıştır (70). Geriye kalan 48 olgudan 46 olgunun da Sanger dizileme yöntemiyle bu SNP'leri taşıdığı gösterilmiştir (sırasıyla 35 ve 11 olgu). 5'-UTR bölgesinde SNP taşıyan, ancak 1q21.1 delesyonu taşımayan iki olgunun diğer allellerinde ise sırasıyla 4. ekzonda çerçeve kaymasına neden olan 4 baz çiftlik bir insersiyon ve 6. ekzonda dur kodonuna yol açan bir nokta mutasyonu saptanmıştır. Avrupa kökenli olmayan etkilenmiş bir anne ve fetusunda bu iki SNP'nin olmadığı gösterilmiş ve bu olgularda farklı allellerin etyopatogenezde rol oynayabileceği belirtilmiştir. Ailevi delesyon taşıyan 25 olguda, delesyon ve SNP'nin farklı ebeveynlerden geldiği gösterilmiş ve *in vitro* çalışmalarda bir allelde delesyon ve diğer allelde kodlamayan bölgelerde saptanan iki SNP'den birinin olmasının *RBM8A* transkript düzeylerini azalttığı, TAR sendromlu olguların trombositlerinde ise *RBM8A* tarafından kodlanan ekzon birleşke kompleksinin (EBK) Y14 alt ünitesinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu bulgularla, TAR sendromunun EBK'nin Y14 alt ünitesinin yetersizliğinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

EBK, mRNA'nın yerleşimi, translasyonu ve yıkımı gibi post-transkripsiyonel olayları düzenleyen önemli bir role sahiptir. EBK, mRNA yolağında görev alan diğer faktörlerin bağlanmasına aracılık eden dört alt üniteden oluşur: eIF4AIII, Magoh, Y14 ve kırpılmış

mRNA'nın sitoplazmaya taşınması sonrasında pre-EBK'ya eklenen MLN51 (71). Bunlardan Y14 proteini, *RBM8A* geni tarafından kodlanmaktadır.

RBM8A transkripti, tüm hematopoetik hücre serilerinde ifade edilir ve protein dizisi türler arasında oldukça korunmuştur. EBK'nin önemli fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda, Y14'ün tam yokluğunun insanlarda yaşam ile bağdaşmayacağı düşünülmektedir. Nitekim *Danio rerio'*da Y14'ün ortoloğu *rbm8a* transkriptinin susturulduğu durumda ağır malformasyonlar ve fertilizasyondan 2 gün sonra ölüm gözlenmiştir (70). Ayrıca *Mus musculus*'ta *Rbm8a* için bir transkripsiyon baskılayıcı faktör olan *Evi1*'in embriyogenezde ekstremite tomurcuğu oluşumu sırasında geçici olarak ifade edildiği gösterilmiştir (72). TAR sendromlu olgularda 5'-UTR bölgesinde saptanan SNP'nin EVI1'in bağlanma afinitesini artırdığı (70) göz önünde bulundurulduğunda, TAR sendromlu olgularda gözlenen ekstremite anomalileri, embriyogenezde artmış EVI1 afinitesine bağlanabilir.

2.3.3.2. TAR sendromu'nda Tedavi

TAR sendromlu olgularda tedavi, trombositopenik olgularda trombosit transfüzyonu ve ekstremite fonksiyonlarının optimizasyonu için cerrahi müdahaleleri içerir.

Sık trombosit transfüzyonu, alloimmunizasyon ve enfeksiyon gibi komplikasyonlara yol açabileceğinden, seçilmiş olgulara trombosit transfüzyonu yapılmalıdır. Bununla birlikte, trombositopenik yenidoğanlarda transfüzyon için belirlenmiş net eşik değerler bulunmamaktadır (73), ancak yaygın uygulamada trombosit transfüzyonu aşağıdaki endikasyonlarda yapılmaktadır (74) :

- Term, stabil bir infantta trombosit sayısının 20.000/µl'nin altına inmesi
- Preterm infantlarda ilk hafta içinde veya durumu stabil olmayan (kan basıncında düzensizlikler, peteşi, göbek kordonundan sızıntı gibi kanama bulgularının olması) term infantlarda, trombosit sayısının 50.000/µl'nin altında olması
- Aktif kanaması olan ve trombosit sayısı 100.000/µl'nin altında olan tüm olgular
- Major cerrahi operasyon uygulanacak trombosit sayısı 100.000/µl'nin altında olan olgular

Ekstremite fonksiyonlarının optimizasyonu için TAR sendromlu olgularda protez, ortez gibi cihazlar ya da cerrahi müdahaleler uygulanabilmektedir (75).

TAR sendromu tanısı alan olgular, olası kardiyovasküler sistem ve genitoüriner sistem anomalileri açısından EKG, ekokardiyografi ve ultrasonografik incelemeler ile ayrıca değerlendirilmelidir.

2.3.4. Cornelia de Lange Sendromu (OMIM #122470)

Cornelia de Lange sendromu (CdLS), özgün fasiyal dismorfizm, pre- ve postnatal büyüme geriliği, mental retardasyon, hirsutizm ve üst ekstremite anomalileri ile karakterizedir. Birçok olguda otistik davranışlar ve kendine zarar verme eğilimi gibi davranışsal problemler de gözlenir. Olgularda sık gözlenen diğer bulgular arasında kardiyak septal defektler, gastrointestinal disfonksiyon, işitme kaybı, miyopi, kriptorşidizm veya hipoplastik genitalya yer alır. CdLS'nun klasik fenotipinden farklı olarak hafif fenotiplerinde ise büyüme geriliği, mental retardasyon ve ekstremite anomalileri daha az belirgin iken, sıklıkla karakteristik fasiyal dismorfizm mevcuttur.

CdLS'de kraniyofasiyal bulgular oldukça tipiktir ve yaşla birlikte yüz bulgularında farklılaşma gözlenir. Bu nedenle ileri yaşlarda olguların yüz bulguları tipik ve daha az tipik olarak ikiye ayrılır (76). Tipik kraniyofasiyal bulgular arasında; mikrobrakisefali, sinofri ve yay şeklinde kaşlar (% 99), uzun ve kalın kirpikler (% 99), düşük, geriye dönük ve/veya kalın heliksli/kıllı kulaklar (% 70), basık veya geniş burun kökü, kısa ve yukarı dönük burun (% 78-88), uzun / belirgin filtrum (% 78-94), üst dudakta ince vermilion kenarı (% 94), aşağı dönük ağız köşeleri (% 65-94), yüksek damak / yarık damak (% 59), küçük ve aralıklı yerleşmiş dişler (% 86), mikrognati (% 84), mandibuler çıkıntı (% 42), kısa boyun (% 66) yer alır (76-79). Özellikle hirsutizmin eşlik ettiği sinofri, uzun kirpikler, uzun filtrum, ince üst dudak ve aşağı dönük ağız köşeleri, olguların büyük kısmında birlikte gözlenen karakteristik fasiyal dismorfik bulgulardır (78).

Olguların % 95'inden fazlasında büyüme geriliği gözlenir. Büyüme geriliği genellikle prenatal başlangıçlı olup, olguların boyu ve kilosu yaşam boyu 5. persantilin altında seyreder (80-82). Ayrıca bu olgularda sık gözlenen beslenme problemleri, gastroözofageal reflü, intestinal malrotasyon, pilor stenozu gibi komplikasyonlar büyüme geriliğini daha belirgin hale getirebilir.

Gelişme geriliği / mental retardasyon, olguların % 95'inde gözlenir. Olguların % 98'inde baş çevresi 2. persantilin altındadır (83). Klasik CdLS olgularında ağır mental retardasyon gözlenirken; hafif fenotiplerde genellikle zeka geriliği hafif veya orta düzeydedir.

CdLS olgularının ortalama IQ skoru 53 (30-85) olmakla birlikte, normal zeka düzeyine sahip nadir olgular da bildirilmiştir (84, 85).

Ekstremite anomalileri, CdLS'de sıklıkla gözlenir. Üst ekstremite anomalileri, alt ekstremite anomalilerine göre daha sıktır. Üst ekstremitelerde redüksiyon defektleri, oligodaktili gibi ağır tutulum olguların % 27'sinde gözlenir ve genellikle ekstremite bulguları olguların klinik ağırlığı ile korelasyon gösterir (78). Ağır ekstremite tutulumu olmayan olguların hemen hemen tamamında küçük eller, proksimal yerleşimli el başparmakları, 5. el parmaklarında klinodaktili gibi hafif bulgular gözlenir. Radyolojik olarak kısa birinci metakarpal kemikler, özellikle hafif fenotipler için önemli bir tanısal ipucu olabilir (86). Radioulnar sinostoz, olgularda sık gözlenen (% 64) diğer bir ekstremite anomalisi olup, dirseklerde fleksiyon kontraktürlerine yol açabilir (78).

Alt ekstremite anomalileri, üst ekstremitelere göre daha nadir gözlenir. Bazı olgularda alt ekstremite redüksiyon defektleri, üst ekstremite redüksiyon defektlerine eşlik edebilir. Bununla birlikte küçük ayaklar, 2-3. ayak parmakları arasında sindaktili sık gözlenir (78).

CdLS'da birçok sistem etkilenebilir, ancak nörogelişimsel, kraniyofasiyal gastrointestinal ve kas-iskelet sistemi en fazla etkilenen sistemlerdir.

Gastrointestinal sistemde, özellikle gastroözofageal reflü olguların büyük bir kısmında önemli bir problemdir ve tedavi edilmezse özofajit, aspirasyon, kimyasal pnomoni ve solunum sistemi irritabilitesi gibi komplikasyonlara yol açabilir. Pilor stenozu, yaklaşık % 4 olguda gözlenir ve yenidoğan döneminde inatçı kusmaların en sık nedenidir. Diğer gastrointestinal bulgular arasında malrotasyon (% 2), artmış volvulus riski ve konjenital diafragma hernisi (% 1) yer alır (87).

Kardiyovasküler anomaliler olguların yaklaşık % 25'inde gözlenir. Olgularda bildirilen kardiyovasküler anomaliler sıklık sırasına göre; ventriküler septal defekt, atriyal septal defekt, pulmoner stenoz, Fallot tetralojisi, hipoplastik sol kalp sendromu ve biküspit aortadır (78, 88, 89).

Olguların % 80'inde sensörinöral işitme kaybı bildirilmiş olup; işitme kaybı, bu olguların % 40'ında ileri derecede olabilmektedir (77). Yaklaşık olarak olguların yarısında değişen derecelerde pitozis, % 60 olguda miyopi, % 37 sinde ise nistagmus bildirilmiştir (90). CdLS'unda bildirilmiş diğer göz anomalileri; glokom, nazolakrimal kanal stenozu, mikrokornea, astigmatizm, optik atrofi, optik sinir kolobomu, strabismus ve proptozistir (90-92).

Kriptorşidizm olguların % 73 ünde, hipoplastik genitalya % 57 sinde, özellikle vezikoüreteral reflü olmak üzere renal anomaliler % 12 sinde bildirilmiştir (78). Olgularda gözlenen diğer anomaliler arasında; genellikle infant dönemde kaybolan pes tonda ağlama (% 75), kutis marmorata (% 60), hipoplastik meme başları ve umbilikus (% 55) yer alır (87).

CdLS'li olguların yaşam beklentisinde belirgin bir azalma saptanmamıştır. İkiyüzdoksanbeş olguluk bir seride ölüm sebepleri olarak; aspirasyon / reflü ve pnömoniyi içeren respiratuvar sebepler (% 31), intestinal obstrüksiyon / volvulusu içeren gastrointestinal sebepler (% 19), konjenital kalp anomalileri ve konjenital diafragma hernisi gibi konjenital anomaliler (% 15), edinilmiş kalp hastalıkları (% 3), nörolojik sebepler (% 8), kazalar (% 8), sepsis (% 4), kanser (% 2), renal hastalık (% 1.7) ve diğer nedenler (% 9) bildirilmiştir (93).

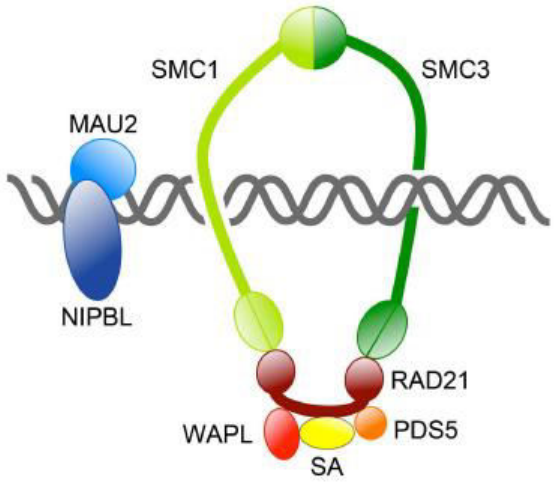
2.3.4.1. Cornelia de Lange Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez

Tipik CdLS olgularının yarısından fazlasında (~% 60) *NIPBL* genindeki heterozigot fonksiyon kaybettirici mutasyonların rol oynadığı gösterilmiştir (94, 95). Mutasyon saptanmayan olguların % 23'ünde ise *NIPBL* geninde mozaik mutasyonlar bildirilmiştir (96, 97). Ayrıca CdLS olgularının yaklaşık % 6'sında otozomal *SMC3* ve *RAD21* genlerindeki heterozigot mutasyonlar ile X'e bağlı *SMC1A* ve *HDAC8* genlerdeki hemizigot veya heterozigot mutasyonlar gösterilmiştir (98). *NIPBL* dışındaki genlerde mutasyon saptanan olgularda klasik CdLS fenotipi ile uyumlu bir çok bulgu olmasına rağmen, bu olgularda major malformasyonlar gözlenmez ve sıklıkla büyümeleri ve/veya yüz görünümleri atipiktir (98).

Bilinen CdLS genlerinin protein ürünlerinin her biri kohezin kompleksinde yer alırlar (99, 100). Kohezin kompleksinin en iyi bilinen fonksiyonu, kardeş kromatidleri bir arada tutmasıdır. *NIPBL*, metafaz kromozomları üzerinde multimerik bir halka yapısının oluşmasına aracılık eder (101). Bu halka yapısı; *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* ve *STAG1/2* (SA1/2) den oluşur (Şekil 2-3). Kardeş kromatidlerin metafazda birbirinden ayrılması, separaz ile RAD21'in yarıklanması sonucu gerçekleşir (102). Kohezin kompleksinin bir diğer fonksiyonu, bölünmeyen hücrelerde transkripsiyonun düzenlenmesidir (103). İnterfaz kromatinlerinde kohezin halkasının idamesi veya serbest kalması, *SMC3*'ün asetilasyonu veya deasetilasyonu ile düzenlenir. *SMC3*; *ESCO1* veya *ESCO2* (fonksiyon kaybettirici mutasyonları Roberts sendromu'na neden olur (MIM #268300)) tarafından asetile olurken, *HDAC8* tarafından deasetile olur. *SMC3*'ün deasetilasyonu, profaz ve anafazda kromatinden ayrışan kohezinin yenilenmesini kolaylaştırır. Bu nedenle *HDAC8* fonksiyonunun kaybı, asetile-*SMC3*'ün

artışına ve kromatin üzerindeki kohezinin azalmasına neden olarak transkripsiyonda değişime yol açar (104). Bu nedenle CdLS'nun bir kohezinopati olduğu söylenebilir.

NIPBL'nin kohezinden farklı zamanlarda ve DNA'da farklı bölgelere bağlandığı gösterilmiştir. Bu bağlanma bölgelerinin özellikle aktif genlerin promoter bölgelerinde yer alması, *NIPBL*'nin bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynadığını; ayrıca *NIPBL* veya kohezin inaktivasyonunun bu genlerin transkripsiyonlarını farklı oranlarda azaltması, *NIPBL*'nin transkripsiyon üzerinde kohezinden bağımsız bir etkisinin de olduğunu göstermektedir (105). Bu bulgular, *NIPBL*'nin hem kohezin bağlantılı hem de kohezinden bağımsız olarak önemli gelişimsel genlerin transkripsiyonunu etkilemek suretiyle CdLS fenotipine yol açtığını düşündürmektedir (105, 106).



Şekil 2-3. Kohezin Kompleksi ve İlişkili Proteinler[1]. Kohezin kompleksi 4 alt üniteden oluşur: SMC1, SMC3, RAD21 ve SA. Bu alt üniteler DNA zincirlerinin etrafını saran bir halka yapısı oluştururlar. Diğer proteinler kohezinin DNA'ya bağlanmasını ve idamesini düzenlerler. NIPBL/MAU2 dimeri kohezinin DNA üzerinde kalmasını sağlarken, WAPL/PDS5 ise RAD21-SMC3 ilişkini keserek kohezinin DNA'dan ayrışmasını sağlar.

1: Julia A. Horsfiled et al., 2012 yayınından alınmıştır.

2.3.5. Roberts Sendromu (OMIM #268300)

İlk kez Roberts tarafından 1919 yılında birinci derece kuzen evliliği ürünü üç İtalyan kardeşte tanımlanmış olan Roberts sendromu (RBS), prenatal büyüme geriliği, kraniyofasiyal bulgular (mikrosefali, yarık damak/dudak, fasiyal dismorfizm) ve ekstremite anomalileri ile karakterizedir. Bilişsel yetersizlik, olguların çoğunda bildirilmiştir. Geçmişte Roberts sendromu için Appelt-Gerken-Lenz sendromu, hipomeli-hipotrikozis-fasiyal hemanjiom sendromu ve tetrafokomeli-yarık damak sendromu gibi isimler de kullanılmıştır. RBS, otozomal resesif kalıtımlı nadir bir sendrom olup, sıklığı ile ilgili kesin bilgi

bulunmamaktadır. Bununla birlikte literatürde farklı etnik kökenden 150 civarında olgu bildirilmiştir (107).

Olgularda gözlenen büyüme geriliği antenatal başlangıçlı olup, oldukça sabit bir bulgudur. Postnatal büyüme geriliği orta ya da ağır olabilir ve ekstremite/kraniyofasiyal bulguların ağırlığı ile korelasyon gösterir (108).

Ekstremite anomalileri, simetrik mezomelik kısalık ve anterior-posterior aks tutulumu ile karakterizedir. En sık ve en ağır tutulan uzun kemikler sıklık sırasına göre üst ekstremitelerde radius, ulna, humerus; alt ekstremitelerde ise fibula, tibia ve femurdur. Ekstremite anomalilerinin derecesi sefalo-kaudal bir patern gösterir, üst ekstremiteler, alt ekstremitelere göre daha ağır etkilenir (108, 109), hatta sadece üst ekstremite tutulumu gösteren olgular da bildirilmiştir (109-111).

Olgularda gözlenen el anomalileri arasında brakidaktili ve oligodaktili yer alır. En sık etkilenen parmak el başparmakları olup, sıklıkla agenezi, hipoplazi veya proksimal yerleşimli başparmak anomalileri gözlenir. El başparmaklarından sonra en sık klinodaktili, hipoplazi veya agenezi gibi anomaliler ile beşinci parmaklar etkilenir. Ağır olgularda ellerde sadece üç parmak, daha nadir olarak tek parmak gözlenebilir (108, 109).

Kraniyofasiyal anomaliler, yarık dudak ve/veya yarık damak, premaksiller çıkıntı, mikrognati, mikrobrakisefali, midfasiyal kapiller hemanjiyom, malar hipoplazi, aşağı çekik palpebral fissürler, hipertelorizm, sığ orbitalara bağlı ekzoftalmus, korneal bulutlanma, hipoplazik ala naziler, sivri/gaga burun ve kulak malformasyonları ile karakterizedir. Hafif etkilenmiş olgularda yarık damak gözlenmeyebilir veya sadece yüksek damak gözlenebilir. (108, 109).

Ekstremite anomalilerinin ağırlığı ile kraniyofasiyal anomaliler arasında korelasyon mevcuttur. Yani ağır ekstremite anomalileri gözlenen olguların yüz bulguları da daha ağır olmaktadır (108, 109).

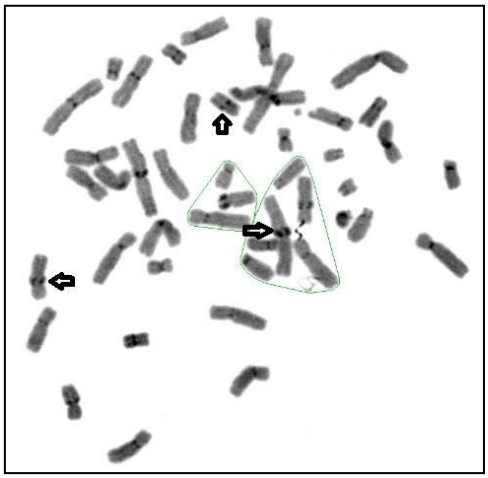
Olgularda bildirilen diğer anomaliler arasında ASD, VSD, PDA gibi kalp anomalileri, polikistik böbrek, at nalı böbrek gibi renal anomaliler, büyük penis (ekstremite anomalilerine bağlı göreceli büyük olabilir), kriptorşidizm ve kliteromegali gibi genital anomaliler, gümüş sarısı/seyrek saçlar, kraniyal sinir paralizileri (nadir), moyamoya hastalığı ve inme (nadir) yer alır (108, 109).

Normal bilişsel ve sosyal gelişim gösteren RBS'li olgular bildirilmekle birlikte, olguların çoğunda bilişsel yetersizlik gözlenir (108, 109, 112).

Roberts sendromu'nun doğal seyri ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Etkilenmiş olgular arasında, aynı ailede bile geniş klinik varyabilite gösterilmiştir. RBS'li bir olgunun prognozu, mevcut anomalilerin ağırlığına bağlıdır. Ağır etkilenmiş olgularda antenatal veya yenidoğan döneminde ölüm gözlenebilirken, hafif etkilenmiş olgular erişkin çağa kadar yaşabilmektedir.

2.3.5.1. Roberts Sendromu'nda Tanı: Erken Sentromer Ayrışması

Roberts sendromu'nun tanısı, periferik kandan yapılan sitogenetik analizde ''erken sentromer ayrışması'' bulgusunun gösterilmesine dayanır (113, 114). Roberts sendromlu olgularda; standart G-band ya da C-band tekniğiyle hazırlanmış sitogenetik preparatlarda, tanısal değer taşıyan ''erken sentromer ayrışması (*premature centromere separation-[PCS]*)'' ve ''heterokromatin bölgelerde ayrışma (*heterochromatin repulsion-[HR]*)'' bulgusu saptanır (Şekil 2-4).



Şekil 2-4[1]. Roberts sendromlu bir olgunun metafaz kromozomlarında C-bantlama. Oklar, karakteristik erken sentromer ayrışmasını göstermektedir.

1: İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD. Lab. arşivinden

2.3.5.2. Roberts Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez

Roberts sendromu'nun da Cornelia de Lange sendromu gibi bir kohezinopati olduğu ve kohezin asetiltransferazı kodlayan *ESCO2* genideki homozigot mutasyonların Roberts sendromu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (115).

Kohezin kompleksini oluşturan proteinlerden *SMC3*'ün asetilasyonu, kohezinin yapışkan formunu oluşturur ve böylece kardeş kromatidlerin G2'den M fazına kadar bir arada tutulması sağlanır (116). Bu nedenle insanda *SMC3*'ün asetilasyonunu sağlayan ESCO1 ve ESCO2 koasetil transferazlar (CoAT), kardeş kromatidlerin bir arada tutulması için gereklidir. Bununla birlikte, Roberts sendromlu hastalarda özellikle heterokromatin bölgelerde ve kardeş kromatidlerin sentromer bölgelerinde ayrışma gözlenmesi, ESCO2 CoAT'nin özellikle heterokromatin bölgelerin kohezyonunda rol oynadığını göstermektedir (115).

Kromatid kohezyonundaki defekt mitotik iğcik kontrol noktasının aktivasyonuna ve hücre büyümesinin durmasına yol açar (117). RBS olgularında gözlenen kohezyon defekti, bu kontrol noktasını aktive ederek, mitotik duraksamaya ve hücre çoğalmasının azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle; erken embriyogenez aşamasında progenitör hücrelerin kaybının, RBS olgularında etkilenen yapıların gelişimi için yeterince hücrenin olmaması ve sendrom dahilinde gözlenen anomalilerin ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir (115).

2.3.6. *SALL4* İlişkili Fenotipler (OMIM #607323)

SALL4 ilişkili fenotipler; Duane-Radiyal Işın sendromu (DRRS, Okihiro sendromu), acro-renal-oküler sendrom (AROS) ve *SALL4* ilişkili Holt-Oram sendromunu içerir ve otozomal dominant olarak kalıtılırlar (118).

DRRS (Duane-Radial Ray Syndrome), unilateral veya bilateral *Duane* anomalisi'ne eşlik eden radiyal ışın malformasyonları ile karakterizedir. Bu olgularda gözlenen radiyal ışın malformasyonları arasında tenar hipoplazi, el başparmaklarının aplazisi/hipoplazisi, radius hipoplazisi/aplazisi, ön kollarda kısalık ve radiyal deviasyon, trifalangeal başparmaklar ve preaksiyel polidaktili yer alır. Bu sendrom dahilinde gözlenen *Duane* anomalisi, gözlerde bilateral veya unilateral abduksiyon kısıtlılığına diğer gözde (adduksiyondaki gözde) eşlik eden glob retraksiyonu ve palpebral fissürde daralma ile karakterizedir. *Duane* anomalisinde postmortem olarak nervus abdusens çekirdek ve sinirinin olmadığı ve lateral rektus kasının, okülomotor sinir dalları tarafından kısmi olarak inerve edildiği gösterilmiştir (119).

AROS (Acro Renal Ocular Syndrome), radiyal ışın malformasyonlarına eşlik eden renal ve oküler anomaliler ile karakterizedir. Bu olgularda gözlenen renal anomaliler arasında hafif malrotasyon, at nalı böbrek, renal hipoplazi, ektopik böbrek, vezikoüreteral reflü ve mesane divertikülü yer alır. Oküler kolobom ve *Duane* anomalisi ise bu olgularda gözlenen göz anomalileridir. AROS terimi ilk kez 1984 yılında başparmak anomalileri, renal malformasyonlar, oküler kolobom, pitozis ve *Duane* anomalisi bulguları ile 3 kuşakta

etkilenmiş 7 olguda otozomal dominant kalıtımlı bir antiteyi tanımlamak için *Halal* ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (120).

Renal anomalilerin, DRRS'de de bildirildiği ve bir çok klinik bulgunun DRRS ve AROS'da ortak olduğu göz önünde bulundurulduğunda, aslında DRRS ve AROS'un aynı sendrom olduğu söylenebilir. Nitekim, DRRS ve AROS tanılı olgularda, moleküler düzeyde *SALL4* mutasyonlarının lokalizasyonu açısından belirgin bir farklılık gözlenmemiş olup, bu iki antitenin moleküler düzeyde de örtüştüğü gösterilmiştir (118).

IVIC sendromu (***I**nstituto **V**enezolano de **I**nvestigaciones **C**ientificas)*, ilk kez 1980 yılında Kanarya adaları'ndan Venezuela'ya göç etmiş bir ailede 4 kuşak boyunca etkilenmiş ve yaşayan 17 olguda tanımlanmıştır (121). Etkilenmiş olgularda değişen ağırlıklarda radiyal ışın defektleri, ekstraoküler kasların tutulumuna bağlı şaşılık, mikst tipte işitme kaybı ve 50 yaşından önce ortaya çıkan hafif trombositopeni ve lökositoz bulguları; ayrıca bazı olgularda, ek olarak renal malrotasyon ve imperfore anüs bulguları bildirilmiştir. Daha sonra üç farklı ailede daha otozomal dominant kalıtımla uyumlu benzer fenotipte olgular bildirilmiştir (122-124). 2007 yılında; *Arias ve ark. (1980)* tarafından bildirilen Venezuellalı ailede, *SALL4* geninde çerçeve kaymasına yol açan heterozigot bir mutasyon (c.2607delA, p.Q869fsX44) saptanmış ve IVIC sendromunun *SALL4* ilişkili fenotipler arasında yer aldığı gösterilmiştir (125). IVIC sendromu, 50 yaşından önce ortaya çıkan hafif trombositopeni ve lökositoz bulguları dışında DRRS ile ortak klinik bulgular gösterir. Bu nedenle IVIC sendromu ile DRRS'in aynı klinik antite mi, yoksa allelik sendromlar mı olduğu konusu; IVIC sendromlu olgu sayısının çok az olması nedeniyle henüz netleşmemiştir.

Holt-Oram sendromu klinik tanısı alan ve *TBX5* geninde mutasyon saptanmayan bazı olgularda *SALL4* geninde mutasyon saptanmış olsa da; aslında olgular tekrar değerlendirildiğinde çoğunun ek olarak *Duane* anomalisi veya renal anomaliler gösterdiği ve DRRS ile uyumlu bir fenotiplerinin olduğu saptanmıştır (34, 118). Bu nedenle Holt-Oram sendromu'nun *SALL4* ilişkili fenotipler arasındaki yeri şüphelidir.

2.3.6.1. DRRS'de Moleküler Etyopatogenez

DRRS, *SALL* gen ailesinden *SALL4* genindeki heterozigot mutasyonlarda ilişkili olup, otozomal dominant kalıtım özelliği gösterir. *SALL* gen ailesinin dört üyesi olup (*SALL1*, *SALL2*, *SALL3* ve *SALL4*) bunlardan *SALL1* geni Townes-Brocks (OMIM #107480) sendromu ile ilişkilidir. *SALL2* geninin otozomal resesif oküler kolobom (OMIM #216820) ile

ilişkili olabileceği bir ailede gösterilmiş olmakla birlikte, *SALL2* ve *SALL3* genleri ile ilişkili kesin bir klinik fenotip henüz tanımlanmamıştır.

2002 yılında Kohlhase ve ark., *SALL1* geni ile ilişkili Townes-Brocks sendromunun DRRS ile ortak bazı klinik bulgular (*Duane* anomalisi, anal stenoz, sağırlık ve dış kulak anomalileri) göstermesi ve *SALL4* bölgesini içeren (20q13.2) kromozomal delesyonlu olgularda ekstremite anomalilerinin bildirilmiş olması nedeniyle, *SALL4* geninin DRRS için aday gen olabileceğini öne sürmüş ve DRRS tanılı 8 ailenin 5'inde *SALL4* geninde mutasyon göstermiştir (126).

SALL4, 4 ekzondan oluşan bir transkripsiyon faktörüdür. Farelerde yapılan çalışmalarda; Sall4'ün erken embriyonik hücrelerde ifade edildiği, Oct4 ve Sox2'nin transkripsiyonlarını düzenlemek suretiyle embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenileme ve pluripotent özelliklerinin devamını sağladığı gösterilmiştir (127, 128).

Embriyonik kök hücrelerin kendilerine özgü iki önemli özellikleri; kendi kendini yenileme ve pluripotensidir (vücuttaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli). Oct-3/4 ve Sox2 gibi bir grup transkripsiyon faktörü, embriyonik kök hücrelerin bu özelliklerini devam ettirebilmesi için anahtar bir rol üstlenirler. *In vitro* çalışmalarda; Oct-3/4 ve Sox2'nin farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde ifade edildiği ve bu genlerin baskılanması ile embriyonik kök hücrelerde farklılaşmanın başladığı; Sall4'ün ise, Oct4 ve Sox2 ifadesini düzenlediği gösterilmiştir (127). Bu da DRRS'de gözlenen anomalilerin, erken embriyonik aşamada embriyonik kök hücrelerdeki farklılaşma bozukluklarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

2.3.7. Townes-Brocks Sendromu (OMIM #107480)

Townes-Brocks sendromu (TBS), imperfore anüs, sıklıkla işitme kaybının eşlik ettiği displastik kulaklar ve anormal el başparmakları triadı ile karakterize otozomal dominant kalıtımlı bir sendromdur. İlk kez 1972 yılında Townes ve Brocks tarafından, etkilenmiş bir baba ve 5 çocuğunda (3 erkek, 2 dişi) imperfore anüs, trifalangeal başparmaklar ve diğer el-ayak anomalileri, hafif sensörinöral işitme kaybı ve displastik kulak bulguları ile tanımlanmıştır (129). Kesin sıklığı bilinmemekle birlikte Martinez-Frias ve arkadaşları (1999) İspanya'da yaptıkları bir epidemiyolojik çalışmada sıklığını yaklaşık 1:250,000 olarak saptamışlardır (130).

TBS olgularında gözlenen el başparmak anomalileri trifalangeal başparmaklar, başparmak duplikasyonu (preaksiyel polidaktili) ve nadiren de hipoplastik başparmaklardır.

Tipik kulak yapısı ise katlantılı superior heliksler şeklindedir (sarkık kulaklı) ve preauriküler deri uzantısı eşlik edebilir.

Yakında zamanda bildirilen klinik ve moleküler tanılı 29 ve 32 olgudan oluşan toplam 61 olguluk iki seri birlikte değerlendirildiğinde; anal anomaliler olguların % 84 ünde, el anomalileri % 89 unda, kulak anomalileri % 87 sinde ve bu üç karakteristik bulgunun birlikteliği ise % 67 sinde saptanmıştır (131, 132). Karakteristik bulgulardan sadece ikisini gösteren olgularda, sıklıkla TBS sendromu'nda gözlenen renal anomaliler, işitme kaybı, kalp anomalileri gibi diğer ek anomaliler saptanır.

TBS'de karakteristik üç bulgunun (imperfore anüs, başparmak anomalileri ve displastik kulaklar) dışında gözlenen ek anomaliler şöyle sıralanabilir (131-133):

Göz bulguları: Mikroftalmi (nadir), iris kolobomu, lamellar katarakt, vizyon kaybının eşlik ettiği koriyoretinal kolobom.

Böbrek anomalileri (% 54): Renal agenezi, renal hipoplazi, polikistik böbrekler, yapısal anomalilerin eşlik ettiği veya etmediği renal fonksiyon bozukluğu (% 42). Olguların yaklaşık % 20'sinde son dönem böbrek yetmezliğini de içine alan böbrek yetmezliği tablosu gözlenebilir.

İşitme kaybı (% 65): Konjenital sensörinöral ve/veya iletim tipi işitme kaybı hafiften ağıra kadar değişen derecelerde olabilir. Hafif işitme kayıpları yaşla birlikte ilerleyici olabilir.

Kalp anomalileri: p.Arg276* mutasyonunu taşıyan TBS olgularının % 50'sinde konjenital kalp anomalileri gözlenirken, diğer mutasyonları taşıyan olgularda bu oran % 12-25 e azalmaktadır. Olgularda saptanan kalp anomalileri arasında atriyal septal defekt, ventriküler septal defekt, Fallot tetralojisi, letal trunkus arteriozus, pulmoner kapak atrezisi ve persistan duktus arteriozus yer alır.

Gastrointestinal anomaliler: Anal stenoz, kronik konstipasyon ve gastroözofageal reflü bildirilmiştir (134).

Genitoüriner anomaliler (% 36): Hipospadiyas, vajinal atrezi, bifid uterus, bifid skrotum, kriptorşidizm olgularda bildirilen genitoüriner anomaliler arasında yer almaktadır.

Alt ekstremite anomalileri (% 52): Yumru ayak, üst üste binmiş ayak parmakları (II ve IV, III'ün üstünde), sindaktili, III. parmak yokluğudur.

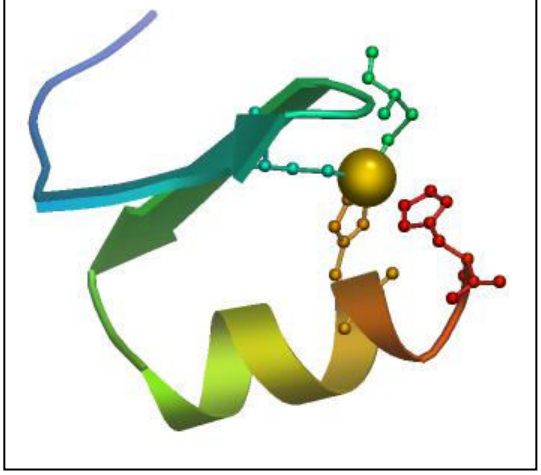
Diğer anomaliler: Hemifasiyal mikrozomi (135), mikrosefali, mental retardasyon (~%10), kraniyal sinir paralizileri (VI, VII), *Duane* anomalisi (nadir), korpus kallozumun dorsal hipoplazisi (nadir), kot ve vertebral anomaliler (% 9), konjenital hipotiroidizm (nadir).

TBS'in penetransı tamdır, ancak aynı ailede dahi geniş ekspresivite değişkenliği gösterir. Bu nedenle TBS tanısı alan bir olgunun ebeveynleri, gözden kaçabilecek hafif bulgular açısından dikkatle değerlendirilmelidir.

2.3.7.1. Townes-Brocks Sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez

Otozomal dominant kalıtımlı TBS, *SALL1* genindeki heterozigot mutasyonlarla ilişkilidir.

İnsan *SALL1* geninin, Meyve sineğindeki homoloğu, *spalt* tarafından kodlanan Sal proteinine benzer bir C2H2 çinko parmak proteinini kodlamaktadır. Bu protein, dört tane çift çinko parmak domaini içerir ve bu domainler tüm protein boyunca yayılmıştır. Ayrıca iki tane tek çinko parmak domaini içerir. Bunlardan bir tanesi N-terminal ucunda yer alan C2HC domaini ve diğeri ise ikinci çift çinko parmak domainine tutunmuş olan C2H2 parmağıdır (Şekil 2-5). *SALL1*'in yoğun bir şekilde hücre çekirdeğinde bulunduğu, heterokromatik bölgelere bağlandığı ve biri N-terminal uçta, diğeri ise merkezi kısmında yer alan iki tane baskılayıcı bölgesinin olduğu gösterilmiştir. Merkezde bulunan baskılayıcı bölge, proteinin heterokromatin lokalizasyonu için gereklidir ve oldukça önemlidir (136).



Şekil 2-5. *SALL1* proteininin üç boyutlu görüntüsü (*http://swissmodel.expasy.org/repository/smr.php?sptr_ac=Q9NSC2&csm=41AFA91ADEBEEF8C* internet adresinden alınmıştır.)

TBS'ye yol açan mutasyonların büyük çoğunluğu *SALL1* geninin 5' ucunda yer alan birinci çift çinko parmak domainini kodlayan bölgede meydana gelir ve mutasyonların hemen tamamı prematür stop kodon mutasyonlarıdır (136). Bu da TBS etyopatogenezinde *SALL1* haployetersizliğinin rol oynadığını düşündürmektedir. Ancak farelerde ve tavuklarda yapılan çalışmalarda mutant proteinin çekirdek ve sitoplazmada bulunduğu ve diğer Sall proteinleri ile etkileşime girerek onları çekirdekten sitoplazmaya taşıdığı ve daha zararlı hale geldiği gösterilmiştir (137, 138). Ayrıca *SALL1* geninin 3' bölgesinde yer alan mutasyonların, 5' bölgesindekilere göre daha hafif bir fenotipe neden olduğu gösterilmiştir (132, 139). Bu olgularda *SALL1*'in özellikle heterokromatin lokalizasyon bölgesi olmak üzere, iki baskılayıcı bölgesinin korunması nedeniyle proteinin kısmi olarak fonksiyon gösterdiği ve bu nedenle fenotipin daha hafif olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında; TBS patogenezinde kritik noktanın, fonksiyonel *SALL1* proteininin heterokromatin bağlanma bölgesindeki dozajının olduğu düşünülmektedir (136). Bir allelin tam delesyonu, heterokromatin bağlanma odaklarındaki *SALL1* dozajının % 50 azalmasına neden olurken; her iki baskılayıcı bölgenin kaybına neden olan 5' bölge mutasyonlarında ise mutant proteinin normal proteine de bir miktar bağlanmak suretiyle onu sitoplazmaya taşıdığı ve heterokromatin odaklardaki fonksiyonel *SALL1* dozajının % 50'den daha fazla azaldığı düşünülmektedir.

Tavuklarda, ekstremitelerde *csal1* (*SALL1*'in tavuklardaki ortologu) ifadesinin ektopik *Shh* tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte bu aktivasyonun apikal ektodermal kabartıdan gelen *Fgf4/8, Wnt3a* ve *Wnt7a* sinyallerini gerektirdiği saptanmıştır (140). Zebra balıklarında ise *SALL1* homoloğu olan *sall1a*'nın tbx5 tarafından düzenlendiği ve posterior pektoral kanat tomurcuğunda *fgf10* ve *fgfr2* ifadesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (141). Farelerde ise *Sall1*'in perisentrometrik heterokromatin bölgelere lokalize olarak Wnt sinyal yolağını uyardığı gösterilmiştir (142). Tüm bu bilgiler, TBS'de gözlenen anomalilerin, erken embriyogenezde *SALL1*'in bu yolaklarla olan ilişkisinin bozulmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

2.3.8. *RECQL4* İlişkili Fenotipler

2.3.8.1. Baller-Gerold Sendromu (OMIM #218600)

Baller-Gerold sendromu (BGS), kraniyosinostoz ve radiyal ışın defektleri ile seyreden otozomal resesif kalıtımlı nadir bir sendromdur. Sıklığı bilinmemekle birlikte, prevalansının 1:1,000,000 civarında olduğu tahmin edilmektedir (143). İlk olguların 1950 yılında Baller ve

1959 yılında Gerold tarafından tanımlanmasından sonra literatürde 30 civarında olgu bildirilmiştir.

BGS'nin kardinal bulgularından biri kraniyosinostozdur (144). Bu olgularda kraniyosinostoz genellikle koronal kraniyosinostoz şeklindedir ve buna bağlı olarak brakisefali, proptozis ve çıkık alın gibi sekonder bulgular gözlenir. Kraniyosinostozun kesin tanısı, direkt kafa grafisi veya tercihen kraniyal üç boyutlu bilgisayarlı tomografi ile konabilir.

BGS'nin diğer kardinal bulgusu radiyal ışın defektleridir. Radiyal defektler; başparmak aplazisi/hipoplazisi veya radiyal aplazi/hipoplazi şeklinde ve asimetrik olabilir. Ayrıca oligodaktili, patella aplazi/hipoplazisi de bu olgularda bildirilmiş ekstremite anomalileri arasında yer alır (145).

Brakisefali, sığ orbitalar, çıkık alın ve geniş fontaneller gibi koronal sinostoza ikincil bulgular her zaman doğumda mevcuttur. Ayrıca BGS olgularında eşlik edebilecek kraniyofasiyal bulgular arasında semer burun, hipoplazik burun, ince vermilion kenarlı küçük ağız ve yüksek damak yer alır.

Büyüme geriliği BGS olgularında oldukça sabit bir bulgudur. Özellikle çocukluk döneminde büyüme geriliği belirgin hale gelir ve olguların boy ve kiloları genellikle -4 SD'nin altındadır. Bununla birlikte zeka genellikle normaldir (146).

RECQL4 ilişkili fenotiplerden özellikle Rothmund-Thompson sendromu için karakteristik bir bulgu olan poikiloderma tarzında cilt lezyonları BGS'de de gözlenebilir. BGS olgularında, doğumdan birkaç ay sonra cilt bulguları ortaya çıkar. Cilt bulgularının ortaya çıkmasından önce ekstremitelerde şişme meydana gelir. Ardından kollarda, ön kollarda ve bacaklarda özgün benekli tarzda hipopigmentasyon alanları (poikiloderma) belirmeye başlar. Yüz bölgesinde veziküller oluşabilir ve sonra bu veziküller kalçalara ve ekstremitelere yayılabilir. Yıllar sonra ciltte retiküler tarzda hipo-/hiperpigmentasyon alanları, punktat atrofi ve telenjiektaziler ortaya çıkar.

Diğer *RECQL4* ilişkili fenotipler gibi BGS'de de kanser riski artmıştır (147, 148). Osteosarkom, lenfoma ve cilt kanserleri özellikle ikinci ve üçüncü dekatlarda ortaya çıkabilir.

Kraniyosinostozu bilateral olan olgularda genellikle 6 aydan önce cerrahi önerilmektedir. Ayrıca başparmağı olmayan veya ileri derecede hipoplazik olan olgular, pollisizasyondan fayda görebilirler.

Özellikle *RECQL4* geninde mutasyon saptanan BGS'li olgular; osteosarkom riski nedeniyle kemik ağrısı, kemiklerde şişlik, patolojik kırıklar gibi kemik tümör belirti ve

bulguları açısından ve ayrıca lenfoma riski nedeniyle lenfadenopatiler açısından izlenmelidirler (146).

2.3.8.2. Rothmund-Thomson Sendromu (OMIM #268400)

Rothmund-Thompson sendromu (RTS) infant dönemde başlayan poikilodermaya eşlik eden; kısa boy, seyrek saçlar, seyrek kirpikler ve/veya kaşlar; juvenil katarakt, iskelet anomalileri, radiyal ışın defektleri, erken yaşlanma ve artmış osteosarkom riski ile karakterize nadir otozomal resesif bir genodermatozistir (149). İlk kez 1868 yılında Auguste Rothmund tarafından ilk olgunun tanımlanmasından beri, literatürde 400 civarında olgu bildirilmiştir. RTS'nin prevalansı bilinmemektedir (150).

Tipik olgularda poikiloderma infant dönemde başlar. Genellikle 3-6 ay arasında yanaklarda eritem şeklinde ortaya çıkan lezyonlar (akut faz), ekstremitelerin ekstansör yüzeylerine doğru yayılır. Gövde ve karın bölgesinde genellikle tutulum olmazken, kalçalara yayılım gözlenebilir. Aylar veya yıllar süren bir süreç sonucunda lezyonlar retiküler hiper-/hipopigmentasyon alanları, noktasal atrofi alanları ve telenjiektazik lezyonlardan oluşan kronik faza geçerler ve bu fazdaki lezyonlar poikiloderma adını alır (Şekil 2-6). Poikiloderma şeklindeki lezyonlar hayat boyu devam eder (151). Poikiloderma, RTS için tanısal bir bulgudur. Olguların % 89'unda ilk 2 yaşta poikiloderma ortaya çıkar (149). Olguların 1/3'ünde hiperkeratotik lezyonlar da gözlenebilir.





Şekil 2-6[1]. Tipik bir RTS olgusu. **A)** poikiloderma ve alopesi (21 yaş erkek). **B)** Aynı olguda başparmak agenezisi.

1: *Lidia Larizza, Gaia Roversi & Ludovica Volpi, 2010* yayınından değiştirilerek alınmıştır.

Birçok olguda diş anomalileri de gözlenir. Rudimenter hipoplazik dişler, mikrodonti, gecikmiş diş sürme, fazla ya da eksik diş, artmış diş çürükleri RTS olgularında bildirilmiş diş anomalileri arasında yer alır (152, 153).

Genellikle zamanında doğan RTS olgularında SGA doğum sık gözlenir ve yaşam boyu olguların boy ve kiloları 5. persantilin altında seyreder.

RTS olgularının % 75'inde en az bir major iskelet anomalisi gözlenir (154). Yaygın iskelet bulguları arasında anormal metafizyel trabekülasyon, brakimezofalangi, el başparmaklarında aplazi/hipoplazi, osteopeni, radius başı çıkığı, radiyal aplazi/hipoplazi ve patellar ossifikasyon defektleri yer alır.

Kronik kusma veya diare gibi gastrointestinal problemler, RTS olgularında % 17 oranında gözlenebilir (155). Bazı olgularda nazogastrik tüp, gastrostomi/jejunostomi tüpü gibi yardımcı beslenme teknikleri gerekse de genellikle olgulardaki beslenme problemleri erken çocukluk döneminde spontan düzelme eğilimindedir.

Juvenil katarakt bazı serilerde % 50 oranında bildirilmiş olup, başlangıç yaşı genellikle 3-7 yaş arasıdır. Bununla birlikte birkaç aylıkken katarakt saptanan olguların yanı sıra, erişkin yaşta katarakt tanısı alan olgular da bildirilmiştir (151). Bazı serilerde ise katarakt oranı % 5-10 civarında bildirilmiştir (155). RTS olgularında katarakt, total körlüğe ilerleyebilir (149).

RTS olgularında total kanser prevalansı bilinmemektedir. Bununla birlikte, bu olgularda en sık bildirilen kanser osteosarkom olup, sıklığı % 30 olarak bildirilmiştir (155). Bu olgularda osteosarkom ortalama tanı yaşı 11 yaş olup, genel populasyona göre biraz daha erken bir yaşta ortaya çıkmaktadır.

RTS olgularında ayrıca skuamöz hücreli kanser, bazal hücreli kanser ve malign melanomu içeren deri kanserleri için de risk artışı söz konusudur (156, 157). RTS olgularında deri kanseri prevalansı % 5 civarındadır. Deri kanseri her yaşta ortaya çıkabilir. Epitelial tümörlerin RTS olgularında ortalama ortaya çıkış yaşı 34.4 olarak bildirilmiştir (157).

1999 yılında RTS'nin *RECQL4* genindeki homozigot veya birleşik heterozigot mutasyonlarla ilişkisi gösterildikten (158) sonra, klinik ve moleküler bulgular ışığında RTS'nin iki tipi tanımlanmıştır; poikiloderma, ektodermal displazi ve juvenil kataraktın gözlendiği, ancak *RECQL4* mutasyonunun olmadığı form Tip I RTS ve poikiloderma, konjenital iskelet anomalileri ve *RECQL4* genideki mutasyonlara bağlı artmış osteosarkom riskinin olduğu form tip II RTS (159).

RTS olgularının çoğunda zeka normaldir. % 5-10 olguda mental retardasyon gözlenebilir. Malignitelerin yokluğunda yaşam beklentisi normaldir.

2.3.8.3. RAPADILINO Sendromu (OMIM #266280)

RAPADILINO sendromu, ismini bu sendromda gözlenen bulguların oluşturduğu akronimden alır; RA (RAdiyal ışın defektleri), PA (PAtella hipoplazi/aplazisi, yüksek veya yarık damak (*PAlate*)), DI (DIare ve eklemlerde DIslokasyon), LI (büyüme geriliği (*LIttle size)*, ekstremite anomalileri (*LImb malformations*)) ve NO (uzun silindir şeklinde burun (NOse) ve NOrmal zeka).

RAPADILINO sendromu, otozomal resesif kalıtılan, sıklığı bilinmeyen çok nadir bir hastalıktır. Olguların çoğu Finlandiya'dan bildirilmiş olup, tanımlanan 15 Finlandiyalı olguda *RECQL4* geninde aynı mutasyon (c.1390+2delT/p.Ala420_ Ala463del) gösterilmiştir (*founder effect*). Daha sonra farklı mutasyon taşıyan birkaç olgu daha bildirilmişse de RAPADILINO sendromu genetik olarak oldukça homojendir (160).

RAPADILINO sendromu, klinik olarak RTS olgularına benzer bulgular gösterir. Radiyal ışın defektleri, büyüme geriliği, artmış osteosarkom riski her iki sendromda da gözlenen ortak bulgulardır. Bununla birlikte poikiloderma RTS olgularının tamamında gözlenen tanısal bir bulgu iken, RAPADILINO sendromunda bugüne dek bildirilmemiştir (Tablo 2-4). Bu nedenle poikiloderma, RAPADILINO sendromu ile RTS sendromunu birbirinden ayıran önemli bir bulgudur. Ayrıca alopesi, RTS'de gözlenen seyrek kaş ve kirpikler, diş anomalileri, RAPADILINO sendromu'nda gözlenmemektedir.

RTS'de olduğu gibi RAPADILINO sendromunda da kanser riski artmıştır (160). Bu olgularda riski artan kanser türleri osteosarkom ve lenfomadır.

Tablo 2-4. *RECQL4* İlişkili Fenotiplerin Klinik Karşılaştırması (147)

Klinik Bulgu	BGS	RTS	RAPADILINO
Kısa boy	Hemen her olguda	% 66	% 93
Koronal ve/veya lambdoid kraniyosinostoz	Kardinal bulgu	-	-
Anal anomali	Anterior ektopik	olabilir	-
Malforme kulaklar	Geriye dönük kulaklar	-	-
Poikiloderma	nadir	Kardinal bulgu	-
Seyrek saçlar	-	% 50	-
Seyrek kaşlar / kirpikler	-	% 75	-
Katarakt	-	% 50-60	-
Diare/beslenme sorunları	-	% 17	% 90
Normal zeka	% 50	% 95	% 85
Patellar hipoplazi/aplazi	-	nadir	Kardinal bulgu
Radiyal ışın defektleri	Bilateral, genellikle simetrik	% 25	% 100
Osteosarkom / kanser	-	% 30	Artmış risk

2.3.8.4. *RECQL4* İlişkili Fenotiplerde Moleküler Etyopatogenez

RTS'nin bir ATP bağımlı DNA helikazı kodlayan *RECQL4* genindeki homozigot veya birleşik heterozigot mutasyonlarla ilişkisi gösterildikten sonra; klinik olarak RTS ile ortak bulgular gösteren RAPADILINO sendromu ve BGS'nin de aynı gendeki homozigot veya birleşik heterozigot mutasyonlarla ilişkili oldukları gösterilmiştir (158, 161, 162).

RECQL4 geni, 8q24.3'te lokalize 21 ekzon içerir ve 1208 aminoasitten oluşan 133-kDA'luk ATP bağımlı DNA helikaz Q4 proteinini kodlar. Bu protein, *E.Coli* RecQ helikazı ile homolog olan korunmuş bir DNA helikaz domaini içerir (149). İnsanda en az 5 çeşit RECQ helikaz tanımlanmıştır ve bunlar DNA replikasyonu, DNA tamiri ve rekombinasyonu gibi önemli süreçlerde rol almaktadırlar (163, 164). Bu helikaz genlerinden *RECQL2* (*BLM*), *RECQL3* (*WRN*) ve *RECQL4* genlerindeki mutasyonların, insanlarda sırasıyla Bloom sendromu (OMIM #210900), Werner sendromu (OMIM #277700) ve RTS/BGS/RAPADILINO sendromuna yol açtığı gösterilmiştir. Bu üç sendrom da genomik instabilite ve kansere yatkınlık gibi ortak özellikler gösterirler. Diğer RECQ helikazlardan olan *RECQL1* ve *RECQL5*'in ise henüz bir klinik fenotiple ilişkisi gösterilmemiştir.

*RECQL4'*ün DNA bağımlı ATPaz aktivitesi olup, tek zincirli DNA'ya bağlanarak, DNA zincirlerinin yeniden birleşmesini sağladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, diğer RECQ helikaz ailesi üyelerinden farklı olarak *RECQL4*'ün belirgin bir helikaz aktivitesi gösterilememiştir (165). *RECQL4*'ün hücre siklusunun S fazında yoğun bir şekilde ifade edilmesi, onun DNA replikasyonunda da rol aldığını göstermektedir (166). Ayrıca *RECQL4*'ün hücre çekirdeğinde DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyonunda görev yapan *RAD51* ile birlikte odaklanması, *RECQL4*'ün DNA çift zincir kırıklarının tamirinde de rol aldığını düşündürmektedir (149). RTS olgularında, fibroblastların iyonize radyasyona karşı artmış hassasiyeti de bunun bir göstergesidir. Bir başka çalışmada, *RECQL4*'ün oksidatif stres karşısında hücre çekirdeğinde yoğunlaştığı gösterilmiştir (167). Bu da onun oksidatif strese karşı hücreyi koruyucu bir özelliğinin de bulunduğunu göstermekte ve RTS olgularında erken yaşlanma ve artmış kanser riski gibi bulguları açıklamaktadır (168).

Tüm bu bilgiler ışığında, *RECQL4* mutasyonlarında DNA sentez bozukluğunun, hücre çekirdeğinin iyonize radyasyon ve serbest oksijen radikallerine karşı artmış hassasiyetinin ve DNA tamir bozukluğunun genomik kararsızlığa yol açtığı söylenebilir (149). *RECQL4* ilişkili fenotiplerde birçok bulgunun gözlendiği gelişmekte olan kemik dokusu ve deri gibi

proliferasyonun yoğun olduğu bazı dokularda, *RECQL4*'ün bu fonksiyonlarının daha önemli olabileceği vurgulanmıştır (168).

2.3.9. Nager sendromu (Akrofasiyal Dizostoz, Nager Tip; OMIM #154400)

Akrofasiyal dizostozlar (AFD), kraniyofasiyal bulgular ve ekstremite anomalileri ile karakterizedir. Bu olgularda gözlenen kraniyofasiyal anomaliler, aşağı çekik palpebral fissürler, alt göz kapağı kolobomları, midfasiyal hipoplazi, mikrognatidir ve nöral krest hücrelerinin faringeal arkuslara göçündeki defektle ilişkilidir. AFD grubu, ekstremite anomalilerine göre preaksiyel, postaksiyel ve diğer olmak üzere klinik olarak üç gruba ayrılır. Preaksiyel AFD içinde en sık gözlenen ve en iyi bilinen tip Nager sendromu, postaksiyel AFD içinde ise Miller sendromudur (169).

Nager sendromu ilk kez 1948 yılında Nager ve DeReynier tarafından tanımlanmıştır. Nadir bir sendrom olup, insidansı 3:1,000,000 olarak tahmin edilmektedir ve literatürde 100 civarında olgu bildirilmiştir. Fasiyal dismorfizm ve preaksiyel ekstremite anomalileri ile karakterizedir. Tipik kraniyofasiyal bulguları arasında aşağı çekik palpebral fissürler, malar hipoplazi, mikrognati, iletim tipi işitme kaybına yol açabilen dış kulak anomalileri ve yarık damak yer alır (169).

Olgularda gözlenen preaksiyel ekstremite anomalileri oldukça değişken ağırlıklarda olabilir ve sıklıkla asimetriktir. El başparmaklarında hipoplazi, aplazi, duplike başparmak veya simfalanjizm gibi anomaliler gözlenebilir. Radiyal hipoplazi veya a/hipoplazi, sıklıkla proksimal radioulnar sinostoz ile birlikte gözlenir. Alt ekstremite anomalileri nadirdir ve genellikle talipes ekinovarus, hipoplastik ayak parmakları ve ayak parmak çizgilerinin olmaması gibi hafif bulgular şeklindedir (169).

Nager sendromu'nda iç organ anomalileri nadir olarak gözlenir. Vezikoüreteral reflü, renal agenezis, üreter duplikasyonu gibi genitoüriner anomaliler; VSD, Fallot tetralojisi gibi kardiyovasküler anomaliler; Hirschsprung hastalığı gibi gastrointestinal anomaliler nadir olgularda bildirilmiştir (170). Nörolojik ve psikososyal gelişim genellikle normaldir, ancak hafif psikomotor geriliği olan olgular da bildirilmiştir. Bu olgulardaki hafif psikososyal gelişme geriliğine, sendrom dahilinde sık gözlenen işitme kaybının da katkısının olduğu düşünülmektedir (170).

Mutasyon saptanan 26 olguluk bir seride (171), anormal el başparmakları 22 olgunun tamamında (% 100), mikrognati 24 olgunun 23'ünde (% 96), aşağı çekik palpebral fissürler 21 olgunun 20'sinde (% 95), işitme kaybı 20 olgunun 19'unda (% 95), displastik kulaklar 20

olgunun 18'inde (% 90), radioulnar sinostoz 18 olgunun 15'inde (% 83), damak anomalileri (yarık damak, yüksek damak) 22 olgunun 15'inde (% 68), radiyal ışın anomalileri 17 olgunun 10'unda (% 59), gelişme geriliği 12 olgunun 6'sında (% 50) ve alt göz kapaklarında kirpik yokluğu 14 olgunun 6'sında (% 43) saptanmıştır.

Nager sendromlu olgularda gözlenen midfasiyal/mandibular hipoplazi nedeniyle oluşabilecek hava yolu obstrüksiyonları, yenidoğan döneminde ölümlere yol açabilir ve anestezi sırasında entübasyon güçlüklerine neden olabilir (172, 173).

2.3.9.1 Nager sendromu'nda Moleküler Etyopatogenez

Nager sendromunda otozomal dominant, sporadik ve otozomal resesif kalıtım ile uyumlu aileler bildirilmiştir (174, 175). Bununla birlikte Nager sendromu'nun otozomal dominant formunun *SF3B4* genindeki heterozigot mutasyonlarla olan ilişkisi, tüm ekzom dizileme çalışması ile gösterilmiştir (171). Tanımlanan mutasyonların hemen hepsinin çerçeve kayması veya anlamsız mutasyonlar olması nedeniyle, Nager sendromu'nun *SF3B4* haployetersizliğinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (171). Bununla birlikte, olguların yaklaşık yarısında *SF3B4* mutasyonunun gösterilememesi, Nager sendromu ile ilişkili henüz tanımlanmamış başka gen ya da genlerin de olduğunu göstermektedir (170, 171, 176).

Ökaryot hücrelerde pre-mRNA'dan intronların kırpılması, translasyon öncesi önemli ve temel bir olaydır ve 170'den fazla protein içeren ve *spliceosome* adı verilen bir ribonükleoprotein kompleksi tarafından gerçekleştirilir (177). İntronların büyük bir kısmı, küçük nükleer RNA-protein komplekslerinden (snRNP) (U1, U2, U4/U6 ve U5) oluşan *major spliceosome* tarafından, 700-800 kadar intron ise *U12 bağımlı minör spliceosome* tarafından kırpılır (178). *Spliceosome* protein veya RNA'larını kodlayan birçok genin germline mutasyonları, otozomal dominant veya otozomal resesif kalıtımlı fenotiplerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin; retinitis pigmentoza (OMIM #268000) *PRPF3*, *PRPF4*, *PRPF6*, *PRPF8*, *PRPF31*, *RP9* ve *SNRNP200* genlerindeki dominant mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Bu genler, pre-mRNA kırpılma sürecinde önemli bir rolü bulunan U4/U6-U5 üçlü kompleksinin oluşumu veya fonksiyonu ile ilişkili faktörleri kodlamaktadırlar (179).

U2 snRNP, iki major protein kompleksinden oluşur: *SF3A* ve *SF3B*. *SF3B4* ile *SF3B2* arasında ve *SF3B4* ile pre-mRNA'nın dallanma noktasının (*branch site*) 5' ucuna yakın bir bölge arasında etkileşim olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, *SF3B* kompeksinin, U2 snRNP'yi intronların dallanma noktasına bağlayan süreçte rol oynadığını göstermektedir (178). *SF3B4*'ün mayalardaki ortologu olan *Hsh49p*'nin viabilite ve mRNA kırpılması için elzem

olduğu gösterilmiştir (180). Ayrıca, SF3B kompleksi ve U5 snRNP arasında da etkileşim olduğu ve bu etkileşimin üçlü snRNP kompleksinin (U4/U6-U5) oluşumunda önemli olabileceği vurgulanmıştır (181). *SF3B4*'ün bir başka fonksiyonunun ise kemik morfojenik protein (BMP) reseptörü olan BMPR1A reseptörüne bağlanarak BMP ilişkili osteokondral farklılaşmayı inhibe etmek olduğu bildirilmiştir (182). Ayrıca *SF3B4*'ün farelerdeki homoloğu olan *msap49'*un konsepsiyondan sonraki 11. günde ekstremite ve somitlerde yoğun olarak ifade edildiği gösterilmiştir (183). Bu bilgiler ışığında Nager sendromu'nda gözlenen anomalilerin, *SF3B4*'ün BMPR1A ile olan ilişkisinin bozulması ve gelişimin erken evrelerinde kraniyofasiyal dokularda ve ekstremitelerde kırpılma hataları nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir (171).

2.3.10. Mandibulofasiyal Dizostoz, Guion-Almeida Tip (OMIM #610536)

Guion-Almeida tip mandibulofasiyal dizostoz (MFDGA), ilk kez 2000 yılında Guion-Almeida ve arkadaşları tarafından mental retardasyon ve büyüme geriliği, mikrosefali, trigonosefali, preauriküler deri uzantısı ve yarık damak bulguları olan iki Brezilyalı erkek olguda tanımlamıştır (184). MFDGA'nın *EFTUD2* genindeki mutasyonlarla olan ilişkisi gösterildikten sonra (185), 50'den fazla olguda fonksiyon kaybettirici veya delesyon mutasyonları saptanmıştır (178).

MFDGA'nın major bulguları, mandibulofasiyal dizostoz (malar ve mandibuler hipoplazi), mikrosefali ve bilişsel geriliktir. Daha az gözlenen bulgular ise, işitme kaybı, yarık damak, koanal atrezi, özofageal atrezi, kalp anomalileri ve radiyal ışın defektleridir (178). Sendrom, mandibulofasiyal dizostoz ve mikrosefali, Guion-Almeida tip AFD gibi alternatif isimlerle de anılmaktadır. *Spliceosomal* defektten kaynaklanan MFDGA ve Nager sendromu'nda gözlenen klinik bulgular tablo 2-5'te karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Tablo 2-5. MFDGA ve Nager sendromu'nda Gözlenen Klinik Bulgular

	MFDGA	**Nager sendromu**
Kraniyofasiyal fenotip		
Mandibular hipoplazi	**58/62** (94%)	**21/21** (100%)
Malar hipoplazi	**46/50** (92%)	**17/19** (89%)
Dış kulak anomalileri	**61/63** (97%)	15/18 (83%)

Preauriküler deri uzantısı	27/61 (44%)	1/7
İşitme kaybı	43/55 (78%)	11/14 (79%)
Dış kulak yolu stenozu	30/51 (59%)	4/9 (44%)
Koanal atrezi	22/62 (35%)	–
Yarık damak/bifid uvula	22/61 (36%)	8/13 (62%)
Fasiyal asimetri	27/49 (55%)	2/7 (29%)
Göz anomalileri	10/33 (30%)	–
Alt göz kapağı defekti	–	11/16 (69%)
Semisirküler kanal anomalileri	11/15 (73%)	–
Lakrimal kanal agenezisi	1/59	1/7
Temporo–mandibuler anomaliler	–	**5/5 (100%)**
Nörolojik Fenotip		
Mikrosefali	**57/64** (89%)	–
Psikomotor gerilik/Bilişsel bozukluk	**59/60** (98%)	2/14 (14%)
Beyin MRG anomalileri	9/19 (47%)	–
Epilepsi	13/56 (23%)	–
Otizm	1/55	–
Ekstremite Anomalileri		
Üst ekstremite anomalileri	27/62 (44%; başparmak 34%)	**21/21** (başparmak 100%)
Alt ekstremite anomalileri	6/62 (10%) (minör ayak anomalileri)	8/21 (ayak 100%)
Radio-ulnar sinostoz	1/62	7/20 (35%)
Büyüme Geriliği	13/62 (21%)	–
Konjenital kalp anomalileri	23/58 (40%) (VSD, ASD, PDA)	5/20 (25%) (AVSD, PDA, Fallot t.)
Özofageal atrezi	23/63 (37%)	–
Diyafragma hernisi	–	1/7
Omurga ve toraks anomalileri	5/56 (9%)	–
Skolyoz	2/56 (4%)	–
Genitoüriner anomaliler	11/61 (18%)	1/3 (renal agenezi)

2.3.10.1. MFDGA'da Moleküler Etyopatogenez

2012 yılında, tüm ekzom dizileme çalışması ile MFDGA'nın *EFTUD2* genindeki haployetersizliğe yol açan mutasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiş (185) ve günümüzde

50'de fazla olguda bu gende fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar veya delesyonlar saptanmıştır (178).

EFTUD2, ökaryotlarda oldukça korunmuş bir *spliceosomal* GTPaz'ı kodlar. *EFTUD2*'nin *Saccharomyces cerevisiae* ortologu olan Snu114p ile yapılan çalışmalarda, bu proteinin *spliceosomal* döngünün birçok basamağında rol aldığı gösterilmiştir (178).

Pre-mRNA kırpılma sürecinde anahtar basamaklar; U4/U6 heliksinin açılması, U2/U6 heliksinin oluşumu, U2/U6 heliksinin açılması ve U4/U6 kompleksinin yeniden oluşumudur. Tüm bu basamaklar sekiz ATPaz ve bir GTPaz (Snu114p) tarafından düzenlenir ve Snu114p mutasyonlarının kırpılma hatalarına yol açarak, ölüme veya mayalarda ısıya duyarlı büyüme defektlerine yol açtığı gösterilmiştir. Snu114p/EFTUD2, U5 snRNP'nin merkezi bir bileşeni olup, pre-mRNA kırpılma sürecinden önce U4/U6 snRNA'nın ve kırpılma sonrası *spliceosome* bileşenlerinin çözülmesinde rol alır (178, 186).

2.3.11. Diamond-Blackfan Anemisi (OMIM #105650)

Diamond-Blackfan anemisi (DBA), nadir görülen (7:1,000,000 canlı doğumda), genetik ve klinik olarak heterojen, kalıtımsal bir kırmızı hücre aplazisidir. Bulgular hayatın ilk bir yılı içinde ortaya çıkar. Bununla birlikte, çocukluk çağında ve erişkin çağda ortaya çıkan ve daha hafif bulgularla seyreden nonklasik formlar da tanımlanmıştır (187).

DBA'nın ana klinik bulgusu anemidir ve olguların % 90'ından fazlasında, hayatın ilk bir yılı içinde ortaya çıkar. Lökosit ve platelet sayıları normal iken; derin, izole, normokromik ve genellikle makrositik bir anemi saptanır (188). Kemik iliğinde diğer seriler normal iken eritroid prekürsörlerde azalma vardır. Aneminin ortalama ortaya çıkış yaşı 2 ay, ortalama DBA tanı yaşı ise 3 aydır. Olguların % 10 kadarında doğumda anemi saptanabilir, ancak hidrops fetalis nadirdir (189). DBA olgularının % 80-85'inde eritrosit adenozin deaminaz (eADA) aktivitesi artış gösterir. Remisyona giren ya da kortikosteroid tedavisi ile anemisi düzelen olgularda genellikle eADA aktivitesi yüksek kalmaya devam eder (190). DBA tanısını destekleyen bir diğer hematolojik bulgu ise HbF yüksekliğidir.

DBA olgularının yaklaşık % 50 sinde konjenital anomaliler mevcuttur. En sık gözlenen anomaliler sırasıyla; kraniyofasiyal anomaliler (% 50), sıklıkla üst ekstremite ve elleri tutan iskelet anomalileri (% 39), genitoüriner anomaliler (% 38) ve kardiyak anomalilerdir (% 30), (Tablo 2-6). Olguların % 21'inde birden fazla anomali mevcuttur (190).

Tablo 2-6. DBA'da Gözlenen Fiziksel Anomaliler[1]

Sistem	Bulgular
Kraniyofasiyal	Hipertelorizm, yarık dudak ve/veya damak, yüksek damak, mikrosefali, mikrognati, mikroti, düşük kulaklar, düşük ense saç çizgisi, epikantus, ptozis
Oftalmolojik	Konjenital glokom, strabismus, konjenital katarakt
Boyun	Kısa boyun, yele boyun, Sprengel deformitesi, Klippel-Feil deformitesi
Kas-iskelet	Kısa boy, el başparmak anomalileri (hipoplastik, bifid/duplike, trifalangeal) sindaktili, tenar hipoplazi
Ürogenital	Renal agenezi, at nalı böbrek, duplike toplayıcı sistem, hipospadiyazis
Kardiyak	VSD, ASD, aort koarktasyonu, PFO, Fallot tetralojisi, kompleks kardiyak anomaliler

1: Vlachos, A., & Muir, E. (2010).

DBA'da tedavi seçenekleri, kortikosteroid tedavisi, eritrosit süspansiyon transfüzyonu ve hematolojik kök hücre naklidir. Kortikosteroid tedavisi bir yaşından itibaren uygulanabilir ve olguların % 80'i başlangıçta steroid tedavisine yanıt verirken % 20 si kronik transfüzyon ihtiyacı gösterir (190). Ancak kortikosteroid tedavisine direnç gelişebilmekte veya yan etkileri nedeniyle kullanımı sınırlı kalmaktadır. Neticede, olguların % 37 si kortikosteroid tedavisine devam ederken, % 31 olgu transfüzyon bağımlısı olmaktadır. Spontan remisyon % 13 olguda gözlenebilmektedir. % 9 olguya hematolojik kök hücre nakli yapılırken, % 9 olguda ise ölüm gözlenmektedir (190).

2.3.11.1. Diamond-Blackfan Anemisinde Moleküler Etyopatogenez

Ribozomlar, ribozomal RNA(rRNA), ribozomal proteinler (RPs) ve küçük nükleolar RNA (snoRNA)'lardan oluşurlar ve hücrede protein sentezinden sorumludurlar. Ribozomlara

ait bu komponentlerin yapı ve/veya fonksiyonlarının bozulması sonucu ortaya çıkan klinik tablolar ‘‘ribozomopatiler’’ olarak adlandırılır. DBA ile birlikte bu grupta, Shwachman-Diamond sendromu (OMIM #260400), 5q- sendromu (OMIM #153550), kıkırdak-saç hipoplazisi (OMIM #250250), X’e bağlı diskeratozis konjenita (OMIM #305000) ve Treacher-Collins sendromu (OMIM #154500) yer alır. Ribozomopatilerin genel özelliği, kemik iliği yetmezlik bulguları ve kanser riskinde artıştır (191).

İlk kez 1999 yılında, bir ribozomal proteini kodlayan *RPS19* genindeki mutasyonların DBA ile ilişkisi gösterildikten sonra (192), DBA’nın bir ribozomopati olduğu anlaşılmış ve DBA ile ilişkilendirilen, RP kodlayan genlerin sayısı giderek artmıştır. DBA olgularının % 50-70’inde RP’leri kodlayan genlerde mutasyon saptanmaktadır (191). Tanımlanan RP mutasyonlarının hepsi otozomal dominant kalıtımla uyumlu olarak heterozigot formda olup, RP genlerindeki homozigot mutasyonların letal olduğu hayvan modellerinde gösterilmiştir (193). Bununla birlikte, tüm ekzom dizileme çalışması ile DBA’nın GATA1 genindeki mutasyonlarla ilişkili X’e bağlı bir formu da tanımlanmıştır (193). DBA olgularında ilişkili genler ve bu genlerde saptanan mutasyon oranları tablo 2-7’de gösterilmiştir.

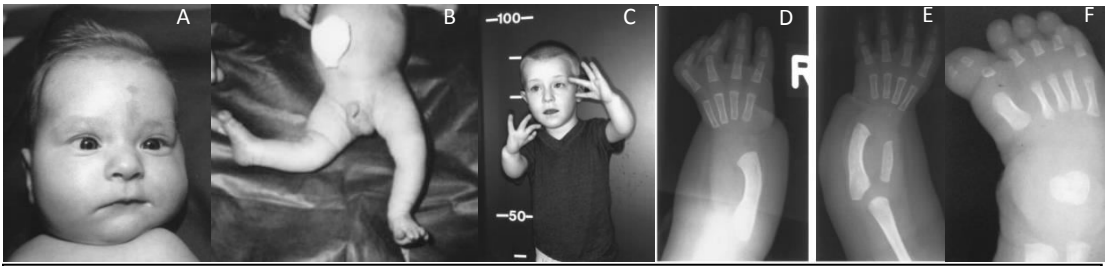
Tablo 2-7. DBA’da İlişkili Genler, Mutasyon Oranları ve Kalıtım Modelleri

Gen	**Lokalizasyon**	**Mutasyon Oranı**	**Kalıtım Modeli**
RPS19	19q13.2	% 25	Otozomal dominant
RPL5	1p22.1	% 6.6	Otozomal dominant
RPS10	6p21.31	% 6.4	Otozomal dominant
RPL11	1p36.11	% 4.8	Otozomal dominant
RPL35A	3q29	% 3	Otozomal dominant
RPS26	12q13.2	% 2.6	Otozomal dominant
RPS24	10q22.3	% 2	Otozomal dominant
RPS17	15q25.2	% 1	Otozomal dominant
RPS7	2p25.3	% 1	Otozomal dominant
RPL26	17p13.1	Nadir	Otozomal dominant
GATA1	Xp11.23	Nadir	X’e bağlı
RPL15	3p24.2	Nadir	Otozomal dominant
RPS29	14q21.3	Nadir	Otozomal dominant

DBA patogenezinde p53'ün de rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. *In vitro* koşullarda *RPS19* geni baskılanmış insan CD34+ hücrelerinde, DBA'da gözlenen eritropoez bozukluğunun yanı sıra, eritoroid seride p53 birikimi de gözlenmiştir. Farmakolojik olarak bu hücrelerde p53'ün baskılanması ile eritropoez bozukluğunun düzeldiği saptanmıştır (194).

2.3.12. İskelet Anomalileri-Genital Hipoplazi-Mental Retardasyon (OMIM #612447)

Wieczorek ve ark. (2002) tarafından bilateral el başparmak agenezisi, sağ aplazik/sol hipoplazik radius, bilateral hipoplastik ulna, sağ duplike ayak başparmağı, boy kısalığı, mikrosefali, kriptorşidizm, mikropenis ve mental retardasyon bulguları olan 5 yaşında bir erkek olgu bildirilmiş ve bunun yeni bir fenotip olduğu öne sürülmüştü [(195), şekil 2-7]. Daha sonra aynı olgu 12 yaşındayken tekrar değerlendirilmiş ve hipoplastik sağ skapula ve klavikula, diz eklemlerinde hiperelastisite, hipoplastik ve laterale yerleşimli sağ patella gibi ek klinik bulgular ile array CGH (*comparative genomic hybridisation*) çalışmasında 11q22.3 bölgesinde ~8 Mb intersitisyel bir delesyon saptandığı bildirilmiştir (198). Bununla birlikte, olgudaki bulguların literatürdeki 11q22.3 delesyonu saptanan olgulara kıyasla daha ağır olması ve bu bölgede yer alan *PLZF* (*ZBTB16*) genindeki mutasyonların daha önce farelerde iskelet gelişimi ve spermatogonial kök hücrelerin devamlılığında rol oynadığının gösterilmiş olması (196, 197) nedeniyle, ek olarak *PLZF* dizi analizi yapılmış ve diğer allelde c.1849A>G (p.Met617Val) mutasyonu saptanmıştır. Fonksiyonel çalışmalar ile bu mutasyonun protein yapısını bozduğu gösterilmiş ve tanımlanan bu yeni fenotipin *PLZF* genindeki bilallelik fonksiyon kaybıyla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (198).



Şekil 2-7[1]. A. 10 haftalıkken yüz görünümü. Fasiyal asimetri, alında hemanjiyom, strabismus ve ince üst dudak vermilionu. **B.** 6 günlükken dizdeki belirgin hiperekstansibilite. **C.** 5 yaşındaki görünümü. Uzun yüz, gözlerde asimetri, cerrahi olarak düzeltilmiş eller. **D-F.** 6 aylık röntgenleri. **D.** Sağ aplazik radius ve başparmak, hipoplazik ulna. **E.** Sol hipoplazik radius ve ulna, aplazik başparmak. **F.** Bifid ayak başparmağı.
1: Wieczorek ve ark., 2002 (192) yayınından değiştirilerek alınmıştır.

2.4. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri

Frederick Sanger ve arkadaşları 1977 yılında, 3'OH grubu olmayan modifiye nükleotidler (dideoksinükleotid, ddNTP) ile DNA zincir uzamasının sonlandırılması esasına dayalı DNA dizileme yöntemini keşfettikten sonra (199); 30 yılı aşkın bir süredir Sanger dizileme, en çok kullanılan ve altın standart olan bir DNA dizileme yöntemi olmuş, tanı ve araştırma çalışmalarında çok yoğun olarak kullanılmıştır. Lloyd M. Smith ve arkadaşlarının, her bir DNA bazının farklı florofor ile işaretlenmesi ve poliakrilamid jel elektroforezi sırasında detektör vasıtasıyla florofor işaretli bazların saptanması yöntemini keşfiyle, Sanger dizileme otomatize edilmeye başlanmıştır (200). Floresan boya ile işaretli ddNTP'lerin kullanıma girmesiyle birlikte (201) birden fazla örneğin aynı anda dizilenmesi mümkün olmuş, bu işlemler bilgisayar sistemiyle entegre edilerek otomatize sistemler geliştirilmeye başlanmış ve 96 örneğin veya 384 örneğin aynı anda dizilenmesine olanak tanıyan otomatize kapiller sistemler geliştirilmiştir (202). Bu sistemler her bir yürütmede 600-1000 baz uzunluğundaki DNA dizisini yüksek doğruluk oranlarıyla okuyabilmektedir.

İnsan genom projesinin tamamlanmasından sonra, ikinci nesil dizileme ya da yeni nesil dizileme olarak adlandırılan masif paralel dizileme yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. İlk olarak 2005 yılında, 454 platformu *454 Life Sciences* tarafından piyasaya sürülmüştür. Bir yıl sonra *Solexa* tarafından *Genome Analyser* ve *Agencourt* tarafından SOLİD yeni nesil dizileme platformları piyasaya sürülmüştür. Daha sonra *Agencourt, Applied Biosystems* tarafından (2006); 454, *Roche* tarafından (2007) ve Solexa, *Illumina* tarafından satın alınmıştır (203). 2011 yılında ise 3 major yeni nesil dizileme platformu daha geliştirilmiştir: *Ion Torrent's PGM*, *Pacific Biosciences' RS* (*Pac Bio*) ve *the Illumina MiSeq.*

Yeni nesil dizileme yöntemi, bir örnekten elde edilen DNA'nın milyonlarca fragmanının eş zamanlı olarak dizilenmesi esasına dayanan masif paralel dizileme yöntemidir. Günümüzde en çok kullanılan yeni nesil dizileme platformları; *Ion Torrent PGM* ve *Illumina MiSeq* olup, bazı farklar dışında her iki platformun da yöntemi temelde benzerdir (204). Bu platformların temel basamakları; taslak (*template*) hazırlama, dizileme, görüntüleme ve elde edilen verilerin analiz edilmesidir.

454, ilk ticari yeni nesil dizileme platformudur ve 2007'de *Roche* tarafından alınmıştır. 454 platformu; taslak hazırlama aşamasında, boncuklar üzerine bağlanmış tek bir kalıp molekülün emülsiyon PZR ile çoğaltılması yöntemini kullanır. PZR sonrası, üzerinde milyonlarca klonal kopya bulunan boncuklar, her bir kuyuya bir boncuk girecek şekilde

tasarlanmış pikolitrelik kuyucuklara yüklenir ve her bir kuyucuktaki fragmanlar paralel olarak pirosekans yöntemiyle dizilenir (205).

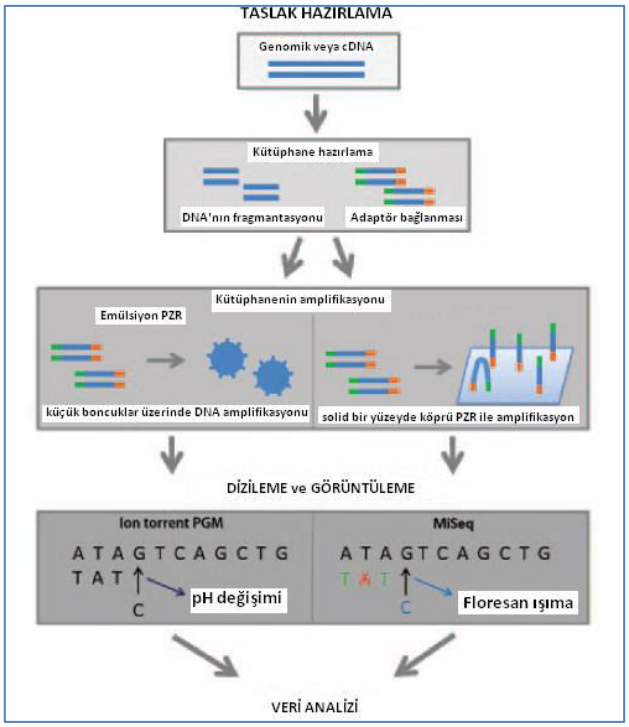
Solexa, ikinci ticari yeni nesil dizileme platformudur ve Illumina tarafından satın alınmıştır. Bu nedenle Illumina olarak da anılır. Illumina platformunda, DNA fragmanlarını yakalamak için solid cam yüzeyler kullanılır ve bu yüzeyde köprü PZR ile her bir DNA fragmanı çoğaltılarak klonal DNA kümeleri elde edilir. Daha sonra floresan işaretli reversibl terminatörler kullanılarak, Sanger dizilemeye benzer bir yöntemle senteze dayalı dizileme yapılır. *Illumina MiSeq* daha küçük laboratuvarlar için tanısal amaçlı geliştirilmiş olup, *HiSeq 2000* platformu ise daha yüksek kapasiteli dizilemeler (tüm ekzom dizileme, tüm genom dizileme) için geliştirilmiştir (205, 206).

SOLİD, *Life Technologies* tarafından piyasaya sürülen üçüncü ticari yeni nesil dizileme platformudur. Bu platformda da emülsiyon PZR ile çoğaltılmış boncuklar üzerindeki klonal DNA fragmanları dizilemede kullanılır. Bu sistemde floresan işaretli di-baz problar kullanılarak ligasyon temelli dizileme yapılır (205).

Helicos, *HeliScope* tarafından geliştirilen ilk ticari tek molekül dizileyicidir. Ancak yüksek maliyeti ve okuma uzunluğunun kısa olması sistemin dezavantajlarıdır. Helicos, dizileme hizmetini sadece merkezi olarak yürütmektedir (205).

Life Technologies tarafından 2010 yılında piyasaya sürülen Ion Torrent; 454 platformuna benzer şekilde senteze dayalı dizileme yapar. Ancak bu sistem, nükleotidlerin uzayan DNA zincirine eklenmesi sonucu açığa çıkan H^+ iyonlarının neden olduğu pH değişimlerini algılayan bir sisteme sahiptir (207). Dolayısıyla diğer sistemlerden farklı olarak dizileme için floresan işaretli nükleotidlere, kamera ya da lazer sistemlerine ihtiyaç duymaz. Bu da Ion Torrent platformunu daha maliyet etkin hale getirmektedir.

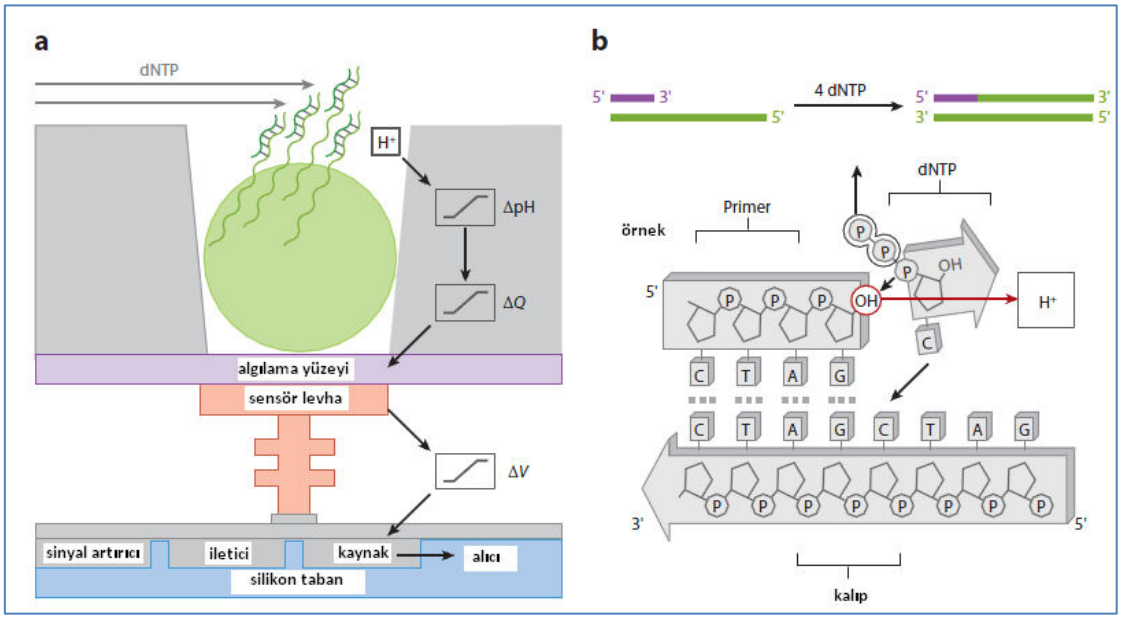
Ion Torrent platformunda kütüphane ve taslak hazırlama aşamaları; DNA'nın fragmantasyonu, DNA fragmanlarının uçlarının enzimatik olarak modifikasyonu ve adaptörlerin bağlanması, adaptör bağlı kütüphane ürünlerinin emülsiyon PZR ile çoğaltılması aşamalarından oluşur (şekil 2-8).



Şekil 2-8[1]**.** Ion Torrent ve Miseq platformlarında taslak hazırlama aşamaları

1: (201) numaralı yayından değiştirilerek alınmıştır.

Uçlarına adaptör bağlı DNA fragmanları, üzerlerinde adaptör dizilerin tamamlayıcı bazlarından oluşan dizilerin kovalent olarak bağlı bulunduğu boncuklarla eşleştirilir ve içerisinde PZR için gerekli reaktiflerin ve polimerazın bulunduğu yağ mişelleri oluşturularak her bir DNA fragmanı emülsiyon PZR ile amplifiye edilir. Sonraki aşamada, amplifiye olmuş DNA fragmanlarını taşıyan boncuklar yağ parçacıkları, reaktifler ve amplifikasyona katılmamış boncuklardan ayrıştırılır (zenginleştirme aşaması). Zenginleştirme sonrası elde edilen boncuklar, dizi primerleri ve polimeraz eklenmesi sonrasında *Ion Chip* kuyucuklarına yüklenir. Bu kuyucukların her biri uzayan DNA zincirine uygun bazın katılması sonucu açığa çıkan H^+ iyonlarının oluşturduğu pH değişimlerini algılayarak elektrik sinyallerine dönüştürür ve bu sinyaller kaydedilir (şekil 2-9). Belirli bir sırada her bir baz (A,G,C,T) için tekrarlayan döngülerle bu işlem tekrar edilir ve böylece her bir kuyucukta bulunan DNA dizisi belirlenir (202, 205, 207).



Şekil 2-9[1]. a) *Ion Torrent Ion Chip*'in yapısı. **b)** Uygun bazın diziye girmesi sonucu H^+ salınımı.
1: (199) numaralı yayından değiştirilerek alınmıştır.

Ion Torrentin günümüzde daha çok tanısal amaçlı gen panelleri için tasarlanmış daha düşük kapasiteli *Ion PGM* ve ekzom dizileme veya tüm genom dizileme gibi yüksek kapasiteli dizilemeler için tasarlanmış *Ion Proton* sistemleri mevcuttur. Bu sistemlerde kullanılan çip modelleri ve özellikleri tablo 2-8'de gösterilmiştir.

Ion Torrent sisteminin özellikle homopolimer bölgelerde hata oranı yüksek olup, 8 bazdan daha uzun homopolimer bölgelerde bu sistemin baz sayısını doğru saptayamadığı gösterilmiştir (206).

Tablo 2-8. Ion Torrent Platformunda Kullanılan Çipler ve Özellikleri

Özellik	**PGM 314[1]**	**PGM 316[1]**	**PGM 318[1]**	**PI[2]**
Sensör sayısı	1.2 milyon	6.1 milyon	11 milyon	165 milyon
Baz sayısı	100 milyon baz	1 milyar baz	2 milyar baz	10 milyar baz
Çalışma süresi	2-4 saat	3-5 saat	4-7 saat	2-4 saat
Ort. baz okuma uzunluğu	200/400 baz	200/400 baz	200/400 baz	200 baz
Okuma sayısı	0.6 milyon	3 milyon	5.5 milyon	82 milyon

1: Ion PGM sisteminde kullanılan çipler
2: Ion Proton sisteminde kullanılan çip

Pac Bio sistemi, tek molekülün gerçek zamanlı dizilenmesine olanak tanıyan bir platform olarak geliştirilmiştir. Bu sistemde; 50 nm genişliğindeki kuyucukların dibine bağlanmış polimerazlar vasıtasıyla kalıp DNA moleküllerinden γ-fosfat floresan ile işaretli nükleotidler kullanılarak yeni zincir sentezlenirken, her bir baz için özgün floresan ışıma algılanır ve böylece DNA dizisi gerçek zamanlı olarak belirlenir (205, 206).

Tablo 2-9. Farklı yeni nesil dizileme platformlarının karşılaştırılması[1]

Platform	Illumina MiSeq	Ion Torrent PGM	Pac Bio RS	Illumina HiSeq 2000
Cihaz maliyeti	128 bin $	80 bin $	695 bin $	654 bin $
Dizileme kapasitesi	1.5-2 Gb	314 çip: 20-50 Mb 316 çip: 100-200 Mb 318 çip: 1 Gb	100 Mb	600 Gb
Gb başına dizileme maliyeti	502 $	1000 $ (318 çip)	2000 $	41 $
Dizileme süresi	27 saat	2 saat	2 saat	11 gün
Hata oranı (ham veri)	% 0.80	%1.71	% 12.86	% 0.26
Okuma uzunluğu	150 baza kadar	~200 baz	ort. 1500 baz	150 baza kadar
DNA gereksinimi	50-100 ng	100-1000 ng	~1 µg	50-100 ng

1: (203) numaralı yayındaki veriler kullanılmıştır.

Yeni nesil dizileme yöntemi birçok alanda kullanılabilmektedir. Hedefe yönelik yeni nesil dizileme panelleri ile hastalık ilişkili birçok genin aynı anda dizilenmesi, hastalıklarla ilişkili yeni gen/genlerin keşfi amacıyla tüm ekzom dizileme ya da tüm genom dizileme, ekspresyon çalışmaları için RNA dizileme (RNA-Seq) ve mikrobiyoloji alanında hastalığa yol açan etkenin saptanması ya da viral / bakteriyal yeni virulans faktörlerinin saptanması amacıyla mikroorganizma genomlarının dizilenmesi bu alanlardan bazılarıdır (204).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma grubumuzu, 2004-2014 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine genetik konsültasyon amacıyla çeşitli Pediyatri ve Tıbbi Genetik kliniklerinden yönlendirilen ve unilateral ya da bilateral radiyal ışın defekti olan 37 aileden 48 etkilenmiş olgu oluşturdu. Bu grupta yer alan 6 aile daha önce moleküler ve/veya sitogenetik tanı almıştı.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (25.12.2014 tarih ve 1939 sayı, ek-1). Çalışmaya katılan ailelerden aydınlatılmış onam alındı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. KLİNİK DEĞERLENDİRMELER

Olguların öykü ve fizik muayene bulguları ekte (ek-3) gösterilen muayene formu esas alınarak kaydedildi. Aile öykülerine göre aile ağaçları hazırlandı. Etkilenmiş bireylerin fotoğrafları ve ekstremite grafileri arşivlendi. Bilinen bir sendromla uyumlu bulunan olgulara gerekli ek tetkikler (EKO, batın ultrasonografi vd.) ile laboratuar testleri (hematolojik, sitogenetik, moleküler genetik vd.) yapıldı. Bilinen bir sendromla uyumlu bulunmayan olgular, radiyal ışın defektlerine eşlik eden ek bulgular açısından detaylı olarak değerlendirildi.

3.2.2. SİTOGENETİK YÖNTEMLER

3.2.2.1. HRBT (*High Resolution Banding Techniques*) İLE KROMOZOM ANALİZİ

PSMG, mental retardasyon ya da ek anomalilerin eşlik ettiği ve özgün klinik tanısı olmayan olgularda, moleküler çalışmalardan önce Na-heparinli enjektörlere alınan 2-3 cc periferik kanda yüksek çözünürlüklü bant tekniği (HRBT) ile 550-600 bant düzeyinde kromozom analizi yapıldı.

3.2.2.1.1. Periferik Kan Lenfosit Kültürü

Steril koşullarda alınmış periferik kan 5 ml besiyeri içeren santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 0,2 ml (3 damla) PHA eklendi. Tüpün ağzı ve kapağı alevden geçirildikten sonra sıkıca kapatılarak hafifçe çalkalandı ve 37 °C' lik etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. 48. saatte,

inkübasyona bırakılan kan kültürlerine 0,2 ml timidin (filtre ile 3 damla) eklendi ve 37 °C'lik etüvde 18 saat inkübasyona devam edildi. Sürenin bitiminde, kültür etüvden çıkarılarak 1000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Kültür tüpüne 5 ml taze DMEM medyum eklenerek etüve konuldu. 72 saatin dolmasından 1–1,5 saat önce kültürlere 0,2 ml kolşemid eklendi.

3.2.2.1.2. Kromozom Eldesi

72 saatlik kültür sonunda tüpler santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hafifçe vurularak tüplerin dibindeki pelletin karışması sağlandı. Daha sonra tüplere 37 °C'de ısıtılmış 10 ml 0.075 M KCl (hipotonik solusyon) ilave edildi ve ortam koşullarına göre 7 ile 10 dakika arası bir süre boyunca 37 °C'lik etüvde bekletildi (hipotonik şok). Hipotonik şok süresi dolmadan tüpler santrifüje aktarıldı ve sürenin dolmasıyla birlikte 10 dakika 1000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra supernatant uzaklaştırılarak vorteks eşliğinde pellet üzerine yavaş damlalar halinde taze hazırlanmış ve buzdolabında bekletilmiş Carnoy fiksatifinden eklenerek tüpler fiksatifle doldurulduu ve tekrar santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez daha tekrar edildi. Son yıkamadan sonra, hücrelerin üzerinde ~ 1 ml fiksatif kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı. Dip materyali Pasteur pipetle içine hava verilerek iyice karıştırıldı. Lamların uzerine yaklaşık 3–4 damla dip materyalinden 4–5 damla da Carnoy fiksatifinden damlatılarak ve preparatlar hazırlandı. Preparatların hazırlanması aşamasında ortam sıcaklığının 20–23 °C, neminin ise % 55–60 olmasına dikkat edildi. Faz-kontrast mikroskobunda kontrol edilen preparatlarda mitoz yayılması ve kalitesi uygun ise yayma işlemine devam edildi. Gerekiyorsa yayma koşulları değiştirildi. Preparatlar havada kurutuldu. Eskime süresinin sonunda G banlama yöntemi ile bantlanarak analiz edildi.

3.2.3. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

3.2.3.1. DNA ELDESİ

DNA izolasyonları, steril 2 ml K_3EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon / manyetik boncuk bazlı sistemle özgün kitler (*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood*, *Roche11667327001* / *Magnapure Large Volume KIT*, *Roche03730972001* ve *Prepito DNA Cyto Pure Kit, Perkin Elmer*) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı.

Fanconi anemisi nedeniyle kemik iliği transplantasyonu yapılmış bir olgunun DNA'sı, deri biyopsi materyalinden kit protokollerine uygun şekilde (*Prepito DNA Cyto Pure Kit*) elde edildi.

3.2.3.2. DNA Kalite Araştırması ve Seyreltme İşlemleri

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin yoğunlukları (ng/µl) ve absorbsiyon ölçümleri ($A_{260/280}$) (1,80 - 1,89) spektrofotometrede ölçülerek kayıt edildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). $A_{260/280}$ değerleri 1.80'den daha az olan örnekler protein kontaminasyonu nedeniyle manuel olarak tekrar çöktürülerek saflaştırıldı. (Son konsantrasyonu 2mM Ammonium Asetat [$NH_4C_2H_3O_2$] ve 2,5 hacim %100 etanol [C_2H_5OH] ile çöktürüldükten sonra, pellet 2 defa %80'lik ve bir defa %100'lük etanolde yıkandıktan sonra kurutularak, dH_2O'da çözüldü). $A_{260/280}$ değerleri 1.80-1.89'den fazla olan örnekler ise RNase enzimi ile muamele edilerek fazla olan ribonükleik asitler parçalandı. Her olgu için, DNA yoğunluğu 1,6-2.0 ng/µl olacak şekilde miliQ (18MΩ) su kullanılarak gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme sonrası, her bir olgunun DNA örnekleri özgün kit kullanılarak (*Qubit dsDNA HS Assay Kit*) florometrik yöntemle (*Qubit® 3.0 Fluorometer*) tekrar ölçüldü ve final DNA yoğunluklarının yeni nesil dizileme için istenen aralıkta (1,6 - 2 ng/µl) olması sağlandı.

3.2.3.3. Qubit® 3.0 Florometre İle DNA Yoğunluklarının Ölçümü

Seyreltilmiş DNA örnekleri ölçülmeden önce kalibrasyon amaçlı *Qubit dsDNA HS Assay Kit* ile ölçüm yapıldı. Kalibrasyon ölçümü için kitin içeriğinde bulunan iki farklı standart örnek kullanıldı. Standart örnek başına 199 µl *Qubit® dsDNA HS Buffer* ve 1 µl *Qubit® dsDNA HS Reagent* kullanılarak çalışma solusyonu hazırlandı. On mikrolitre standart örnek 190 µl çalışma solusyonu ile karıştırılarak 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra *Qubit® 3.0 Florometre*'de ölçüm yapıldı. Kalibrasyon ölçümü sonrasında, her bir örnek için aynı şekilde hazırlanmış çalışma solusyonu kullanılarak miks (198 µl çalışma solusyonu + 2 µl seyreltilmiş DNA örneği) hazırlandı. İki dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası ölçüm yapıldı. Örnek DNA yoğunlukları istenen aralığa (1,6-2 ng/µl) gelinceye kadar gerekli seyreltme ya da deriştirme işlemleri sonrasında ölçümler tekrarlandı.

3.2.3.4. YENİ NESİL DİZİLEME (YND)

Çalışma grubumuzda yer alan, klinik bulgular ışığında daha önce kromozom analizi (n:2) veya moleküler analizlerle (n:4) tanı alan olgular dışında kalan 31 olgu, radiyal ışın defektleri ile giden sendromlar için *Ion Torrent PGM* platformunda tasarladığımız YND paneli (tablo 3-1) ile araştırıldı.

3.2.3.4.1. YND Paneli İçin Hedef Bölgelerin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı

Radiyal ışın defektleri ile giden sendromlar, LMD (*London Medical Database*) ve OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*)'den tarandı. İlişkili geni/genleri bilinen 14 fenotip seçildi. Bu fenotiplerle ilişkilendirilmiş genler, HGMD (*Biobase Professional*) veri tabanından tarandı. Her bir genin HGMD transkripti referans alınarak *Ion AmpliSeq Designer* (http://www.ampliseq.com) ile tablo 3-1'de gösterilen fenotiplerle ilişkili genlerin kodlayan bölgelerini, ekzon-intron sınır bölgelerini ve varsa mutasyon tanımlanmış diğer bölgelerini (derin intron, UTR vs.) içine alan, 765 amplikondan ve iki primer havuzundan oluşan bir yeni nesil dizileme paneli oluşturuldu.

3.2.3.4.2. Hedef Bölgelere Ait *Hotspot* Dosyasının Oluşturulması

Analiz aşamasında kullanılmak üzere, her bir hedef bölgedeki bilinen bütün varyasyonlara ait gerekli bilgiler, amplikonların hg19/GRCh37 ile uyumlu başlangıç ve bitiş koordinatları girilerek ENSEMBL (http://grch37.ensembl.org/) veri bankasından indirildi. Her bir varyasyonun yer aldığı kromozom, başlangıç ve bitiş koordinatları, ismi, referans ve değişime uğramış allel bilgilerini içeren excel dosyası oluşturuldu. Tanımlanmış mutasyonlar, *HGMD Professional 2015.2* sürümünden kontrol edilerek, her bir gen için eksik olan mutasyon bilgileri eklendi. Oluşturulan excel dosyası, BED dosyası formatına çevrilerek, *Torrent server* ve *Ion Reporter* yazılımlarındaki ilgili analiz akış şemasına eklendi.

3.2.3.4.3. Kütüphane hazırlanması

Kütüphane hazırlanması, *Ion Ampliseq Library Kit 2.0* (*Life Technologies*) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı. Kütüphane ürünleri, *Ion Xpress Barcode Adapters Kit* (*Life Technologies*) ile barkodlandı. Barkodlanan kütüphane ürünleri *Agentcourt AMPure XP reagent* ve % 70'lik etanol kullanılarak firma protokollerine uygun olarak saflaştırıldı. Normalizasyon için miktar tayini, *Ion Library Quantitation Kit* kullanılarak qPCR ile yapıldı.

Tablo 3-1. RID İle Giden Sendromlar İçin Oluşturulan YND Panelinde Yer Alan Genler ve İlişkili Fenotipler

Fenotip	**Gen**
Cornelia de Lange sendromu 1 (OMIM #122470)	*NIPBL* (NM_133433.3)
Cornelia de Lange sendromu 2 (OMIM #300590)	*SMC1A* (NM_006306.3)
Cornelia de Lange sendromu 3 (OMIM #610759)	*SMC3* (NM_005445.3)
Cornelia de Lange sendromu 4 (OMIM #614701)	*RAD21* (NM_006265.2)
Cornelia de Lange sendromu 5 (OMIM #300882)	*HDAC8* (NM_001166419.1)
Roberts sendromu (OMIM #268300)	*ESCO2* (NM_001017420.2)
Thrombositopeni-radius yokluğu sendromu (TAR) (OMIM #274000)	*RBM8A* (NM_001031743.2)
Duane-radiyal ışın sendromu (OMIM #607323)	*SALL4* (NM_020436.3)
Akrofasiyal Dizostoz 1, Nager tip (OMIM #154400)	*SF3B4* (NM_005850.4)
Holt-Oram sendromu (OMIM #142900)	*TBX5* (NM_000192.3)
Fanconi anemisi (OMIM #227650)	*FANCA* (NM_000135.2)
	FANCC (NM_000136.2)
	FANCG (NM_004629.1)
	FANCD2 (NM_033084.3)
	FANCB (NM_001018113.1)
	FANCM (NM_020937.2)
	BRCA2 (NM_000059.3)
	FANCL (NM_018062.3)
	BRIP1 (NM_032043.2)
	PALB2 (NM_024675.3)
	FANCE (NM_021922.2)
	FANCF (NM_022725.3)
	FANCI (NM_001113378.1)
	*RAD51*C (NM_058216.2)
	SLX4 (NM_032444.2)
	XRCC2 (NM_005431.1)
	ERCC4 (NM_005236.2)
Mandibulofasiyal dizostoz, Guion-Almeida tip (OMIM #610536)	*EFTUD2* (NM_004247.3)
Baller-Gerold sendromu (OMIM #218600)	*RECQL4* (NM_004260.3)
Rapadilino sendromu (OMIM #266280)	
Rothmund-Thomson sendromu (OMIM #268400)	
Townes-Brocks sendromu (OMIM #107480)	*SALL1* (NM_002968.2)
Diamond-Blackfan anemisi (OMIM #105650)	*RPS19* (NM_001022.3)
	RPL15 (NM_002948.3)
	RPS10 (NM_001014.4)
	RPL11 (NM_000975.3)
	RPL35A (NM_000996.2)
	RPS17 (NM_001021.4)
	RPS24 (NM_033022.3)
	RPL26 (NM_000987.3)
	RPS7 (NM_001011.3)
	GATA1 (NM_002049.3)
	RPL15 (NM_002948.3)
	RPS29 (NM_001032.4)
İskelet Defektleri-genital hipoplazi-MR (OMIM #612447)	*PLZF* (*ZBTB16*) (NM_006006.4)

3.2.3.4.3.1. Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması

Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması için toplam 765 primer çifti içeren (havuz I: 387 primer çifti; havuz II: 378 primer çifti) iki adet primer havuzu kullanıldı. Her bir örnek için iki farklı primer havuzu kullanılarak tablo 3-2'deki gibi iki farklı miks hazırlandı.

Tablo 3-2. 2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks

Malzeme	**Miktar**
5X Ion Ampliseq HiFi Mix	4 µl
2X Ion Ampliseq Primer Havuzu	10 µl

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için; hazırlanan iki farklı miks kullanılarak her bir örnek başına Tablo 3-3'de gösterilen şekilde iki farklı solusyon oluşturuldu.

Tablo 3-3. PZR solusyonları

2X Primer Havuzu için Hazırlanan Miks	14 µl
Seyreltilmiş DNA örneği	6 µl
Total hacim	20 µl

Hazırlanan PZR solusyonu, Tablo 3-4'te gösterilen program kullanılarak termal döngü cihazında hedef bölgelerin çoğaltılması için kullanıldı.

Tablo 3-4. Hedef Bölgelerin Çoğaltılmasında Kullanılan Termal Döngü Programı

Evre	**Basamak**	**Sıcaklık**	**Süre**
Bekleme	Enzim aktivasyonu	99 °C	2 dk
Döngü (x17)	Denatürasyon	99 °C	15 sn
	Bağlanma ve uzama	60 °C	4 dk
Bekleme	-	10 °C	∞

3.2.3.4.3.2. Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi

Bu aşamadan önce, her bir DNA örneğinin iki farklı primer havuzu ile çoğaltılmış olan PZR ürünleri, her birinden 10'ar µl alınarak, toplam hacim 20 µl olacak şekilde birleştirildi. Birleştirilmiş ürünlere 2 µl *FuPa Reagent* eklenerek, tablo 3-5'de gösterilen programda termal döngü cihazına kondu.

Tablo 3-5. Primer Dizilerinin Kesimi İçin Kullanılan Termal Döngü Programı

Sıcaklık	**Süre**
50 °C	10 dk
55 °C	10 dk
60 °C	20 dk
10 °C	Bekleme (1 saate kadar)

3.2.3.4.3.3. Barkod ve Adaptörlerin Bağlanması

Her bir barkod (*Ion Express™ Barcode*), *Ion P1 Adapter* ve nukleazdan arındırılmış su ile karıştırılarak 1:4 oranında seyreltildi (**Tablo 3-6**).

Tablo 3-6. Örnek Barkod Adaptör Karışımı

İçerik	**Hacim**

Ion P1 Adapter	2 µl
Ion Xpress™ Barcode X[1]	2 µl
Nukleazdan arındırılmış su	4 µl
Toplam hacim	**8 µl**

1: Seçilmiş barkod

Primer dizilerinin kısmi kesiminden sonra elde edilen ürüne (22 µl), örnek başına, tablo 3-7'de gösterilen miktarlarda *switch solusyonu*, *barkod adaptör karışımı* ve *DNA ligaz* eklenerek, barkod-adaptörlerin ligasyonu için tablo 3-8'deki programda termal döngü cihazına kondu.

Tablo 3-7. Barkod-Adaptör Ligasyon Solusyonu

Malzeme	**Hacim**
Switch solusyonu	4 µl
Barkod-Adaptör Karışımı	2 µl
DNA ligaz	2 µl
Toplam Hacim (22 µl ürün ile birlikte)	**30 µl**

Tablo 3-8. Ligasyon İçin Kullanılan Termal Döngü Programı

Sıcaklık	**Süre**
22 °C	30 dk
72 °C	10 dk
10 °C	Bekleme (1 saate kadar)

Barkod-adaptörlerin ligasyonu sonrasında fazla DNA materyalinin ve enzimlerin uzaklaştırılması amacıyla çoğaltılmamış kütüphane ürünlerinin saflaştırılması aşamasına geçildi.

3.2.3.4.3.4. Çoğaltılmamış Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması

Bu aşamada *Agencourt® AMPure® XP Reagent* ve taze hazırlanmış % 70'lik etanol kullanıldı.

Her bir örneğe 45 µl (toplam örnek hacminin 1.5 katı) *Agencourt® AMPure® XP Reagent* eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Sonra örnekleri içeren plate manyetik bir rafa (DynaMag^{TM} -96 Side Magnet (Cat.no.12331D)) alındı ve solusyon berraklaşıncaya kadar (~2 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pellete zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı. Ardından her bir örneğe 150 µl taze hazırlanmış % 70'lik etanol eklendi. Plate, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış amplikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdan uzaklaştığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından kütüphane ürünlerinin normalizasyonu için kantitasyon aşamasına geçildi. Kütüphane ürünlerinin kantitasyonu kantitatif PZR ile yapıldı.

3.2.3.4.3.5. Çoğaltılmamış Kütüphane Ürünlerinin Kantitatif PZR ile Yoğunluk Tayini

Kantitatif PZR için *Ion Ampliseq^{TM} Library Quantitatin Kit* kullanıldı. Bu kitin içeriğinde yer alan malzemeler: *E. Coli DH10B Ion Control Library, 2X TaqMan® MasterMix, 20X Ion TaqMan® Assay.*

Saflaştırma sonrasında manyetik boncuklara bağlı olarak bulunan amplikonların ayrıştırılarak çözünmesi için her bir örneğe 50 µl *low TE* (Tris-EDTA) eklendi. *Low TE* eklenmiş örnekleri içeren plate, manyetik rafa yerleştirildi ve manyetik boncukların kuyucukların kenarlarına tam olarak yapışması için oda sıcaklığında 2 dk bekletildi. Daha sonra her bir örnek, nükleazdan arındırılmış su kullanılarak 1:100 oranında (495 µl nükleazdan arındırılmış su + 5 µl örnek) seyreltildi. Kantitatif PZR için bu seyreltilmiş örnekler kullanıldı.

Standart örnek olarak kullanılmak üzere *E. Coli DH10B Ion Control Library* (~68.0 pM)'den seri seyreltme işlemleri ile 6.8 pM, 0.68 pM ve 0.068 pM yoğunluklarında örnekler hazırlandı. Kantitatif PZR için her kütüphane örneği ve standart örnek duplike olarak çalışıldı. Her örnek için tablo 3-9'da gösterilen miktarlarda *2X TaqMan® MasterMix, 20X Ion TaqMan® Assay,* kullanılarak karışım hazırlandı. Bu karışıma her kütüphane örneği ve standart örnekten 9'ar µl eklenerek tablo 3-10'daki gibi hızlı döngü programında gerçek zamanlı PZR yapıldı.

Tablo 3-9. Kantitatif PZR İçin Örnek Başına Hazırlanan Karışım

Malzeme	**Miktar**
2X TaqMan® MasterMix	20 µl
20X Ion TaqMan® Assay	2 µl
Toplam Hacim[1]	22 µl

1: Her bir örnek duplike olarak çalışıldığından, 2x karışım hazırlandı ve 11'er µl dağıtıldı.

Tablo 3-10. Gerçek Zamanlı PZR İçin Kullanılan Termal Döngü Programı

Basamak	Sıcaklık	Süre
UDG İnkubasyonu	50 °C	2 dk
Polimeraz aktivasyonu	95 °C	3 sn
Döngü (40X)	60°C	30 sn

Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen yoğunluk değerlerine göre gerekli seyreltme işlemleri yapılarak, tüm kütüphane ürünleri ~100 pM yoğunluğa eşitlendi. Eşitleme sonrasında her kütüphane örneğinden 10 µl alınarak emülsiyon PZR'de kullanılmak üzere stok kütüphane hazırlandı.

3.2.3.4.4. Taslak (*Template*) Hazırlanması

Taslak hazırlanmasında kullanılan kitler tablo 3-11'de gösterilmiştir. Bu aşamada normalize edilmiş kütüphane ürünlerine emülsiyon PZR ve zenginleştirme işlemleri uygulandı.

Tablo 3-11. Taslak Hazırlanmasında Kullanılan Kitler ve İçerikleri

Ion PGM Template OT2 Reactions 400 Kit	Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter Assembly
Ion PGM Template OT2 Supplies 400 Kit	Ion OneTouch Reagent tubes, Ion OneTouch Recovery Routers, Ion OneTouch Recovery Tubes, Ion OneTouch Sipper Tubes, Ion OneTouch 2 Amplification Plates, Ion

	OneTouch ES Supplies, Ion OneTouch 2 Cleaning Adaptors
Ion PGM Template OT2 Reagents 400 Kit	Ion PGM Template OT2 400 Reagent Mix, Ion PGM Template OT2 400 Enzyme Mix, *Ion PGM Template OT2 400 Ion Sphere Particles,* Ion PGM Template OT2 400 Reagent X
Ion PGM Template OT2 Solutions 400 Kit	Ion PGM Template OT2 400 PCR Reagent B, Ion OneTouch Oil, Ion OneTouch Reaction Oil, Nuclease Free Water, Ion PGM OT2 Recovery Solution, Ion PGM Wash Solution, MyOne Beads Wash Solution, Neutralization Solution, Tween Solution
Ion PGM Enrichment Beads	Dynabeads MyOne Streptavidin C1 Beads

3.2.3.4.4.1. Emülsiyon PZR

Bu aşamada, hedef bölgeleri içeren kütüphane ürünlerinin yağ-su emülsiyonları oluşturarak klonal çoğaltılması amaçlanmıştır.

Bir önceki basamakta hazırlanan stok kütüphane ürününden 2 µl alınarak toplam hacim nükleazdan arındırılmış su ile 25 µl'ye tamamlandı. Böylece kütüphane ürünleri 8 pM'a seyreltildi. Emülsiyon PZR için tablo 3-12'de gösterildiği gibi amplifikasyon çözeltisi hazırlandı.

Tablo 3-12. Emülsiyon PZR İçin Hazırlanan Amplifikasyon Çözeltisi

Malzeme	**Hacim**
Ion PGM Template OT2 400 Reagent Mix	500 µl
Ion PGM Template OT2 400 PCR Reagent B	285 µl
Ion PGM Template OT2 400 Enzyme Mix	50 µl
Ion PGM Template OT2 400 Reagent X	40 µl
Seyreltilmiş kütüphane	25 µl
Toplam hacim	900 µl

Hazırlanan amplifikasyon çözeltisi vorteks ile karıştırıldıktan sonra, üzerine 100 µl *Ion PGM Template OT2 400 Ion Sphere Particles* eklenerek toplam hacim 1000 µl'ye tamamlandı. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra tüm karışım reaksiyon filtresine (*Ion PGM OneTouch Plus Reaction Filter Assembly*) yüklendi. Üzerine 1,5 kat hacimde (1500 µl) reaksiyon yağı ilave edilerek kullanılan kite uygun programda, *Ion OneTouch 2* cihazında emülsiyon PZR yapıldı.

3.2.3.4.5. Emülsiyon PZR Ürünlerinin Zenginleştirilmesi

Emülsiyon PZR sonrası ~10 dk santrifüj yapılarak amplikon yüklü partiküller (*template positive ion sphere particles*) dibe çöktürüldü. Toplam 100 µl ürün kalacak şekilde supernatant kısım atıldı ve zenginleştirme için gerekli çözeltiler hazırlandı.

3.2.3.4.5.1 *Melt-Off* Çözeltisinin Hazırlanması

Melt-Off çözeltisi için *Tween® Solution* ve 1 M NaOH kullanıldı. Final yoğunluklar; % 0.1 *Tween® 20 deterjan* ve 125 mM NaOH olacak şekilde, 280 µl *Tween®* çözeltisi ve 40 µl 1 M NaOH kullanılarak 320 µl *melt-off* çözeltisi hazırlandı.

3.2.3.4.5.2. Streptavidin C1 Boncuklarının Yıkanması

DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads karıştırıldı ve 13 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf, manyetik rafa (*DynaMag™ -2 Magnet*) alındı ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilerek boncukların ependorf duvarına yapışması sağlandı. Oluşan supernatant atıldı. 130 µl *MyOne™ Beads Wash Solution* eklenerek ependorf manyetik raftan alındı ve pipet yardımıyla karıştırıldı. Böylece streptavidin C1 boncukları, stok çözeltiden uzaklaştırılmış oldu.

3.2.3.4.5.3. Sekiz Kuyulu Levhanın Doldurulması

Hazırlanan çözeltiler ve emülsiyon PZR ürünü, tablo 4.3'te gösterilen şekilde 8 kuyulu levhaya yüklendi ve zenginleştirme işlemi için *Ion OneTouch™ ES* cihazına (resim 4.1) konuldu. Ek olarak, zenginleştirme sonrası oluşacak ürünün aktarılacağı 0.2 ml ependorf tüpüne 10 µl nötralizasyon çözeltisi konularak resim 3-13'deki gibi cihaza yerleştirildi.

Tablo 3-13. Sekiz Kuyulu Levhanın Doldurulması

Kuyu Numarası	Yüklenen malzeme

Kuyu 1	Emülsiyon PZR ürünü (100 µl)
Kuyu 2	DynaBeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (130 µl)
Kuyu 3	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 4	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 5	Ion OneTouch™ Wash Solution (300 µl)
Kuyu 6	Boş
Kuyu 7	Taze hazırlanmış melt-off çözeltisi (300 µl)
Kuyu 8	Boş

3.2.3.4.6. Zenginleştirilmiş Ürünlerin Dizilenmesi

Dizileme için *Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit* kullanıldı. Firma protokollerine uygun olarak; Ion PGM™ dizileme cihazının klorid tablet ve 18 MΩ su ile yıkamaları, pH kalibrasyonları yapıldı ve zenginleştirilmiş ürünler çipe (*Ion 318™ Chip v2*) yüklendi. Tablo 3-14'deki gibi dizileme planı oluşturularak dizileme işlemi başlatıldı.

Tablo 3-14. Dizileme Planı

Ion Reporter	Version: 4.6
Örnek	DNA
Hedef Tekniği	AmpliSeq DNA
Ion reporter iş akışı	Oluşturulacak
Kütüphane hazırlanmasında kullanılan kit	Ion AmpliSeq 2.0 Library Kit
Kütüphane anahtarı	Ion TCAG (TCAG)
Template Kiti	Ion PGM Template OT2 400 Kit
Dizileme Kiti	Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit
Akış sayısı	850
Çip Tipi	Ion 318™ Chip v2
3' Adaptör:	Ion P1B (ATCACCGACTGCCCATAGAGAGGCTGAGAC)
Barkod	IonXpress
Boncuk yükleme (%)	10
Anahtar Sinyal (1-100)	30
Kullanılabilir dizi (%)	30

Referans Kütüphane	hg19(Homo sapiens)
Hedef Bölgeler	RRD_IAD68579_200_Designed.bed
Hotspot Bölgeler	
Eklentiler	coverageAnalysis, FileExporter, RunTransfer, variantCaller (germline_low_stringency)
Proje	RRD_Panel

3.2.3.4.7. Veri Analizi

Dizileme sonrasında *Torrent server* yazılımına aktarılan verilere ait BAM dosyaları, analiz için *Ion Reporter* yazılımına aktarıldı. Hedef bölgelere ve *hotspot* bölgelere ait BED dosyası eklenerek ve gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, *Ion Reporter*da analiz akış şeması oluşturuldu. Her bir hasta, bu akış şeması ile analiz edildi. Her hastada bulunan değişimler, filtrelere tabi tutularak birkaç aşamada değerlendirildi. İlk aşama filtreleme işleminde, çerçeve kaymasına, dur kodonu oluşumuna veya aminoasit değişimine yol açan değişimler listelendi. Fenotip ile uyumlu bulgu elde edilemeyen olgularda ikinci aşama filtreleme ile kodlayan bölgeler, kırpılma bölgeleri ve UTR (*untranslated regions*) bölgelerindeki sıklığı bilinmeyen veya nadir (MAF<0.01) değişimler listelenerek incelendi. Daha önce tanımlanmamış değişimlerin *in silico* olarak patolojik olup olmadığı, *Mutation Taster* *http://www.mutationtaster.org/), Prediction of functional effects of human nsSNPs* (*http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/*) ve *Scale-invariant feature transform* (*http://sift.jcvi.org/*) veritabanları kullanılarak değerlendirildi.

3.2.3.5 YND İle Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme İle Konfirmasyonu

3.2.3.5.1. Primerlerin Tasarlanması

Primerlerin tasarlamasında dikkat edilen özellikler, seçilen primerlerin, dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış herhangi bir SNP veya tekrarlayan dizi içermemesine, ileri-geri primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla +/- 2-5˚C fark), içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin mümkün olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18-24 nükleotid içermesine ve gen bölgesinde beklenen mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak bölgeleri kapsamasına, dizi analizinde ~30-50 bazın iyi okunamayabileceği gözetilerek özen gösterildi. Özgünlük, *UCSC Genome Bioinformatics* (https://genome.ucsc.edu/index.html)' den "*in silico* PZR" interaktif sistemi ile test edildi.

3.2.3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X $(NH4)_2SO_4$] (Thermo Scientific), 25 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific), %0-10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ve 200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH_20) ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol)'ı ile birlikte çalışıldı.

PZR; 95°C de 10 dk denatürasyon, ardından 95°C de 30 sn denatürasyon, primerlerin Tm (Temparature of Melting)'e göre değişen 64°C den 52°C ye kadar ve 30 sn lik bağlanma ısılarında ve 70°C de 45-90 sn (1 kb / 1 dk) uzama basamaklarından oluşan toplam 35-40 döngü ve son olarak 70°C de 10 dk lık uzama ile, PZR yöntemi kullanılarak, termal döngü cihazlarında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PZR örneklerinden 5 µl alınarak, 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 V da, 20 dk yürütülerek beklenen bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Ultraviyole ışık altında elde edilen bantlar görüntülendi ve kayıt edildi.

3.2.3.5.3 PZR Saflaştırması (Enzimatik Yöntem İle)

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

3.2.3.5.4. Dizi Analizi

PZR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan amplikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi.

3.2.3.5.4.1. DNA Dizi Analizi

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

3.2.3.5.4.2. Dizi PZR Reaksiyonu

5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer (PZR için gerekli kimyasalları içerir), BigDye v3.1 (ddNTP leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), Primer (PZR da kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti ayrı yönlü olarak (dizi okuma kalitesi için seçilir) saflaştırılmış PZR ürünü ve dH_2O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak sekilde plak (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazında yürütüldü. Protokol toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn ile denatürasyon, 50°C de 5 sn ile bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

3.2.3.5.4.3. Dizi Reaksiyon Ürünlerinin Saflaştırılması

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden temizliği için plak içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol eklendi. Plak alüminyum koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika beklendi ve 3810 rpm'de 45 dak. santrifüj yapıldı. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açılarak kuyucuk ağızları üste gelecek biçimde çevrildi ve 1100 rpm'de 30 sn. kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik etanol eklendi. Plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açılarak 1170 rpm'de 60 sn. kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon buffer'ı [(dH_2O ya da HiDi formamid (Highly Deionized formamid)] eklendi. Örnekler 95 °C de 5 dak. denatüre edildi, 2 dak. buz üzerinde bekletildi ve ABI3500'de yürütüldü.

3.2.3.5.4.4. Elektroforez Cihazına Yükleme

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

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

3.2.3.5.4.5. Elektroforez Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kapiller Elektroforezi sonucunda alınan piklerin rengine göre değerlendirme yapıldı. Elektroferogramda pik rengi, Adenin ise yeşil, Guanin ise siyah, Sitozin ise mavi ve Timin ise kırmızı ile gösterildi.

Pikler ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v2.7 (ABI) programlarında bilgisayar ortamında analiz edildi. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/index.html), Ensembl Genome Browser (http://www.ensembl.org/index.html) vb. çeşitli web sitelerinden yararlanıldı.

SeqScape v2.7 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra Fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işlemden sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği olup olmadığı kontrol edilerek değerlendirildi. Belirtilen kontrollerden sonra herhangi birinde farklılık var ise çalışma PZR aşaması veya yeterli örnek mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. SeqScape v2.7 programında analiz aşamasında, elde edilen olgu dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP), HGMD (http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php) ve ENSEMBL GeneSNPView (www.ensembl.org/genesnpview) gibi veritabanları kullanılarak programda işaretlendi.

4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde, 2004-2014 yılları arasında, radiyal ışın defektleri nedeniyle 37 aileden 48 etkilenmiş olgu değerlendirildi. Olguların erkek/dişi oranı 1.3 (erkek:27, dişi:21), klinik değerlendirmede ortalama yaş 4.2 (aralık 3 gün-51 yaş) idi. Olgu grubundan 2 ailede sitogenetik analizde kromozom anomalisi (trizomi 18 ve ailevi t(2;12)(q31;q24.3)) saptanmıştı. Dört ailede ise ilişkili genlerdeki (*SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*, *FANCA*) mutasyonlar çalışma öncesinde yapılan moleküler analizlerde belirlenmişti. Çalışma kapsamında 31 ailenin indeks olgularında, radiyal ışın defektleri için tasarladığımız hedefe yönelik yeni nesil dizileme paneli ile moleküler analizler yapıldı ve beş ailede, 4 farklı gende (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*) 6 farklı mutasyon saptandı. Sonuç olarak, radiyal ışın defekti nedeniyle değerlendirilen 37 ailenin 2'sinde (% 5.4) kromozom anomalisi ve 9'unda (% 24.3) 7 farklı gende (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*, *SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*) 9 farklı mutasyon saptandı (tablo 4.1). Saptanan mutasyonlardan ikisi yanlış anlamlı mutasyon, üçü kırpılma bölgesi mutasyonu ve dördü çerçeve kayması mutasyonu idi. Bu mutasyonlardan beşi daha önce tanımlanmış bilinen mutasyon, dördü ise ilk kez bu çalışmada tanımlanan yeni mutasyonlardı.

Tablo 4.1. Çalışma grubunda değerlendirilen olgulardaki moleküler ve sitogenetik bulgular

Aile	Kalıtım modeli	Klinik Tanı	Gen/Mutasyon	Karyotip	Yöntem	Referans
RID-1	OR	Fanconi Anemisi	*FANCA*: c.894-2A>G homozigot	46,XY	YND + SD ile konfirmasyon	Bilinen mutasyon (206, 207)
RID-2	OR	Fanconi Anemisi	*FANCA*: c.894-2A>G homozigot	46,XY	YND[1] + SD ile konfirmasyon	Bilinen mutasyon (206, 207)
RID-3	OD	Cornelia de Lange sendromu	*NIPBL*: c.6893G>A, (p.Arg2298His), heterozigot	46,XX	YND + SD ile konfirmasyon	Bilinen mutasyon (95)
RID-4	OR	Roberts sendromu	*ESCO2*: c.1104_1105insA, (T371N*fs**32), homozigot	46,XY,PCD+	YND + SD ile konfirmasyon	Yeni mutasyon
RID-5	OR	Fanconi anemisi	*BRIP1*: c.205+5G>T [a]+ c.761_764delAGCA[b] (p.K254R*fs**19), birleşik heterozigot Anne: c.761_764delAGCA heterozigot Baba: c.205+5G>T heterozigot	46,XX	YND + SD ile konfirmasyon	a: Bilinen mutasyon (207, 208) b: yeni mutasyon
RID-6	OR	Fanconi anemisi	*FANCA*: c.4261-2A>C homozigot	46,XY	YND + SD ile konfirmasyon	Bilinen mutasyon (209)
RID-7	OD	Nager sendromu	*SF3B4*: c.1147delC (p.His383Met*fs**75) heterozigot	46,XX	SD[2]	Bilinen mutasyon (168, 169)

RID-8	OD	Okihiro sendromu	*SALL4*: c.2484delG (p.Phe829Leu*fs**27), heterozigot	(-)	SD[3]	Yeni mutasyon
RID-9	OD	Holt-Oram sendromu	*TBX5*: c.481A>C (p.Thr160Pro), heterozigot	46,XX	SD	Yeni mutasyon
RID-10	-	Trizomi 18	(-)	47,XY,+18	HRBT	
RID-11	OD	Holt-Oram sendromu	TBX5 (12q24)	Etkilenmiş anne: 46,XX,t(2;12)(q31;q24.3) Etkilenmiş fetus: 46,XY,t(2;12)(q31;q24.3)mat	HRBT	

OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant, YND: Yeni nesil dizileme, SD: Sanger dizileme, HRBT: *high resolution banding techniques*
1: Yeni nesil dizileme (YND) çalışması Almanya'da (*Centogene AG, Schillingallee 68, 18057, Rostock*) yapıldı.
2: Sanger dizilemesi Almanya'da (*Institut für Humangenetik, University Duisburg, Essen)* yapıldı.
3: Sanger dizilemesi Fransa'da (*Laboratoire de Biochimie, Biologie Moleculaire, Hormonologie, Metabolisme-Nutrition, Oncologie, Centre de Biologie et Pathologie-CHRU 59037 Lille Cedex)* yapıldı.

4.1.1. Aile RID-1:

Klinik Bulgular

Aralarında 1.5 derece kuzen evliliği bulunan anne ve babanın ikinci gebeliklerinden doğan erkek çocukları (G2P2), 1 yaş 9 aylıkken başparmak anomalisi, pes ekinovarus, sütlü kahverengi lekeler ve hipotiroidi bulguları nedeniyle polikliniğimizde değerlendirildi.

Aile öyküsünde, amcada başparmak hipoplazisi, anemi nedeniyle transfüzyon öyküsü ve vücutta birkaç adet sütlü kahverengi leke ve azospermi tarifleniyordu. Olgunun bir kız kardeşi 3.5 yaşında pnömoni nedeniyle eks olmuş (Şekil 4.1). Antenatal izleminde, 28 haftalıkken intrauterin büyüme geriliği (IUBG) saptanmış. Ek patolojik ultrason bulgusu saptanmayan gebelik, 39. gebelik haftasında (GH) sezaryen ile 2150 g tartı (<10 p, 34. GH ile uyumlu), 42.5 cm boy (<10 p, 33-34. GH ile uyumlu) ve 33 cm baş çevresi (25-50 p) ile doğmuş. Postnatal uyum sorunu yaşamayan olgu, unilateral (sol) PEV nedeniyle ponseti alçısı ile tedavi edilmiş. Ayrıca, yenidoğan taramasında konjenital hipotirodi saptanan olgu L-tiroksin tedavisi almaya başlamış. Bu bulgulara ek olarak başparmak hipoplazisi ve vücutta sütlü kahverengi lekeler olması nedeniyle olgu için genetik konsultasyon istenmişti.

1 yaş 9 aylıkken yapılan fizik muayenesinde; boy: 76 cm (-1.2 SD), tartı: 7.5 kg (-2.98 SD), baş çevresi: 43 cm (-3.24 SD) saptandı. Fasiyal dismorfik bulgular (dar ve yukarı çekik palpebral fissürler, hafif midfasiyal hipoplazi, ince üst dudak), vücutta çok sayıda sütlü kahverengi lekeler, bilateral proksimal yerleşimli el başparmakları ve sağ el başparmağında hipoplazi ve fleksiyon kısıtlılığı ve bilateral ayak 2-3. parmaklar arasında parsiyel sindaktili mevcuttu. Olgunun nöromotor gelişimi kronolojik yaşı ile uyumlu idi ve sistemik muayenesinde ek bir bulgu saptanmadı. Olası ek anomaliler açısından istenen batın ultrasonunda hafif splenomegali dışında özellik saptanmadı. Tüm bu klinik bulgular nedeniyle

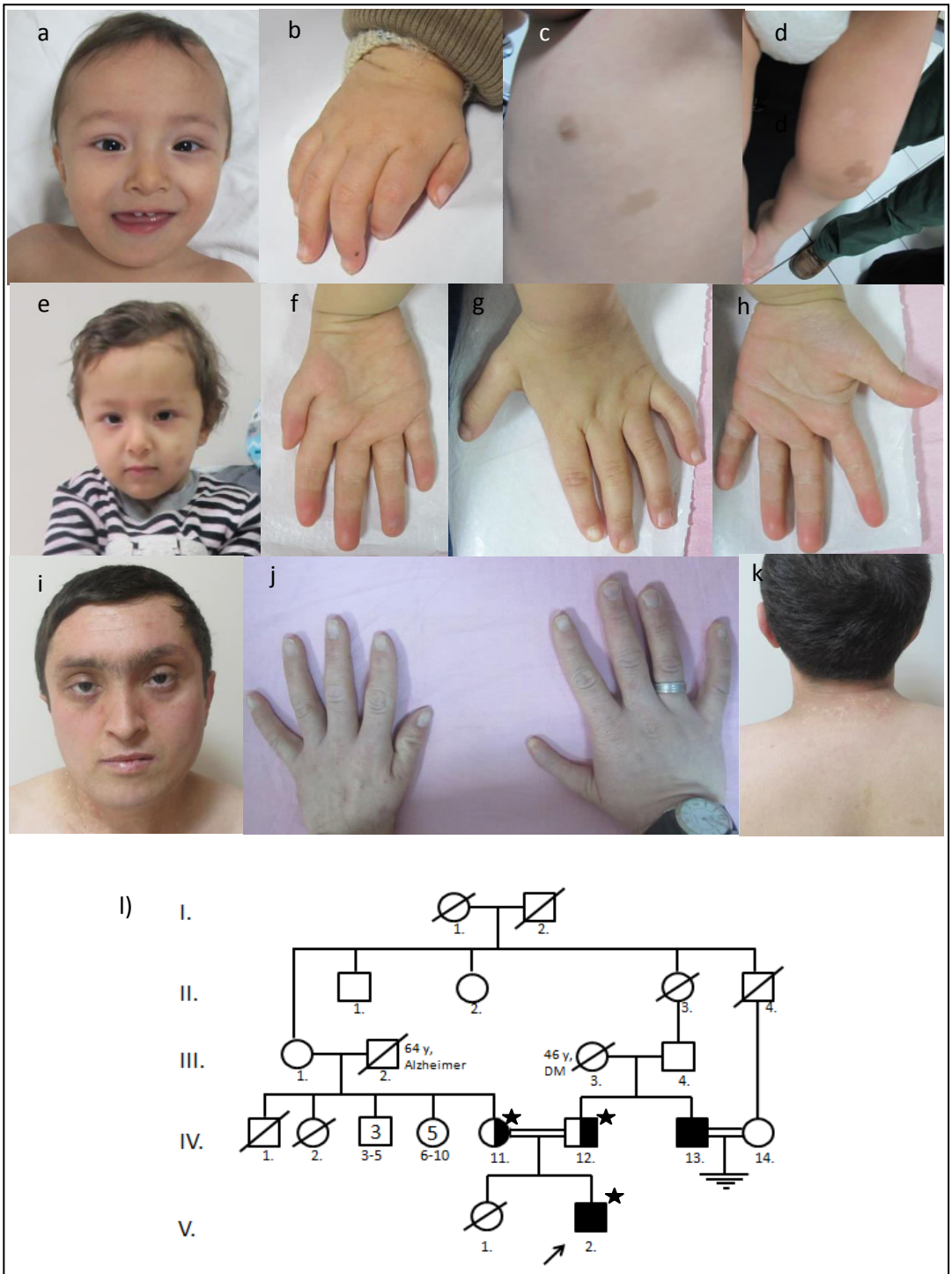
olgunun ayırıcı tanısında ilk sırada Fanconi anemisi yer aldı. Bu nedenle yapılan tam kan sayımında saptanan trombositopeni (102.000/µl) tanıyı destekledi. Sendroma özgün sitogenetik inceleme sonuçları Fanconi anemisi ile uyumlu idi (kromozom kırık çalışmasında, nitrojen mustard [NTM] ile % 3.80 kırık; diepoksibütan [DEB] ile % 3.69 kırık) ve olguda Fanconi anemisi tanısı kesinleşti.

Etkilenmiş amcanın (şekil 4.1, IV-13) 30 yaşındaki fizik muayenesinde; indeks olguya benzer yüz görünümü, vücutta sütlü kahverengi lekeler, boyunda akantozis nigrikans benzeri hiperpigmentasyon ve hipopigmente noktasal maküler lezyonlar, belirgin hipoplastik sağ el başparmağı mevcuttu (şekil 4.1). Ek olarak sağ kulakta kısmi işitme kaybı, hipergonadotropik hipogonadizm, azospermi ve testis biyopsisinde germ hücre yokluğu saptanmıştı. İki yıldır tip 1 DM tanısı ile izlenmekte olan olgu 7-8 yaşından beri anemi nedeniyle eritrosit transfüzyonu almaktaydı. Olgunun kromozom kırık çalışmasında Fanconi anemisi ile uyumlu olarak NTM ile % 3.48, DEB ile % 6.96 kırık tespit edildi.

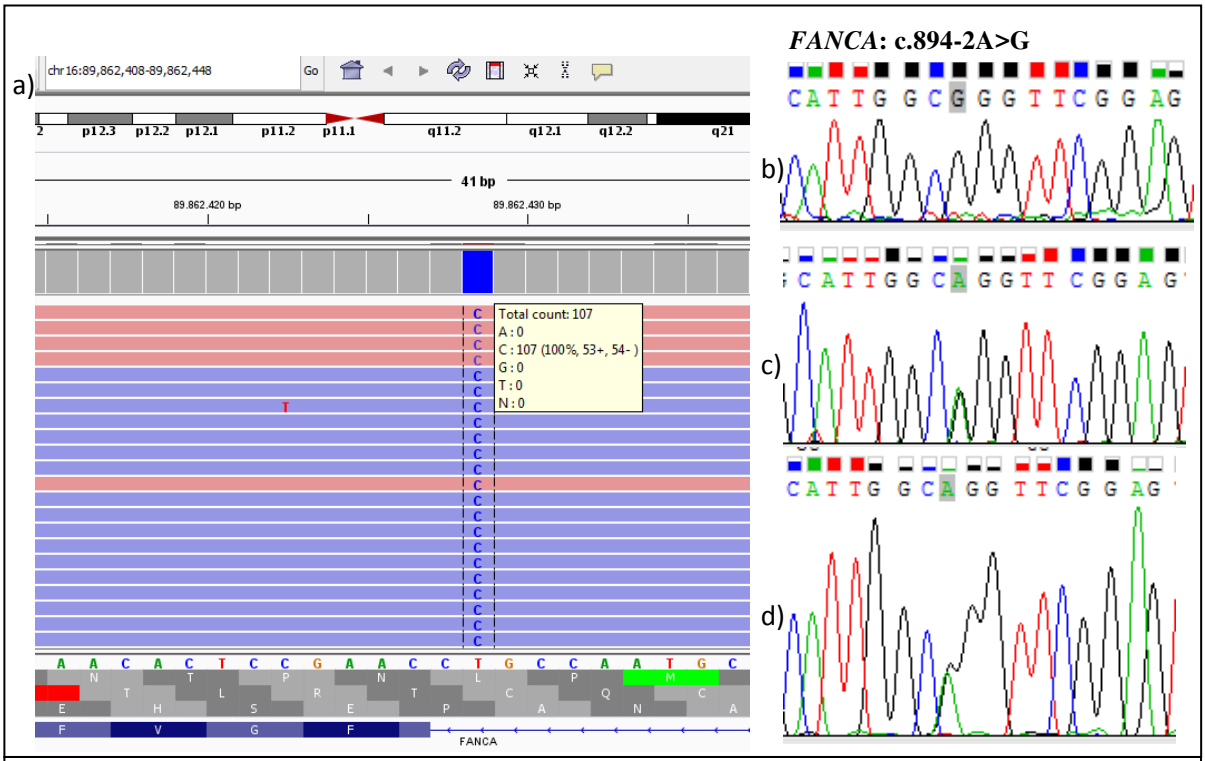
4.1.2. Aile RID-1:

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.1, V-2) radiyal ışın defekti sendromları yeni nesil dizileme paneli ile *FANCA* geninde (NM_000135.2; NP_000126.2) c.894-2A>G ([hg19] chr16:89862428T>C) homozigot değişimi saptandı ve bulgu Sanger dizileme ile olguda homozigot ve anne-babada heterozigot olarak doğrulandı (şekil 4.2). Saptanan bu değişim daha önce Fanconi anemisi'nde kırpılma hatasına yol açan bir mutasyon olarak bildirilmişti (208, 209).



Şekil 4.1. Aile RID-1. **(a)-(d)** olgunun 1 yaş 9 aylık fotoğrafları, **(a)** yüz görünümü, **(b)** hipoplastik ve proksimal yerleşimli sağ başparmak, **(c)** ve **(d)** sütlü kahverengi lekeler, **(e)-(h)** olgunun 2 yaş 7 aylık fotoğrafları, **(e)** yüz görünümü, **(f)** hipoplastik ve proksimal yerleşimli sağ başparmak, **(g)** ve **(h)** proksimal yerleşimli sol başparmak. **(i)-(k)** etkilenmiş amca, **(i)** indeks olguya benzer yüz görünümü, **(j)** hipoplastik sağ başparmak, **(k)** sırtta sütlü kahverengi lekeler, boyunda akantozis nigrikans benzeri hiperpigmentasyon ve hipopigmente noktasal maküler lezyonlar, **(l)** aile ağacı. ★: moleküler analiz yapılan olgular.



Şekil 4.2. Aile RID-1, moleküler sonuçlar. **(a)** olgu V-2'de YND ile saptanan mutasyonun (*FANCA*: c.894-2A>G) IGV (*Integrative Genomics Viewer*) görüntüsü, **(b)** Aynı mutasyonun sanger dizileme ile konfirmasyonu, olgu V-2, **(c)** taşıyıcı babanın (IV-12) elektroferogram görüntüsü, **(d)** taşıyıcı annenin (IV-11) elektroferogram görüntüsü.

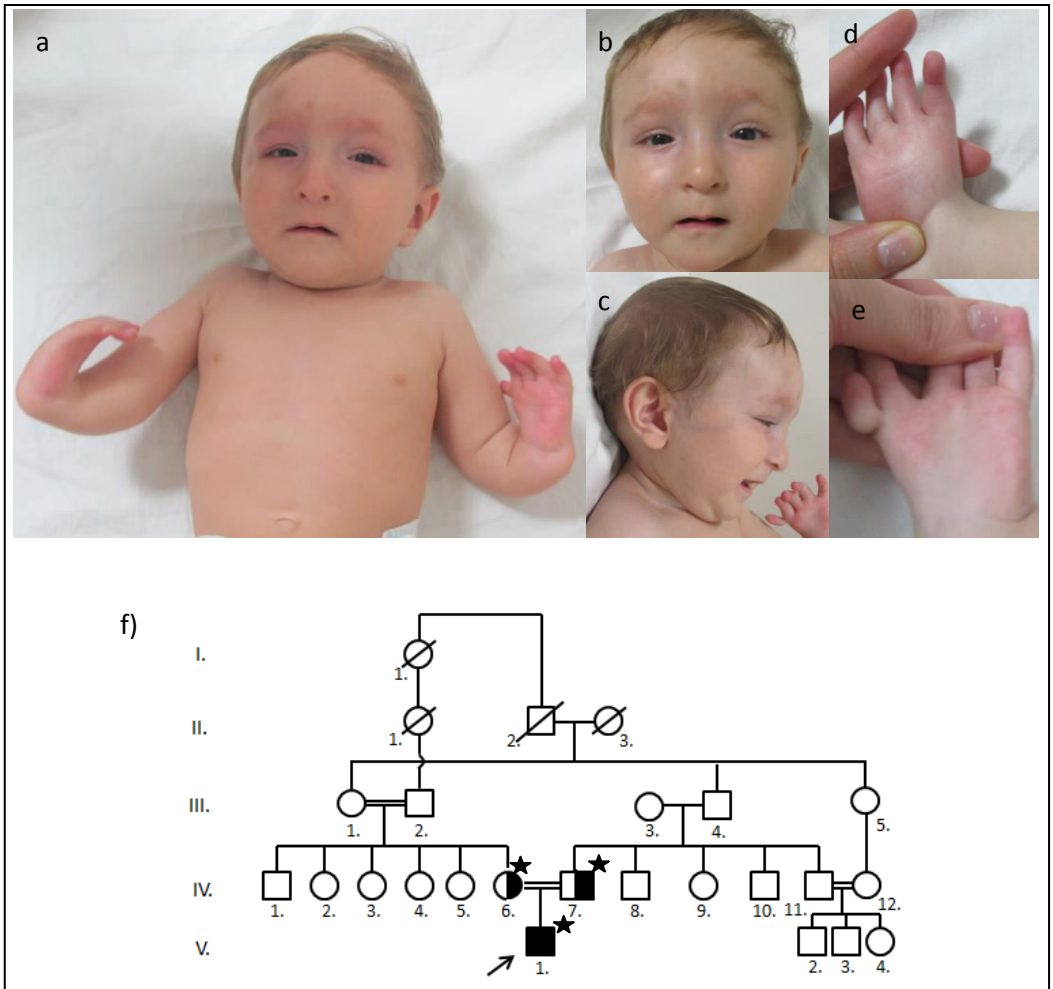
4.2.1.Aile RID-2:

Klinik Bulgular

Aralarında 1. derece kuzen evliliği bulunan anne ve babanın ilk gebeliklerinden doğan erkek olgu (G1 P1), 8.5 aylıkken bilateral radiyal agenezi ve başparmak hipo/agenezisi nedeniyle polikliniğimizde değerlendirildi.

Aile öyküsünde benzer olgu/ek özellik tariflenmiyordu (Şekil 4.3). Olgunun antenatal izleminde, 22. GH'de, ön kollarda tek kemik ve başparmak agenezisi saptanmış ve gebeliğin sonlandırılması seçeneği aileye sunulmuş, ancak aile kabul etmemiş. Olgu, 37. GH'da fetal distres nedeniyle sezaryen ile 2000 g tartı (-3 SD), 45 cm boy (-2.2 SD) ve 33 cm baş çevresi (-1.3 SD) ile doğmuş. Postnatal solunum sıkıntısı nedeniyle 21 gün yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenen olguya, konjenital hipotiroidi nedeniyle L-tiroksin tedavisi başlanmış. Bilateral radiyal deviasyon nedeniyle 5 aydır fizik tedavi alan olgu, el cerrahisi kliniği tarafından değerlendirilerek operasyon planlanmış ve genetik konsultasyon istenmişti.

8.5 aylıkken yapılan fizik muayenesinde; boy 60.4 cm (<3p, 3 ay ile uyumlu), tartı 5450 g (-3.93 SD), baş çevresi 42.5 cm (-2.59 SD) saptandı. Geniş ve yüksek alın, hafif yüksek damak, bilateral kısa ve radiyale deviye ön kollar, sağ elde başparmak agenezisi, sol elde ele yumuşak doku ile tutunan ve tırnak yapısı olan hipoplastik başparmak mevcuttu (şekil 4.3). Nöromotor gelişimi kronolojik yaşı ile uyumlu idi ve sistemik muayenede ek bulgu saptanmadı.



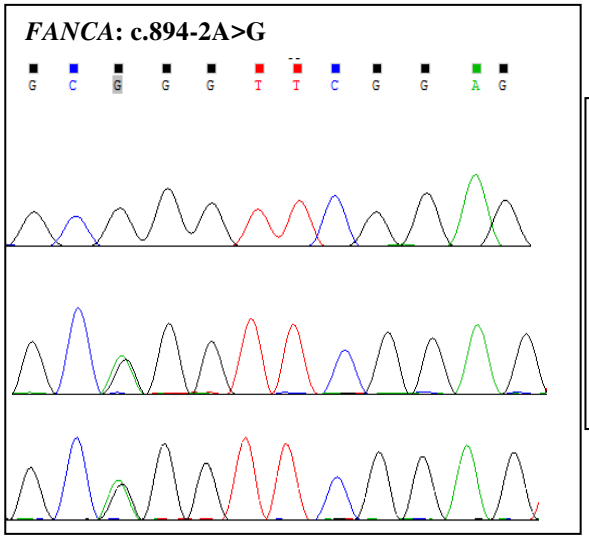
Şekil 4.3. Aile RID-2, indeks olgu. **(a)** olgunun 8.5 aylık fotoğrafı, bilateral kısa ön kollar ve radiyal deviasyon **(b)** ve **(c)** olgunun önden ve yandan yüz görünümü: geniş ve yüksek alın, dar palpebral fissürler, üçgen yüz, malar hipoplazi, ince üst dudak. **(d)** sağ elde başparmak agenezisi, **(e)** sol elde, ele yumuşak dokuyla tutunan hipoplastik başparmak, **(f)** aile ağacı.

Bilateral radiyal ışın defekti, büyüme geriliği, mikrosefali bulguları ve otozomal resesif kalıtım modeli ile uyumlu pedigri analizi nedeni ile ayırıcı tanıda radiyal ışın defektleri ile giden OR sendromlar ve ön planda Fanconi anemisi ve Roberts sendromu düşünüldü. Sitogenetik analizde G ve C-bantlamada erken sentromer ayrışmasının gözlenmemesi nedeniyle Roberts sendromu dışlandı. Fanconi anemisi ayırıcı tanısı ön plana çıkan olgunun tam kan sayımında özellik saptanmadı, ancak kromozom kırık çalışması Fanconi anemisi ile uyumlu (NTM ile % 10.65 kırık, DEB ile % 11.52 kırık) bulundu ve Fanconi anemisi kesinleşti. Olgunun, olası ek anomaliler açısından istenen batın/üriner sistem ultrasonu ve EKO'sunda patoloji saptanmadı. Moleküler analiz için, ailenin onayı ile olguya ait DNA örneği yurt dışına (Centogene/Almanya) gönderildi.

4.2.2. Aile RID-2:

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.3, V-1) dış merkezde hedefe yönelik yeni nesil dizileme ile yapılan incelemede *FANCA* geninde (NM_000135.2; NP_000126.2) saptanan homozigot c.894-2A>G ([hg19] chr16:89862428T>C) mutasyonu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı. Anne ve babanın aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı gösterildi (şekil 4.4).



Şekil 4.4. Aile RID-2. **(a).** indeks (V-1) olguda *FANCA* c.894-2A>G homozigot mutasyonu, elektroferogram görüntüsü, **(b).** aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıyan anneye (IV-6) ait elektroferogram görüntüsü, **(c).** aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıyan babaya (IV-7) ait elektroferogram görüntüsü.

4.3.1. Aile RID-3:

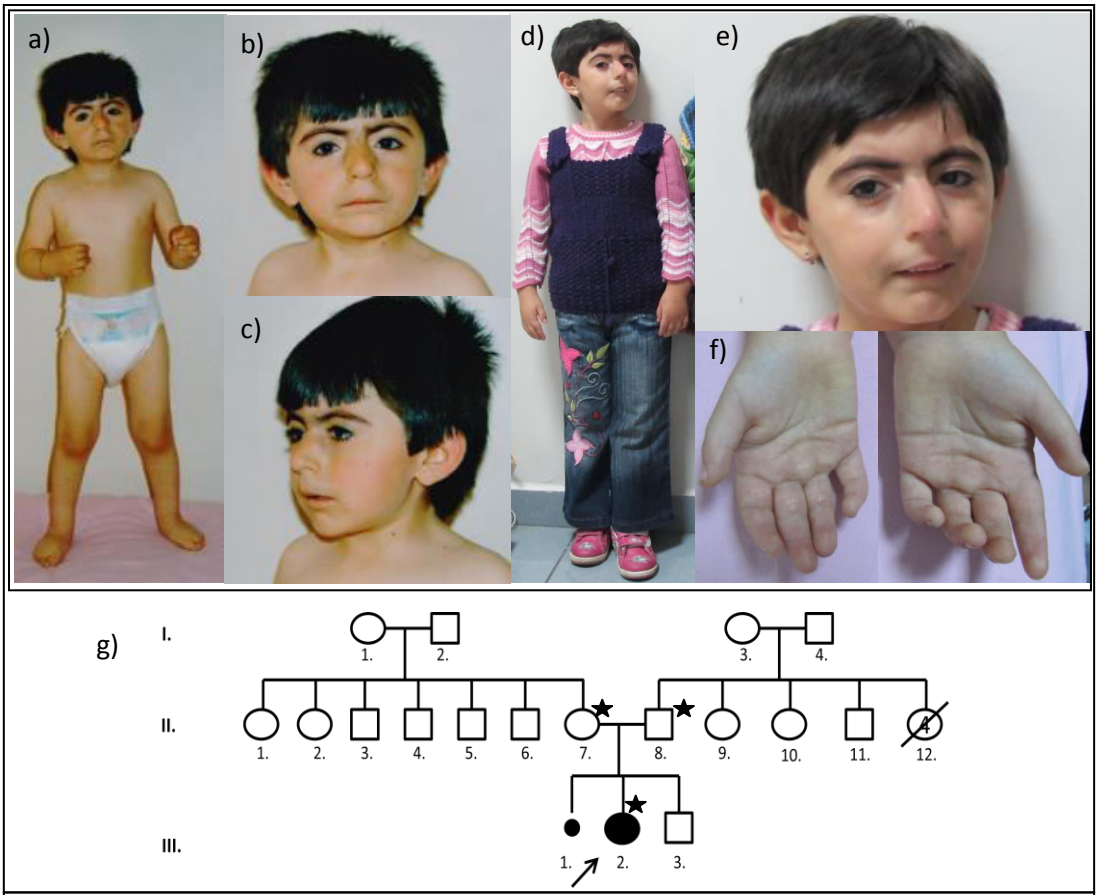
Klinik Bulgular

Aralarında akraba evliliği olmayan anne ve babanın ikinci gebeliklerinden doğan dişi olgu (G3 P2 Ab1), 3 yaş 3 aylıkken psikomotor gerilik, büyüme geriliği ve dismorfik bulgular nedeniyle polikliniğimizde değerlendirildi.

Aile öyküsünde benzer olgu/ek özellik tariflenmiyordu (Şekil 4.5). Ailenin ilk gebeliği, 16. GH'da erken membran rüptürü nedeniyle spontan abortus ile sonuçlanmış. Olgunun antenatal izleminde, IUBG dışında özellik saptanmamış. Olgu, 40. GH'da sezaryen ile (maternal anksiyete) 2400 g tartı (10 p) ve 42 cm (?) boy (<10 p, 32. GH ile uyumlu) ile doğmuş. Doğum baş çevresi bilinmiyordu. Postnatal uyum sorunu olmamış.

3 yaş 3 aylıkken yapılan fizik muayenesinde; boy 87 cm (-2.47 SD), tartı 10,5 kg (-2.60 SD), baş çevresi 43,5 cm (<3 p, 8 ay ile uyumlu) idi. Mikrobrakisefali, fasiyal dismorfik bulgular (dar alın, yay şeklinde kaşlar ve sinofri, uzun ve kıvrık kirpikler, belirgin ve geniş burun kökü ve burun kemeri, uzun filtrum, ince dudaklar, retrognati ve yüksek damak) mevcuttu. Ek olarak, ellerde, bilateral hipoplastik el başparmakları ve 5. parmaklarda klinodaktili, ayaklarda 2-3. parmaklar arasında total kutanöz sindaktili, sırtta belirgin hirsutizm, sakral gamze ve hipoplastik dış genitalya bulguları mevcuttu (şekil 4.5). Kardiyovasküler sistem muayenesinde 3/6 sistolik üfürüm saptandı. Psikomotor gelişimi geri (baş kontrolü 6 ay, yürüme 2,5 yaş, heceleme 3 yaş, cümle kurma ve tuvalet terbiyesi yok) olarak değerlendirildi. Olgudaki psikomotor gerilik DENVER testiyle doğrulandı (kronolojik yaş 3 yaş 3 ay, kişisel-sosyal 23 ay, ince motor 21 ay, dil 10 ay, kaba motor 2 yaş 3 ay ile uyumlu).

Olguda büyüme geriliği, psikomotor gerilik, mikrosefali, fasiyal dismorfik bulgular ve hirsutizm bulguları nedeniyle ayırıcı tanıda ilk sırada Cornelia de Lange sendromu (CDLS) düşünüldü. Ayırıcı tanıya giren kromozom anomalileri (özellikle 3q duplikasyonu) periferik kandan yapılan sitogenetik analiz ile (46,XX) dışlandı. Kardiyak üfürüm ve CDLS'da eşlik edebilecek konjenital kalp anomalileri açısından istenen EKO'da patoloji saptanmadı.

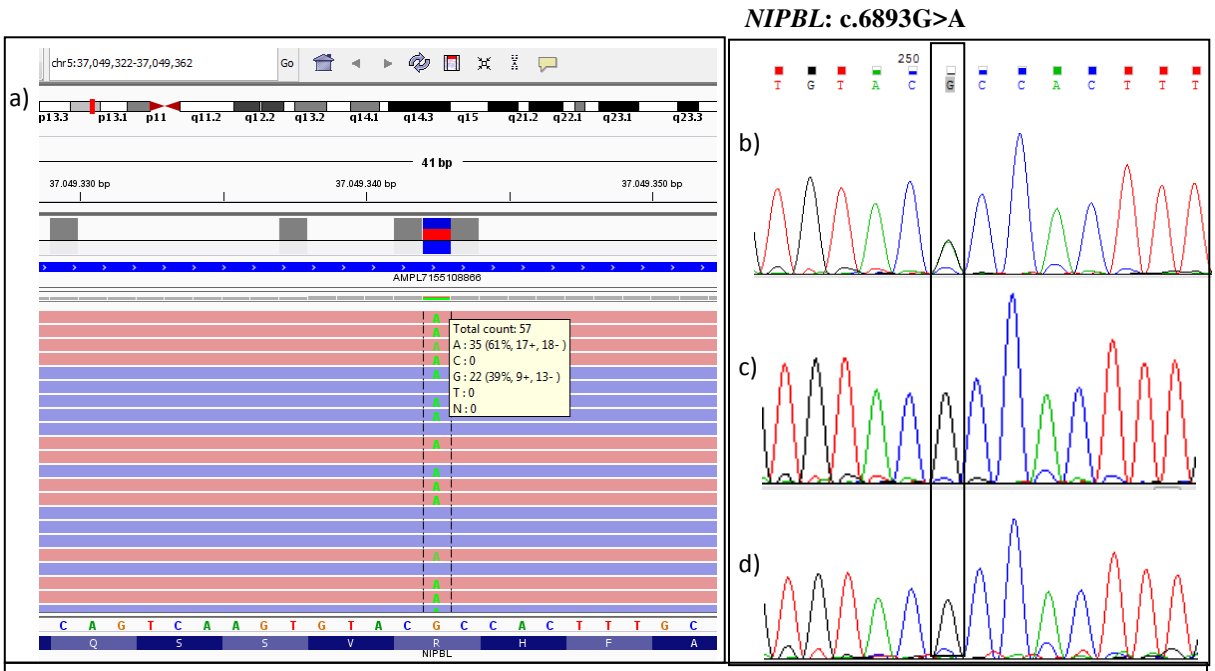


Şekil 4.5. Aile RID-3, indeks olgu. **(a), (b)** ve **(c).** Olgunun 3 yaş 3 aylık fotoğrafları. **(b)** ve **(c).** Olgunun yüz görünümü: dar alın, yay şeklinde kaşlar ve sinofri, uzun ve kıvrık kirpikler, belirgin ve geniş burun kökü ve burun kemeri, uzun filtrum, ince dudaklar, retrognati. **(d), (e) ve (f).** olgunun 8 yaş 5 aylık fotoğrafları. **(f).** bilateral hafif hipoplastik başparmaklar ve 5. parmaklarda klinodaktili, **(g).** aile ağacı. ★: moleküler analiz yapılan olgular.

4.3.2. Aile RID-3:

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.5, III-2) radiyal ışın defekti sendromları yeni nesil dizileme paneli ile *NIPBL* geninde (NM_133433.3; NP_056199.2) daha önce tanımlanmış heterozigot c.6893G>A, p.Arg2298His ([hg19] chr5:37049342G>A) mutasyonu saptandı (95). Saptanan mutasyon, Sanger dizileme ile konfirme edildi, sağlıklı anne ile babanın bu mutasyonu taşımadıkları gösterilerek gonadal mozaisizm dışlanamamakla birlikte *de novo* oluştuğu bildirildi (şekil 4.6).



Şekil 4.6. Aile RID-3. **(a).** YND ile indeks olgunun (III-2) *NIPBL* geninde saptanan chr5:37049342G>A heterozigot mutasyonunun IGV görüntüsü, **(b).** indeks olguda saptanan mutasyonun Sanger dizileme ile konfirmasyonu, elektroferogram görüntüsü, **(c)** ve **(d)**. aynı bölgenin, sağlıklı anne ve babaya (II-7 ve II-8) ait elektroferogram görüntüsü.

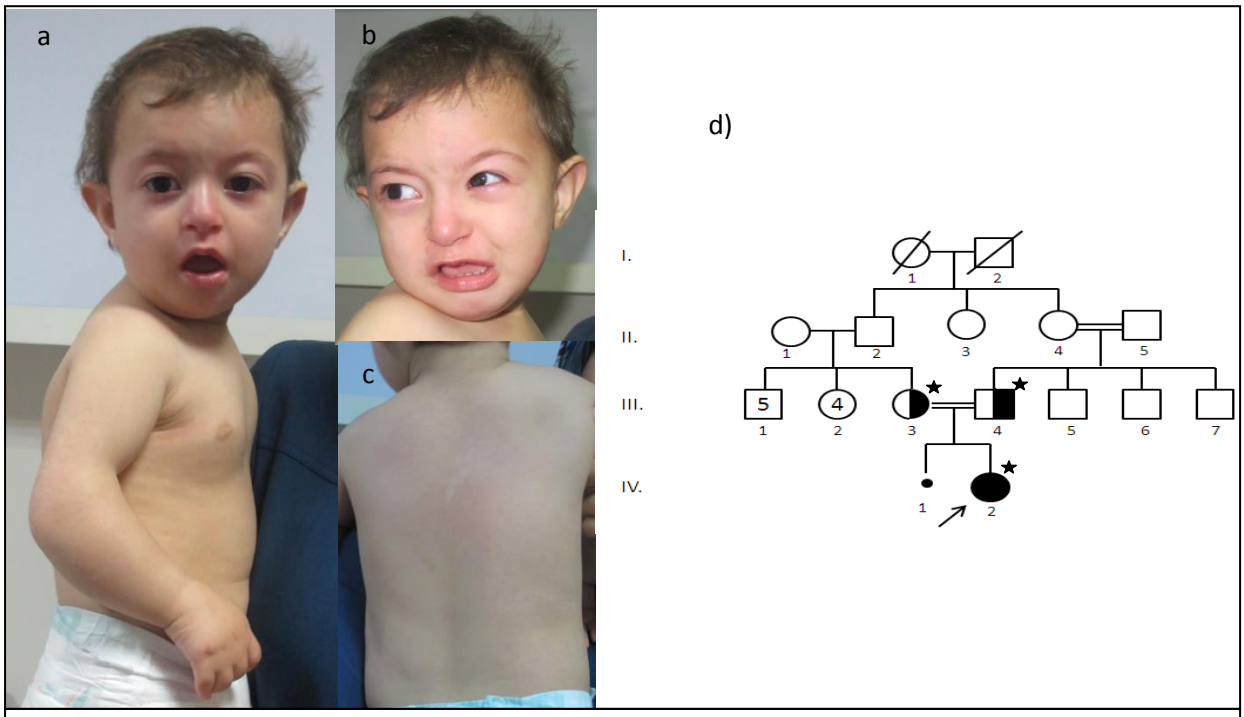
4.4.1. Aile RID-4:

Klinik Bulgular

Aralarında 1. derece kuzen evliliği bulunan anne ve babanın ikinci gebeliklerinden doğan dişi olgu (G2 P1 Ab1), 14 aylıkken multipl kırık ve eklem anomalileri nedeniyle polikliniğimizde değerlendirildi.

Aile öyküsünde benzer olgu/ek özellik tariflenmiyordu (şekil 4.7). Olgunun antenatal izleminde sorun saptanmamış. Fetal distres nedeniyle, 38. GH'da sezaryen ile 2320 g tartı (<10 p, 35. GH ile uyumlu), 50 cm boy (75-90 p) ve 31 cm baş çevresi (<10 p, 33. GH ile uyumlu) ile doğmuş. Postnatal adaptasyon sorunu olmayan olgunun 3 günlükken sol kolunda, 1 haftalıkken sağ kolunda minör travmalar sonrası kırık oluşmuş. Grafilerinde bilateral humeroradiyal sinostoz saptanan olgu, ortopedi tarafından izleme alınmış. Ek olarak, 3 aylıkken yapılan EKO'da PFO ve hafif mitral yetmezlik bulguları ve 8 aylıkken 1 saat ara ile 2 kez afebril konvulziyon öyküsü mevcuttu.

14 aylıkken fizik muayenesinde boy 75 cm (-0.79 SD), tartı 8,4 kg (-1.36 SD), baş çevresi 40,5 cm (-4.50 SD) saptandı. Mikrobrakisefali, seyrek saçlar, fasiyal dismorfik bulgular (bilateral sığ orbitalar, oryantal epikantus, hafif uzun kolumella, hipoplastik ala naziler, sağ burun deliğinin altında hemanjiyom ve hafif retrognati) mevcuttu (şekil 4.7). Ayrıca, hafif hipoplastik el başparmakları ve sağ başparmakta fleksiyon kısıtlılığı, bilateral 5. parmaklarda klinodaktili saptandı. Her iki dirsekte 100° fleksiyon kontraktürü ve ciddi supinasyon kısıtlılığı ve bilateral dirseklerde gamzeleşme, sırtta hipopigmente ve hiperpigmente maküler lezyonlar mevcuttu. Sistemik muayenesinde ek bulgu saptanmadı. Nöromotor gelişimi kronolojik yaşı ile uyumlu idi.



Şekil. 4.7. Aile RID-4, indeks olgu (14 aylık). **(a).** Fasiyal dismorfik bulgular ve dirsekte fleksiyon kontraktürü, **(b).** Seyrek saçlar, sığ orbitalar, oryantal epikantus, malar hipoplazi, hipoplastik ala naziler, sol burun deliğinin altında hemanjiyom, **(c).** Sırtta hipo-/hiperpigmente maküler lezyonlar, **(d).** aile ağacı. ★: moleküler analiz yapılan olgular.

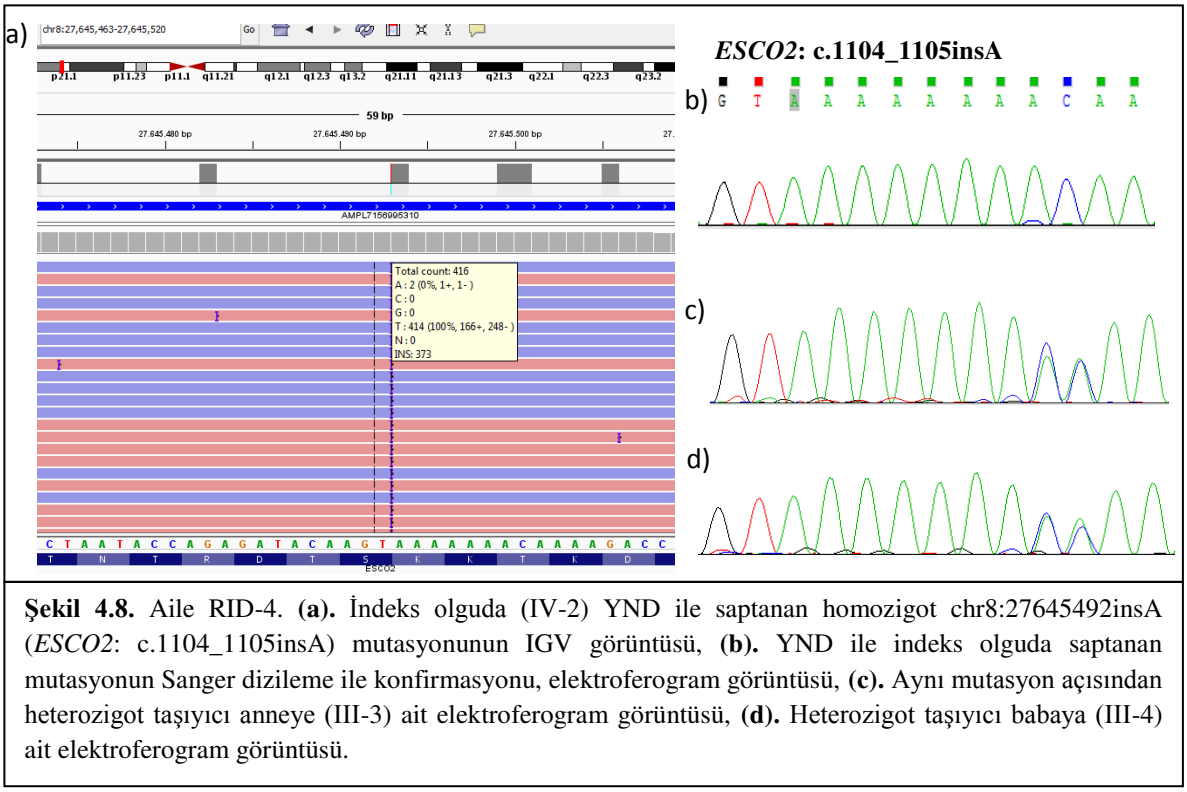
Olguda, her iki dirsekte ve sağ el başparmağında saptanan sinostoz bulguları nedeniyle, ayırıcı tanılar arasında yer alan multipl sinostoz sendromu (OMIM #186500)

açısından *NOG* geni dizilendi, ancak herhangi bir mutasyon saptanmadı. Tekrar değerlendirilen olguda; mikrosefali, brakisefali, seyrek saçlar, fasiyal dismorfik bulgular (malar hipoplazi, sığ orbitalar, geniş burun kökü, hipoplazik ala naziler), ciltte hiperpigmente maküler lezyonlar ve midfasiyal hemanjiyom bulguları ile ayırıcı tanıda Roberts sendromu düşünüldü ve sitogenetik analiz ile erken sentromer ayrışması saptanarak klinik tanı kesinleştirildi.

4.4.2. Aile RID-4:

Moleküler Bulgular

Etkilenmiş olguda (şekil 4.7, IV-2) radiyal ışın defekti sendromları yeni nesil dizileme paneli ile *ESCO2* geninde (NM_001017420.2; NP_001017420.1) c.1104_1105insA, T371N*fs**32 ([hg19] chr8:27645492insA) homozigot değişimi saptandı. Bu değişim daha önce literatürde bildirilmemişti. Çerçeve kaymasına yol açan bir değişim olması nedeniyle patolojik olarak değerlendirildi. Sanger dizileme ile, olguda saptanan bu mutasyonun konfirmasyonu yapıldı, anne ve babanın bu mutasyonu heterozigot olarak taşıdıkları gösterildi (şeklil 4.8).



Şekil 4.8. Aile RID-4. **(a).** İndeks olguda (IV-2) YND ile saptanan homozigot chr8:27645492insA (*ESCO2*: c.1104_1105insA) mutasyonunun IGV görüntüsü, **(b).** YND ile indeks olguda saptanan mutasyonun Sanger dizileme ile konfirmasyonu, elektroferogram görüntüsü, **(c).** Aynı mutasyon açısından heterozigot taşıyıcı anneye (III-3) ait elektroferogram görüntüsü, **(d).** Heterozigot taşıyıcı babaya (III-4) ait elektroferogram görüntüsü.

4.5.1. Aile RID-5:

Klinik Bulgular

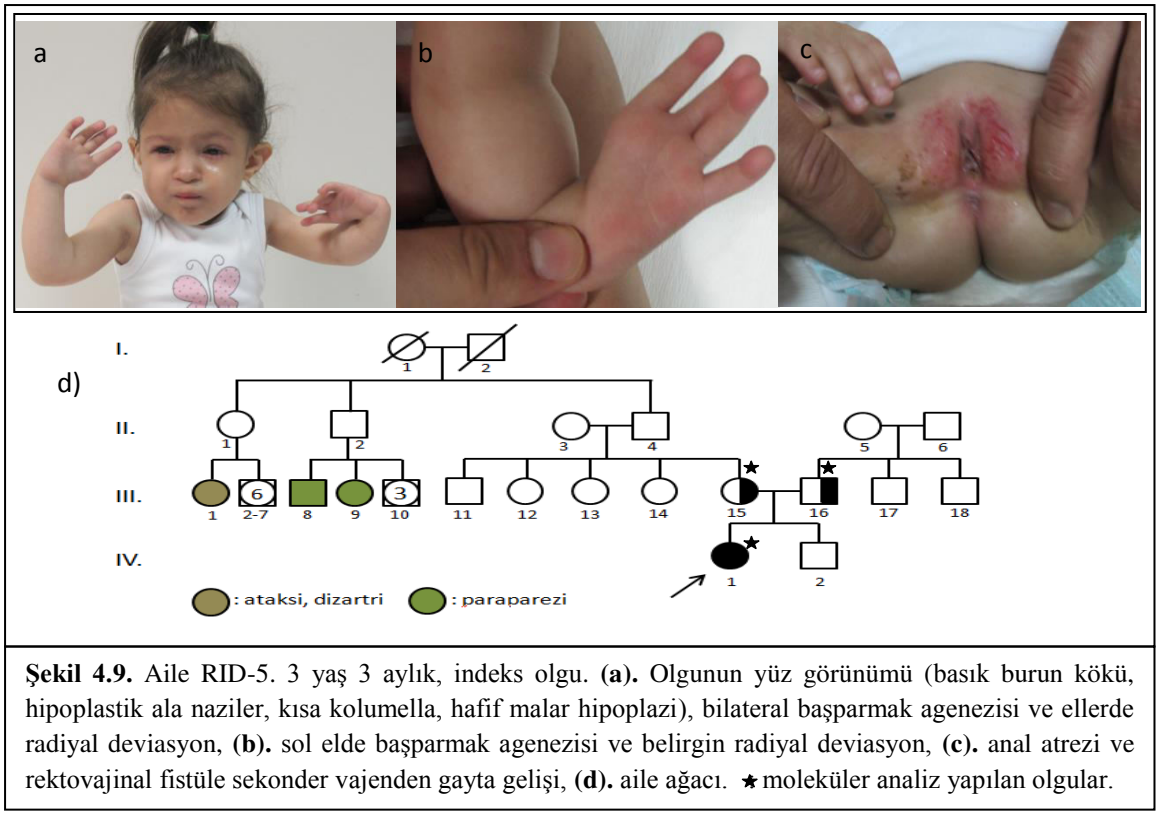
Aralarında akraba evliliği bulunmayan anne ve babanın ilk gebeliklerinden doğan erkek olgu (G2 P2), 3 yaş 3 aylıkken hidrosefali, anal atrezi ve radiyal ışın defektleri nedeniyle polikliniğimizde değerlendirildi.

Aile öyküsünde benzer olgu tariflenmedi. Ancak olgunun annesinin amcasının iki çocuğunda paraparezi (polio sekeli?) ve halasının bir kızında ataksi, dizartri tariflendi (şekil 4.9). Antenatal izleminde, 16. GH'da oligohidramniyos ve hidrosefali bulguları saptanmış. Amniyosentez ile yapılan fetal kromozom analizi normal sonuçlanmış ve aile, gebeliğin sonlandırılması seçeneğini kabul etmemiş. Olgu, 38^{+6}. GH'da sezaryen ile 1690 g tartı (<10 p, 32-33. GH ile uyumlu), 41 cm boy (<10 p, 31. GH ile uyumlu) ve 35 cm baş çevresi (75-90 p) ile doğmuş. Postnatal 20 gün küvöz bakımı alan olgunun, ek olarak, bilateral el başparmaklarında agenezi, anal atrezi, rektovajinal fistül, renal ultrasonda at nalı böbrek ve EKO'sunda biküspit aorta bulguları saptanmış. Elli günlükken, hidrosefali nedeniyle ventrikülоperitoneal şant takılmış, 2.5 yaşındayken, hipotiroidi nedeniyle L-tiroksin tedavisi başlanmış. Olgu, büyüme geriliği ve tartı alamama nedeniyle metabolik hastalıklar açısından tetkik edilmiş, ancak tanı alamamıştı. Bir yaşından beri formül mama desteği alan olguda, tartı alımındaki yetersizlik nedeniyle anal atrezi ve rektovajinal fistülün cerrahi tedavisi yapılamamış. Olgu, radiyal ışın defektleri, anal atrezi, biküspit aorta ve at nalı böbrek bulguları ile dış merkezde VACTERL birlikteliği tanısı almıştı.

3 yaş 3 aylıkken yapılan fizik muayenesinde, boy 65 cm (<3 p, 6 ay ile uyumlu), tartı 4,8 kg (<3 p, -9.26 SD), baş çevresi 37,7 cm (<3 p, yenidoğan ile uyumlu) saptandı. Fasiyal dismorfik bulgular (basık burun kökü, hipoplastik ala naziler, kısa kolumella, hafif malar hipoplazi), ciltte en küçüğü 6 mm çapında olan çok sayıda sütlü kahverengi lekeler, bilateral el başparmaklarında agenezi, el bileklerinde radiyal deviasyon, hipoplastik ayak tırnakları, ayaklarda parmak pozisyon anomalileri (3. parmaklar, 2 ve 4. parmakların altında yerleşimli), anal atrezi ve rektovajinal fistüle sekonder vajenden gayta gelişi mevcuttu (şekil 4.9). Sistemik muayenesinde ek bulgu saptanmadı. Nöromotor gelişimi kronolojik yaşı ile uyumlu idi.

Olguda saptanan bilateral radiyal ışın defekti, anal atrezi ve renal anomali (at nalı böbrek) bulgularına ek olarak hidrosefali bulgusu ile VACTERL-H sendromu (OMIM #276950) ayırıcı tanılar arasında düşünüldü ancak ağır büyüme geriliği, mikrosefali, çok sayıda sütlü kahverengi lekelerin olması nedeniyle Fanconi anemisi ayırıcı tanıda ilk sırada

yer aldı. Tam kan sayımında özellik saptanmamasına rağmen kromozom kırık çalışması Fanconi anemisi ile uyumlu (NTM ile % 11.3 kırık, DEB ile % 10 kırık) bulundu ve olgu Fanconi anemisi klinik tanısı aldı.



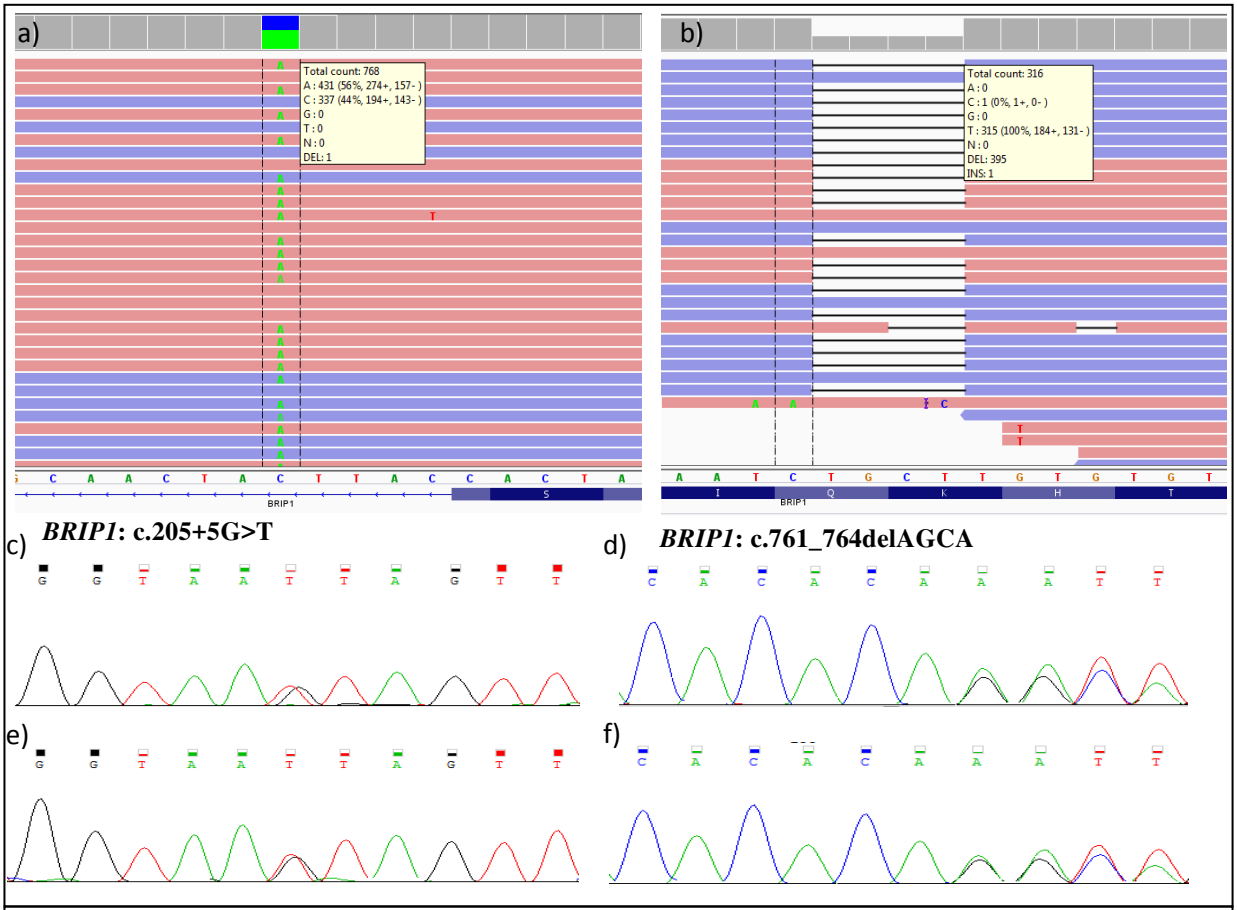
Şekil 4.9. Aile RID-5. 3 yaş 3 aylık, indeks olgu. **(a).** Olgunun yüz görünümü (basık burun kökü, hipoplastik ala naziler, kısa kolumella, hafif malar hipoplazi), bilateral başparmak agenezisi ve ellerde radiyal deviasyon, **(b).** sol elde başparmak agenezisi ve belirgin radiyal deviasyon, **(c).** anal atrezi ve rektovajinal fistüle sekonder vajenden gayta gelişi, **(d).** aile ağacı. ★ moleküler analiz yapılan olgular.

4.5.2. Aile RID-5:

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (şekil 4.9, IV-1), radiyal ışın defekti sendromları yeni nesil dizileme paneli ile *BRIP1* geninde (NM_032043.2; NP_114432.2) heterozigot c.205+5G>T ([hg19] chr17:59937152C>A) mutasyonu ve heterozigot c.761_764delAGCA, p.K254Rfs*19 ([hg19] chr17:59885981delTGCT) değişimi saptandı. c.205+5G>T'nin daha önce Fanconi anemisi ile ilişkili bir mutasyon olduğu bildirilmişti (209, 210). c.761_764delAGCA değişimi ise daha önce literatürde bildirilmemiş olmasına rağmen çerçeve kaymasına yol açması nedeniyle patolojik olarak kabul edildi. Saptanan her iki mutasyon, Sanger dizileme ile konfirme edildi.

Anne ve babada yapılan analizde, olgunun c.205+5G>T mutasyonunu babadan, c.761_764delAGCA mutasyonunu ise anneden aldığı, böylece bu iki mutasyonun olguda birleşik heterozigot formda bulunduğu gösterildi (şekil 4.10).



Şekil 4.10. Aile RID-5. **(a) ve (b).** indeks olguda (IV-1) YND ile saptanan *BRIP1*: c.205+5G>T heterozigot ve c.761_764delAGCA heterozigot mutasyonlarının IGV görüntüsü, **(c).** indeks olguda c.205+5G>T heterozigot mutasyonunun Sanger dizileme ile konfirmasyonu, **(d).** İndeks olguda c.761_764delAGCA heterozigot mutasyonunun Sanger dizileme ile konfirmasyonu, **(e).** babada (III-16), c.205+5G>T heterozigot mutasyonu, elektroferogram görüntüsü, **(f).** annede c.761_764delAGCA heterozigot mutasyonu, elektroferogram görüntüsü.

4.6.1. Aile RID-6:

Klinik Bulgular

Aralarında 1. derece kuzen evliliği bulunan anne ve babanın ikinci ve dördüncü gebeliklerinden doğan, 10 yaş 3 aylık (olgu RID-6.1; şekil 4.11, IV-2) ve 3 yaş 6 aylık (olgu

RID-6.2; şekil 4.11, IV-4) iki erkek kardeş (G5 P5), Fanconi anemisi tanısıyla Hematoloji kliniğinden izlemdeyken genetik konsultasyon amaçlı polikliniğimizde değerlendirildi.

Aile öyküsünde, etkilenmiş iki kardeş dışında benzer olgu tariflenmedi. Ailenin ilk gebeliklerinden olan erkek çocukları, 4 günlükken solunum sıkıntısı nedeniyle ölmüş (Şekil 4.11).

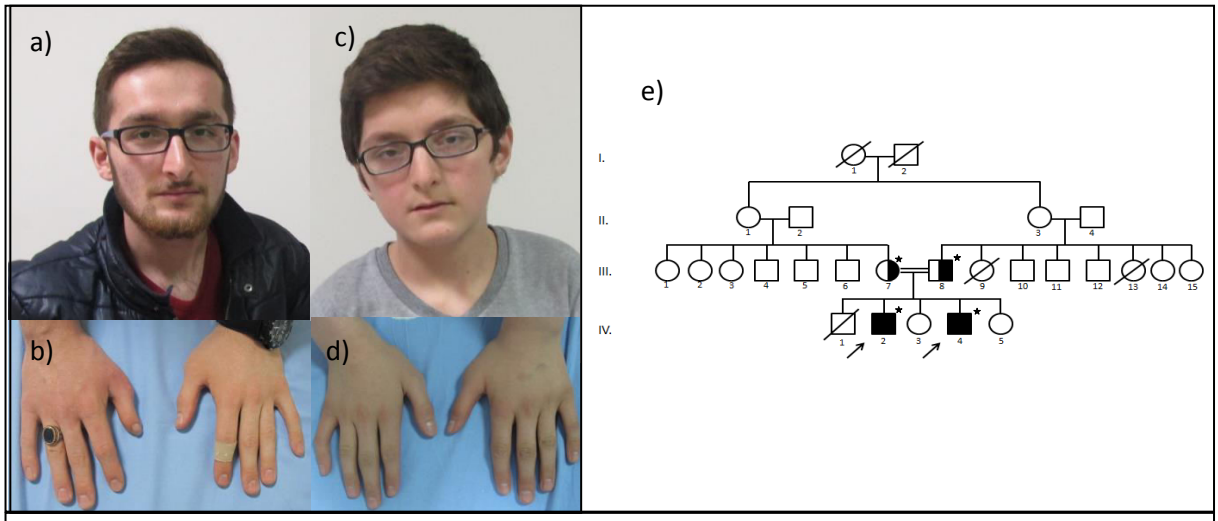
Antenatal izleminde sorun saptanmayan olgu RID-6.1, zamanında, normal spontan doğum ile 3150 g tartı (25-50 p) ve 48 cm (25-50 p) boyunda doğmuş. Doğum baş çevresi bilinmiyordu. Postnatal adaptasyon sorunu olmayan olgunun, doğumdan sonra her iki elinde preaksiyel polidaktili saptanmış ve 4 aylıkken opere edilmiş. Üç yaşındayken, tartı alamama ve sık enfeksiyon geçirme şikayetleri nedeniyle tetkik edilen olgunun tam kan sayımında pansitopeni (hgb: 10.7 g/dl, htc: % 31, lökosit: 2800/mm^3, trombosit: 37000/µl) ve kemik iliği aspirasyonunda tüm hücre serilerinde azalma saptanmış. Preaksiyel polidaktili ve kemik iliği yetmezliği bulguları ile Fanconi anemisi düşünülen olguda, kromozom kırık çalışması (DEB testi) ile Fanconi anemisi tanısı kesinleştirilmiş. On yaşında belirginleşen trombositopeni (23000/µl) nedeniyle streoid (metilprednizolon) tedavisi başlanmış.

Ailenin ikinci etkilenmiş olgusu (RID-6.2), zamanında, normal spontan doğum ile 3150 g tartı ve 50 cm boyunda doğmuş. Postnatal adaptasyon sorunu olmayan olguda, doğum sonrası, sol elinde preaksiyel polidaktili ve sınırda trombosit sayısı (150.000/µl) saptanmış. Kardeşinde Fanconi anemisi, olguda preaksiyel polidaktili ve sınırda trombosit sayısı nedeniyle yapılan kromozom kırık çalışması Fanconi anemisi ile uyumlu (NTM ile % 7.17 kırık, DEB ile % 3.48 kırık) saptanarak tanı kesinleştirilmiş.

Olgu RID-6.1'in 10 yaş 3 aylıkken fizik muayenesinde, boy 123 cm (-2.66 SD), tartı 22 kg (-2.55 SD), baş çevresi 51 cm (-1.80 SD) ölçüldü. Strabismus, nistagmus, bilateral ptozis ve yüksek damak mevcuttu. Sağ lomber bölgede 2x3 cm sütlü kahverengi leke ve sağ kalçada 3x4 cm ekimoz saptandı. Her iki elde opere preaksiyel polidaktili mevcuttu. Ek olarak, sağ el başparmağında hipoplazi ve distal interfalangeal ekleminde fleksiyon kısıtlılığı saptandı. Penis boyu 3 cm ve bilateral testis hacmi 1 cm^3 ölçüldü (mikropenis, mikroorşidi). Sistemik muayenesinde ek bulgu saptanmadı. Nöromotor gelişimi kronolojik yaşı ile uyumlu idi.

Olgu RID-6.2'nin 3 yaş 6 aylık iken fizik muayenesinde, boy 101 cm (0.12 SD), tartı 15 kg (-0.45 SD) ve baş çevresi 51 cm (0.13 SD) ölçüldü. Yüksek damak dışında kraniyofasiyal bulgu saptanmadı. Sol elde preaksiyel polidaktili, vücutta çok sayıda sütlü

kahverengi lekeler ve karın bölgesinde hipopigmente maküler lezyon mevcuttu. Sistemik muayenesinde ek bulgu saptanmadı. Nöromotor gelişimi kronolojik yaşı ile uyumlu idi.



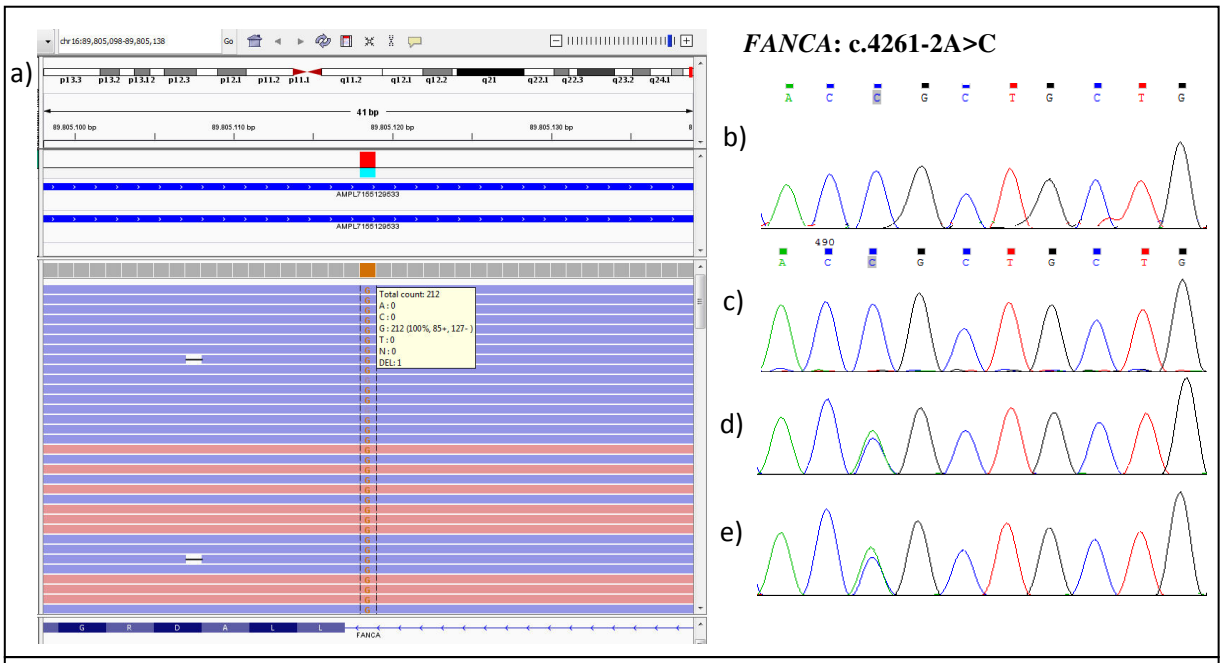
Şekil 4.11. Olgu RID-6.1'in (IV-2) 19 yaş 6 aylık, olgu RID-6.2'nin (IV-4) 13 yaş 8 aylık fotoğrafı. **(a).** Olgu RID-6.1, dar palpebral fissürler, hipoplazik ala naziler, aşağı yerleşimli kolumella, kısa filtrum, belirgin çene. **(b).** Olgu RID-6.1, bilateral opere preaksiyel polidaktili, hipoplastik ve radiyale deviye sağ el başparmağı. **(c).** Olgu RID-6.2, benzer yüz görünümü. **(d).** Olgu RID-6.2, sol elde opere preaksiyel polidaktili ve hipoplastik başparmak, **(e).** aile ağacı.

Her iki olgunun da EKO'su ve renal ultrasonografisi normal saptandı. Olgu RID-6.1 19 yaş 6 aylıkken ve olgu RID-6.2 13 yaş 8 aylıkken tekrar değerlendirildi (şekil 4.11). Olgu RID-6.1'in trombosit sayısının 30.000-40.000/µl düzeylerinde seyrettiği, hafif anemisinin olduğu ve sadece diş cerrahisi öncesi birkaç kez trombosit ve eritrosit suspansiyonu aldığı, sürekli transfüzyon ihtiyacının olmadığı öğrenildi ve olguda ek anomali saptanmadı. Olgu RID-6.2'nin ise 4 yaşındayken preaksiyel polidaktili nedeniyle opere olduğu, trombosit sayısının en fazla 50.000/µl düzeylerine kadar düştüğü, ancak hiç transfüzyon ihtiyacının olmadığı öğrenildi. Ek anomali saptanmadı. Her iki olgu da henüz kemik iliği nakli olmamıştı ve malignite öyküsü yoktu.

4.6.2. Aile RID-6:

Moleküler Bulgular

İndeks olgu RID-6.2 (şekil 4.11, IV-4)'de, radiyal ışın defekti sendromları yeni nesil dizileme paneli ile *FANCA* geninde (NM_000135.2; NP_000126.2) homozigot c.4261-2A>C ([hg19] chr16:89805118T>G) mutasyonu saptandı. Bu mutasyon, kırpılma hatasına yol açan, daha önce Fanconi anemisi ile ilişkili olarak bildirilmişti (211). Sanger dizileme ile etkilenmiş kardeşin (olgu RID-6.1, şekil 4.11, IV-2) aynı mutasyonu homozigot olarak, anne ve babanın heterozigot olarak taşıdığı gösterildi (şekil 4.12).



Şekil 4.12. Aile RID-6. **(a).** olgu RID-6.2 (IV-4)'de YND ile saptanan *FANCA*: c.4261-2A>C ([hg19] chr16:89805118T>G) homozigot mutasyonunun IGV görüntüsü, **(b).** Olgu RID-6.2'de YND ile saptanan mutasyonun Sanger dizileme ile konfirmasyonu, **(c).** Aynı mutasyonun, etkilenmiş kardeşte (IV-2) Sanger dizileme ile gösterilmesi, **(d)** ve **(e).** sırasıyla anne ve babada, heterozigot formdaki c.4261-2A>C mutasyonunu gösteren elektroferogram görüntüleri.

4.7.1. Aile RID-7:

Klinik Bulgular

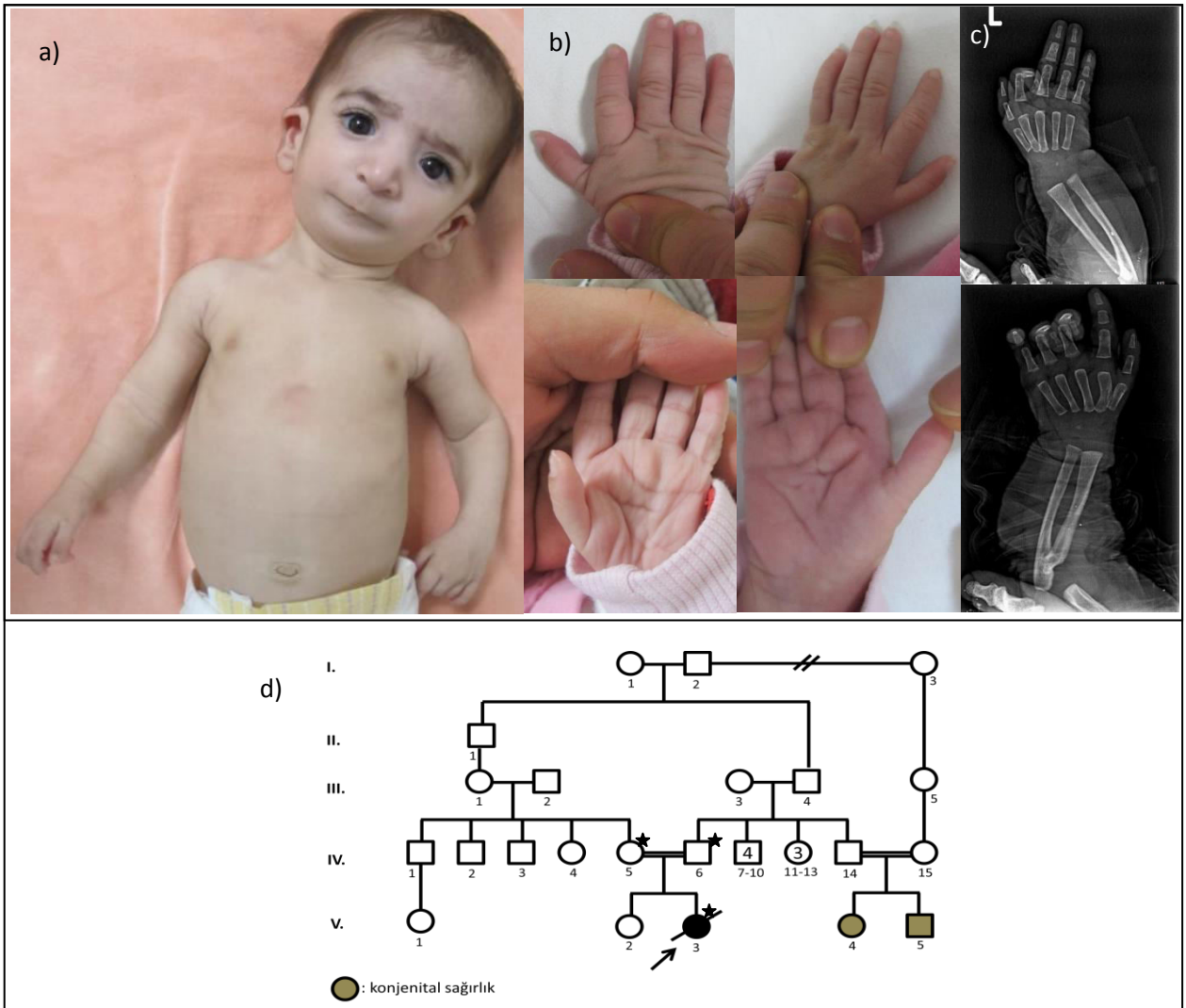
Aralarında 1.5 derece kuzen evliliği bulunan anne ve babanın ikinci gebeliklerinden doğan dişi olgu (G2 P2), 2.5 aylıkken yarık damak, mikrognati ve glossopitoz bulguları nedeniyle polikliniğimizde değerlendirildi.

Aile öyküsünde benzer olgu tariflenmedi ancak konjenital sağırlığı olan olgular mevcuttu (şekil 4.13). Antenatal izlemi düzenli olarak yapılmayan olgu, zamanında, normal spontan doğum ile 3500 g tartı (75 p), 50 cm boy (50-75 p) ve 36 cm baş çevresi (90 p) ile doğmuş. Doğum sonrası Pierre-Robin sekansı (yarık damak, mikrognati ve glossopitoz) saptanan olguya genetik konsultasyon önerilmiş.

Emmesi yeterli olmayan olguya formül mama başlanmış olmasına rağmen tartı alımı yetersizdi. Yenidoğan işitme taramasından geçemeyen olguda dış kulak yolu atrezisi saptanmış ve 6 aylık olunca BERA testi önerilmiş.

2.5 aylıkken fizik muayenesinde, boy 55 cm (-2 SD), tartı 3.6 kg (-3.18 SD), baş çevresi 37 cm (-2.42 SD) saptandı. Kraniyofasiyal bulguları, aşağı çekik palpebral fissürler, uzun kirpikler, mavi sklera, alt göz kapağı kenarlarında düzensizlik, belirgin burun kökü, hipoplazik ala naziler, hafif malar hipoplazi, ince dudaklar, mikroretrognati, yumuşak damakta U şeklinde yarık, glossopitoz, düşük ve hafif geriye yerleşimli kulaklar, katlantılı heliksler ve atrezik dış kulak yolları idi. El başparmakları hipoplastik ve uzundu, interfalangeal eklemlerinde fleksiyon hareketi ve fleksiyon çizgisi yoktu. Her iki elde hokey çizgisi ve 5. parmaklarda klinodaktili mevcuttu. Her iki ön kolda supinasyon hafif kısıtlıydı. Ayaklarda pes ekinovarus ve parmak pozisyon anomalileri mevcuttu (şekil 4.13). Sistemik muayenesinde ek bulgu saptanmadı. Nöromotor gelişimi kronolojik yaşı ile uyumlu idi. Yarık damak, mikrognati, dış kulak yollarında atrezi bulguları nedeniyle kulak-burun-boğaz konsultasyonu istendi ancak olgu, 5 aylıkken solunum yetmezliği nedeniyle kaybedildi.

Olguda, tipik kraniyofasiyal bulgular ve radiyal ışın defektleri ile klinik olarak Nager sendromu düşünüldü.



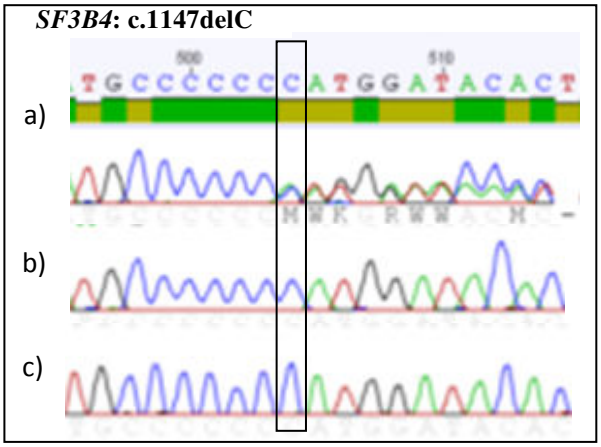
Şekil 4.13. Aile RID-7, indeks olgu. **(a).** Tipik fasiyal dismorfizm: aşağı çekik palpebral fissürler, malar hipoplazi, alt göz kapaklarında kirpik azlığı ve düzensizlik, düşük ve displastik kulaklar, mikrognati. **(b).** hipoplastik ve ankiloze el başparmakları, **(c).** her iki elde birinci metakarp ve falankslarda hipoplazi, direkt grafi görüntüsü, **(d).** aile ağacı.

4.7.2. Aile RID-7:

Moleküler Bulgular

Nager sendromu klinik tanılı indeks olgu ve anne-babasına (şekil 4.13; V-3, IV-5 ve IV-6) ait EDTA'lı kanlar, moleküler analiz için araştırma kapsamında yurtdışına (*Dagmar Wieczorek, Institut für Humangenetik, University Duisburg, Essen, Germany*) gönderildi. İndeks olguda, Nager sendromu ile ilişkili *SF3B4* geninin (NM_005850.4, NP_005841.1) 6. ekzonunda, çerçeve kaymasına yol açan heterozigot c.1147delC (p.H383M*fs**75) mutasyonu

saptandı. Bu mutasyon, daha önce Nager sendromu ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmişti (170, 171). Aynı mutasyonun anne ve babada olmadığı gösterildi (şekil 4.14).



Şekil 4.14. Aile RID-7: moleküler sonuçlar. **(a).** İndeks olguda c.1147delC heterozigot mutasyonu, elektroferogram görüntüsü, **(b).** annede aynı bölgenin elektroferogram görüntüsü, **(c)** babada aynı bölgenin elektroferogram görüntüsü.

4.8.1. Aile RID-8:

Klinik Bulgular

Aralarında uzak akrabalık bulunan anne ve babanın ilk gebeliklerinden doğan 29 yaşındaki bilateral radiyal ışın defekti olan olgu (G4 P4), gebeliğinin 21. haftasında polikliniğimizde değerlendirildi.

Anne adayının ilk gebeliğindeki fizik muayenede, her iki ön kolda kısalık, radiyal hipoplazi ve buna bağlı belirgin radiyal deviasyon, sol elde başparmak agenezisi, sağ elde ileri derecede hipoplazik ve ikinci parmağın lateralinden çıkan başparmak yapısı saptanmıştı. Kolay morarma şikayeti de tarifleyen olgunun, Fanconi anemisi ayırıcı tanısı ile istenen tam kan sayımında özellik saptanmamıştı. Başparmak agenezisi nedeniyle olgu Holt-Oram sendromu ile uyumlu bulunmuş ve fetusun hastalık riskinin % 50 olduğu belirtilmiş ve US ile izleme alınmıştı. Gebeliğinde yapılan US izleminde, fetusta major anomali saptanmamış ve sağlıklı bir erkek çocuk doğmuştu.

Olgu 37 yaşındayken, ikinci gebeliğinin 19. haftasında tekrar başvurdu. Yapılan antenatal US'de, fetusta, her iki elde başparmak izlenmedi, sağ ön kolda tek kemik ve proksimal radiyoulnar füzyon (?) bulguları saptandı. Fetusun etkilenmiş olduğu belirtildi, ileri

anne yaşı nedeniyle fetal karyotip amaçlı amniyosentez önerildi. Aile girişimi kabul etmediğinden doğum sonrası genetik konsultasyon önerildi.

Etkilenmiş olgu (G2), 38. GH'da sezaryen ile 3320 g tartı (≈75 p), 46 cm boy (10-25 p) ve 35 cm baş çevresi (75-90 p) ile doğmuş. Postnatal adaptasyon sorunu yaşamayan olgu, 3. günde karnında şişkinlik ve huzursuzluk nedeniyle çocuk cerrahisi ile konsulte edilmiş ve anokutanöz fistül, anal stenoz tanılarıyla opere edilmiş.

7 aylıkken fizik muayenesinde, boy 65 cm (-1.64 SD), tartı 8.5 kg (0.00 SD), baş çevresi 43.5 cm (-1.10 SD) ölçüldü. Bilateral hafif epikantus, basık ve bifid burun ucu, dış kulak yolunda darlık bulgularına eşlik eden her iki elde radiyal deviasyon, sağ elde başparmak agenezisi, sol elde 1-2. parmaklar arasında total kutanöz sindaktili bulguları mevcuttu.

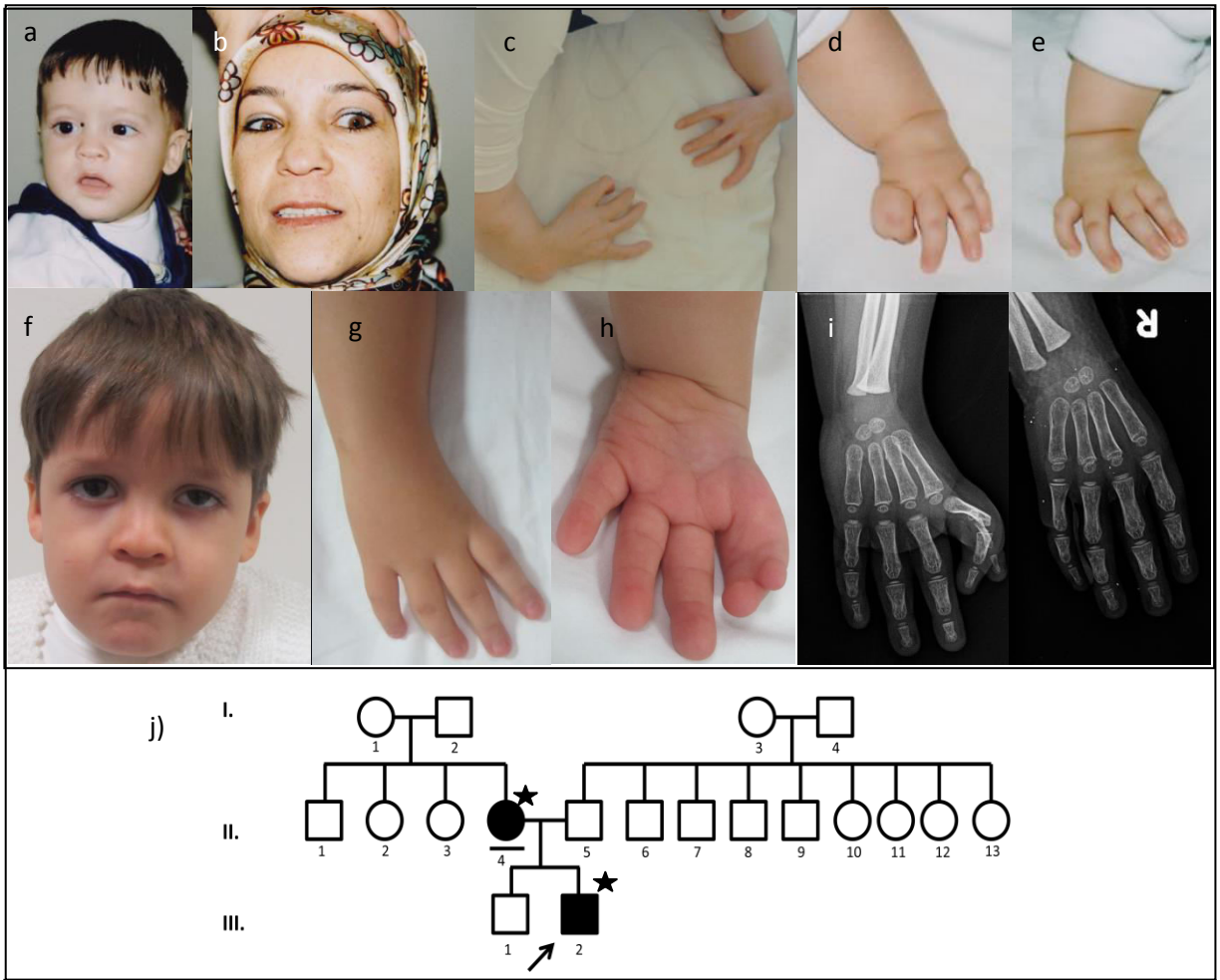
Anne ve oğlu, benzer bulgular (radiyal ışın defektleri) nedeniyle ailevi otozomal dominant Holt-Oram sendromu klinik tanısı ile izleme alındı. Olası kalp anomalileri açısından yapılan EKO'da patoloji saptanmadı. Olguların kardiyak ileti bozuklukları açısından izlemi önerildi.

4.8.2. Aile RID-8:

Moleküler Sonuçlar

Benzer etkilenmiş anne ve oğluna ait DNA örnekleri, *TBX5* moleküler analizi için yurt dışına (*Laboratoire de Biochimie, Biologie Moleculaire, Hormonologie, Metabolisme-Nutrition, Oncologie, Centre de Biologie et Pathologie-CHRU 59037 Lille Cedex, Fransa*) gönderildi. *TBX5* geninde dizi analizi ve MLPA ile mutasyon saptanmadı. Olgularda ayırıcı tanıda yer alan Okihiro sendromu nedeniyle *SALL4* dizi analizi yapıldı ve heterozigot c.2484delG (p.Phe829Leu*fs**27) mutasyonu saptandı. Saptanan bu mutasyon, daha önce literatürde bildirilmemişti, ancak çerçeve kaymasına yol açan bir değişim olması nedeniyle patolojik olarak değerlendirildi. Anne ve oğlunda DRRS (Okihiro sendromu) tanısı kesinleşti.

Moleküler sonuçlar ışığında tekrar değerlendirilen olguların her ikisinde de *Duane* anomalisi saptandı (şekil 4.15). Ayrıca, her iki olguda saptanan dış kulak yolundaki darlık ve etkilenmiş oğuldaki (G2) anal stenoz bulgularının, DRRS ile uyumlu bulgular olduğu fark edildi. Olası renal anomaliler açısından yapılan renal US'lerinde patoloji saptanmadı.



Şekil 4.15. Aile RID-8. **(a).** Etkilenmiş olgunun (III-2) 1 yaşındaki yüz görüntüsü ve *Duane* anomalisi (sağ gözde laterale bakış felci, sol gözün kısılması), **(b).** etkilenmiş annede (II-4) benzer yüz görünümü ve *Duane* anomalisi, **(c).** annede bilateral radiyal hipoplaziye bağlı ön kollarda kısalık ve radiyal deviasyon, başparmaklarda hipo-/aplazi, **(d)** ve **(e).** etkilenmiş olgunun sol elinde *trifalangeal* başparmak benzeri 1. parmak ile 2. parmak arası total sindaktili, sol elinde başparmak agenezisi, **(f), (g) ve (h).** olgunun (III-2) 4 yaşındaki fotoğrafları, **(i).** olgunun (III-2) 4 yaş 3 aylıkken çekilen grafileri: sağda başparmak agenezisi, solda superpoze olmuş üç falanks yapısı izlenen 1. parmak ve 2. parmak izleniyor, **(j).** aile ağacı.

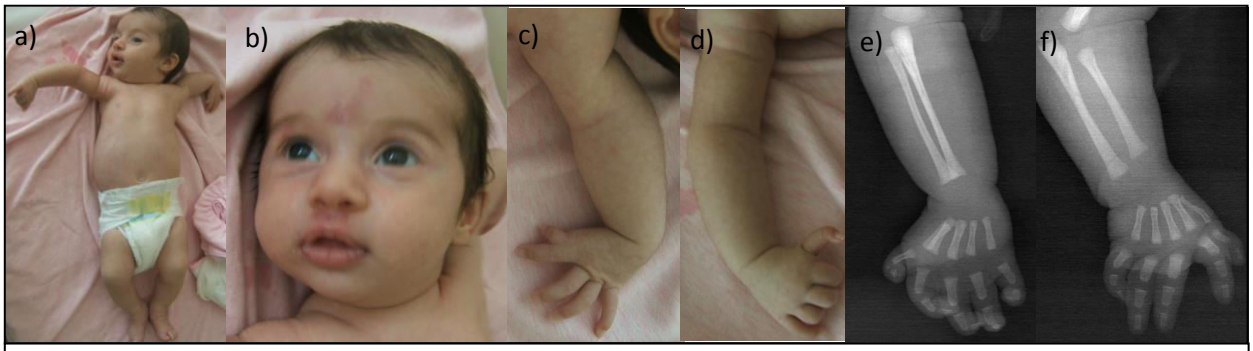
4.9.1. Aile RID-9:

Klinik Bulgular

Aralarında akrabalık bulunmayan anne ve babanın ilk gebeliklerinden doğan dişi olguda (G1 P1), 47 günlükken, radiyal ışın defektleri ve konjenital kalp anomalileri (ASD + VSD + PDA) saptanarak Holt-Oram sendromu ön tanısı ile genetik konsultasyon için gönderildi.

Aile öyküsünde benzer olgu/ek özellik tariflenmiyordu. Anne, gebeliğinin 20. haftasında düşük tehditi nedeniyle Mg^{++} kullanmış, ek sorun yaşanmamış. Olgu, 38^{+5} GH.'da makat geliş endikasyonlu sezaryenle 3360 gr (50-75 p) tartısında doğmuş. Postnatal adaptasyon sorunu yaşamayan olgunun, 3. gün emerken morarması olmuş ve EKO'sunda müsküler VSD, küçük sekundum ASD ve PDA bulguları saptanmış. Ek olarak üst ekstremite anomalileri (radiyal ışın defektleri) saptanan olgu, Holt-Oram sendromu ön tanısı ile genetik konsultasyon için gönderilmişti.

47 günlükken yapılan fizik muayenesinde, boy 53 cm (-0.04 SD), tartı 4590 g (0.90 SD), baş çevresi 37 cm (-0.08 SD) saptandı. Alında ve üst dudak orta hatta kapiller hemanjiyom, dar omuzlar, her iki el bileğinde radiyal deviasyon mevcuttu. Sağ el başparmak ince ve uzun (*trifalangeal başparmak*), sol el başparmak ileri derecede hipoplazik ve 2. parmağın radiyal kısmından çıkıyordu (şekil 4.16). Kardiyovasküler sistem muayenesinde 3/6 sistolik üfürüm saptandı. Göz teması ve takibi mevcuttu. Baş kontrolü henüz yoktu. Primitif refleksleri kronolojik yaşı ile uyumlu idi.



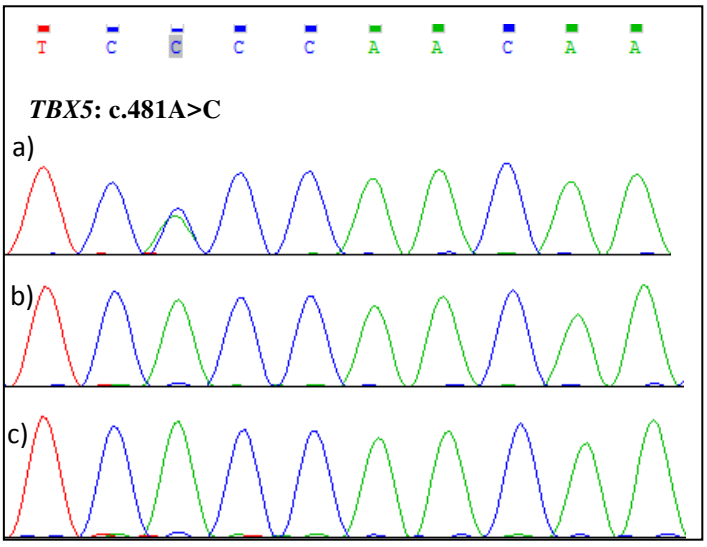
Şekil 4.16. Aile RID-9. **(a).** 47 günlük olguda bilateral radiyal deviasyon, **(b).** olgunun yüz görünümü, alında ve filtrum üzerinde kapiller hemanjiyomlar, **(c).** sol elinde radiyal deviasyon, hipoplastik ve 2. parmağın radiyal yüzeyinden çıkan başparmak, **(d).** sağ elde radiyal deviasiyon ve *trifalangeal* başparmak, **(e).** sağ el-ön kol grafisi; metakarpı, 2. metakarp ile superpoze olmuş hipoplastik *trifalangeal* başparmak, **(f).** sol el-ön kol grafisi; hipoplastik radius ve başparmağa ait metakarp ve falankslar.

4.9.2. Aile RID-9:

Moleküler Sonuçlar

İndeks olguda *TBX5* geninin (NM_000192.3; NP_000183.2) kodlayan bölgeleri, intron ve ekzon sınır bölgeleri Sanger yöntemiyle dizilendi ve ekzon 5'te daha önce literatürde tanımlanmamış heterozigot c.481A>C değişimi saptandı (şekil 4.17). Bağımsız örnek tekrarında aynı değişim gözlendi ve olası *taq* polimeraz hatası dışlandı. Anne ve babada yapılan analizde, bu değişimi taşımadıkları gösterildi.

TBX5 geninde saptanan c.481A>C değişimi, protein zincirinde, 160. kodondan kodlanan ''yüksüz polar hidroksil grubu'' olan treonini, ''nonpolar'' proline dönüştürmektedir (p.Thr160Pro). Değişimin oluştuğu bölge, *TBX5* geninin kodladığı *T-box transkripsiyon faktörünün,* transkripsiyonel regülasyonda önemli olan ve DNA bağlanma özelliği gösteren *T-box domaini'*nde yer almaktadır. Yanlış anlamlı değişimlerin patolojik olup olmadığını değerlendiren interaktif web tabanlı *Mutation Taster* programı, bu değişimin >% 99.9 patolojik bir mutasyon olduğu tahminini verdi. Bu nedenle, olguda saptanan c.481A>C değişimi, Holt-Oram sendromu ile ilişkili bir mutasyon olarak değerlendirildi.



Şekil 4.17. Aile RID-9, moleküler sonuçlar. **(a).** indeks olguda *TBX5* geninde c.481A>C heterozigot mutasyonuna ait elektroferogram görüntüsü, **(b).** Annede, aynı bölgenin normal dizisine ait elektroferogram görüntüsü, **(c).** Babada, aynı bölgenin normal dizisine ait elektroferogram görüntüsü.

4.10.1. Aile RID-10:

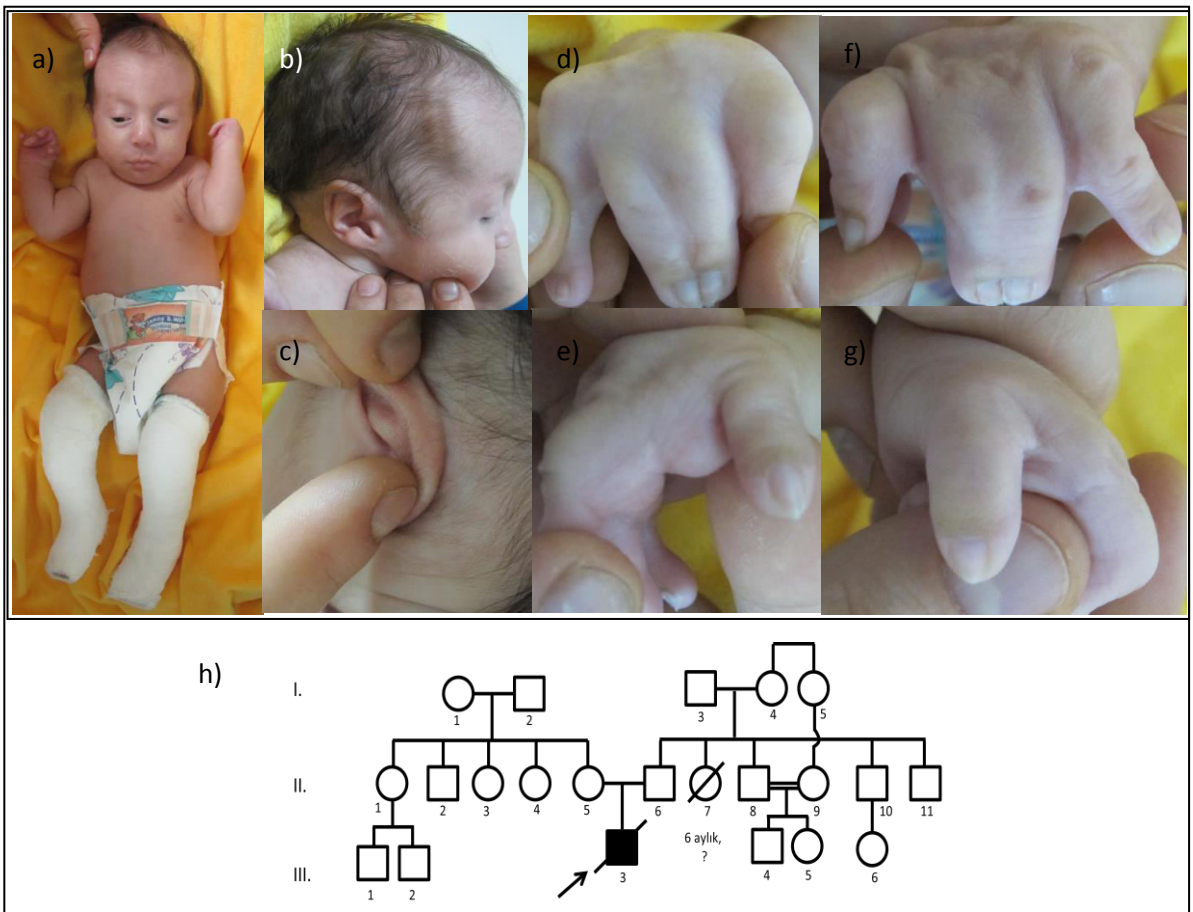
Klinik Bulgular

Aralarında akrabalık bulunmayan anne ve babanın ilk gebeliklerinden doğan erkek olgu (G1 P1), 1 aylıkken ekstremite anomalileri, şüpheli korpus kallozum agenezisi ve mikroretrognati bulguları nedeniyle polikliniğimizde değerlendirildi.

Aile öyküsünde benzer olgu tariflenmedi. Babanın bir kız kardeşi, 6 aylıkken bilinmeyen bir nedenle ölmüş (şekil 4.18). Antenatal US izlemi düzenli olarak yapılmış ve patoloji saptanmamış. Tarama testleri yapılmamış. Anne, gebeliğinin 14. haftasından doğuma kadar genital enfeksiyon nedeniyle adını hatırlamadığı bir antibiyotik ve Travazol krem (gebelik kategorisi C) kullanmış. Olgu, 39. GH'da fetal distres endikasyonlu sezaryen ile 2750 g tartı (10-25 p), 45 cm boy (<10 p, 34. GH ile uyumlu) ve 34,5 cm baş çevresi (75 p) ile doğmuş. Doğum sonrası göğüs deformitesi (pektus karinatum), el ve ayak parmaklarında yapışıklıklar (sindaktili), ve ayaklarının içe dönük olduğu fark edilmiş. Postnatal solunum sıkıntısı nedeniyle yoğun bakımda izleme alınan olgunun, kraniyal US'sinde şüpheli korpus kallozum agenezisi saptanmış ve emme refleksi yokmuş. Olgu, nazogastrik sonda vasıtasıyla anne sütü ve formül mama ile besleniyormuş.

Bir aylıkken fizik muayenesinde, boy 51 cm (-1.11 SD), tartı 3660 g (-1.09 SD), baş çevresi 37 cm (-0.64 SD) saptandı. Skafosefali, belirgin metopik sütür, sığ orbitalar, belirgin burun kökü ve tübüler burun yapısı, mikroretrognati, sekonder alveoler kemer, düşük ve geriye yerleşimli kulaklar mevcuttu. Ağlarken ağzını tam açamıyordu. Her iki kulak kepçesi deriye yapışıktı ve antiheliksler belirgindi. Solda aksesuar meme başı ve sternum orta hatta pektus karinatum deformitesi mevcuttu. Sağ elde 2-3. parmaklar arasında distal interfalangeal eklem çizgisine kadar uzayan parsiyel kutanöz sindaktili, 4-5. parmaklar arasında perdelenme, sağ el bileği unlar yüzeyinde gamzeleşme, başparmakta hipoplazi ve radiyal deviasyon, 1. ve 2. parmakta kamptodaktili mevcuttu. Sol elde 2-3. ve 4-5. parmaklar arasında proksimal interfalangeal eklem çizgisine kadar uzayan parsiyel kutanöz sindaktili ve 2. parmakta kamptodaktili mevcuttu. Her iki elde 3-4. parmaklar arasında total sindaktili, metakarpofalangeal eklemlerde ve sağ el bileğinde ekstansiyon kısıtlılığı saptandı. Bilateral pes ekinovarus nedeniyle her iki alt ekstremite ponseti alçısına alınmıştı. Her iki ayakta 3-4. parmaklar arasında total sindaktili izlendi (şekil 4.18). Sistemik muayenesinde hipotoni dışında ek bulgu saptanmadı. Batın US'de ek patoloji saptanmadı. Kraniyal US'de saptanan korpus kallozum agenezisi şüphesi nedeniyle kraniyal MRG önerildi, ancak olgunun MRG çekilemeden 2 yaşındayken öldüğü öğrenildi.

Olguda dismorfik bulgulara eşlik eden hipotoni ve ekstremite anomalileri nedeniyle ayırıcı tanıda kromozom anomalileri (trizomi 18) düşünüldü. Sitogenetik analiz amacıyla olgudan Na-heparinli periferik kan örneği alındı.



Şekil 4.18. Aile RID-10. İndeks olgu. **(a).** 1 aylık olgunun genel görünümü. **(b)** ve **(c).** düşük, geriye dönük ve deriye yapışık kulaklar, **(d).** sağ elde 3-4 arası total, 1-2 ve 4-5 arası parsiyel sindaktili, **(e).** hipoplastik ve radiyale deviye sağ el başparmağı, **(f).** sol elde 3-4 arası total, 1-2 ve 4-5 arası parsiyel sindaktili, **(g).** Hafif hipoplastik sol el başparmağı, **(h).** aile ağacı.

4.10.2. Aile RID-10:

Sitogenetik Sonuçlar

Olgunun periferik kanından yapılan sitogenetik analizde trizomi 18 saptandı (şekil 4.19).



Şekil 4.19. Aile RID-10. İndeks olgunun periferik kanından yapılan sitogenetik analizde trizomi 18 ile uyumlu karyotip görünütüsü.

4.11.1. Aile RID-11:

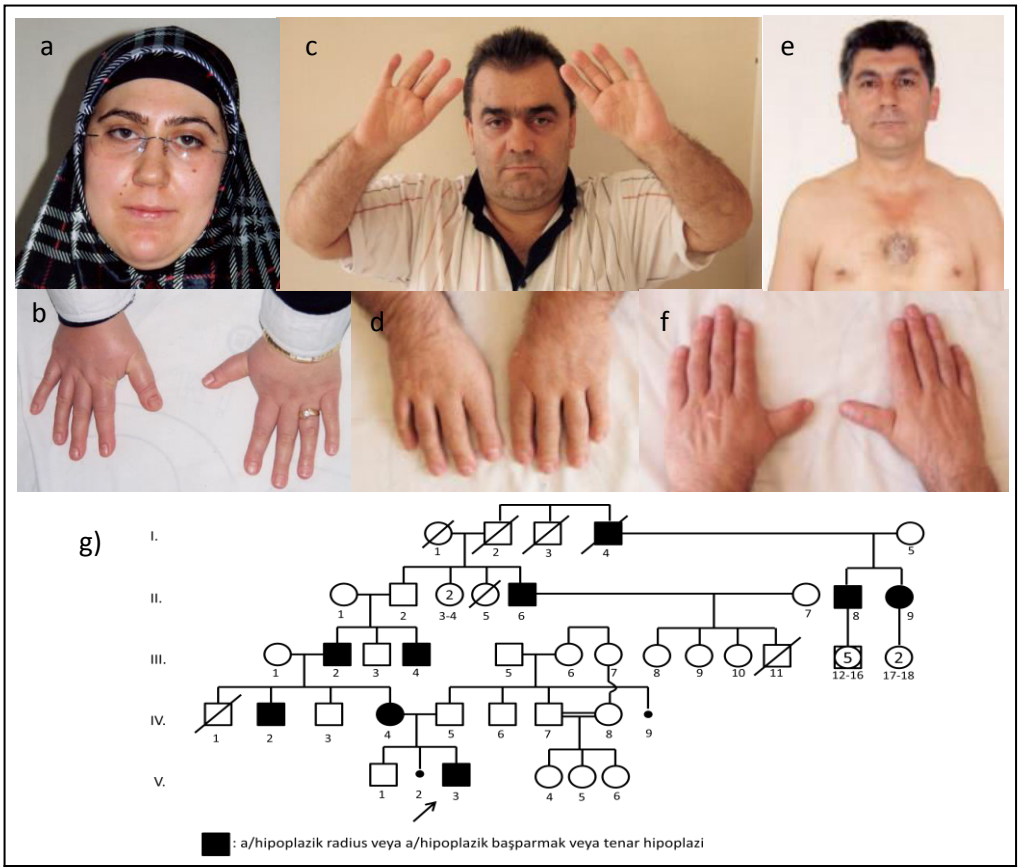
Klinik Bulgular

Aralarında akraba evliliği bulunmayan anne ve babanın dördüncü gebeliklerinden doğan, tenar hipoplazi ve konjenital kalp anomalisi olan dişi olgu (G4 P4), 30 yaşındayken gebeliğinin 28. haftasında, fetusun her iki ön kolunda tek kemik, sağ elinde başparmak agenezisi, 4 ve 5. parmaklarında sindaktili, her iki elinde ulnar deviasyon, kalbinde inlet tipi VSD, sağ ventrikül dominansı ve tek umbilikal arter bulguları saptanmış olması nedeniyle genetik danışma için başvurdu.

Dış merkezde, fetal sitogenetik analiz amacıyla 27. GH'da amniyosentez yapılmış ve sonuç bekleniyordu. Aile öyküsünde, olgunun, erkek kardeşinin benzer el bulgularının (tenar hipoplazi) olduğu, babasının ön kollarının kısa ve her iki elinde başparmağının olmadığı, amcasının başparmaklarının küçük olduğu, babasının amcasının ön kollarının kısa ve eğri olduğu (radiyal agenezi) bilgisine ulaşıldı (şekil 4.20). Fetusta mevcut ultrason bulguları ve aile öyküsünden elde edilen bilgiler ışığında, ekspresivite farklılığı ile giden ailevi Holt-Oram sendromu düşünüldü. Aile, gebeliğin sonlandırılması seçeneğini kabul etmedi. Doğan bebeğin (erkek), postnatal 12. günde öldüğü daha sonra öğrenildi. Ölü bebeğin postmortem muayenesi, aile getirmediği için yapılamadı.

30 yaşındaki gebe olgunun (şekil 4.20, IV-4) fizik muayenesinde boyu 168 cm, kulaç boyu 154 cm ölçüldü. Hafif hipotelorizm ve yüksek damak dışında fasiyal dismorfik bulgusu

yoktu. Bilateral kubitus valgus, her iki elde tenar hipoplazi ve hafif supinasyon kısıtlılığı saptandı. *Duane* anomalisi saptanmadı. Yedi yaşındayken konjenital kalp anomalisi (VSD?) nedeniyle opere olduğu öğrenilen olgunun EKO'sunda sol atriyal dilatasyon ve hafif triküspit yetmezlik, EKG'sinde nadir ekstrasistoller saptandı.



Şekil 4.20. Aile RID-11. **(a).** etkilenmiş anne (IV-4), **(b).** etkilenmiş annede bilateral tenar hipoplazi ve proksimal yerleşimli başparmaklar, **(c)** ve **(d).** etkilenmiş annenin babası (III-2), bilateral başparmak agenezisi, **(e)** ve **(f).** etkilenmiş annenin amcası (III-4), pektus ekskavatus ve bilateral hipoplastik el başparmakları, **(g).** aile ağacı.

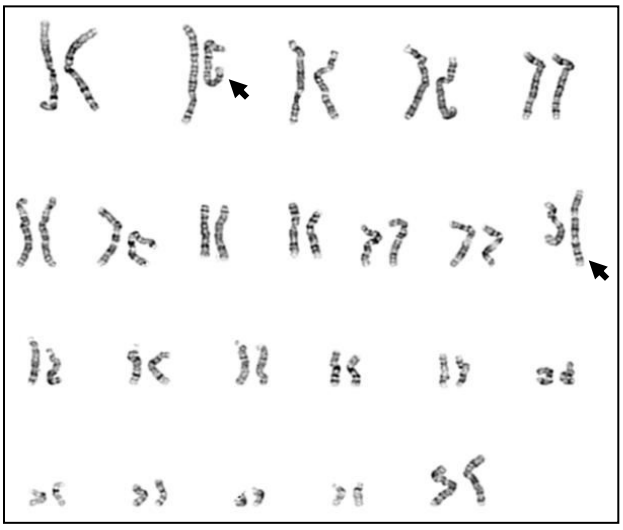
Etkilenmiş babanın (şekil 4.20, III-2) 51 yaşındaki fizik muayenesinde boyu 165 cm, kulaç boyu 141 cm ölçüldü. Bilateral ön kol supinasyonunda kısıtlılık ve el başparmaklarının olmadığı saptandı. Öyküsünden, el başparmaklarının çok küçük olduğu ve operasyonla alındığı bilgisine ulaşıldı (hipoplastik başparmaklar). Ek anomali saptanmadı.

Etkilenmiş amcanın (şekil 4.22, III-4) 45 yaşındaki fizik muayenesinde boyu 173 cm, kulaç boyu 159 cm ölçüldü. Bilateral proksimal yerleşimli ve hipoplastik el başparmakları, bilateral tenar hipoplazi, ön kol supinasyonunda minimal kısıtlılık ve pektus ekskavatus bulguları saptandı (şekil 4.20).

4.11.2. Aile RID-11:

Sitogenetik Sonuçlar

Dış merkezde, amniyotik sıvıda yapılan fetal kromozom analiz sonucu 46,XY,t(2;12)(q31;q24.3) olarak geldi. Translokasyona katılan kromozomlardan 12. kromozomun kırık noktası (12q24.3), *TBX5* geninin bulunduğu lokustan (12q24.21) geçmekteydi. Kırık noktasının, *TBX5* geninin yapısını bozarak Holt-Oram sendromu'na yol açabileceği düşünülerek etkilenmiş anne, sağlıklı baba ve sağlıklı erkek çocuklarından kromozom analizi yapıldı ve etkilenmiş annenin fetusta saptanan resiprokal translokasyonu taşıdığı (şekil 4.21), sağlıklı baba ve erkek kardeşin ise normal kromozom kuruluşuna sahip olduğu gösterildi. Etkilenmiş annede (şekil 4.20, IV-4) yapılan array-CGH analizinde herhangi bir kromozomal kopya sayısı değişikliği saptanmadı. Aile ağacı genişletildiğinde, ailede toplam 9 etkilenmiş olgu tariflendi. Bu olgulardan IV-4 ve V-3'te ek olarak kalp anomalileri mevcuttu.



Şekil 4.21. Aile RID-11.
Etkilenmiş anneye (IV-4) ait karyotip görüntüsü. 2 ve 12. kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon gözleniyor (oklar).

Tablo 4.2. Yeni Nesil Dizileme İle Mutasyon Saptanmayan Olgular

Olgu	Akrabalık	Ekstremite bulguları	Ek bulgular	Fasiyal dismorfik bulgular	YND öncesi tetkikler
RID-12 (5 yaş 8 aylık)	(-)	Bilateral trifalangeal başparmak, sağ elde preaksiyel polidaktili	Mikrosefali, VSD, hiperaktivite ve dikkat eksikliği, bilateral ezotropia, hipoplastik labium majuslar	Belirgin alın, bilateral epikantus, hipotelorizm, kısa burun, hipoplastik burun kanatları, dolgun yanaklar, sınırda düşük displastik kulaklar, katlantılı heliksler	Karyotip: 46,XX *TBX5* ve *SALL4* dizi: normal
RID-13 (7 günlük)	(-)	sağ elde fleksiyon kontraktürü ve başparmak agenezisi, sağ radiyal agenezi	ICSI gebelik ürünü DK-DA ikiz eşi, VSD, ASD, göreceli makrosefali (tartı ve boy: 25-50 p, baş çevresi: 90 p), at nalı böbrek	üçgen yüz, yüksek damak ve hafif mikrognati	Karyotip: 46,XY DEB testi: normal *TBX5* dizi: normal
RID-14 (3 günlük)	(-)	sağda hipoplastik el başparmağı ve dirsekte fleksiyon kontraktürü, solda başparmak ve radius agenezisi	annede gestasyonel diyabet nedeniyle insulin kullanım öyküsü, babada sağ başparmak distal falanks duplikasyonu, SGA doğum, ASD, VSD, serebellar atrofi, yenidoğan döneminde trombositopeni öyküsü (65000/µl)	hafif enoftalmi, belirgin burun kökü, hafif yüksek damak, gingival hipertrofi	Karyotip: 46,XX DEB testi: normal *TBX5* dizi: normal
RID-15 (11 günlük)	(-)	bilateral radiyal hipoplazi, ellerde radiyal deviasyon, başparmak agenezisi ve 2. parmaklarda kamptodaktili, 5. parmaklarda klinodaktili, solda proksimal radiyoulnar sinostoz	sekundum ASD	(-)	*TBX5* dizi: normal
RID-16 (48 günlük)	(-)	sol elde bifid başparmak	annede gestasyonel hipertansiyon ve gestasyonel diyabet (diyetle regüle) öyküsü, simetrik SGA doğum, sakral gamze (US normal)	(-)	Karyotip: 46,XX
RID-17 (4 günlük)	1.5° kuzen evliliği	solda radiyal agenezi ve hipoplastik, ele yumuşak dokuyla tutunan başparmak	perimembranöz VSD	(-)	Karyotip: 46,XY *TBX5* dizi: normal *SALL4* dizi: normal DEB testi: normal
RID-18 (7 aylık)	1° kuzen evliliği	sol elde başparmak agenezisi ve radiyal deviasyon, sol radiyal hipoplazi	KKH (midseptal VSD, geniş koroner sinüs, pulmoner ven dönüş anomalisi, geniş sol ventrikül), servikal hemivertebra, C6-7 ve D1-2 vertebra korpuslarında parsiyel füzyon, C3 korpusunda hipoplazi, iki adet 5x5 mm sütlü kahverengi lekeler	Brakisefali, fasiyal asimetri, belirgin metopik sütür, frontal ve oksipital bölgelerde sekonder saç düğümleri, alında ve ensede kapiller hemanjiyomlar, epikantus, yukarı çekik palpebral fissürler, basık burun kökü, sağ kulak tragusunda hipoplazi, sağda preauriküler deri uzantısı	Karyotip: 46,XY DEB testi: normal
RID-19 (2 yaş 7 aylık)	1° kuzen evliliği	proksimal yerleşimli el başparmakları, küçük eller, sağ ayakta 2-3. parmaklar arası parsiyel sindaktili	mikrosefali, sınırda büyüme geriliği, psikomotor gerilik	sinofiri, belirgin kirpikler, basık burun kökü, uzun filtrum, ince dudaklar, aşağı dönük ağız köşeleri, mikrognati, yüzde kıllanma artışı, kısa boyun	Karyotip: 46,XX

RID-20 (5 yaş)	(-)	sağ elde başparmak agenezisi, sol elde hipoplastik başparmak, her iki elde radiyal deviasyon	bilateral hidronefroz, sekundum ASD ve triküspit yetersizlik, sakral agenezi, L4-L5 vertebra füzyonu, tüm kemik yapılarda osteopenik görünüm	(-)	Karyotip: 46,XX DEB testi: normal *TBX5* dizi: normal *SALL4* dizi: normal
RID-21 (5 aylık)	1° kuzen evliliği	sağ elde hipoplastik başparmak ve 1-2 arası parsiyel sindaktili, sağ ön kolda supinasyon kısıtlılığı ve elde radiyal deviasyon, sol el başparmağında ulnar deviasyon	anterior ektopik ve stenotik anüs	bilateral epikantus, basık burun kökü, dolgun yanaklar	Karyotip: 46,XX *SALL1* dizi: normal.
RID-22 (9 aylık)	2,5° kuzen evliliği	sol üst ekstremitede kısalık ve radiyal agenezi, sol elde oligodaktili (3 parmak var) ve başparmak agenezisi (pollisizayon yapılmış)	ASD, periferik pulmoner stenoz, sakral gamze +babada düşük sol omuz, pektus ekskavatus ve ritim bozukluğu	epikantus, antevert burun delikleri, dolgun yanaklar	Karyotip: 46,XY *TBX5* dizi: normal.
RID-23 (3 yaş)	(-)	sağ elde hipoplastik başparmak ve tenar hipoplazi, sol el başparmakta ulnar deviasyon, her iki elde 2-3. parmaklar arası ayrık	VSD, kısa boyun, pektus karinatum, + kız kardeşinde benzer başparmak anomalisi	dolgun yanaklar, belirgin kulaklar, dar damak	*TBX5* dizi: normal
RID-24 (8 aylık)	(-)	sağ elde radiyal deviasyon, hipoplastik ve yumuşak doku ile ele tutunan başparmak, sağ ön kolda belirgin kısalık	VSD, kısa boyun, solda gelişimsel kalça displazisi, hafif skolyoz, T11'de hemivertebra, T4'de segmentasyon anomalisi, bilateral 14 adet kot	brakisefali, belirgin alın, bulböz burun ucu, basık burun kökü, hafif sinofiri	**Antenatal:** Karyotip: 46,XY Array-CGH: normal *TBX5* dizi: normal
RID-25 (7 aylık)	(-)	sağ dirsekte kısıtlı ekstansiyon, sol dirsekte ankiloz, bilateral el başparmak agenezisi ve 4-5. parmaklar arasında pasiyel sindaktili, sol ön kolda belirgin kısalık ve radiyal deviasyon, sol elde 3 parmak yapısı ve bifid sonlanan 1. parmak	belirgin mikrosefali ve büyüme geriliği, total yarık damak, glossopitozis, epilepsi, PFO, sağ renal agenezi, hipotoni, anterior ektopik anüs	brakisefali, bilateral propitozis, belirgin koronal sütürler, aşağı çekik palpebral fissürler, midfasiyal hipoplazi, hafif retrognati, protrüde üst dudak, küçük burun	Karyotip: 46,XX
RID-26 (1 yaş 9 aylık)	1° kuzen evliliği	hipoplastik ve ele yumuşak dokuyla bağlı sağ el başparmağı, hipoplastik ve ankiloze sol el başparmağı	sakral sinüs (US normal)	(-)	(-)
RID-27 (2 yaş 7 ay)	(-)	sol elde hipoplastik ve ankiloze başparmak ve tenar atrofi	solda enfeksiyon sonrası iletim tipi işitme kaybı (% 40-50), + babada mos 45,XY,der(13;15)(q10;q10)	(-)	Karyotip: 46,XX
RID-28 (10,5 aylık)	(-)	hipoplastik sol el başparmağı, uca doğru incelen parmaklar, proksimal yerleşimli sağ el 4. parmak	Fallot tetralojisi (opere), prenatal başlangıçlı büyüme geriliği, mikrosefali, psikomotor gerilik, kısa boyun	düz kaş kemerleri, dar palpebral fissürler, bilateral epikantus, hafif malar hipoplazi, hipoplastik ala naziler, dolgun yanaklar, mikrognati	Karyotip: 46,XX Array-CGH: .arr (1-22,X)x2 DEB testi: normal
RID-29 (5.5 aylık)	(-)	sol elde radiyal deviasyon, tenar atrofi, hipoplastik ve ankiloze başparmak	mikrosefali, sol lateral yarık dudak ve total yarık damak, sağda aksesuar meme başı	(-)	Karyotip: 46,XY

RID-30 (6 günlük)	(-)	her iki ön kolda tek kemik (radiyal agenezi), her iki elde 3 parmak (başparmak ve 5. parmak yok), ellerde ulnar deviasyon, kısa ön kollar	(-)	dolikosefali, hipertelorizm, yukarı çekik palpebral fissürler, geniş burun kökü, dolgun yanaklar, retromikrognati, kısa boyun	Karyotip: 46,XY *TBX5* dizi: normal.
RID-31 (23 günlük)	2° kuzen evliliği	her iki elde belirgin radiyal deviasyon ve ön kollarda kısalık (radiyal hipoplazi ve ulnar *bowing*), sağda proksimal yerleşimli başparmak, solda hipoplastik başparmak, dirseklerde hafif ekstansiyon kısıtlılığı	kutis marmoratus, VSD + PFO, sağ renal agenezi, ayrık meme başları, +annede, anneanne ve teyzede brakidaktili tip D.	belirgin alın, hafif bitemporal basıklık, belirgin burun kökü	Karyotip: 46,XY TBX5 dizi: normal.
RID-32 (4 aylık)	(-)	sağ ön kolda belirgin kısalık, sağ elde radiyal deviasyon (sağ radiyal agenezi), ele yumuşak doku ile tutunan hipoplastik sağ el başparmağı, sol elde proksimal yerleşimli ve radiyale deviye başparmak	PFO + ince PDA, sol hipokondriyak bölgede ve sol omuzda 1x1 cm hiperpigmente maküller, sakral sinüs (US normal), ayaklarda önde yerleşimli 2. parmaklar	seyrek kaşlar, hafif ince üst dudak, belirgin kulak lobülleri	Karyotip: 46,XY
RID-33 (10 aylık)	1° kuzen evliliği	her iki elde tenar atrofi, hipoplastik ve ankiloze başparmaklar	(ICSI gebelik ürünü), sağ aksiller hatta 1x1 cm sütlü kahverengi leke	belirgin alın, bilateral epikantus, dar ve hafif yukarı çekik palpebral fissürler, basık burun ucu	Karyotip: 46,XY
RID-34 (14 günlük)	(-)	sağ elde proksimal yerleşimli ankiloze başparmak, dirseklerde hafif ekstansiyon kısıtlılığı, sol ayak başparmağında kısalık, 4-5. ayak parmakları arasında parsiyel sindaktili	mikrosefali, bilateral yarık dudak ve total yarık damak, kısa boyun, anterior ektopik anüs; kraniyal MRG: semilobar holoprozensefali ile uyumlu bulgular	geriye eğimli alın, seyrek kaş ve kirpikler, epikantus inversus, kısa palpebral fissürler, hipertelorizm, basık burun kökü, geriye yerleşimli kulaklar	Karyotip: 46,XX Array-CGH: .arr (1-22,X)x2
RID-35 (13 aylık)	(-)	sağ elde radiyal deviasyon (radiyal hipoplazi) ve addukte başparmak	psikomotor gerilik, EKO: VSD + PFO, **servikal MR**: C2-3-4-5-6 vertebraları hipoplazik, belirgin skolyoz, C4-5 düzeyinde kelebek vertebra görünümü, spinal kordda C3-C7 arası kalınlık artışı, C4-C5 arası 12x3 mm boyutlarında lineer uzanım gösteren lipom ile uyumlu lezyon	üçgen yüz, epikantus, basık ve geniş burun kökü, belirgin kulaklar	Karyotip: 46,XY *TBX5* dizi: normal.
RID-36 (4,5 aylık)	1° kuzen	Uzun el parmakları , proksimal yerleşimli el başparmakları, uca doğru incelen el parmakları, bilateral radiyal hipoplazi, dirseklerde fleksiyon kontraktürü	(-)	Brakisefali, bilateral oryantal epikantus, yukarı çekik palpebral fissürler	*TBX5* dizi: normal. DEB testi: normal.
RID-37 (3,5 aylık)	(-)	Sağ elde başparmak agenezisi ve radiyal deviasyon (radial agenezi), 3-4. parmaklarda kamptodaktili, sol elde hafif radiyal deviasyon	EKO: Geniş VSD + PFO + hafif mitral darlık + pulmoner hipertansiyon, tüm yönlerde göz hareket kısıtlılığı (restriktif oftalmopleji), kalkan göğüs deformitesi	Derin yerleşimli gözler, yukarı çekik palpebral fissürler	*TBX5* dizi: normal *SALL4* dizi: normal

5. TARTIŞMA

Radiyal ışın defektleri, üst ekstremitelerin preaksiyel kısımlarını (radius, skafoid ve trapezium kemiği, başparmağa ait metakarp ve falanks yapıları) tutan gelişimsel defektlerle karakterizedir ve hafif başparmak hipoplazisinden, radius ve başparmağın yokluğuna kadar değişen ağırlıklarda gözlenebilmektedir (1). Üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalileri olan radiyal ışın defektleri, izole ya da sendromik olabilir. İzole radiyal ışın defektleri, olguların % 8- 30'unu oluşturmaktadır (212, 213). Radiyal ışın defektleri, çoğunlukla eşlik eden bir ya da daha fazla major anomali ile birlikte gözlenmekte, özellikle bilateral radiyal ışın defekti olan olgularda perinatal ölüm oranı % 35 gibi yüksek oranda olabilmektedir (5, 213).

Holt-Oram sendromu, Fanconi anemisi, TAR sendromu ve VACTERL birlikteliği, radiyal ışın defektlerinin gözlendiği ilk akla gelen ve en sık gözlenen sendromlardır (1). Bu sendromların ortak özelliği, radiyal ışın defektlerine ek olarak kardiyovasküler sistem, ürogenital sistem ve/veya hematolojik sistemin tutulmasıdır. VACTERL birlikteliğinde ek olarak vertebral anomaliler, anal anomaliler ve trakeoözofageal fistül de gözlenebilmektedir. Bunlar dışında radiyal ışın defektleri Okihiro sendromu, Roberts sendromu, Townes-Brocks sendromu, Cornelia de Lange sendromu, Nager sendromu, Baller-Gerold sendromu, RAPADILINO sendromu, Rothmund-Thomson sendromu ve Diamond-Blackfan anemisi gibi daha nadir tek gen sendromları ve trizomi 18 gibi kromozom anomalileri ile ilişkili olabilmektedir (5-7).

Radiyal ışın defektleri, erken embriyolojik süreçte (ilk 4 hafta) ekstremite tomurcuğundaki anterior-posterior eksenin (üst ekstremitede radiyal-ulnar eksen, alt ekstremitede tibial-fibular eksen) oluşumunda meydana gelen aksaklıklardan kaynaklanır (14). Bu süreçte rol alan SHH (*sonic hedgehog*), FGFs (*fibroblast growth factors*) ve kemik morfogenetik proteinler (BMPs) gibi moleküler aktörler birçok farklı gelişimsel süreçte de rol almaktadırlar. Bu da radiyal ışın defektleri ile birlikte başka major konjenital anomalilerin sık gözlenme nedenini açıklamaktadır (5).

Radiyal ışın defektlerinin yaklaşık üçte ikisinin sendromik olması ve sıklıkla kardiyolojik, hematolojik, ürogenital ve/veya sindirim sistemi anomalileri ile birlikte gözlenmesi (7) nedeniyle, bu olguların doğru klinik ve moleküler tanı alması, olguların izlemi açısından oldukça önemlidir. Örneğin; radiyal ışın defektleri ile ilişkili fenotipler arasında sık

gözlenen Fanconi anemisi, kemik iliği yetmezliği ve kanser riskinde artış gibi hayatı tehdit eden bulgularla seyretmekte, klinik ve genetik olarak heterojenite göstermektedir. Günümüzde, Fanconi anemisi ile ilişkilendirilmiş 17 gen (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCJ*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN*, *FANCO*, *FANCP*, *XRCC2*, *ERCC4*) bilinmektedir. *FANCA* geninde normal protein sentezinin hiç olmadığı olgularda aneminin, bir miktar anormal protein sentezinin olduğu olgulara göre daha erken yaşta ortaya çıktığı ve malignite riskinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (214). *FANCD1* olarak da bilinen *BRCA2* genindeki biallelik mutasyonların, erken yaşta ortaya çıkan akut lösemi ve solid tümörlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (215, 216). Bu örnekler, klinik tanının yanı sıra moleküler tanının da önemini vurgulamaktadır.

Radiyal ışın defektleri ile ilişkili birçok sendrom ortak klinik bulgular göstermekte ve bu durum özellikle antenatal dönemde saptanan radiyal ışın defektlerinde hasta yönetimi açısından zorluklara yol açabilmektedir. Bu nedenle, radiyal ışın defektleri ile ilişkili sendromların sıklıklarının ve moleküler etyopatogenezlerinin bilinmesi, prenatal ve postnatal olguların izlemi açısından önemlidir. Bu çalışmada, kliniğimizde 2004-2014 yılları arasında radiyal ışın defektleri ile takip edilen 37 aileden 48 olgu klinik, moleküler ve sitogenetik bulgular eşliğinde incelendi. İlişkili genlerin büyük ve çok sayıda olması ayrıca mutasyonların heterojen dağılımı moleküler genetik analizleri zorlaştırmakta ve maliyeti arttırmaktaydı. Bu nedenle moleküler analizleri hızlandırmak ve ekonomik açıdan uygun hale getirmek amacıyla yeni nesil dizileme teknolojisi için "radiyal ışın defekti sendromları" paneli oluşturuldu. Bu tez kapsamında hazırlanan panelin, ülkemizde radiyal ışın defektleri ve ilişkili sendromların tanısında etkinliğini, radiyal ışın defekti sendromları ile ilişkili gen/ler ve özgün mutasyon/ları araştırmak, ayrıca herhangi bir mutasyon saptanamayan olguların bir sonraki aşamada tüm ekzom dizileme çalışmaları için bankalanarak bir kohort oluşturulması bu tezin en önemli amaçlarıdır. Bu çalışmada mutasyon saptanan olgu ve ailelerinin özgün genetik danışma almaları, postnatal ve taşıyıcılık testlerinin yapılması ve prenatal tanı için zemin oluşturulması ise klinik izlemdeki en önemli katkı olacaktır.

Goldfarb ve ark., 1949-2005 yılları arasındaki hastane kayıtlarına dayalı yaptıkları bir çalışmada, radiyal ışın defekti olan 164 olguluk bir serideki olguların % 33'ünün izole, % 67'sinin ise eşlik eden ek anomaliler ile birlikte gözlendiğini bildirmişlerdir (212). *Koskimies ve ark*., 1993-2005 yılları arasında Finlandiya'daki 753,342 konjenital anomalili doğum kayıtlarını incelemişler ve üst ekstremite anomalisi olan 419 olgudan 138'inin radiyal ışın

defekti olduğunu ve bu olguların da 11 tanesinin (% 8) izole olduğunu bildirmişlerdir (213). *Stoll ve ark.* ise, Fransa'daki 1979-2004 yılları arasında 346,831 doğum kayıtlarını incelemiş ve 73 radiyal ışın defekti olan olgudan % 25'inin izole, % 75'inin ise ek malformasyonlarla birlikte gözlendiğini raporlandırmışlardır (6). Bizim olgu serimizde, 48 olgunun 2'si (% 4) izole (RID-26, RID-27), 46'sı (% 96) ise ek anomalilerle birlikte gözleniyordu. Bizim serimizdeki izole olguların oranının düşük olması, olgu serimizin genetik konsultasyon için gönderilen seçilmiş olgulardan oluşması, izole ve hafif radiyal ışın defekti olan olguların daha az oranda genetik konsultasyon için yönlendiriliyor olmasından kaynaklanabilir.

Koskimies ve ark., 138 olgudan 81'inde (% 59), *Goldfarb ve ark.*, 164 olgudan 81'inde (% 49), *Stoll ve ark.* ise, 73 olgudan 41'inde (% 56) bilateral radiyal ışın defekti olduğunu bildirmişlerdir (6, 212, 213). Ayrıca, bilateral radiyal ışın defekti olan olguların % 75'inde, unilateral radiyal ışın defekti olan olguların ise % 65'inde eşlik eden ek anomaliler saptamışlardır (212). Bizim olgu serimizde, 12 olguda (% 24) unilateral, 36 olguda (% 76) ise bilateral radiyal ışın defekti mevcuttu. Ayrıca unilateral radiyal ışın defekti olan 12 olgunun 11'inde (% 92), bilateral radiyal ışın defekti olan 36 olgunun 35'inde (% 97) ek anomaliler saptandı. Literatürle uyumlu olarak, bilateral radiyal ışın defekti olan olgularda ek anomali olasılığı, unilateral radiyal ışın defektlerine göre daha yüksekti. Ancak olgu sayımızın ve izole olguların az olmasının ek anomali eşlik etme oranlarının yüksek çıkmasına yol açtığı düşünüldü.

Olgu serimizdeki 37 aileden 2 si kromozom analizi ile, 4 ü ise özgün klinik tanının yönlendirmesi ile hedef genlerde yapılan moleküler analizlerle tanı almıştı. Geriye kalan 31 ailedeki indeks olgular radiyal ışın defekti sendromları için tasarladığımız yeni nesil dizileme paneli ile incelendi ve 5 aileden 5 olgu (% 16) moleküler tanı aldı. Bu olgulardan üçünde Fanconi anemisi ile ilişkili *FANCA* (n:2) ve *BRIP1* (n:1) genlerinde, bir olguda CdLS ile ilişkili *NIPBL* geninde ve bir olguda ise Roberts sendromu ile ilişkili *ESCO2* geninde mutasyon saptandı. Yeni nesil dizilemede mutasyon saptanan bu olguların klinik bulguları söz konusu sendromlar ile uyumlu idi.

Radiyal ışın defekti ile ilişkili genlerin büyük olması, bir sendromla ilişkili birden fazla gen olabilmesi ve radiyal ışın defekti ile ilişkili sendromların ortak klinik bulgular göstermesi nedeniyle klinik tanıda güçlükler yaşanabilmesi, bu olguların moleküler tanısında yeni nesil dizilemeyi avantajlı hale getirmektedir.

Roberts sendromu klinik ve sitogenetik bulgular ile nispeten kolaylıkla tanı konulabilir bir sendrom olup ilişkili bilinen tek geni *ESCO2* genidir ve 11 ekzondan oluşmaktadır. *ESCO2* geninin Sanger yöntemiyle dizilenmesi de doğru bir yaklaşım olabilirdi. Buna karşın CdLS ilişkili bugüne kadar beş gen tanımlanmıştır; *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *HDAC8* ve *RAD21*. Klasik CdLS olgularının yarısından fazlasında (~% 60) 47 ekzondan oluşan *NIPBL* genindeki heterozigot fonksiyon kaybettirici mutasyonların rol oynadığı gösterilmiştir (94, 95). Olgumuzda Sanger dizileme ile çalışılacak olsaydı araştırılacak ilk aday gen büyük bir gen olmasına karşın *NIPBL* geni olurdu. Ancak bu gende mutasyon saptanmaması durumunda CdLS ile ilişkili diğer 4 farklı genin de (*SMC1A*: 25 ekzon, *SMC3*: 29 ekzon, *RAD21*: 14 ekzon, *HDAC8*: 11 ekzon) incelenmesi gerekecekti ki bu da daha fazla iş gücü ve maliyet anlamına gelecekti. CdLS ile ilişkili beş genin eş zamanlı dizilenmesine olanak sağlayan yeni nesil dizlemenin, bu olguların tanısında Sanger yöntemine oranla daha etkin olduğu gösterilmiş oldu. Fanconi anemisi'nde ise ilişkili 17 büyük gen (toplam 308 ekzon) tanımlanmıştır (tablo 2-3). Fanconi anemili olgularda en sıklıkla *FANCA* geninde (~% 60) mutasyon saptanırken, olguların yalnızca % 2 sinde *BRIP1* geni mutasyonları bildirilmektedir (38). Klinik ve sitogenetik olarak (DEB testi) kesin tanı almış Fanconi anemili dört olgumuzun üçünde *FANCA* geninde mutasyon saptanırken birinde *BRIP1* geninde mutasyon saptanması yeni nesil dizilemenin etkinliğine iyi bir örnek oluşturmaktadır.

Shimamura&Alter (2010), Fanconi anemili olgularda en sıklıkla (% 60) *FANCA* geninde, buna karşın olguların sadece ~ % 2'sinde *BRIP1* (*FANCJ*) geninde mutasyon saptandığını bildirmiştir (38). Bizim çalışmamızda ise Fanconi anemisi kesin tanılı 4 ailenin 3'ünde (% 75) *FANCA* geninde mutasyon saptanırken 1 ailede (% 25) *BRIP1* geninde mutasyon saptandı. Bu çalışmadaki olgu sayısının azlığı nedeniyle ülkemizdeki Fanconi anemisi ile ilişkili genlerin sıklık sıralamasının verilmesi doğru bir çıkarım olamaz. Ancak, *BRIP1* geninde mutasyon saptanan ailede (RID-5) ebeveynler arasında akraba evliliğinin olmaması ve etkilenmiş olguda birleşik heterozigot mutasyon saptanması, *BRIP1* mutasyon taşıyıcılığının ülkemizde Avrupa populasyonlarına göre daha sık olabileceğini ve olgu sayısının artması ile ülkemizdeki Fanconi anemisi ile ilişkili genlerin sıralamasının değişebileceğini göstermektedir.

FANCA geninde mutasyon saptanan 2 farklı aileden (3 birey) birinde c.894-2A>G mutasyonu, diğerinde ise (iki kardeş) c.4261-2A>C homozigot mutasyonu saptandı. Her iki

mutasyon da *FANCA* geninde kırpılma hatasına yol açan ve daha önce Fanconi anemili olgularda bildirilmiş mutasyonlardı (208, 209, 211).

FANCA c.894-2A>G mutasyonu, ilk olarak *Levran ve ark.* (2005) tarafından DEB testi ile kesin tanı almış Fanconi anemili olgularda yaptıkları bir çalışmada gösterilmiş ve aile içi segregasyon çalışması ve hesaplanan kırpılma bölgesi skoru göz önünde bulundurularak kırpılma hatasına yol açan yeni bir mutasyon olarak değerlendirilmiştir (208). Ayrıca, *Xiong ve ark.* (2015) tarafından, kırpılma bölgesi değişimlerinin patolojik olup-olmadığını değerlendirmek üzere tasarlanan *in silico* analiz programı ile yapılan bir çalışmada, *FANCA* c.894-2A>C değişiminin kırpılma hatasına yol açan patolojik bir değişim olduğu tahmini elde edilmiştir (209). Ancak *FANCA* geninde saptanan bu değişimin patolojik olduğu, cDNA veya protein düzeyinde yapılan çalışmalarla gösterilmemiştir. Bizim çalışmamızda da Fanconi anemisi kesin tanılı iki farklı aileden (RID-1 ve RID-2) etkilenmiş olgularda *FANCA* genindeki bu değişimin homozigot formda, sağlıklı anne ve babalarında heterozigot formda saptanmış olması, c.894-2A>C değişiminin Fanconi anemisi ile ilişkili bir mutasyon olduğu bilgisini desteklemektedir.

Çalışmamızda, *FANCA* geninde saptanan ikinci mutasyon olan c.4261-2A>C mutasyonunun *FANCA* geninde 42. intronun kırpılmamasına yol açan patolojik bir değişim olduğu, cDNA düzeyinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (211). Aynı çalışmada, c.4261-2A>C mutasyonu saptanan aynı aileden etkilenmiş üç olgunun üçünde de hipoplastik el başparmakları; ikisinde mikrosefali, mental retardasyon ve işitme kaybı ve iki olguda da böbrek anomalisi (unilateral renal agenezi/pelvik ektopik böbrek) saptanmıştır. Ayrıca bu olgularda ortalama 8.5 yaşında kemik iliği yetmezliği ve iki olguda ise sırasıyla 26 ve 30 yaşlarında yassı hücreli deri kanseri gelişmiştir. Bizim çalışmamızda aynı mutasyonu taşıyan etkilenmiş iki kardeş (RID-6.1 ve RID-6.2; şekil 4.12, IV-2 ve IV-4) olguda ise klinik bulgular daha hafifti. Her iki olguda da başparmak anomalisi mevcuttu. Ancak böbrek anomalisi, mikrosefali, mental retardasyon ve işitme kaybı gibi bulgular yoktu. En son 19 yaş 6 aylık (RID-6.1) ve 13 yaş 8 aylıkken (RID-6.2) değerlendirilen iki olguda da belirgin bir transfüzyon ihtiyacı yoktu, kemik iliği naklini gerektirecek düzeyde kemik iliği yetmezliği ve malignite gelişmemişti. Ancak olgularımızın malignite açısından takip edilmesi gerekmektedir (211).

FANCA geninde protein ürününün hiç olmamasına yol açan homozigot *null* mutasyonların, anormal protein ürünlerine yol açan mutasyonlara kıyasla daha erken yaşta

anemi gelişmesine ve daha yüksek malignite insidansına neden olduğu gösterilmiştir (214). Bizim olgularımızda saptanan *FANCA* c.4261-2A>C mutasyonunun, kırpılma hatasına yol açarak anormal protein ürününün oluşmasına neden olduğu göz önünde bulundurulduğunda, daha hafif bir fenotipin gözlenmesi literatürle uyumlu bir bulgudur. Ancak bu mutasyon, literatürde sadece bir Arap ailesinden etkilenmiş üç olguda bildirilmiştir (211) ve bu nedenle, mutasyon özelinde genotip-fenotip korelasyonu yapmak için olgu sayısının yetersiz olduğunu düşünmekteyiz. Fanconi anemisi moleküler etyopatogenezi ve genotip-fenotip korelasyonu çalışmaları bu konuyu daha fazla aydınlatarak, hastaların prenatal ve postnatal yönetimlerine yardımcı olacaktır.

Fanconi anemisi ile ilişkili genlerden *BRIP1 (FANCJ)* (210, 217, 218) geninin önemli DNA tamir yolaklarından biri olan FA-yolağında yer aldığı ve monoubikuitine-FANCD2'nin BRCA1 ile etkileşimi için gerekli olan bir helikaz geni olduğu gösterilmiştir (52, 219). Biallelik mutasyonları Fanconi anemisi ile ilişkili olan *BRIP1*'in, monoallelik mutasyonlarının ise meme kanserine yatkınlık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (220).

BRIP1 mutasyonu taşıyan Fanconi anemili olgularda genellikle ağır fiziksel anomaliler gözlenmekte ve ortalama 4-5 yaşlarında kemik iliği yetmezliği gelişmektedir (217). Bazı olgularda ağır olmak üzere tüm olgularda büyüme geriliği ve radiyal ışın defektleri gözlenir ve birçok olguda ek olarak ürogenital anomaliler, kardiyovasküler anomaliler, hidrosefali, yarık damak, mikroftalmi, psikomotor gerilik ve iskelet anomalileri gibi ek bulgular gözlenir (217). Bizim çalışmamızda, *BRIP1* geninde birleşik heterozigot mutasyon saptadığımız olguda (RID-5), literatürdeki olgular ile uyumlu olarak ağır fiziksel anomaliler mevcuttu. Olgumuzda saptanan ağır büyüme geriliği, mikrosefali, bilateral radiyal ışın defekti, anal atrezi, at nalı böbrek ve hidrosefali gibi bulguların tamamı *BRIP1* ilişkili Fanconi anemili olgularda bildirilmişti (217).

Olgu RID-5'te, *BRIP1* geninde saptanan iki farklı heterozigot değişimden c.205+5G>T mutasyonu daha önce Fanconi anemisi ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmiştir (209, 210). Bu mutasyonun, kırpılma hatasına yol açarak, BRIP1'in helikaz motif I bölgesini kodlayan 3. ekzonunun delesyonuna yol açtığı, cDNA düzeyinde gösterilmiştir (210). Bu ailede saptanan c.761_764delAGCA değişimi ise daha önce literatürde bildirilmemiştir. Ancak bu değişimin, protein düzeyinde 254. kodonda lizin yerine arjinin gelmesine, çerçeve kaymasına ve 19. kodonun dur şifresi alarak protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (p.K254R*fs**19) patolojik bir değişim olarak değerlendirildi.

Cornelia de Lange sendromu klinik tanılı olgu RID-3'te saptanan *NIPBL* genindeki c. 6893G>A (p.Arg2298His) yanlış anlamlı mutasyonu, daha önce CdLS olgularında bildirilmiştir (95). *Gillis ve ark.* tarafından, 120 olguluk bir serinin 56'sında (% 47) *NIPBL* geninde mutasyon saptanmıştır (95). Aynı seride, iki farklı olguda saptanan c.6893G>A mutasyonu, korunmuş bir bölgede aminoasit değişikliğine yol açması, olguların sağlıklı ebeveynlerinde ve 150 olguluk kontrol grubunda saptanmaması nedeniyle patolojik olarak değerlendirilmiştir. Büyüme geriliği, mikrosefali, psikomotor gerilik, hirsutizm ve tipik fasiyal dismorfik bulguları nedeniyle klinik olarak CdLS tanısı alan olgumuzda da *NIPBL* geni c.6893G>A değişiminin sağlıklı anne ve babasında saptanmaması, bu değişimin CdLS ile ilişkili bir mutasyon olduğu görüşünü desteklemektedir. *NIPBL* geninde yanlış anlamlı mutasyon saptanan olgularda, diğer mutasyon tiplerine (çerçeve kayması, anlamsız veya kırpılma hatasına yol açan mutasyonlar) göre fenotipin daha hafif olduğu, özellikle ekstremite anomalileri ve psikomotor gerilik bulgularında bu farkın daha belirgin olduğu bildirilmiştir (95). Bizim olgumuzda da literatürle uyumlu olarak ekstremite anomalileri daha hafifti ve psikomotor gerilik orta düzeyde idi .

Mikrosefali, büyüme geriliği ve ekstremite anomalilerine eşlik eden fasiyal dismorfik bulguları (sinofiri, belirgin kirpikler, basık burun kökü, uzun filtrum, ince dudaklar, aşağı çekik ağız köşeleri ve mikrognati) nedeniyle Cornelia de Lange sendromu ön tanısı alan bir olgumuzda (RID-19) paneldeki CdLS ile ilişkili 5 gende de herhangi bir ekzonik mutasyon saptanmadı. 2013 ve 2014 yıllarında yayınlanan 2 çalışmada CdLS da somatik mozaisizme dikkat çekilmiş ve olguların % 23'ünde *NIPBL* geninde mozaik mutasyonlar gösterilmiştir (96, 97). Mutasyon gösterilemeyen olgumuzda (RID-19) mozaisizm olasılığı, derin intronik bölge/regülatör bölge mutasyonları veya CdLS ile ilişkili henüz tanımlanmamış yeni gen/ler olabiliceği göz ardı edilmemelidir.

Klinik olarak Roberts sendromu tanısı alan ve sitogenetik analizde erken sentromer ayrışması gösterilerek tanısı kesinleşen olguda (RID-4) yeni nesil dizileme ile *ESCO2* geninde homozigot c.1104_1105insA değişimi saptanmıştı. Bu değişim daha önce literatürde bildirilmemiştir. Değişim, peptid zincirinde 371. kodondaki treonin aminoasidinin yerine asparajinin gelmesine ve sonraki 32 kodonda çerçeve kaymasına (p. T371N*fs**32) neden olduğundan patolojik bir değişim olarak değerlendirildi. HGMD 2015 (Eylül) verilerine göre *ESCO2* geninde bugüne kadar Roberts sendromu/SC fokomeli ile ilişkili 28 farklı mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlardan 3 tanesi dur kodon, 2 tanesi yanlış anlamlı, 5 tanesi kırpılma

bölgesi, 17 tanesi çerçeve kayması, 1 tanesi ise tek aminoasit delesyonuna yol açan küçük delesyon/insersiyon mutasyonlarıdır. Bizim olgumuzda saptanan ve çerçeve kaymasına yol açan c.1104_1105insA mutasyonu da Roberts sendromu ile ilişkili yeni bir mutasyon olarak literatüre katkı sağlamıştır.

Roberts sendromunda genotip-fenotip korelasyonu yapılamamaktadır. *ESCO2* genindeki mutasyonların yeri ve/veya tipi ile klinik fenotip arasında bir bağlantı kurulamamakta hatta aynı ailede aynı mutasyonu taşıyan aile bireyleri arasında dahi belirgin klinik farklılıklar gözlenebilmektedir (107, 221). Bizim olgumuzda da *ESCO2* geninde homozigot çerçeve kaymasına yol açan bir mutasyon saptanmasına rağmen, klinik bulguları oldukça hafifti. Klinik tanı almasında ekstremite bulgularından çok fasiyal dismorfik bulguları yol gösterici oldu.

Nager sendromu klinik tanılı olgu RID-7'de, *SF3B4* geninde saptanan c.1147delC mutasyonu, protein düzeyinde 383. pozisyondaki histidin aminoasidinin yerine metyoninin gelmesine ve sonraki 75 aminoasidin değişmesine neden olan çerçeve kaymasına yol açmaktadır (p.H383M*fs**75). Bu mutasyon, daha önceki çalışmalarda Nager sendromu ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmiştir (170, 171). HGMD 2015 verilerine göre, *SF3B4* geninde Nager sendromu ile ilişkili 30 farklı mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonlardan altısı (% 20) dur kodon, ikisi yanlış anlamlı (% 7), üçü kırpılma bölgesi (% 10), 19 u (% 63) ise çerçeve kaymasına yol açan insersiyon/delesyon mutasyonlarıdır. Tanımlanan mutasyonların büyük bir kısmının olgumuzdaki gibi çerçeve kayması ya da anlamsız mutasyonlar olması nedeniyle, Nager sendromunun *SF3B4* genindeki haployetersizlikten kaynaklandığı bildirilmiştir (171).

SF3B4'ün, kemik morfojenik protein (BMP) reseptörü olan BMPR1A reseptörüne bağlanarak BMP ilişkili osteokondral farklılaşmayı inhibe ettiği, pre-mRNA'dan intronların kırpılması sürecinde rol alan *spliceosome* bileşenleriyle etkileşime girdiği ve dolayısıyla intronların kırpılma sürecinde rol aldığı gösterilmiştir (178, 180). Ayrıca *SF3B4*'ün farelerdeki homoloğu olan *msap49'*un konsepsiyondan sonraki 11. günde ekstremite ve somitlerde yoğun olarak ifade edildiği gösterilmiştir (183). Dolayısıyla, Nager sendromunda gözlenen anomalilerin, *SF3B4*'ün BMPR1A ile olan ilişkisinin bozulması ve gelişimin erken evrelerinde kraniyofasiyal dokularda ve ekstremitelerde kırpılma hataları nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir.

Nager sendromlu olgularda en sık gözlenen bulgular; aşağı çekik palpebral fissürler (% 95), mikrognati (% 96), işitme kaybı (% 95), displastik kulaklar (% 90), el başparmak anomalileri (% 100), radiyoulnar sinostoz (% 83) ve damak anomalileri (% 68) olarak bildirilmiştir (171). Bizim olgumuzda bu bulguların tamamı mevcuttu. Literatürde olgumuzdaki mutasyonu taşıyan iki olgudan birinde ek olarak konjenital diafragma hernisi ve mikrosefali mevcuttu ve SGA ile doğmuş ve doğumda da kaybedilmişti (170). İki yaşındayken tanı alan diğer olguda ise, ek olarak psikomotor gerilik saptanmıştı (171). Ayrıca, her iki olguda radius ve başparmak aplazilerini içeren daha ağır radiyal ışın defektleri mevcuttu. Bizim olgumuzun ise doğum boy, tartı ve baş çevresi normaldi. Radiyal ışın defektleri (hipoplastik ve ankiloze el başparmakları) daha hafifti. Ancak, iki buçuk aylık muayenesinde büyüme geriliği ve mikrosefali saptandı ve 5 aylıkken solunum yetmezliği nedeniyle öldü. Olgumuzda saptanan c.1147delC mutasyonunun daha ağır bir fenotiple ilişkili olabileceği düşünülebilir. Ancak olgu sayısının çok az olması göz önünde bulundurulduğunda bu konuda bir kanaate varmak güçtür ve yeni olgulara ihtiyaç vardır.

DRRS (*Duane-Radial Ray syndrome*, Okihiro sendromu), radiyal ışın defektleri ve *Duane* anomalisi ile karakterizedir ve Holt-Oram sendromunun ayırıcı tanıları arasında yer alır. Her iki sendromda da radiyal ışın defektlerine eşlik eden kalp anomalileri gözlenir. Ancak DRRS'de farklı olarak *Duane* anomalisi, ürogenital anomaliler ve nadiren gastrointestinal anomaliler (Hirschsprung hastalığı) de gözlenebilir. Çalışmamızda yer alan ailede (RID-8) etkilenmiş iki olgu (anne-oğul) için, önce Holt-Oram sendromu tanısı düşünülmüştü. *TBX5* geninde mutasyon saptanmayınca analiz edilen *SALL4* geninde etkilenmiş her iki olguda heterozigot c.2484delG (p.Phe829Leu*fs**27) mutasyonu saptanması üzerine olgular DRRS tanısını almıştı. Holt-Oram sendromu klinik ön tanısı alan ve *TBX5* geninde mutasyon saptanmayan bazı olgularda *SALL4* geninde mutasyon saptanması, bu sonuç üzerine tekrar değerlendirilen olguların çoğunda *Duane* anomalisi veya renal anomalilerin belirlenmesi ile tanının DRRS ile uyumlu bulunması moleküler analizlerin tanıdaki önemini göstermektedir (34, 118). Bizim olgularımız da, *SALL4* mutasyonu saptandıktan sonra tekrar değerlendirildiğinde her iki olgunun da DRRS ile uyumlu bulunması bu gözlemin doğruluğunu desteklemektedir. Bu nedenle, radiyal ışın defektleri ve/veya kalp anomalileri nedeniyle değerlendirilen olguların ayırıcı tanıları arasında Holt-Oram sendromu ile birlikte DRRS de yer almalı ve olgular mutlaka *Duane* anomalisi ve ürogenital anomaliler açısından değerlendirilmelidir.

Radiyal ışın defektleri ile ilişkili olarak en sık gözlenen sendrom Holt-Oram sendromudur (222). Holt-Oram sendromu için kesin tanı kriterleri; olguda veya aile öyküsünde kardiyak septal defektler (ASD, VSD) ve/veya kardiyak ileti defektlerine eşlik eden radiyal ışın defektleri olarak bildirilmiş ve bu tanı kriterlerini karşılayan olguların % 74'ünde *TBX5* geninde mutasyon saptanmıştır (29). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda *TBX5* geninde mutasyon saptama oranı % 22-35 arasında bulunmuştur (34, 223, 224). Bizim çalışmamızda da Holt-Oram sendromu kesin tanı kriterlerini karşılayan biri ailevi olmak üzere 7 olgudan (RID-9, RID-11, RID-15, RID-17, RID-22, RID-23 ve RID-37) ikisinde (~% 29) *TBX5* geni ile ilişkili mutasyon gösterilmesi literatür ile uyumlu idi. Bu iki aileden birinde (RID-9) *TBX5* geninde daha önce tanımlanmamış c.481A>C değişimi saptanırken, diğer olguda ise (ailevi, RID-11) *TBX5* lokusundan geçen (12q24) dengeli resiprokal bir translokasyon saptandı.

TBX5 geninde saptanan c.481A>C değişimi, protein zincirinde, 160. kodondan kodlanan ''yüksüz polar hidroksil grubu'' olan treonini, ''nonpolar'' proline dönüştürmektedir (p.Thr160Pro). *TBX5* geninde saptanan mutasyonların büyük çoğunluğu 55-237. aminoasitler arasında yer alan, ileri derecede korunmuş bir bölge olan ve DNA bağlanma özelliği gösteren *T-box* domaininde gözlenmektedir (224). Olgumuzda saptanan c.481A>C değişimi de bu bölgede bulunmaktadır. Ayrıca, yanlış anlamlı değişimlerin patolojik olup olmadığını değerlendiren interaktif web tabanlı *Mutation Taster* programına göre, bu değişim >% 99.9 patolojik bir mutasyon olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, olguda saptanan c.481A>C değişimi, Holt-Oram sendromu ile ilişkili yeni bir mutasyon olarak değerlendirilmiştir.

RID-11'de ise, etkilenmiş anne ve oğlunda, 2 ve 12. kromozomlar arasında kırık noktalarından biri *TBX5* lokusundan (12q24) geçen dengeli resiprokal bir translokasyon saptandı. Etkilenmiş diğer aile bireyleri kromozom analizini yapılmasına izin vermediğinden aile içi segregasyon gösterilemedi. Holt-Oram sendromlu olgularda 12q24 lokusundan geçen kromozomal yeniden düzenlenmeler ender de olsa bildirilmiştir ve sendrom-*TBX5* geni ilişkisi ilk kez, böyle bir translokasyon taşıyan olguda tanımlanmıştır (27, 33). Otozomal dominant ya da X'e bağlı kalıtımlı tek gen sendromlarında kromozomal yeniden düzenlenmeler ilişkili geni/leri henüz bilinmeyen sendromlarda genlerin lokasyonlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu tür kromozomal yeniden düzenlenmelerin genlerde disrüpsiyona yol açtığı düşünülmektedir. Bu bulgu, otozomal dominant hastalıklarda, ilişkili

gende mutasyon saptanamadığı durumlarda, olası kromozom anomalilerinin de akılda bulundurulması gerektiğini göstermiştir.

Holt-Oram sendromu tanı kriterlerini karşılayan olgularda *TBX5* geninde mutasyon saptama oranının literatürde ~% 22 ila %74 arasında geniş bir aralığa yayılması sendromun genetik heterojenitesini, sendrom ile ilişkili henüz olası tanımlanmamış yeni gen/genlerin varlığını düşündürmektedir. Literatürdeki % 74 ile en yüksek *TBX5* geninde mutasyon saptanan çalışmada klinik olgu seçim kriterlerinin belirgin oluşu ve incelenen olgu sayısının yüksek oluşu, diğer çalışmalarda ise olgu seçim kriterlerinin daha esnek tutulduğu dikkat çekmektedir. Olgu grubumuzdaki % 29 luk oran ise olgu sayısının azlığı ile ilişkili olabilir diye düşünmekteyiz. Gelecekte, *TBX5* geni mutasyon negatif olgularda, kırpılma hatasına yol açan derin intronik mutasyonların ve regülatör bölge mutasyonlarının araştırılması, tüm ekzom dizileme, tüm genom dizileme gibi daha ileri moleküler çalışmalarla yeni mutasyonların ve yeni genlerin belirlenmesinde çok önemli bir kaynak oluşturacaktır.

Radiyal ışın defektleri ile giden 14 farklı fenotip ile ilişkili 43 genin yeni nesil dizileme yöntemi ile analiz edildiği çalışmamızda, 26 olguda mutasyon saptanmadı (Tablo 4.2). Mutasyon saptanmayan olgular klinik bulgular açısından değerlendirildiğinde; 4 olgu (RID-13, RID-20, RID-24 ve RID-31) VACTERL birlikteliği ile uyumlu idi. VACTERL birlikteliği, vertebral anomaliler, anal atrezi, trakeo-özofageal fistül, renal anomaliler ve ekstremite anomalilerinin rastgele olmayan birliktelikleri ile karakterizedir. VACTERL tanısı için beş bulgudan en az üç tanesinin olması ve fenotipin başka sendromlarla uyumlu olmaması gerekir (225). *Hilger ve ark.* (2015), siliyopati ile ilişkili 25 aday genin hedefe yönelik yeni nesil dizilenmesi ile yaptıkları çalışmada, 4 olguda *ZIC3* geninde, 1 olguda ise *FOXF1* geninde mutasyon saptamış ve gelişimin erken evrelerinde fare embriyolarında yaptıkları çalışmalarla, VACTERL birlikteliğinde etkilenen organlarla uyumlu olarak presomitik mezoderm ve ekstremiteler, özofagus, trakea, vertebral, anal ve genital tüberkül dokularında *Zic3* ve *Foxf1*'in ifade edildiğini göstermişlerdir (226). Yeni nesil dizileme panelimizi tasarladığımız 2014 de bu iki gen bilinmediğinden panelde yer alamadı. Ancak, bir sonraki aşamada, olgu serimizde yer alan VACTERL birlikteliği ile uyumlu 4 olguda *ZIC3* ve *FOXF1* genleri de dizilenebilir. Bu iki gendeki mutasyonların VACTERL ile ilişkisi protein düzeyinde yapılacak çalışmalarla kesinlik kazandığında ise radiyal ışın defektleri ile giden sendromlar için tasarlanan gen panelimize *ZIC3* ve *FOXF1* genlerinin de eklenmesi, bu gruptaki olguların moleküler tanısına katkı sağlayabilir.

Olgu RID-18; radiyal ışın defektlerine eşlik eden konjenital kalp anomalileri, vertebral anomaliler, fasiyal asimetri ve preauriküler deri uzantısı bulguları ile klinik olarak okülo-aurikülo-vertebral spektrum (hemifasiyal mikrozomi, Goldenhar sendromu, OMIM %164210) fenotipi ile uyumlu bulundu. Goldenhar sendromu ile ilişkili bir gen henüz tanımlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında incelenen genlerde olgumuzda da herhangi bir mutasyon ne yazık ki saptanamadı.

Radiyal ışın defektlerine eşlik eden ek malformasyonların gözlendiği 13 olgumuzda ise özgün klinik tanımız yoktu ve yeni nesil dizileme panelinde mutasyon saptanmadı.

Özetle, çalışmamızda yer alan 37 aileden etkilenmiş 48 olgu klinik ve moleküler/sitogenetik bulgular eşliğinde değerlendirildiğinde; 37 aileden 11 ailede klinik tanı, laboratuvar bulguları (moleküler/sitogenetik) ile desteklendi (tablo 4.1). Bu 11 aileden 6 olgu Fanconi anemisi, 2 olgu Holt-Oram sendromu, 2 olgu Okihiro sendromu, 1 olgu Cornelia de Lange sendromu, 1 olgu Roberts sendromu, 1 olgu Nager sendromu ve 1 olgu trizomi 18 tanısı aldı. Bu olgular içerisinde, daha önce moleküler/sitogenetik tanı almamış olan 5 aileden 5 indeks olgu, radiyal ışın defektleri ile giden sendromlar için tasarladığımız yeni nesil dizileme paneli ile moleküler tanı aldı. Mutasyon saptanmayan 26 indeks olgu klinik bulguları ile değerlendirildiğinde; 5 olgu (RID-15, RID-17, RID-22, RID-23 ve RID-37) Holt-Oram sendromu ile, 4 olgu (RID-13, RID-20, RID-24 ve RID-31) VACTERL birlikteliği ile, 1 olgu Goldenhar sendromu ile, 1 olgu ise CdLS ile uyumluydu. İki olgu (RID-26, RID-27) ise izole radiyal ışın defekti olarak değerlendirildi. Klinik olarak bilinen sendromlarla uyumlu olmayan radiyal ışın defektli diğer 13 olguda moleküler analizlerde de herhangi bir mutasyon saptanmadığından bilinen gen mutasyonları dışlanmış oldu. Olgu serimizde radiyal ışın defektleri ile giden sendromlar içerisinde en sık olarak Holt-Oram sendromu, Fanconi anemisi ve VACTERL birlikteliği gözlenmekteydi. Mutasyon saptanmayan olgular, radiyal ışın defektleri ile giden sendromlarla ilişkili yeni genlerin araştırılacağı ileri moleküler projeler için değerli bir kohort oluşturdu.

6. KAYNAKLAR

1. Kozin SH. Upper-extremity congenital anomalies. The Journal of Bone & Joint Surgery. 2003;85(8):1564-76.
2. Giele H, Giele C, Bower C, Allison M. The incidence and epidemiology of congenital upper limb anomalies: a total population study. The Journal of hand surgery. 2001;26(4):628-34.
3. Gold NB, Westgate MN, Holmes LB. Anatomic and etiological classification of congenital limb deficiencies. American Journal of Medical Genetics Part A. 2011;155(6):1225-35.
4. Carli D, Fairplay T, Ferrari P, Sartini S, Lando M, Garagnani L, et al. Genetic basis of congenital upper limb anomalies: analysis of 487 cases of a specialized clinic. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology. 2013;97(12):798-805.
5. Pakkasjärvi N, Koskimies E, Ritvanen A, Nietosvaara Y, Mäkitie O. Characteristics and associated anomalies in radial ray deficiencies in Finland—A population-based study. American Journal of Medical Genetics Part A. 2013;161(2):261-7.
6. Stoll C, Dott B, Alembik Y, Roth M. Associated malformations among infants with radial ray deficiency. Genetic counseling (Geneva, Switzerland). 2012;24(2):223-34.
7. de Graaff E, Kozin SH. Genetics of radial deficiencies. The Journal of Bone & Joint Surgery. 2009;91(Supplement 4):81-6.
8. Linder JM, Pincus DJ, Panthaki Z, Thaller SR. Congenital anomalies of the hand: an overview. Journal of Craniofacial Surgery. 2009;20(4):999-1004.
9. Dobyns J, Doyle J, Von Gillern T, Cowen N. Congenital anomalies of the upper extremity. Hand clinics. 1989;5(3):321-42; discussion 39-40.
10. Daluiski A, Soyun EY, Lyons KM. The molecular control of upper extremity development: implications for congenital hand anomalies. The Journal of hand surgery. 2001;26(1):8-22.
11. Smithells RW. Defects and disabilities of thalidomide children. BMJ. 1973;1(5848):269-72.
12. Gallant GG, Bora F. Congenital deformities of the upper extremity. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1996;4(3):162-71.
13. Schmidt CC, Neufeld SK. Ulnar ray deficiency. Hand clinics. 1998;14(1):65-76.
14. Lyons K, Ezaki M. Molecular regulation of limb growth. The Journal of Bone & Joint Surgery. 2009;91(Supplement 4):47-52.
15. Jacob J, Hacker A, Guthrie S. Mechanisms and molecules in motor neuron specification and axon pathfinding. Bioessays. 2001;23(7):582-95.
16. Tickle C. Patterning systems—from one end of the limb to the other. Developmental cell. 2003;4(4):449-58.
17. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(14):5062-7.
18. Dahn RD, Fallon JF. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. Science. 2000;289(5478):438-41.
19. Elek C, Vitéz M, Czeizel E. [Holt-Oram syndrome]. Orvosi hetilap. 1991;132(2):73-4, 7-8.
20. STEttN AM. Skeletal manifestations of the Holt-Oram syndrome. Radiology. 1970;94:45-53.
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). New England Journal of Medicine. 1994;330(13):885-91.
22. Sletten LJ, Pierpont MEM. Variation in severity of cardiac disease in Holt-Oram syndrome. American journal of medical genetics. 1996;65(2):128-32.
23. Shono S, Higa K, Kumano K, Dan K. Holt-Oram syndrome. British journal of anaesthesia. 1998;80(6):856-7.
24. Sinha R, Nema D. Rare cardiac defect in Holt-Oram syndrome: case report: online article. Cardiovascular journal of Africa. 2012;23(2):e3-e4.
25. Thal S, Boyella R, Arsanjani R, Thai H, Juneman E, Movahed MR, et al. Unusual Combination of Holt-Oram Syndrome and Persistent Left Superior Vena Cava. Congenital heart disease. 2012;7(4):E46-E9.

26. Chryssostomidis G, Kanakis M, Fotiadou V, Laskari C, Kousi T, Apostolidis C, et al. Diversity of congenital cardiac defects and skeletal deformities associated with the Holt–Oram syndrome. International journal of surgery case reports. 2014;5(7):389-92.
27. Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. Nature genetics. 1997;15(1):21-9.
28. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soults J, et al. Mutations in human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. Nature genetics. 1997;15(1):30-5.
29. 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. Pediatric research. 2005;58(5):981-6.
30. Fan C, Liu M, Wang Q. Functional analysis of TBX5 missense mutations associated with Holt-Oram syndrome. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(10):8780-5.
31. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. Cell. 2001;106(6):709-21.
32. Vaughan CJ, Basson CT. Molecular determinants of atrial and ventricular septal defects and patent ductus arteriosus. American journal of medical genetics. 2000;97(4):304-9.
33. Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, et al. Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt–Oram syndrome mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999;96(6):2919-24.
34. Brassington A-ME, Sung SS, Toydemir RM, Le T, Roeder AD, Rutherford AE, et al. Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype. The American Journal of Human Genetics. 2003;73(1):74-85.
35. Swift M. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. Nature. 1971;230(5293):370-3.
36. Eiler M, Frohnmayer D, Frohnmayer L, Larsen K, Olsen J. Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. Eugene, OR: Fanconi Anemia Research Fund. Inc. 2008;32:33-46.
37. Landmann E, Bluetters-Sawatzki R, Schindler D, Gortner L. Fanconi anemia in a neonate with pancytopenia. The Journal of pediatrics. 2004;145(1):125-7.
38. Shimamura A, Alter BP. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. Blood reviews. 2010;24(3):101-22.
39. Alter BP. Cancer in Fanconi anemia, 1927–2001. Cancer. 2003;97(2):425-40.
40. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. Blood. 2003;101(3):822-6.
41. 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.
42. Deviren A, Yalman N, Hacihanefioglu S. Differential diagnosis of Fanconi anemia by nitrogen mustard and diepoxybutane. Annals of hematology. 2003;82(4):223-7.
43. Esmer C, Sánchez S, Ramos S, Molina B, Frias S, Carnevale A. DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes. American Journal of Medical Genetics Part A. 2004;124(1):35-9.
44. Shimamura A, de Oca RM, Svenson JL, Haining N, Moreau LA, Nathan DG, et al. A novel diagnostic screen for defects in the Fanconi anemia pathway. Blood. 2002;100(13):4649-54.
45. 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. Molecular cell. 2007;25(3):331-43.
46. 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. The EMBO journal. 2007;26(8):2104-14.
47. Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. Blood. 2006;107(11):4223-33.
48. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER, 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.

49. Gari K, Décaillet C, Stasiak AZ, Stasiak A, Constantinou A. The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks. Molecular cell. 2008;29(1):141-8.
50. Kim JM, Kee Y, Gurtan A, D'Andrea AD. Cell cycle–dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. Blood. 2008;111(10):5215-22.
51. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thomä NH, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. Science. 2002;297(5588):1837-48.
52. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. Cell. 2001;105(1):149-60.
53. Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, de Vries Y, Rooimans MA, Sheng Q, et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. Nature genetics. 2007;39(2):159-61.
54. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. Nature genetics. 2007;39(2):165-7.
55. Cohn MA, Kowal P, Yang K, Haas W, Huang TT, Gygi SP, et al. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. Molecular cell. 2007;28(5):786-97.
56. Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD, et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. Molecular cell. 2005;17(3):331-9.
57. Howlett NG, Harney JA, Rego MA, Kolling FW, Glover TW. Functional interaction between the Fanconi Anemia D2 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) via a conserved putative PCNA interaction motif. Journal of Biological Chemistry. 2009;284(42):28935-42.
58. Kim Y, Lach FP, Desetty R, Hanenberg H, Auerbach AD, Smogorzewska A. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. Nature genetics. 2011;43(2):142-6.
59. Stoepker C, Hain K, Schuster B, Hilhorst-Hofstee Y, Rooimans MA, Steltenpool J, et al. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. Nature genetics. 2011;43(2):138-41.
60. Ciccia A, McDonald N, West SC. Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. Annu Rev Biochem. 2008;77:259-87.
61. Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, et al. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. Cell. 2009;138(1):78-89.
62. MacMillan ML, Wagner JE. Haematopoeitic cell transplantation for Fanconi anaemia–when and how? British journal of haematology. 2010;149(1):14-21.
63. Goldfarb CA, Wustrack R, Pratt JA, Mender A, Manske PR. Thumb function and appearance in thrombocytopenia: absent radius syndrome. The Journal of hand surgery. 2007;32(2):157-61.
64. Anyane-Yeboa K, Jaramillo S, Nagel C, Grebin B, Opitz JM, Reynolds JF. Tetraphocomelia in the syndrome of thrombocytopenia with absent radii (TAR syndrome). American journal of medical genetics. 1985;20(4):571-6.
65. Hedberg VA, Lipton JM. Thrombocytopenia with Absent Radii: A Review of 100 Cases. Journal of Pediatric Hematology/Oncology. 1988;10(1):51-64.
66. Greenhalgh K, Howell R, Bottani A, Ancliff P, Brunner H, Verschuuren-Bemelmans C, et al. Thrombocytopenia-absent radius syndrome: a clinical genetic study. Journal of medical genetics. 2002;39(12):876-81.
67. Ahmad R, Pope S. Association of Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser Syndrome with Thrombocytopenia Absent Radii syndrome: A rare presentation. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2008;139(2):257-8.
68. Griesinger G, Dafopoulos K, Schultze-Mosgau A, Schroder A, Felberbaum R, Diedrich K. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome associated with thrombocytopenia-absent radius syndrome. Fertility and sterility. 2005;83(2):452-4.

69. Klopocki E, Schulze H, Strauß G, Ott C-E, Hall J, Trotier F, et al. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia–absent radius syndrome. The American Journal of Human Genetics. 2007;80(2):232-40.
70. 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. Nature genetics. 2012;44(4):435-9.
71. Roignant J-Y, Treisman JE. Exon junction complex subunits are required to splice Drosophila MAP kinase, a large heterochromatic gene. Cell. 2010;143(2):238-50.
72. Perkins A, Mercer J, Jenkins N, Copeland N. Patterns of Evi-1 expression in embryonic and adult tissues suggest that Evi-1 plays an important regulatory role in mouse development. Development. 1991;111(2):479-87.
73. Murray N, Howarth L, McCloy M, Letsky E, Roberts I. Platelet transfusion in the management of severe thrombocytopenia in neonatal intensive care unit patients. Transfusion medicine. 2002;12(1):35-41.
74. Christensen RD, Carroll PD, Josephson CD. Evidence-based advances in transfusion practice in neonatal intensive care units. Neonatology. 2014;106(3):245-53.
75. McLaurin TM, Bukrey CD, Lovett RJ, Mochel DM. Management of thrombocytopenia-absent radius (TAR) syndrome. Journal of Pediatric Orthopaedics. 1999;19(3):289-96.
76. Kline AD, Grados M, Sponseller P, Levy HP, Blagowidow N, Schoedel C, et al., editors. Natural history of aging in Cornelia de Lange syndrome. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics; 2007: Wiley Online Library.
77. Sataloff RT, Spiegel JR, Hawkshaw M, Epstein JM, Jackson L. Cornelia de Lange syndrome: otolaryngologic manifestations. Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery. 1990;116(9):1044-6.
78. Jackson L, Kline A, Barr M, Koch SD. de Lange syndrome: a clinical review of 310 individuals. American journal of medical genetics. 1993;47(7):940-6.
79. Braddock SR, Lachman RS, Stoppenhagen CC, Carey JC, Ireland M, Moeschler JB, et al. Radiological features in Brachmann-de Lange syndrome. American journal of medical genetics. 1993;47(7):1006-13.
80. Bruner J, Hsia Y. Prenatal findings in brachmann-de lange syndrome. Obstetrics & Gynecology. 1990;76(5):966-8.
81. Kliewer MA, Kahler SG, Hertzberg BS, Bowie JD. Fetal biometry in the Brachmann-de Lange syndrome. American journal of medical genetics. 1993;47(7):1035-41.
82. Kousseff BG, Thomson-Meares J, Newkirk P, Root AW. Physical growth in Brachmann-de Lange syndrome. American journal of medical genetics. 1993;47(7):1050-2.
83. Kline AD, Barr M, Jackson LG. Growth manifestations in the Brachmann-de Lange syndrome. American journal of medical genetics. 1993;47(7):1042-9.
84. Saal HM, Samango-Sprouse CA, Rodnan LA, Rosenbaum KN, Custer DA. Brachmann-de Lange syndrome with normal IQ. American journal of medical genetics. 1993;47(7):995-8.
85. Kline AD, Stanley C, Belevich J, Brodsky K, Barr M, Jackson LG. Developmental data on individuals with the Brachmann-de Lange syndrome. American journal of medical genetics. 1993;47(7):1053-8.
86. Halal F, Preus M, Herrmann J. The hand profile in de Lange syndrome: Diagnostic criteria. American journal of medical genetics. 1979;3(4):317-23.
87. Kline AD, Krantz ID, Sommer A, Kliewer M, Jackson LG, FitzPatrick DR, et al. Cornelia de Lange syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. American journal of medical genetics part A. 2007;143(12):1287-96.
88. Tsukahara M, Okamoto N, Ohashi H, Kuwajima K, Kondo I, Sugie H, et al. Brachmann-de Lange syndrome and congenital heart disease. American journal of medical genetics. 1998;75(4):441-2.
89. Mehta AV, Ambalavanan SK. Occurrence of congenital heart disease in children with Brachmann-de Lange syndrome. American journal of medical genetics. 1997;71(4):434-5.
90. Levin AV, Seidman D, Nelson L, Jackson L. Ophthalmologic findings in the Cornelia de Lange syndrome. Journal of pediatric ophthalmology and strabismus. 1989;27(2):94-102.

91. NICHOLSON DH, GOLDBERG MF. Ocular abnormalities in the de Lange syndrome. Archives of ophthalmology. 1966;76(2):214-20.
92. Milot J, Demay F. Ocular anomalies in de Lange syndrome. American journal of ophthalmology. 1972;74(3):394-9.
93. Schrier SA, Sherer I, Deardorff MA, Clark D, Audette L, Gillis L, et al. Causes of death and autopsy findings in a large study cohort of individuals with Cornelia de Lange syndrome and review of the literature. American Journal of Medical Genetics Part A. 2011;155(12):3007-24.
94. Krantz ID, McCallum J, DeScipio C, Kaur M, Gillis LA, Yaeger D, et al. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of Drosophila melanogaster Nipped-B. Nature genetics. 2004;36(6):631-5.
95. Gillis LA, McCallum J, Kaur M, DeScipio C, Yaeger D, Mariani A, et al. NIPBL mutational analysis in 120 individuals with Cornelia de Lange syndrome and evaluation of genotype-phenotype correlations. The American Journal of Human Genetics. 2004;75(4):610-23.
96. Huisman SA, Redeker EJ, Maas SM, Mannens MM, Hennekam RC. High rate of mosaicism in individuals with Cornelia de Lange syndrome. Journal of medical genetics. 2013;50(5):339-44.
97. Baquero-Montoya C, Gil-Rodríguez M, Braunholz D, Teresa-Rodrigo M, Obieglo C, Gener B, et al. Somatic mosaicism in a Cornelia de Lange syndrome patient with NIPBL mutation identified by different next generation sequencing approaches. Clinical genetics. 2014;86(6):595-7.
98. Ansari M, Poke G, Ferry Q, Williamson K, Aldridge R, Meynert AM, et al. Genetic heterogeneity in Cornelia de Lange syndrome (CdLS) and CdLS-like phenotypes with observed and predicted levels of mosaicism. Journal of medical genetics. 2014:jmedgenet-2014-102573.
99. Dorsett D. Cohesin: genomic insights into controlling gene transcription and development. Current opinion in genetics & development. 2011;21(2):199-206.
100. Nasmyth K, Haering CH. Cohesin: its roles and mechanisms. Annual review of genetics. 2009;43:525-58.
101. Ciosk R, Shirayama M, Shevchenko A, Tanaka T, Toth A, Shevchenko A, et al. Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. Molecular cell. 2000;5(2):243-54.
102. Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. Nature. 1999;400(6739):37-42.
103. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, et al. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. Nature. 2008;451(7180):796-801.
104. Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. Nature. 2012;489(7415):313-7.
105. Zuin J, Franke V, van IJcken WF, Van Der Sloot A, Krantz ID, van der Reijden MI, et al. A cohesin-independent role for NIPBL at promoters provides insights in CdLS. 2014.
106. Nolen LD, Boyle S, Ansari M, Pritchard E, Bickmore WA. Regional chromatin decompaction in Cornelia de Lange syndrome associated with NIPBL disruption can be uncoupled from cohesin and CTCF. Human molecular genetics. 2013;22(20):4180-93.
107. Gordillo M, Vega H, Jabs EW. Roberts syndrome. 2013.
108. Van Den Berg DJ, Francke U. Roberts syndrome: a review of 100 cases and a new rating system for severity. American journal of medical genetics. 1993 Nov 15;47(7):1104-23. PubMed PMID: 8291532.
109. 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. Journal of medical genetics. 2010 Jan;47(1):30-7. PubMed PMID: 19574259.
110. Ahmed AA, Imrie S, Duncan R, Tolmie J. Roberts syndrome: facial dysmorphology in a mildly affected case. Clinical dysmorphology. 2009 Oct;18(4):236-7. PubMed PMID: 19707122.
111. Concolino D, Sperli D, Cinti R, Strisciuglio P, Andria G. A mild form of Roberts/SC phocomelia syndrome with asymmetrical reduction of the upper limbs. Clinical genetics. 1996 May;49(5):274-6. PubMed PMID: 8832138.

112. Holden KR, Jabs EW, Sponseller PD. Roberts/pseudothalidomide syndrome and normal intelligence: approaches to diagnosis and management. Developmental medicine and child neurology. 1992 Jun;34(6):534-9. PubMed PMID: 1612213.
113. German J. Roberts' syndrome. I. Cytological evidence for a disturbance in chromatid pairing. Clinical genetics. 1979 Dec;16(6):441-7. PubMed PMID: 527250.
114. Zergollern L, Hitrec V. Four siblings with Robert's syndrome. Clinical genetics. 1982 Jan;21(1):1-6. PubMed PMID: 7067161.
115. 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. Nature genetics. 2005;37(5):468-70.
116. Ben-Shahar TR, Heeger S, Lehane C, East P, Flynn H, Skehel M, et al. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. Science. 2008;321(5888):563-6.
117. Kong X, Ball AR, Jr., Sonoda E, Feng J, Takeda S, Fukagawa T, et al. Cohesin associates with spindle poles in a mitosis-specific manner and functions in spindle assembly in vertebrate cells. Molecular biology of the cell. 2009 Mar;20(5):1289-301. PubMed PMID: 19116315. Pubmed Central PMCID: 2649254.
118. Kohlhase J, Schubert L, Liebers M, Rauch A, Becker K, Mohammed S, et al. Mutations at the SALL4 locus on chromosome 20 result in a range of clinically overlapping phenotypes, including Okihiro syndrome, Holt-Oram syndrome, acro-renal-ocular syndrome, and patients previously reported to represent thalidomide embryopathy. Journal of medical genetics. 2003;40(7):473-8.
119. Hotchkiss MG, Miller NR, Clark AW, Green WR. Bilateral Duane's retraction syndrome. A clinical-pathologic case report. Archives of ophthalmology. 1980 May;98(5):870-4. PubMed PMID: 7378011.
120. Halal F, Homsy M, Perreault G. Acro-renal-ocular syndrome: Autosomal dominant thumb hypoplasia, renal ectopia, and eye defect. American journal of medical genetics. 1984;17(4):753-62.
121. Arias S, Penchaszadeh VB, Pinto-Cisternas J, Larrauri S, 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.
122. Czeizel A, Goblyos P, Kodaj I. IVIC syndrome: report of a third family. American journal of medical genetics. 1989 Jun;33(2):282-3. PubMed PMID: 2764039.
123. Elcioglu N, Berry AC. Monozygotic twins discordant for the oculo-oto-radial syndrome (IVIC syndrome). Genetic counseling. 1997;8(3):201-6. PubMed PMID: 9327262.
124. 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.
125. Paradisi I, Arias S. IVIC syndrome is caused by a c. 2607delA mutation in the SALL4 locus. American Journal of Medical Genetics Part A. 2007;143(4):326-32.
126. Kohlhase J, Heinrich M, Schubert L, Liebers M, Kispert A, Laccone F, et al. Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. Human molecular genetics. 2002;11(23):2979-87.
127. Tanimura N, Saito M, Ebisuya M, Nishida E, Ishikawa F. Stemness-related factor Sall4 interacts with transcription factors Oct-3/4 and Sox2 and occupies Oct-Sox elements in mouse embryonic stem cells. Journal of Biological Chemistry. 2013;288(7):5027-38.
128. Yang J, Chai L, Fowles TC, Alipio Z, Xu D, Fink LM, et al. Genome-wide analysis reveals Sall4 to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105(50):19756-61.
129. Townes PL, Brocks ER. Hereditary syndrome of imperforate anus with hand, foot, and ear anomalies. The Journal of pediatrics. 1972;81(2):321-6.
130. Martinez-Frias M, Bermejo SE, Arroyo CI, Pérez FJ, Pardo RM, Burón ME, et al. [The Townes-Brocks syndrome in Spain: the epidemiological aspects in a consecutive series of cases]. Anales espanoles de pediatria. 1999;50(1):57-60.
131. 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. Human mutation. 2007;28(2):204-5.

132. 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. Human mutation. 2005;26(3):282-.
133. Surka WS, Kohlhase J, Neunert CE, Schneider DS, Proud VK. Unique family with Townes-Brocks syndrome, SALL1 mutation, and cardiac defects*. American journal of medical genetics. 2001;102(3):250-7.
134. Engels S, KOHLHASE J, McGaughran J. ASALL1 mutation causes a branchio-oto-renal syndrome-like phenotype. Journal of medical genetics. 2000;37(6):458-60.
135. Keegan CE, Mulliken JB, Wu B-L, 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. Genetics In Medicine. 2001;3(4):310-3.
136. Netzer C, Bohlander SK, Hinzke M, Chen Y, Kohlhase J. Defining the heterochromatin localization and repression domains of SALL1. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2006;1762(3):386-91.
137. 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. Human molecular genetics. 2003;12(17):2221-7.
138. Sweetman D, Smith T, Farrell ER, Chantry A, Münsterberg A. The Conserved Glutamine-rich Region of Chick Csal1 and Csal3 Mediates Protein Interactions with Other Spalt Family Members IMPLICATIONS FOR TOWNES-BROCKS SYNDROME. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(8):6560-6.
139. Blanck C, KOHLHASE J, Engels S, Burfeind P, ENGEL W, BOTTANI A, et al. Three novel SALL1 mutations extend the mutational spectrum in Townes-Brocks syndrome. Journal of medical genetics. 2000;37(4):303-7.
140. Farrell ER, Münsterberg AE. csal1 is controlled by a combination of FGF and Wnt signals in developing limb buds. Developmental biology. 2000;225(2):447-58.
141. Harvey SA, Logan MP. sall4 acts downstream of tbx5 and is required for pectoral fin outgrowth. Development. 2006;133(6):1165-73.
142. 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. Biochemical and biophysical research communications. 2004;319(1):103-13.
143. Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Bird TD, Dolan CR, Fong C-T, et al. Baller-Gerold Syndrome. 2011.
144. Galea P, Tolmie JL. Normal growth and development in a child with Baller-Gerold syndrome (craniosynostosis and radial aplasia). Journal of medical genetics. 1990 Dec;27(12):784-7. PubMed PMID: 2074565. Pubmed Central PMCID: 1017284.
145. Dallapiccola B, Zelante L, Mingarelli R, Pellegrino M, Bertozzi V. Baller-Gerold syndrome: case report and clinical and radiological review. American journal of medical genetics. 1992 Feb 1;42(3):365-8. PubMed PMID: 1536180.
146. Pagon R, Adam M, Ardinger H, Bird T, Dolan C, Fong C, et al. Baller-Gerold Syndrome--GeneReviews (®).
147. Debeljak M, Zver A, Jazbec J. A patient with Baller-Gerold syndrome and midline NK/T lymphoma. American journal of medical genetics Part A. 2009 Feb 15;149A(4):755-9. PubMed PMID: 19291770.
148. 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 : EJHG. 2009 Feb;17(2):151-8. PubMed PMID: 18716613. Pubmed Central PMCID: 2986053.
149. Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-thomson syndrome. Orphanet J Rare Dis. 2010;5(2).
150. Larizza L, Roversi G, Verloes A. Clinical utility gene card for: Rothmund-Thomson syndrome. European journal of human genetics: EJHG. 2013;21(7).
151. Pagon R, Adam M, Ardinger H, Bird T, Dolan C, Fong C, et al. Rothmund-Thomson Syndrome--GeneReviews (®).

152. Haytaç MC, Öztunç H, Mete UÖ, Kaya M. Rothmund-Thomson syndrome: a case report. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2002;94(4):479-84.
153. Kraus BS, Gottlieb MA, Meliton HR. The dentition in Rothmund's syndrome. The Journal of the American Dental Association. 1970;81(4):894-915.
154. 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. American Journal of Roentgenology. 2008;191(2):W62-W6.
155. 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. American journal of medical genetics. 2001;102(1):11-7.
156. Howell SM, Bray DW. Amelanotic melanoma in a patient with Rothmund-Thomson syndrome. Archives of dermatology. 2008;144(3):416-7.
157. Stinco G, Governatori G, Mattighello P, Patrone P. Multiple cutaneous neoplasms in a patient with Rothmund–Thomson syndrome: case report and published work review. The Journal of dermatology. 2008;35(3):154-61.
158. Kitao S, Shimamoto A, Goto M, Miller RW, Smithson WA, Lindor NM, et al. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. Nature genetics. 1999;22(1):82-4.
159. 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. Journal of the National Cancer Institute. 2003;95(9):669-74.
160. 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.
161. Siitonen HA, Kopra O, Kääriäinen H, Haravuori H, Winter RM, Säämänen A-M, et al. Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases. Human molecular genetics. 2003;12(21):2837-44.
162. Van Maldergem L, Siitonen HA, Jalkh N, Chouery E, De Roy M, Delague V, et al. Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. Journal of medical genetics. 2006;43(2):148-52.
163. Bachrati CZ, Hickson ID. RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. Chromosoma. 2008;117(3):219-33.
164. Ouyang KJ, Woo LL, Ellis NA. Homologous recombination and maintenance of genome integrity: cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. Mechanisms of ageing and development. 2008;129(7):425-40.
165. Macris MA, Krejci L, Bussen W, Shimamoto A, Sung P. Biochemical characterization of the RECQ4 protein, mutated in Rothmund-Thomson syndrome. DNA repair. 2006;5(2):172-80.
166. Sengupta S, Shimamoto A, Koshiji M, Pedeux R, Rusin M, Spillare EA, et al. Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase. Oncogene. 2005;24(10):1738-48.
167. Woo LL, Futami K, Shimamoto A, Furuichi Y, Frank KM. The Rothmund-Thomson gene product RECQL4 localizes to the nucleolus in response to oxidative stress. Experimental cell research. 2006;312(17):3443-57.
168. Werner SR, Prahalad AK, Yang J, Hock JM. RECQL4-deficient cells are hypersensitive to oxidative stress/damage: Insights for osteosarcoma prevalence and heterogeneity in Rothmund-Thomson syndrome. Biochemical and biophysical research communications. 2006;345(1):403-9.
169. Wieczorek D. Human facial dysostoses. Clinical genetics. 2013;83(6):499-510.
170. Czeschik J, Voigt C, Alanay Y, Albrecht B, Avci S, Fitzpatrick D, et al. Clinical and mutation data in 12 patients with the clinical diagnosis of Nager syndrome. Human genetics. 2013;132(8):885-98.
171. 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.
172. Friedman RA, Wood E, Pransky SM, Seid AB, Kearns DB. Nager acrofacial dysostosis: management of a difficult airway. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 1996;35(1):69-72.

173. Groeper K, Johnson JO, Braddock SR, Tobias JD. Anaesthetic implications of Nager syndrome. Pediatric Anesthesia. 2002;12(4):365-8.
174. Chemke J, Mogilner BM, Ben-Itzhak I, Zurkowski L, Ophir D. Autosomal recessive inheritance of Nager acrofacial dysostosis. Journal of medical genetics. 1988;25(4):230-2.
175. Nur BG, Bernier FP, Oztekin O, Kardelen F, Kalay S, Parboosingh JS, et al. Possible autosomal recessive inheritance in an infant with acrofacial dysostosis similar to Nager syndrome. American Journal of Medical Genetics Part A. 2013;161(9):2311-5.
176. Petit F, Escande F, Jourdain A, Porchet N, Amiel J, Doray B, et al. Nager syndrome: confirmation of SF3B4 haploinsufficiency as the major cause. Clinical genetics. 2014;86(3):246-51.
177. Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011;3(7):a003707.
178. Lehalle D, Wieczorek D, Zechi-Ceide RM, Passos-Bueno M, Lyonnet S, Amiel J, et al. A review of craniofacial disorders caused by spliceosomal defects. Clinical genetics. 2015.
179. Mordes D, Luo X, Kar A, Kuo D, Xu L, Fushimi K, et al. Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. Molecular vision. 2006;12:1259.
180. Igel H, Wells S, Perriman R, Ares M. Conservation of structure and subunit interactions in yeast homologues of splicing factor 3b (SF3b) subunits. Rna. 1998;4(1):1-10.
181. Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Sourlis C, Wowro S, Weimann M, et al. Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. Molecular cell. 2012;45(4):567-80.
182. Watanabe H, Shionyu M, Kimura T, Kimata K, Watanabe H. Splicing factor 3b subunit 4 binds BMPR-IA and inhibits osteochondral cell differentiation. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(28):20728-38.
183. Ruiz-Lozano P, Doevendans P, Brown A, Gruber PJ, Chien KR. Developmental expression of the murine spliceosome-associated protein mSAP49. Developmental dynamics. 1997;208(4):482-90.
184. Guion-Almeida M, Kokitsu-Nakata N, Richieri-Costa A. Mental and growth retardation, microtrigonocephaly, cleft palate and preauricular skin tags: a variant of the C syndrome or a new autosomal recessive syndrome. Braz J Dysmorphol Speech Hear Dis. 2000;3:25-9.
185. Lines MA, Huang L, Schwartzentruber J, Douglas SL, Lynch DC, Beaulieu C, et al. Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. The American Journal of Human Genetics. 2012;90(2):369-77.
186. Frazer LN, Nancollis V, O'Keefe RT. The role of Snu114p during pre-mRNA splicing. Biochemical Society transactions. 2008 Jun;36(Pt 3):551-3. PubMed PMID: 18482006.
187. Vlachos A, Ball S, Dahl N, Alter BP, Sheth S, Ramenghi U, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. British journal of haematology. 2008;142(6):859-76.
188. Dianzani I, Garelli E, Ramenghi U. Diamond-Blackfan Anaemia. Paediatric drugs. 2000;2(5):345-55.
189. Bagby GC, Lipton JM, Sloand EM, Schiffer CA. Marrow failure. ASH Education Program Book. 2004;2004(1):318-36.
190. Vlachos A, Muir E. How I treat Diamond-Blackfan anemia. Blood. 2010;116(19):3715-23.
191. Nakhoul H, Ke J, Zhou X, Liao W, Zeng SX, Lu H. Ribosomopathies: Mechanisms of Disease. Clinical Medicine Insights: Blood Disorders. 2014;7:7.
192. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Dianzani I, Ball S, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. Nature genetics. 1999;21(2):169-75.
193. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, Thiru P, Vergilio J-A, Beggs AH, et al. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. The Journal of clinical investigation. 2012;122(7):2439.
194. Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. Blood. 2011;117(9):2567-76.
195. 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.

196. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. Nature genetics. 2004;36(6):647-52.
197. Green MC. Luxoid—a new hereditary leg and foot abnormality in the house mouse. Journal of Heredity. 1955;46(3):91-9.
198. 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.
199. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1977;74(12):5463-7.
200. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. 1986.
201. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, et al. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science. 1987;238(4825):336-41.
202. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. Annual review of analytical chemistry. 2013;6:287-303.
203. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. BioMed Research International. 2012;2012.
204. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. Journal of Investigative Dermatology. 2013;133(8):e11.
205. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. Molecular ecology resources. 2011;11(5):759-69.
206. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC genomics. 2012;13(1):341.
207. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature. 2011;475(7356):348-52.
208. Levran O, Diotti R, Pujara K, Batish SD, Hanenberg H, Auerbach AD. Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. Human mutation. 2005;25(2):142-9.
209. Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, et al. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. Science. 2015;347(6218):1254806.
210. 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. Nature genetics. 2005;37(9):934-5.
211. Tamary H, Dgany O, Toledano H, Shalev Z, Krasnov T, Shalmon L, et al. Molecular characterization of three novel Fanconi anemia mutations in Israeli Arabs. European journal of haematology. 2004;72(5):330-5.
212. 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.
213. Koskimies E, Lindfors N, Gissler M, Peltonen J, Nietosvaara Y. Congenital upper limb deficiencies and associated malformations in Finland: a population-based study. The Journal of hand surgery. 2011;36(6):1058-65.
214. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. Blood. 2000;96(13):4064-70.
215. Wagner JE, Tolar J, Levran O, Scholl T, Deffenbaugh A, Satagopan J, et al. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. Blood. 2004;103(8):3226-9.
216. Hirsch B, Shimamura A, Moreau L, Baldinger S, Hag-alshiekh M, Bostrom B, et al. Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous chromosomal instability and solid tumors of childhood. Blood. 2004;103(7):2554-9.

217. Levran O, Attwooll C, Henry RT, Milton KL, Neveling K, Rio P, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. Nature genetics. 2005;37(9):931-3.
218. Litman R, Peng M, Jin Z, Zhang F, Zhang J, Powell S, et al. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCJ. Cancer cell. 2005;8(3):255-65.
219. 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.
220. 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. Nature genetics. 2006;38(11):1239-41.
221. Schüle B, Oviedo A, Johnston K, Pai S, Francke U. Inactivating mutations in ESCO2 cause SC phocomelia and Roberts syndrome: no phenotype-genotype correlation. The American Journal of Human Genetics. 2005;77(6):1117-28.
222. Barisic I, Boban L, Greenlees R, Garne E, Wellesley D, Calzolari E, et al. Holt Oram syndrome: a registry-based study in Europe. Orphanet journal of rare diseases. 2014;9(1):156.
223. Cross SJ, CHING Y-H, Li QY, ARMSTRONG-BUISSERET L, SPRANGER S, LYONNET S, et al. The mutation spectrum in Holt-Oram syndrome. Journal of medical genetics. 2000;37(10):785-7.
224. Heinritz W, Moschik A, Kujat A, Spranger S, Heilbronner H, Demuth S, et al. Identification of new mutations in the TBX5 gene in patients with Holt-Oram syndrome. Heart. 2005;91(3):383-4.
225. Solomon BD, Baker LA, Bear KA, Cunningham BK, Giampietro PF, Hadigan C, et al. An approach to the identification of anomalies and etiologies in neonates with identified or suspected VACTERL (Vertebral Defects, Anal Atresia, Tracheo-Esophageal fistula with Esophageal Atresia, Cardiac Anomalies, Renal Anomalies, and Limb Anomalies) Association. The Journal of pediatrics. 2014;164(3):451-7. e1.
226. Hilger AC, Halbritter J, Pennimpede T, Ven A, Sarma G, Braun DA, et al. Targeted Resequencing of 29 Candidate Genes and Mouse Expression Studies Implicate ZIC3 and FOXF1 in Human VATER/VACTERL Association. Human mutation. 2015.

7. EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

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

Sayı : 1939 **Tarih : 25.12.2014**

Konu : Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER

Sayın Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi :Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 05/12/2014 gün ve 368 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr.Şahin AVCI'nın yürüteceği 2014/1881 dosya numaralı "Radiyal Işın Defektlerinin Klinik Sınıflandırması Ve Etyopatogenezinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/12/2014 tarih ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

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

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

Ek-2: Bilgilendirilmiş Onay Formu

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

MOLEKÜLER İNCELEMELER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Proje Adı
"RADİYAL IŞIN DEFEKTİ İLE GİDEN SENDROMLARIN KLİNİK SINIFLANDIRMASI VE ETYOPATOGENEZİNİN ARAŞTIRILMASI"

Tarih:

Bu incelemede, klinik ve radyolojik incelemeler sonucunda radiyal ışın defekti olduğu saptanan seçilmiş olgularda, fenotipe neden olan moleküler patolojinin araştırılması amaçlanmaktadır. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine gönderilen olgularda araştırma amaçlı moleküler incelemelerinin yapılmasına izin vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz.

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

1.Yapılacak işlemin tanımı: İnceleme, radiyal ışın defekti saptanan olgularda altta yatan nedenin ileri düzeyde aydınlatılmasını amaçlamaktadır. Bu çalışmalar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

İleri moleküler analizlerin yapılması için hastaların tanı amacı ile önceden alınmış olan mevcut doku örnekleri kullanılacaktır. Seçilecek uygun olgularda ileri moleküler yöntemler kullanılarak detaylı tanıya gidilmeye çalışılacaktır. Eldeki örneklerin yetersiz olması ya da kullanılamaması durumunda hastadan yeniden doku (kan, vb) örnekleri almamız gerekebilir. Bu durumda hasta ve aile bilgilendirilecek ve izni alınacaktır.

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

a. Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra bölümünüz örnek bankasında saklanmasına izin veriyorum.

b. Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra imha edilmesini istiyorum.

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

2. Olası riskler ve faydalar:

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

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

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninize bağlı

olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne ya da babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

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

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

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

---

(Doktor Adı)

hastaya, ---

(Aile Adı)

(Tanık Kişi)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

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

Tarih:

Doktorun imzası:

Kontak kurulabilecek kişiler:

Ulaşılabilecek Tel. No.'ları: Direk hat:

Dahili hat: (0 212) 414 20 00 – 32347

Ulaşım Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Millet Cad. 34390 Çapa – İSTANBUL

Elektronik Posta Adresi: .....

İzin: Yukarıda tanımlanan ileri düzey incelemenin uygulanması, riskleri ve yararları ile ilgili yeterince bilgi aldım. Bu çalışmaya kendimin (çocuğumun) katılmasına izin veriyorum. Çalışmanın herhangi bir aşamasında şayet

vazgeçersem onayımı çekmek hakkında özgür olduğumu biliyorum. Bu nedenle kendimin/çocuğumun bir zarar görmeyeceğini anladım. Araştırma bulguları, ailemdeki genetik hastalığın klinik ve moleküler tanısına ve tedavisine faydalı sonuçlar vermesi durumunda bana rapor edileceğini kabul ettiğimi bildirmek istiyorum.

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

Ek-3: Hasta İzlem Formu

T.C.

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Muayene Formu

Tarih:

Olgu No:

Ad-Soyad: Protokol No:

D.T/ yaşı: DNA No:

Cinsiyet:

Adres bilgileri:

Tel:

Özgeçmiş:

Akrabalık:

Soygeçmiş:

Antenatal/Natal/Postnatal:

Öykü:

Psikososyal motor gelişme:

Aile ağacı

Fizik muayene:

Baş çevresi: Tartı: Boy:

Sistemik muayene:

Görüntüleme:

Ek tetkikler:

Pozitif bulgular:

TANI:

Moleküler analizler:

8. ÖZGEÇMİŞ

Ad : Şahin

Soyad: Avcı

Ünvan: Tıp Doktoru

Doğum Tarihi:04.03.1986

Doğum yeri: Erzurum

e-posta: avci-sahin@hotmail.com

EĞİTİM:

1992-2000: Atatürk İlköğretim Okulu

2000-2004: Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi

2004-2010: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Nisan 2011- : İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Tıpta Uzmanlık Öğrencisi

KISA DÖNEM EĞİTİM PROGRAMLARI:

29-30 Nisan 2011: İstanbul V. Dismorfoloji Günleri

16 Nisan 2011: İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel EKG Kursu

25 Haziran 2011: Frajil-X sendromu Paneli ve İdiyopatik Mental Retardasyonda Array Uygulamaları: Nijmegen Deneyimi toplantısı (Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi)

30 Eylül 2011: İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik Kursu

24-26 Kasım 2011: İstanbul 6. Nadir Hastalıklar ve Yetim İlaçlar Doğu Avrupa Konferansı

17 Şubat 2012: Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri AD Toplantıları V- Otizm Paneli

19-23 Aralık 2012: 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi (Uludağ Ünv./Bursa)

31 Mayıs 2013: III. Klinik Genetik Toplantısı (İstanbul)

3-4 Haziran 2013: VI. Dismorfoloji Günleri (İstanbul)

8-11 Haziran 2013: European Human Genetics Conference 2013 (Paris/Fransa)

26 Kasım 2013: V. Klinik Genetik Toplantısı (İstanbul)

6-7 Aralık 2013: Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyomu (İstanbul)

25 Aralık 2013: IV. Klinik Genetik Toplantısı (İstanbul)

21 Şubat 2014: VI. Klinik Genetik Toplantısı (İstanbul)

9-11 Nisan 2014: 36. Pediatri Günleri (İstanbul)

YAYINLAR:

Uluslararası

1. Clinical and mutation data in 12 patients with the clinical diagnosis of Nager syndrome: Czeschik JC, Voigt C, Alanay Y, Albrecht B, **Avci S**, Fitzpatrick D, Goudie DR, Hehr U, Hoogeboom AJ, Kayserili H, Simsek-Kiper PO, Klein-Hitpass L, Kuechler A, López-González V, Martin M, Rahmann S, Schweiger B, Splitt M, Wollnik B, Lüdecke HJ, Zeschnigk M, Wieczorek D, Hum Genet. 2013 Aug;132(8):885-98.
2. Genetic heterogeneity in Cornelia de Lange syndrome (CdLS) and CdLS-like phenotypes with observed and predicted levels of mosaicism: Ansari M, Poke G, Ferry Q, Williamson K[1], Aldridge R, Meynert AM, Bengani H, Chan CY, Kayserili H, **Avci S**, Hennekam RC, Lampe AK, Redeker E, Homfray T, Ross A, Falkenberg Smeland M, Mansour S, Parker MJ, Cook JA, Splitt M, Fisher RB, Fryer A, Magee AC, Wilkie A, Barnicoat A, Brady AF, Cooper NS, Mercer C, Deshpande C, Bennett CP, Pilz DT, Ruddy D, Cilliers D, Johnson DS, Josifova D, Rosser E,Thompson EM, Wakeling E, Kinning E, Stewart F, Flinter F, Girisha KM, Cox H, Firth HV, Kingston H, Wee JS, Hurst JA, Clayton-Smith J, Tolmie J, Vogt J, Tatton-Brown K, Chandler K, Prescott K, Wilson L, Behnam M, McEntagart M, Davidson R, Lynch SA, Sisodiya S,Mehta SG, McKee SA, Mohammed S, Holden S, Park SM, Holder SE, Harrison V, McConnell V, Lam WK, Green AJ, Donnai D, Bitner-Glindzicz M, Donnelly DE, Nellåker C, Taylor MS, FitzPatrick DR.