

VOLKAN KARAMAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SENDROMİK VE NON-SENDROMİK
KRANİYOSİNOSTOZ OLGULARINDA FGFR1, FGFR2,
FGFR3, TWIST1, MSX2, POR, FREM1 VE RAB23
GENLERİNDE MOLEKÜLER ANALİZLER**

VOLKAN KARAMAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. ZEHRA OYA UYGUNER**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

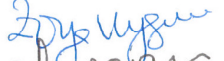




İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Volkan KARAMAN tarafından hazırlanan Sendromik ve Non-Sendromik Kraniosinostoz Olgularında FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST1, MSX2, POR, FREM1 ve RAB23 Genlerinde Moleküler Analizler başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

15 / 06 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Z. Oya UYGUNER (İ.Ü. İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)	
2.Prof. Dr. Seher BAŞARAN (İ.Ü. İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)	
3.Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ (İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.)	
4.Prof. Dr. Hülya K. KARABEY (Koç Üni. Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)	
5.Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE (İ.Ü. İstanbul Tıp Fak. İç Hast. A. D. Tıbbi Genetik B.D.)	

BEYAN

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

Volkan KARAMAN



İTHAF

Canım kızım Ahu Naz KARAMAN'a

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, sabırlı ve öğretici, çok değerli hocam Tıbbi Genetik ABD Başkanı Prof. Dr. Seher BAŞARAN'a

Çalışmaya başladığım günden beri her zaman bana destek olan ve inanan, anlayışlı ve yol gösterici, moleküler genetiği sevdiren danışman hocam Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER'e

Tezimdeki özellikle klinik bilgilerin oluşmasında öğretici ve yardımcı olan, inanılmaz hafızasına hayran olduğum hocam Prof. Dr. Hülya KAYSERİLİ KARABEY'ye

Bilgi ve destekleriyle hep yanımda olduklarını bildiğim sevgili hocam Doç. Dr. Birsen KARAMAN ve bir ağabey olarak gördüğüm Dr. Güven TOKSOY'a

Tez çalışmam boyunca moral ve motivasyon desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Alev YALIN, Fatih TEPGEÇ, Gülendamar BAGİROVA ve Burcu SEVİNÇ'e

Klinik bölümdeki bilgilerini her daim zaman ayırarak benimle paylaşan Uzm. Dr. Umut ALTUNOĞLU, Dr. Şahin AVCI ve diğer klinik bölüm çalışma arkadaşlarıma,

Sabırla ve içtenlikle desteklerini esirgemeyen tüm Tıbbi Genetik AD. çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi destekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan özverili sevgili aileme,

Her zaman yanımda olan ve geleceğimizi ayakta tutan sevgili eşim İrem Yeşildağ KARAMAN'a

Ondan önce hayatımın nasıl olduğunu bana unutturan canım kızıma,

Teşekkür ederim

[Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 24379]

[Proje CRANIRARE-2 konsorsiyum (ERA- NET) TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 112S398.]

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kranyum ve Kraniyal sütürler	4
2.2. Kraniyosinozoz tanımı	4
2.3. Kraniyosinozozlarda Sınıflama	5
2.3.1. Primer Kraniyosinozoz	6
2.3.1.1. Non-sendromik Kraniyosinozozlar	6
2.3.1.1.1. 1. Sagital Sinostoz	6
2.3.1.1.1. 2. Koronal Sinostoz	7
2.3.1.1.1. 3. Metopik Sinostoz	7
2.3.1.1.1. 4. Lambdoid Sinostoz.....	7
2.3.1.1.1. 5. Çoklu Sütür Sinostozları	7
2.3.1.2. Sendromik Kraniyosinozozlar	8
2.3.2. Sekonder Kraniyosinozoz	9
2.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	9
2.5. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör (<i>FGFR</i>) Gen Ailesi	11
2.5.1. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör 2 (<i>FGFR2</i>) Geni	15
2.5.2. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör 1 (<i>FGFR1</i>) Geni	16
2.5.3. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör 3 (<i>FGFR3</i>) Geni	16
2.5.4. Sitokrom P450 Oksidoredüktaz (<i>POR</i>) Geni	17

2.5.5. MSH Homeobox 2 (<i>MSX2</i>) Geni.....	17
2.5.6. Twist Family bHLH Transcription Factor 1 (<i>TWIST1</i>) Geni.....	18
2.5.7. Rab23, member Ras Oncogene Family (<i>RAB23</i>) Geni.....	18
2.5.8. FRAS1 Related Extracellular Matrix 1(<i>FREM1</i>)	19
2.6. Klasik Kraniosinostoz Sendromları	19
2.6.1. Apert Sendromu (AS) (Akrocefalosindaktili, Tip 1, ACS1).....	19
2.6.2. Crouzon Sendromu (CRS) (Kraniofasiyal Dizostozis).....	20
2.6.3. Akantosis Nigrigans Birlikteliği İle Crouzon Sendromu (CAN) (Crouzonodermoskeletal Sendrom)	21
2.6.4. Pfeiffer Sendromu (PS) (Akrocefalosindaktili Tip 5 ACS5)	21
2.6.4.1. Pfeiffer Sendromu Tip 1	22
2.6.4.2. Pfeiffer Sendromu Tip 2.....	22
2.6.4.3. Pfeiffer Sendromu Tip 3.....	22
2.6.5. Saethre Chotzen Sendromu (SCS)(Akrocefalosindaktili Tip 3;ACS3)	22
2.6.6. Muenke Sendromu (MUS)(MNKES)	23
2.6.7. Carpenter Sendromu (CRPT1).....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. GEREÇ	25
3.1.1. Sendromik ve Non-sendromik Kraniosinostoz Olgularında Klinik İncelemeler	25
3.2. YÖNTEM	25
3.2.1. DNA Eldesi	25
3.2.2. DNA kalite araştırması	25
3.2.3. DNA'nın Ethanol kullanılarak çöktürme işlemi	26
3.2.4. Aday gen ve hedef bölgelerin karakterizasyonu	26
3.2.5. Primerlerin tasarlanması	29
3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	30
3.2.7. PZR Saflaştırması	30
3.2.7.1. Spin Kolon Yöntemi ile Saflaştırma	30
3.2.7.2. Enzimatik Yöntem ile Saflaştırma	31
3.3. Dizi Analizi.....	31
3.3.1. DNA Dizi Analizi	31
3.3.1.1. Dizi PZR Reaksiyonu.....	31

3.3.1.2. Dizi Reaksiyon Ürünlerinin Saflaştırılması	32
3.3.1.3. Elektforez Cihazına Yükleme	32
3.3.1.4. Elektforez Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	32
3.4. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Analizi	33
3.4.1. MLPA Tekniği	34
3.4.1.1. MLPA çalışmasının yapılışı.....	34
3.4.1.2. Denatürasyon ve Prob karışımı ile hibridizasyon aşaması.....	36
3.4.1.3. Ligasyon aşaması	36
3.4.1.4. PZR reaksiyonu aşaması	36
3.4.1.5. Kapiler Elektforez Cihazı ile Fragmanların yürütme aşaması.....	37
3.4.1.6. MLPA Sonuçlarının Değerlendirilmesi	37
3.5. Akış Şeması	39
3.5.1. Sendromik Olguların Değerlendirilmesi.....	39
3.5.2. Non-sendromik Olguların Değerlendirilmesi	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Sendromik Olgular	40
4.1.1. Apert Sendromu	40
4.1.1.1. Apert Sendromu Klinik Bulguları.....	40
4.1.1.2. Apert Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları.....	41
4.1.2. Pfeiffer Sendromu	42
4.1.2.1. Pfeiffer Sendromu Klinik Bulguları.....	42
4.1.2.2. Pfeiffer Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları.....	44
4.1.3. Crouzon Sendromu	46
4.1.3.1. Crouzon Sendromu Klinik Bulguları	46
4.1.3.2. Crouzon Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları	47
4.1.4. Saethre-Chotzen Sendromu	48
4.1.4.1. Saethre-Chotzen Sendromu Klinik Bulguları	48
4.1.4.2. Saethre-Chotzen Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları	50
4.1.5. Muenke Sendromu	52
4.1.5.1. Muenke Sendromu Klinik Bulguları.....	52
4.1.5.2. Muenke Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları.....	53
4.2. Non-sendromik Kraniosinostoz Olguları.....	53
4.2.1. Non-sendromik Kraniosinostoz Olgularının Klinik Bulguları	53

4.2.1.1. Non-sendromik Kraniosinostoz Olgularında Moleküler Analiz Sonuçları	54
4.3. Dizi /MLPA Analizi İle Saptanan Mutasyonlara Genel Bakış	56
4.3.1. Bu çalışmada mutasyon saptanan olgulara genel bakış (Genler, Mutasyonlar ve İlişkili Fenotipler)	56
Tablo 11: Mutasyon saptanan olgularda, fenotipler, ilişkili genler, mutasyonlar ve yol açtığı aminoasit değişimleri (n:21)	57
5. TARTIŞMA	58
6. KAYNAKLAR	72
7. FORMLAR	81
7.1. Moleküler Araştırmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu.....	81
7.1.1. Hastanın/Katılımcının Beyanı.....	83
7.2. Gönüllü Onay Formu	84
8. ETİK KURUL KARARI	85
9. EKLER.....	88
9.1. <i>FGFR1</i> geninin genomik DNA primerleri.....	88
9.2. <i>FGFR2</i> geninin genomik DNA primerleri.....	88
9.3. <i>FGFR3</i> geninin genomik DNA primerleri.....	90
9.4. <i>FREMI</i> geninin genomik DNA primerleri	90
9.5. <i>MSX2</i> geninin genomik DNA primerleri	91
9.6. <i>POR</i> geninin genomik DNA primerleri	92
9.7. <i>RAB23</i> geninin genomik DNA primerleri.....	92
9.8. <i>TWIST1</i> geninin genomik DNA primerleri.....	93
TELİF HAKKI İZİNİ.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	95

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Sinostoza uğrayan sütürler ve bunların yol açtığı kraniyal malformasyonların morfolojik/anatomik isimlendirmeleri ile Kraniosinostoz görülme % oranları	8
Tablo 2: Çeşitli kraniosinostoz sendromları ile ilgili kalıtım, tanımlandığı yıl, etkilenen sütürler, ilişkilendirilmiş genler, mutasyon tipleri ve yolak bilgileri	24
Tablo 3: SALSA MLPA Prob Karışımı P080-B1 Kraniofasial kit İçeriği	34
Tablo 4: Sendromik Kraniosinostoz Olgularının Moleküler Etyopatogenezini Belirlemek için Akış Şeması	39
Tablo 5: Apert sendromu ön tanıli olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları ...	40
Tablo 6: Pfeiffer sendromu ön tanıli olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları	42
Tablo 7: Crouzon sendromu ön tanıli olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları	46
Tablo 8: Saethre-Chotzen sendromu ön tanıli olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları.....	49
Tablo 9: Muenke / Saethre-Chotzen sendromu ön tanıli olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları.....	52
Tablo 10: Non-sendromik kraniosinostoz ön tanıli olguların klinik bulguları	54
Tablo 11: Mutasyon saptanan olgularda, fenotipler, ilişkili genler, mutasyonlar ve yol açtığı aminoasit değişimleri (n:21)	57
Tablo 12: Sendromik kraniosinostoz olgularında bu çalışmada saptanan mutasyon oranları ve sonuçlara göre önerilen moleküler analiz akış şeması.....	71
Tablo 13: <i>FGFR1</i> geninin (NM_023110.2) genomik DNA primerleri.....	88
Tablo 14: <i>FGFR2</i> geninin (NM_000141.4) genomik DNA primerleri.....	88
Tablo 15: <i>FGFR3</i> geninin (NM_000142.4) genomik DNA primerleri	90
Tablo 16: <i>FREM1</i> geninin (NM_144966.5) genomik DNA primerleri	90
Tablo 17: <i>MSX2</i> geninin (NM_144966.5) genomik DNA primerleri	91
Tablo 18: <i>POR</i> geninin (NM_000941.2) genomik DNA primerleri	92
Tablo 19: <i>RAB23</i> geninin (NM_183227.2) genomik DNA primerleri.....	92
Tablo 20: <i>TWIST1</i> geninin (NM_000474.3) genomik DNA primerleri	93

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kranial sütürler ve kraniyosinostozda görülen bazı kafa şekilleri	5
Şekil 2: FGF, FGFR ve HSPG Etkileşim Bölgeleri	11
Şekil 3: FGF-FGFR yapısı ve sinyal yollarının gösterimi	13
Şekil 4: FGFR protein yapısı ve patolojik yanlış anlamlı mutasyonların gösterimi.....	14
Şekil 5 : Pürin ve Primidinler ve birbirlerine değişimlerinin gösterimi	15
Şekil 6: <i>FGFR2</i> geninin ‘ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ ’de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları.....	15
Şekil 7: <i>FGFR1</i> geninin ‘ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ ’de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları.....	16
Şekil 8: <i>FGFR3</i> geninin ‘ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ ’de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları.....	17
Şekil 9: <i>POR</i> geninin ‘ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ ’de tanımlanmış kodlayan transkript varyantı	17
Şekil 10: <i>MSX2</i> geninin ‘ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ ’de tanımlanmış kodlayan transkript varyantı	18
Şekil 11: <i>TWIST1</i> geninin ‘ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ ’de tanımlanmış kodlayan transkript varyantı	18
Şekil 12: <i>RAB23</i> geninin ‘ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ ’de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları.....	19
Şekil 13: <i>FREMI</i> geninin ‘ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ ’de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları.....	19
Şekil 14: A. <i>FGFR2</i> geninin NM_000141 transkripti ‘ http://www.ensembl.org/ ’; B. <i>FGFR2</i> proteinin (NP_000132) domain yapısı ‘ http://prosite.expasy.org/ ’un P21802’ için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.	26
Şekil 15: A. <i>FGFR1</i> geninin NM_023110 transkripti, ‘ http://www.ensembl.org/ ’; B. <i>FGFR1</i> proteinin (NP_075598) domain yapısı ‘ http://prosite.expasy.org/ ’un P11362’ için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.	27
Şekil 16: A. <i>FGFR3</i> geninin NM_000142 transkripti, http://www.ensembl.org/ ; B. <i>FGFR3</i> proteinin (NP_000133) domain yapısı ‘ http://prosite.expasy.org/ ’un P22607’ için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.	27

Şekil 17 : A. POR geninin NM_000941 transkripti, http://www.ensembl.org ; B. POR proteinin (NP_000932) domain yapısı ' http://prosite.expasy.org 'un P16435' için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.....	27
Şekil 18: A.MSX2 geninin NM_002449 transkripti, http://www.ensembl.org ; B. MSX2 proteinin (NP_002440) domain yapısı ' http://prosite.expasy.org 'un P35548' için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.....	28
Şekil 19: A. TWIST1 geni NM_000474 transkripti ' http://www.ensembl.org '; B. TWIST1 proteinin (NP_000465) domain yapısı ' http://prosite.expasy.org 'un Q15672 için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.	28
Şekil 20: A. <i>RAB23</i> geni NM_183227 transkripti ' http://www.ensembl.org '; B.RAB23 proteinin (NP_899050) domain yapısı ' http://prosite.expasy.org 'un Q9ULC3 için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.	28
Şekil 21: A. <i>FREM1</i> geni NM_144966 transkripti ' http://www.ensembl.org '; B. FREM1 proteinin (NP_659403) domain yapısı ' http://prosite.expasy.org 'un Q5H8C1 için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.	29
Şekil 22: A.FGFR3 geninin NM_000142 transkripti B. FGFR3 geninin NM_001163213 transkripti (http://www.ensembl.org).....	29
Şekil 23: MLPA protokolünün şematize aşamaları	35
Şekil 24 :MLPA Coffalaysen net programı P080 ayarları	38
Şekil 25: MLPA pik şiddeti oran ayarları	38
Şekil 26: MLPA normal örnek analiz sonucu ve prob bölgeleri bar grafik görüntüsü... 38	
Şekil 27: Apert sendromu klinik tanısı alan ve FGFR2 c.755C>G (p.Ser252Trp) mutasyonu saptanan olgu AS2 (a ve b) ve AS4'e (Şekil c ve d) ait fotoğraflar	41
Şekil 28: Apert sendromlu olgularda saptanan c.755C>G mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu AS 4).....	41
Şekil 29: Pfeiffer sendromu klinik tanısı alan ve mutasyon saptanan PS3 olgusu (a, b), PS9 (c-e) ve PS6 ve babasına (f-j) ait fotoğraflar	43
Şekil 30 : Pfeiffer sendromlu 3 olguda (PF 1, 3 ve 9) saptanan c.1019A>G mutasyonu elektroferogram görüntüsü (PF 1).....	44
Şekil 31 : Pfeiffer sendromlu olguda (PF 6) saptanan c.514_515delGCinsTT mutasyonu elektroferogram görüntüsü	45
Şekil 32 : Pfeiffer sendromlu bir olguda saptanan c.1646A>C mutasyonu elektroferogram görüntüsü (PF 2).....	45

Şekil 33 : Pfeiffer sendromlu bir olguda saptanan c.1694A>C mutasyonu elektroferogram görüntüsü (PF 4).....	45
Şekil 34: Crouzon sendromu klinik tanısı alan ve mutasyon saptanan CRS 2 olgusu (a, b) ait fotoğraflar	47
Şekil 35: Crouzon sendromu iki olguda saptanan c.833G>T mutasyonu elektroferogram görüntüsü (CRS 4 ve 6) (Olgu CRS 4)	48
Şekil 36: Crouzon sendromu bir olguda saptanan c.1025G>A mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu CRS 2).....	48
Şekil 37: Saethre-Chotzen sendromu klinik tanısı alan ve mutasyon saptanan SCS3 olgusu (a, b) ait fotoğraflar	49
Şekil 38: Saethre-Chotzen sendromu bir olguda saptanan <i>TWIST1</i> geni ekzon 1 c.355C>T mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu SCS3).....	50
Şekil 39: Saethre-Chotzen sendromlu bir olguda saptanan <i>TWIST1</i> geni ekzon 1 21bç'lik duplikasyon mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu SCS4)	51
Şekil 40: Saethre-Chotzen sendromlu bir olguda (SCS6) saptanan <i>TWIST1</i> geni ekzon 1 c.376G>T mutasyonu elektroferogram görüntüsü	51
Şekil 41: Saethre-Chotzen sendromlu bir olguda (SCS5) MLPA tekniği ile saptanan <i>TWIST1</i> tüm gen heterozigot delesyonu bar grafik görüntüsü	51
Şekil 42: Muenke sendromunda MUS3 ve MUS4 olgularında saptanan c.749C>G mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu MUS4)	53
Şekil 43 A.NSC1 olgu aile ağacı; IV:1, IV:2 ve III:2 olgularında <i>FGFR2</i> geni ekzon 3 c.234C>T mutasyonu B.Non-sendromik kraniosinostoz NCS1 olgusunda saptanan c.234C>T dizi analizi elektroferogram görüntüsü	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Ailevi
aCGH	: Array comparative genomic hybridisation
ALP	: Alkalin fosfataz
Akt	: protein kinase B
AS	: Apert Sendromu
ASD	: Atriyal Septal Defekt
BÇ	: Baz çifti
BMP	: Bone morphogenetic protein
COL1A1	: Tip 1 kollagen
CRS	: Crouzon Sendromu
D	: Dişi
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
E	: Erkek
EDTA	: Etilendiamin tetraasedik asit
Ensembl	: Ensembl Project
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
ER	: Endoplazmik retikulum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
FGFR	: Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü (Fibroblast Growth Factor Receptor)
FREM1	: FRAS1 related extracellular matrix 1
GH	: Gebelik haftası
Hidi	: Highly Deionized
HGMD	: İnsan Genomu Mutasyon Veri Bankası (The Human Gene Mutation Database)
HGNC	: The HUGO Gene Nomenclature Committee
Ig	: İmmüoglobulin
Ig I / D1	: İmmüoglobulin benzer bölge 1
Ig II / D2	: İmmüoglobulin benzer bölge 2
Ig III / D3	: İmmüoglobulin benzer bölge 3
Jak	: Janus Kinase
MAPK	: Mitojen Aktivasyon Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
Mat.	: Maternal
Med. Dev.	: Medyale Deviyeye
ml	: Mililitre
MLPA	: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MSX2	: Muscle Segment Homeobox 2
MUS	: Muenke Sendromu,
NCBI	: The National Center for Biotechnology Information
ng	: Nanogram
NSC	: Non-sendromik Kraniosinostoz

OC	: Osteokalsin
OD	: Otozomal dominant
O.D.	: Optik Dansite
OR	: Otozomal resesif
Pat.	: Paternal
PDA	: Patent Duktus Arteriosis
PDGFR α	:Platelet-derived growth factor receptor α
PH	: Pulmoner Hipertansiyon
PKC	: Protein Kinaz C (Protein Kinase C-Dependent)
PLC- γ	: Phospholipase C-gamma
PolyPhen-2	: Prediction of functional effects of human nsSNPs
POR	: P450 (cytochrome) oxidoreductase
PS	: Pfeiffer Sendromu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RAB23	: Member RAS oncogene family
Rad. Dev.	: Radyale Deviye
RPM	: Santrifüjün dakikadaki dönüş sayısı (round per minute)
RUNX2	: Osteoblast transkripsiyon faktör
S	: Sporadik
SCS	: Shaetre-Chatzen Sendromu
SH2	: Src homoloji2
SHH	: Sonic hedgehog
SNP	: Tek nükleotidlik polimorfizm (single nucleotide polymorphism)
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
T _m	: Temperature of Melting
TM	: Transmembran bölge
TWIST1	: Twist family bHLH transcription factor 1
U.V.	: Ultra viyole
USCS	: University of California Santa Cruz
UTR	: Untranslated Recent
VSD	: Ventriküler Septal Defekt
Wnt	:Wingless-type MMTV integration site family
WT	: Yabanıl tip (Wild type)
μ l	: Mikrolitre

ÖZET

Karaman V. Sendromik ve Non-Sendromik Kraniosinostoz Olgularında *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREMI* ve *RAB23* Genlerinde Moleküler Analizler

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik ABD.
Yüksek Lisans Tezi. 2015

Anahtar Kelimeler : Kraniosinostoz, *FGFR*, *TWIST1*, *FREMI*, *RAB23*.

Kraniosinostoz, kafatası sütürlerinden bir veya birkaçının erken kapanması ile ortaya çıkan, 1/2100-1/2500 canlı doğumda bir gözlenen bir deformasyon olup sendromik ve non-sendromik olarak iki grupta değerlendirilir. Olguların yaklaşık %21'inin genetik tanı aldığı, bunların %85'inin tek gen sendromları, %15'inin ise kromozom anomalileri ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Kraniosinostozlarda sıklıkla ilişkilendirilen genler fibroblast büyüme faktörü reseptörünü kodlayan *FGFR2* ve *FGFR3* olup, bunu transkripsiyon faktörünü kodlayan *TWIST1* takip etmekte, *FGFR1*, *POR*, *RAB23*, *MSX2*, *FREMI* ise nadiren ilişkilendirilen genlerdir.

Bu çalışmada, etyopatogenezinde kromozom anomalileri dışlanmış 31'i sendromik dokuzu non-sendromik 40 kraniosinostoz olgusunda, bilinen genlerde DNA dizi analizi ve MLPA tekniği kullanılarak mutasyonların araştırılması ve moleküler genetik tanı akış şemasının oluşturulması hedeflendi. Mutasyonların en sık gözleendiği ekzon bölgelerinden başlayarak, tüm genin dizilenmesine kadar sürdürülen bu çalışmada mutasyon saptanmayan olguların tamamında bu genlerdeki ekzon ve/veya gen delesyon ve duplikasyonları araştırıldı.

Toplam beş Apert olgusunun tamamında (%100), dokuz Pfeiffer olgusunun altısında (%66.6), altı Crouzon olgusunun üçünde (%50), yedi Saethre-Chotzen olgusunun dördünde (%57.1), dört Muenke olgusunun ikisinde (%50) bilinen mutasyonlar gösterildi. MLPA tekniği ile tek bir Saethre-Chotzen olgusunda mutasyon gösterildi. Mutasyon saptanmayan tüm olgularda uygulanan tüm gen dizi analizinde bir non-sendromik kraniosinostoz olgusunda patolojik olduğu düşünülen yeni bir değişim saptandı.

Bulgularımız, sendromik kraniosinostozda özgün gen ve bölgelerinin aşamalı olarak incelenmesinin, non-sendromik olgularda tüm gen dizi analizinin ve mutasyon saptanmayan olgularda MLPA tekniğinin kullanılmasının moleküler genetik tanıda süreç ve maliyet açısından uygun bir yaklaşım olacağını gösterdi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP Proje No: 24379) ve CRANIRARE-2 konsorsiyum (ERA- NET) TÜBİTAK (Proje No: 112S398) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Karaman V.(2015) Molecular analysis of *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREMI* and *RAB23* genes in Syndromic and Non-Syndromic Craniosynostosis patients.

Istanbul University Institute of Health Sciences, Master Thesis on Genetics, Istanbul 2015

Key Words: Craniosynostosis, *FGFR*, *TWIST1*, *FREMI*, *RAB23*

Craniosynostosis is a morphological deformation, classified under syndromic or non-syndromic forms, observed in 1/2100-1/2500 live births, as a result of premature fusion of cranial sutures. Etiopathogenesis is by genetic diagnosis revealed in 21% of the cases, in which 85% related to single gene and 15% related to chromosomal defects. *FGFR2* and *FGFR3*, encoding fibroblast growth factor receptors, are the most frequently associated genes followed by transcription factor encoding *TWIST1*. Mutations in *FGFR1*, *POR*, *RAB23*, *MSX2* and *FREMI* are rarely identified.

Towards the aim for establishing a molecular genetic diagnostic flow chart, investigations employed DNA sequencing and MLPA analysis of the known genes, in a cohort of 40 syndromic and non-syndromic craniosynostosis cases with normal karyotype. Investigation is initiated by screening of the hot spot mutation sites, and completed by whole gene sequencing and deletion/duplication analysis of the known genes in all mutation negative cases.

Known mutations are identified in total of five Apert (100%), in six of nine Pfeiffer (66.6%), in three of six Crouzon (50%), in four of seven Saethre-Chotzen (57.1%), and in two of four Muenke (50%) cases. MLPA technique was able to determine a deletion in one Saethre-Chotzen, and whole gene sequencing revealed a novel alteration in one non-syndromic case, interpreted as pathologic.

Our findings supported that the stepwise analysis of the hot spot regions in all associated genes in syndromic, whole gene sequencing in non-syndromic and MLPA in all mutation negative cases, is cost effective and advantageous approach for the definitive molecular diagnosis of the craniosynostosis.

This project was supported by the Istanbul University Scientific Research Projects (BAP) project no:24379 and CRANIRARE-2 consortium (ERA- NET) funded by TUBITAK- 112S398.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kraniyosinostoz; beyin kubbesinde bulunan sütürlerden bir veya birkaçının erken kapanması ile ortaya çıkan, 1/2100-1/2500 canlı doğumda bir gözlenen malformasyondur (1-2). Büyük çoğunluğu izole, az bir kısmı ise başka bulguların eşlik ettiği sendromik formlar şeklinde gözlenir. İzole formlar, non-sendromik kraniyosinostoz olarak da tanımlanır. İzole formlar; sagittal, lambdoid, koronal (tek veya çift taraflı sütürün kapanmasıyla oluşan), metopik ya da çoklu sütür sinostozlarıdır (2-3). En yaygın kraniyosinostoz olan sagittal sinostozda, kranium skafosefalik şekil almaktadır. İkinci sıklıkta gözlenen koronal sinostozda ise, kranium plagiosefalik görünüm alır. Metopik ve lambdoid sütürlerin sinostozu ise daha nadir görülen formlar olup, bu tip sinostozlarda kranium trigonosefalik görünüm kazanır (4-5). Akrocefali ise koronal, lambdoid ve sagittal sütürlerin erken kapanması ile ortaya çıkan kule kafa görünümüdür (3).

Kraniyosinostozların yaklaşık 180 farklı sendromla ilişkisi bildirilmiştir (4, 6). Sendromik formlarda, otozomal dominant, otozomal resesif ve X-e bağlı kalıtım modelleri tanımlanmıştır (4, 6). Son yıllarda genetik araştırmalar, olguların yaklaşık %21'inin genetik tanı aldığını, bunların %85'ini tek gen sendromları, %15'inin ise kromozom anomalileri ile ilişkilendirildiğini göstermektedir (2, 7). Sendromik formlar arasında en yaygın bilinenleri *FGFR* (Fibroblast Growth Factor Receptor) ilişkili sinostozlar olarak sınıflandırılmakta olup, Pfeiffer sendromu, Apert sendromu, Crouzon sendromu, Beare-Stevenson sendromu, *FGFR2*-ilişkili izole koronal sinostoz, Jackson-Weiss sendromu, Akantozis Nigrigansın eşlik ettiği (derinin kıvrım bölgelerinde renk koyuluğu) Crouzon sendromu bu grupta yer almaktadır (2, 6). Günümüzde *FGFR* grubundan kraniyosinostoz ile ilişkisi tanımlanmış genler, *FGFR1*, *FGFR2* ve *FGFR3*'dür. Bu genlerin ürünleri olan reseptörler sinyal yolağının önemli bir protein ailesini oluşturmaktadırlar. Bu yapıların, fibroblast büyüme faktörlerine bağlanan, membran dışına uzanan ligand domaininde üç adet immunoglobulin benzeri domain (Ig I, II ve III), heliks yapısında olan tek bir transmembran domaini ve hücre içine uzanan tirozin kinaz aktivitesi gösteren intrasellüler domaini bulunur (2, 6). *FGFR2* genindeki heterozigot mutasyonlar genetik kökenli tüm kraniyosinostozların yaklaşık %32'sinden sorumlu tutulmaktadır. Bu geni %25 ile *FGFR3* ve %19 ile *TWIST1* takip etmektedir (2). Ardından daha nadir olarak kraniyosinostozla ilişkileri iyi tanımlanmış diğer genler,

FGFR1, *POR* ve *RAB23* gelir (2, 6, 8-9). *FGFR1*, *FGFR2* ve *FGFR3*'de saptanan mutasyonların büyük çoğunluğu genin IgII (D2) ve IgIII (D3), *TWIST1*'de ise "helix-loop-helix" domain kodlayan bölgelerinde saptanmaktadır. Kraniosinostoz ilişkili mutasyon saptanan ilk gen *MSX2*'dir ve günümüze dek tek bir ailede mutasyon gösterilebildiğinden, etyolojideki yerinin çok nadir olduğu düşünülmektedir (2, 6). Son genetik araştırmalar, nadir görülen Antley-Bixler sendromu'nun iskelet tutulumu ile giden formunda *POR* geni ve metopik sinostozlarda *FREMI* genlerinin ilişkisini göstermiştir (2, 6, 8, 10).

Sendromik kraniosinostozların klinik olarak en iyi tanımlanmış olan grubu akrosefalosindaktili grubudur. Bu grubun en iyi bilineni ve sık gözlenen Apert sendromudur ve el ve ayakların bilateral simetrik kompleks sindaktilisi ve bikoronal sinostoz ile karakterizedir (2, 11). Pfeiffer sendromu, genellikle geniş, radyale dönük başparmak ve/veya büyük ayak baş parmaklarıyla, kutanöz sindaktilinin nadiren eşlik etmesi ile karakterizedir (2, 12). Crouzon sendromu'nda *kruzonoid* yüz görünümü dışında, el ve ayaklarda herhangi bir ek bulgu yoktur (2, 13). Saethre-Chotzen sendromu'nda uni veya bilateral koronal sinostoz, fasiyal asimetri, pitoz, anormal kulak görünümü, ellerde ikinci ve üçüncü parmakların sindaktilisi gözlenmektedir. Büyük gen delesyonu dışındakilerde bilişsel fonksiyon normaldir (2, 6, 14).

FGFR2 genindeki mutasyonlar, Pfeiffer sendromu'nun >%95'inden, Apert sendromu ve Crouzon sendromu'nun ise %100'ünden sorumlu tutulmaktadır (6). Bu gende bazı nokta mutasyonlarının, farklı olgularda Crouzon sendromu ve Pfeiffer sendromu'na yol açtığı, ekspresivite değişkenliğinin fenotipte önemli olduğu bildirilmektedir (2, 7). Pfeiffer sendromu'nda ayrıca *FGFR1* geni mutasyonları da tanımlanmıştır ve sendromun <%5'inden sorumlu tutulmaktadır (6). *TWIST1* ve *FGFR2* genlerindeki heterozigot mutasyonlar, Saethre-Chotzen sendromu'na yol açmaktadır (2, 6, 15). *POR* geni, Antley-Bixler sendromu, *RAB23* geni ise akrosefalosindaktili ile karakterize Carpenter sendromu ile ilişkilendirilmektedir (2, 6, 8-9).

Bu çalışmanın amacı, etyopatogenezinde kromozom anomalileri dışlanmış sendromik ve non-sendromik kraniosinostozlu 40 olgu ve ailesinde, ilişkilendirilmiş genlerin (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREMI* ve *RAB23*) DNA dizisi analizi ve MLPA yöntemleri ile incelenerek, olası gen mutasyonlarının saptanmasıdır. İlk aşamada sendromlarla ilişkili genlerde mutasyonların sık gözleendiği

hedef bölgelere dizi analizi, ardından mutasyon saptanmayan olgularda, ilişkili genlerin diğer bölgeleri dizilenmiştir. Kraniosfasiyel MLPA kiti (P080) ile delesyon/duplikasyonlar açısından inceleme yapılarak, büyük delesyon / duplikasyon mutasyonları dışlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile, moleküler tanı akış şemaları oluşturulmasına ve genotip-fenotip ilişkilerinin kurulmasına katkı sağlanması öngörülmüştür. Mutasyon saptanan olgularda, ailelere özgün genetik danışma verilmesi sağlanmıştır. İkinci aşamada bu çalışma kapsamında yer alan ve etyopatogenezin belirlenemediği olgular, kraniosinostozlarla ilişkili yeni genlerin bulunmasını amaçlayan projelerin tasarlanması için özgün çalışma grubunu oluşturmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kranyum ve Kranial sütürler

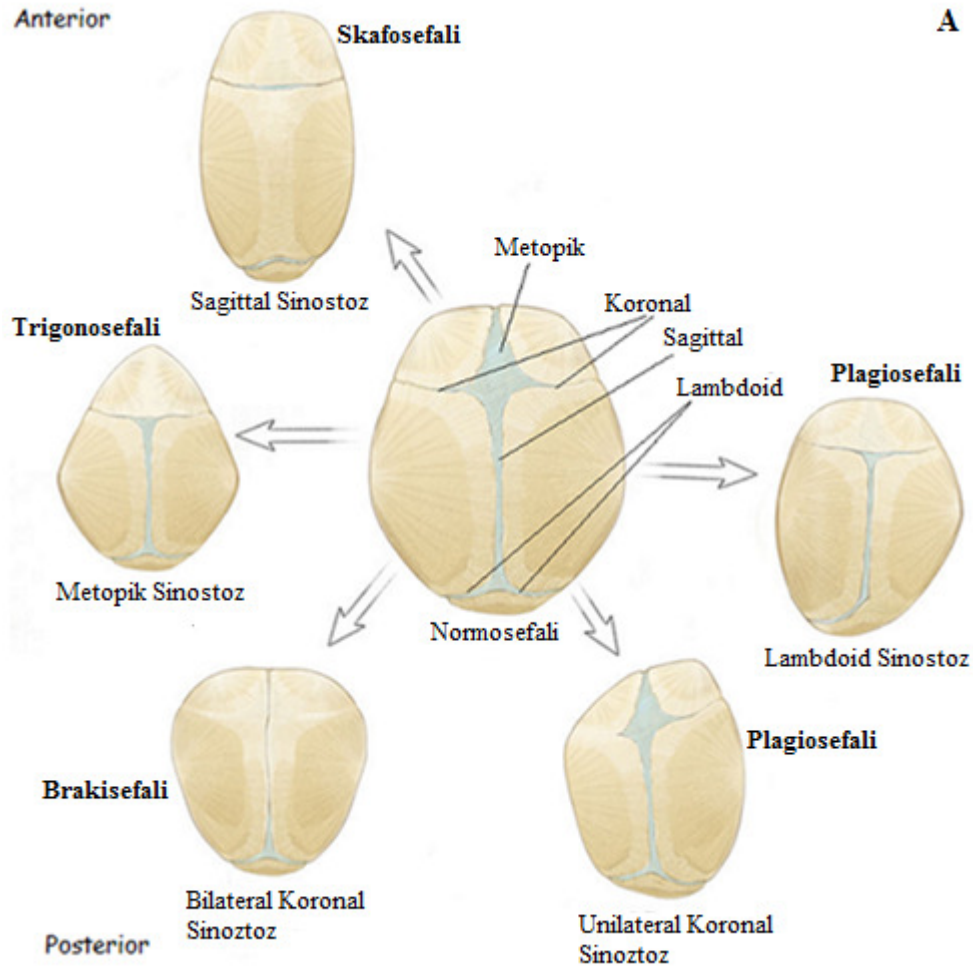
İskelet sisteminin baş bölümünü oluşturan kranyum, beyin ve yüze özgü yapıları destekler. Bu yapı, embriyonik evrede beyin ve beyin kökü için bir kılıf görevi üstlenen nrokranyum ile fasiyal kemikleri destekleyen viserokranyumdan meydana gelir. Nrokranyum, kranyum tabanı ve beyin kubbesi olarak iki bölümden oluşur. Kranyum tabanı endokondral ossifikasyon olarak adlandırılan, kıkırdak evresinin sertleşmesi ile kemikleşirken, beyin kubbesi (kalvaryum), intermembranz ossifikasyon olarak adlandırılan ve yoğunlaşan mezenkim hücrelerinin direkt osteogenik değişime uğraması ile oluşmaktadır. Frontal kemikler, nöral ektoderm kaynaklı nöral krest hücrelerinden, parietal kemikler ise mezodermal hücrelerden köken almaktadırlar. Kranyumun normal gelişimi, beyin, dura, mezenkimal sütürler ve kemik plakalarının birbirleri ile i içe geçen etkileşimleri ile gerçekleşir (4).

Kranial sütürler kafatası kemiklerini birleştiren fibröz dokular olup doğum sırasında kafanın kanaldan rahat geçişini sağlamak ve ilerleyen süreçte de beynin büyümesine olanak sağlamak için birbirinden uzaklaşan kalvariyal kemik kenarlarında kemik yapımının sağlanmasında önemli yapılarıdır (16-17).

Beyin kubbesinde sekiz adet sütür bulunur. Başlıcaları sagital, koronal, metopik ve lambdoid strlerdir. Sütürlerin prematür füzyonu sinostoz olarak adlandırılır. Bir sütür sinostozu uğrarsa, beynin büyümesine paralel olarak kranyum açık olan sütürler üzerinden büyümeye devam eder ve kapanan sütüre zgn (Trigonosefali, Skafosefali, Akrosefali, Plagiosefali, ve Brakisefali vb.) morfolojik deformasyonlar ortaya çıkar (şekil 1A ve 1B) (4-5). Yaşamın ilk yıllarında hızlı olan beynin büyümesi, yaklaşık 7 yaşına kadar sürer. Anterior (frontal) fontanaller yaklaşık 20. Ayda, posterior frontonaller ise yaklaşık 3. ayda kapanır. Sütürlerin füzyonunun 3. dekattan sonra tamamlandığı bildirilmiştir (18-21).

2.2. Kraniosinostoz tanımı

Kraniosinostoz terimi ilk olarak Otto tarafından 1830 yılında prematür sütür füzyonunu tanımlamak için kullanılmıştır (19). Günümüzde beyin kubbesinde bulunan sütürlerden bir veya birkaçının erken kapanması ile ortaya çıkan, 1/2100-1/2500 canlı doğumda bir gözlenen bir malformasyon olarak tanımlanmaktadır (2, 6).



Şekil 1: Kranial sütürler ve kraniosinostozda görülen bazı kafa şekilleri

A. Kranial sütürler normosefali üzerinde gösterilmektedir. Sütürlerin kapanması sonucu oluşan kafa şekilleri ise yanlarda gösterilmektedir. (<http://www.childrenshospital.org> sitesinden düzenlenerek kullanılmıştır.)

B. Kranial sütürlerin kapanması sonucu oluşan kafa şekilleri (<http://www.babysafepillows.com.au/condition/> sitesinden düzenlenerek kullanılmıştır.)

2.3. Kraniosinostozlarda Sınıflama

Virchow, 1851 yılında anatomik olarak kafa şekillerini değerlendirerek, büyük kafa (makrosefali), küçük kafa (mikrosefali), uzun kafa (dolikosefali) ve önden arkaya

doğru biçimi kısa ve basık olan kısa kafa (brakisefali) şeklinde ilk sınıflandırmayı yapmıştır (şekil 1B) (17, 22). Günümüzde kranyosinostoz sınıflandırması temelde primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ayrıca sınıflandırmada farklı yaklaşımlar da kullanılmaktadır. Değerlendirme füzyona uğramış sütür sayısına göre tek sütür ise izole, birden fazla sütür ise kompleks olarak sınıflandırılmaktadır (6, 18). Fenotipik sınıflandırma ise temelde Virchow kurallarına göre kalvaryal kemiklerin füzyonu, şekillenmesi ve büyümesine göre yapılmaktadır (Tablo1).

2.3.1. Primer Kranyosinostoz

Primer karanyosinostozlar, herhangi bir ekstrakraniyal patoloji yok ise “izole” ya da “non-sendromik kranyosinostoz”, eğer ekstrakraniyal patoloji var ise “sendromik kranyosinostoz” olarak adlandırılmaktadır.

2.3.1.1. Non-sendromik Kranyosinostozlar

Kranyosinostozların yaklaşık %85’ini oluşturan non-sendromik kranyosinostozların %92’si sporadiktir (6, 19, 23). İzole ya da sendromik olmayan kranyosinostozda, kafatası deformitesi özgün özellik olup, genelde tek sütür sinostozu ile oluşmaktadır. Prevelansı 3-5/10.000 olup, patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (24). Genellikle sporadik olarak görülmektedir ve mental gelişim çoğunlukla normaldir. Füzyona uğrayan sütüre göre kendi içinde gruplandırılmaktadır (19, 24).

2.3.1.1. 1. Sagital Sinostoz

Sagital sinostoz, doğumda 1.9/10.000 prevelans ile, en sık görülen non-sendromik kranyosinostoz olup, olguların %40–55’ini oluşturmakta (17, 19, 24-25) ve bazı yayınlarda ise oran %64’lere kadar çıkmaktadır (6, 24, 26). Sagital sütürün erken kapanmasıyla oluşan sinostozun yaklaşık %6’sı ailevidir (19, 24) ve erkeklerde dişilere oranla daha fazla izlenir (3.5E/1K) (6, 26). İntrauterin kafa içi basıncı, annenin sigara içmesi ve ikiz gebelik gibi faktörlerin de riski arttırabileceği düşünülmektedir (6). Sagital sütürün sinostozu, anterior-posterior yönde gelişimle uzun kafa (Dolikosefali/Skafosefali) görünümünü sonuçlanmaktadır (şekil 1A ve 1B).

2.3.1.1. 2. Koronal Sinostoz

Koronal sinostoz, 0.8-1/10.000 canlı doğumda görülme sıklığı ile ikinci en sık gözlenen non-sendromik kraniyosinostozdur, ve grubun %20–29'unu oluşturmaktadır (6, 17, 19, 25). Olguların yaklaşık %60-75'i dişidir ve %8-10'unda aile öyküsü mevcuttur (6, 27). Koronal sütürlerden tekinin ya da her ikisinin sinostozu ile oluşmaktadır (şekil 1). Unilateral koronal sütürün sinostozu sonucu plagiosefali oluşmaktadır ve kranyum ve yüzde asimetri görülmektedir (6).

2.3.1.1. 3. Metopik Sinostoz

Metopik sütürün erken kapanmasıyla oluşmakta (17, 19) ve non-sendromik kraniyosinostozların %5–15'ini oluşturmaktadır. Bu olgularda, orta düzeyde hipertelorizm, bitemporal darlık ve biparietal genişleme görülebilmektedir. Metopik sütürün erken kapanması sonucu trigonosefalik kafa yapısı oluşmaktadır (24) (şekil 1).

2.3.1.1. 4. Lambdoid Sinostoz

Non-sendromik kraniyosinostozların <%5'ini oluşturan lambdoid sinostoz, lambdoid sütürün sinostozu ile oluşmaktadır (17, 19). Unilateral lambdoid sinostoz ile asimetric posterior plagiosefali ortaya çıkar ve aynı tarafta alın ve pariyetal bölgede düzleşme oluşurken, karşı tarafta frontal kemikte belirginleşme görülür (şekil 1). Bilateral lambdoid sinostozda ise oksipital bölgede genişleme ve basıklaşma oluşur, yüzde ve kafada asimetri vardır (6).

2.3.1.1. 5. Çoklu Sütür Sinostozları

Çoklu sütür sinostozları, kraniyosinostozların yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Koronal ve sagittal sütürlerin sinostozu ile oluşan oksisefali (kule kafa)'de ağır fenotipik bir görünüm vardır. Beyin, açık olan anterior ve parietal fontaneller boyunca, dışarı doğru büyür. Bilateral koronal sütürün füzyonu ile brakisefali görülmektedir. Kafatası yanlara ve yukarıya doğru genişlemektedir. Bilateral koronal ve sagittal sütürün sinostozunda akrosefali görülmektedir (6).

Tablo 1'de Sinostozu uğrayan sütürler ve bunların yol açtığı kraniyal malformasyonların isimlendirmeleri ile Kraniyosinostoz görülme oranları gösterilmektedir.

Tablo 1: Sinostoza uğrayan sütürler ve bunların yol açtığı kraniyal malformasyonların morfolojik/anatomik isimlendirmeleri ile Kraniosinostoz görülme % oranları (18)

Morfolojik isimlendirme (sefali = kafa)	Sinostoza uğrayan sütür/sütürler	Kraniosinostoz görülme oranı %
Dolikosefali (uzun)	Sagital	50-58
Skafosefali (kayık şekli)	Sagital	
Brakisefali (kısa)	Bikoronal	20-29
Anterior Plagiocefali	Unikoronal	
Turrisefali	Bilateral Lambdoid	2-4
Posterior Plagiocefali	Unilateral Lambdoid	
Trigonosefali	Metopik	4-10
Oksisefali (Akrosefali)	Sagital+Koronal	
Yonca yaprağı kafa	Sagital+Koronal+Lambdoid	

2.3.1.2. Sendromik Kraniosinostozlar

Kraniosinostozlu olgularının %15 ila %40'ı 180'den fazla sendromla ilişkilendirilmektedir (4, 6, 28). Sendromik formlar, otozomal dominant, otozomal resesif ve X-e bağlı kalıtım göstermektedir (4, 6, 29). Yapılan genetik araştırmalar, olguların yaklaşık %21'inin genetik tanı aldığını, bunların %85'inin tek gen sendromları, %15'inin ise kromozom anomalileri olduğu gösterilmiştir (2, 7). Bu sendromlardan klasik kraniosinostoz sendromları olarak da bilinenlerin başlıcaları, Crouzon sendromu (MIM#123500), Apert sendromu (MIM#101200), Pfeiffer sendromu (MIM #101600), Saethre-Chotzen sendromu (MIM#101400), Antley-Bixler sendromu (MIM#207410), Carpenter (MIM# 201000), Muenke sendromu (MIM#602849), Beare-Stevenson cutis gyrate (BSTVS) (MIM#123790), Kraniofrontonazal sendrom (MIM#304110), Shprintzen-Goldberg sendromu (MIM#182212) ve Acanthosis Nigricans ile giden Crouzon sendromu (MIM#612247)'dur.

Sendromik kraniosinostozlarla ilişkili çeşitli gen ve gen ailelerinin rolü son yıllarda ortaya çıkarılmıştır. Bunların arasında *FGFR1* (8p11.23-p11.22), *FGFR2* (10q25.3-q26), *FGFR3* (4p16.3), *TWIST1* (7p21), *MSX2* (5q35.2), *FREMI* (9p22.3), *POR* (7q11.2), *RAB23* (6p12.1) ve *EFNB1* (Xq12) sendromik grubun içinde yer alan önemli genlerdir. (2, 9-10).

Fibroblast büyüme faktörlerini kodlayan *FGFR* (Fibroblast Growth Factor Receptor) gen ailesindeki mutasyonlar, sendromik formlarla ilişkilendirilmiş hedef genler olup, Pfeiffer sendromu, Apert sendromu, Crouzon sendromu, Beare-Stevenson sendromu, *FGFR2*-ilişkili izole koronal sinostoz, Jackson-Weiss sendromu, Akantozis

Nigrigans'ın eşlik ettiği (derinin kıvrım bölgelerinde renk koyuluğu) Crouzon sendromu ve Muenke sendrom'larında tanımlanmıştır (2, 6).

Sendromik kraniyosinostozun en az altı farklı mekanizmayla ortaya çıktığı bildirilmiştir; 1) Reseptör kinaz sinyal yolağının aktivasyonu (FGFR1-3, TGFBR1-2, EFN1), 2) transkripsiyon faktörlerinin inaktivasyonu (TWIST1, MSX2), 3) ekstrasellüler matris proteinlerinin değişimi (alterasyonu) (FBN1, FGF9), 4) ER proteinleri (PDR), 5) helikazlar (RECQL4) ya da 6) membran trafik proteinleri (RAB23, SEC23A) (10, 25).

2.3.2. Sekonder Kraniyosinostoz

Hipertelorizm, hiperkalsemia, vitamin D eksikliği, talasemi, renal osteodistrofi gibi sistemik ve metabolik bozukluklarda mikrosefali, ensefalosel, hidrosefali ve sütür büyümesinde azalma, vb. gibi durumlar görülmektedir (18-19).

2.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

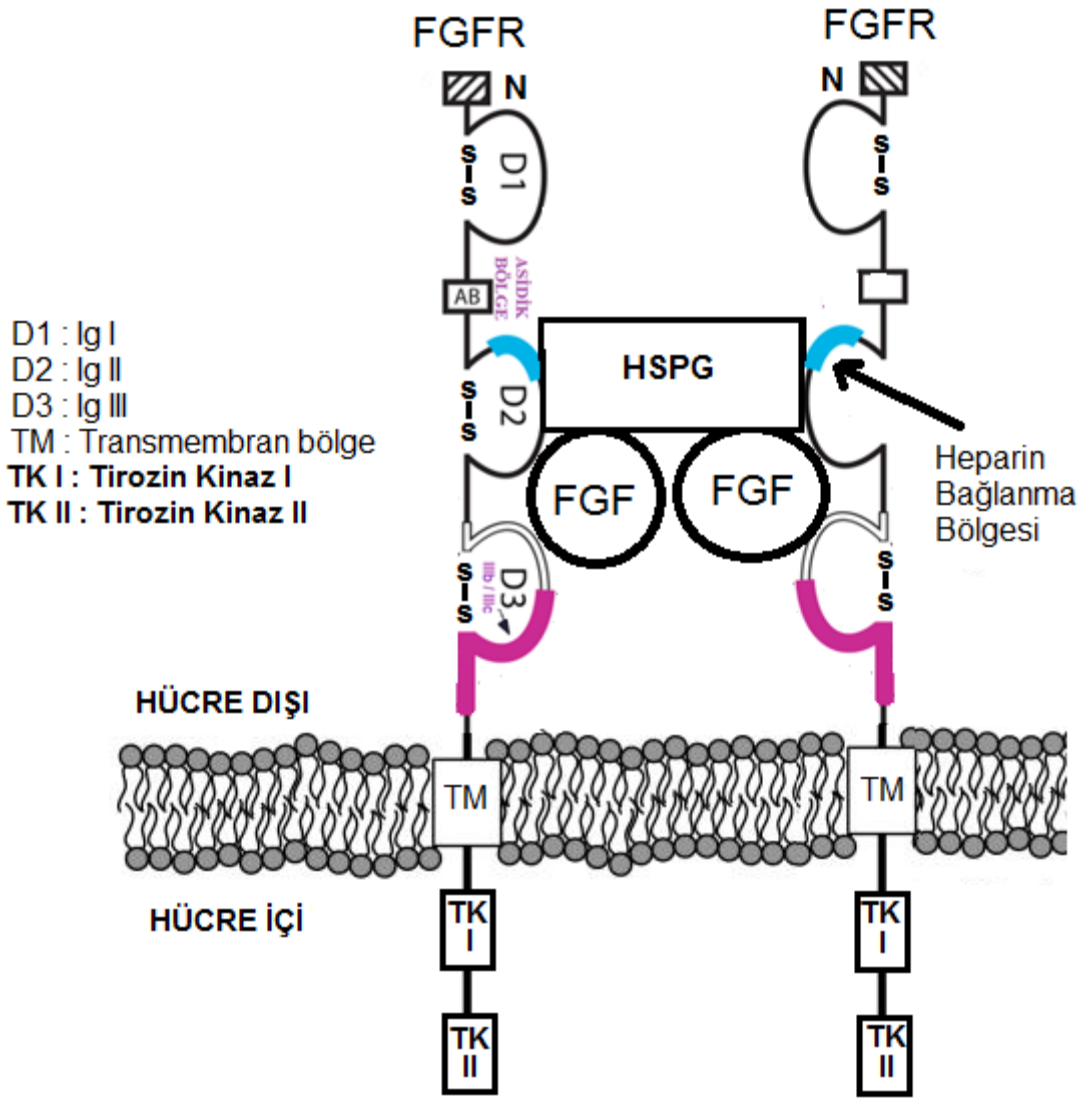
FGF ligandlarından FGF1 ve FGF2, 1975 yılında ilk olarak fare fibroblastlarında yapılan bir çalışmada belirlenerek, proliferasyonu arttırdıkları gösterilmiştir. Diğer FGF'ler ise diğer hücre tipleri için onkogenler ya da büyüme faktörleridir. Günümüze kadar FGF ailesinden 23 üye (FGF1-FGF23) tanımlanmıştır (30-33). FGF ailesi üyelerinin çoğu klasik sinyal molekülleridirler. FGF4 erken embriyonik dönemde 4 hücreli blastosist evresinde eksprese olan ilk üyedir (34). Ekstrasellüler matrikste ve hücre yüzeyinde bulunan Heparan Sülfat Proteoglikan (HSPG) molekülleri, FGF moleküllerinin aktivitesini ve özgüllüğünü belirleyici özelliğe sahiptirler ve bu işlemi otokrin ya da parakrin yolla yüksek afinite ve farklı derecedeki özellikleri sayesinde reseptördeki tirozin kinazlara bağlanarak yapmaktadırlar (31). Tüm FGF'ler, HSPG moleküllerinin bağlandığı, benzer olarak 28'i oldukça korunmuş amino asit rezidüsünü içeren bir kor bölgesi taşımaktadır. FGF'lerin moleküler ağırlığı omurgalılarda 17-34 kDa iken Drosophila'da 84 kDa'a kadar çıkabilmektedir (32-33, 35). FGF'ler ve onların reseptörleri FGFR'ler hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü, adhezyonu ve ölümü ile omurgalı organogenezi ve morfogenezinde önemli roller üstlenmektedir. FGF/FGFR sinyal yolağındaki değişikliğin, malforme/farklı şekilde kafatası oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir (36).

FGF/FGFR sinyali, BMP (*Bone morphogenetic protein*), MAPK (*Mitojen Aktivasyon Protein Kinaz*), Wnt (*Wingless-type MMTV integration site family*), Shh

(*Sonic hedgehog*) gibi diğerk sinyal yolaklarının dolaysız yada dolaylı olarak işlevini arttırabilmekte ya da azaltabilmektedir. Bu yolakların osteogenezin ve kondrogenezin düzenlenmesinde de rol aldıkları bilinmektedir (36-37). FGF/FGFR sinyal yolakları kafatası gelişiminde önemli bir yer tutmakta ve bu yolaklarda fonksiyonu olan çeşitli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile normal gelişim düzeninin bozulmasının *FGFR* ilişkili kraniyosinozlara neden olduğu gösterilmektedir (19, 36). Hayvan modelleme çalışmaları bu grup içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. FGFR/FGF sinyalinin aktivasyonunda sıklıkla iki ana yolak kullanılmaktadır. Bunlar, MAPK/ERK ve Protein Kinaz C (*PKC*) yolaklarıdır. Erk sinyal yolağının hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında kritik rolü ile MAPK/ERK sinyalindeki anormalliğin, çeşitli sendromik kraniyosinostozlara neden olduğu bildirilmektedir (17, 38).

Gebeliğin oluşumuyla FGF ve *FGFR*'ler, kraniyal sütürlerde eksprese olmaya başlamaktadırlar. FGF molekülleri hücre yüzeyinde ve ekstraselüler matrikste bulunabilen glikoproteinlerdir ve hücre yüzeyindeki HSPG'lerin FGF ligant reseptör etkileşiminde FGF'leri sıcaklığa, pH'a ya da protezlara bağlı yıkımdan koruyarak stabilize ettikleri bildirilmiştir (32, 34, 39). Bazı hormon benzeri FGF'lerin (FGF15/19, FGF21 ve FGF23) heparan bağlanma afinitesini azalttıkları ve metabolizmanın düzenlenmesinde rol aldıkları gösterilmiştir (31). FGF'ler *FGFR* gen ailesinin ligantıdır. Özellikle düşük afiniteli FGF2'nin heparan sülfat ile FGFR2'nin ligand bağlayıcı domainleri Ig II ve Ig III için çok özgün ve yüksek afiniteli bir kompleks oluşturdukları bildirilmiştir (30, 40). Örneğin FGFR2b/FGFR2c arasında FGF2 yüksek afiniteyle FGFR2c izoformuna bağlanmaktadır. Oysa FGF7/FGF10 gibi diğerk bazı FGF'lerin FGFR2b'ye özgünlük gösterdiği bildirilmektedir (39).

FGF, FGFR ve HSPG molekülleri arasındaki etkileşim ile reseptörün dimerizasyonunun gerçekleşebilmesi için, FGF moleküllerinin iki tanesi ile HSPG molekülleri aracılığıyla FGFR reseptörlerinden ikisi arasında bağlanma gerçekleşmektedir (Şekil 2) (39). Dimerizasyon ile hücre içinde yer alan tirozin kinaz domainlerinin otofosforilasyonu gerçekleşir. Reseptörün sinyal yolağı aktivasyonunu fosforilasyon ile oluşturduğu bildirilmiştir (33, 39).



Şekil 2: FGF, FGFR ve HSPG Etkileşim Bölgeleri

http://www.med.nyu.edu/mohammadi/LabPage/fgfr_mut.html sitesi ve (34)'den düzenlenerek kullanılmıştır

2.5. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör (*FGFR*) Gen Ailesi

Bu aile, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* ve *FGFR4* genlerini kapsamaktadır (41). Günümüzde *FGFR* ailesinden kraniosinostoz ile ilişkisi tanımlanmış genler, *FGFR1*, *FGFR2* ve *FGFR3*'dür. Bu genlerin ürünleri olan reseptörler sinyal yolağının önemli bir protein ailesini oluşturmaktadır (2, 6) ve FGF/FGFR sinyalinin kraniofasial iskeletide içine alan doku tipleri ve çoklu organ sistemlerinin normal gelişiminde rol oynadıkları düşünülmektedir (2, 6, 42). Bu reseptör ailesinin özgün domainleri; FGF'lere bağlanan, membran dışına uzanan ligand domaininde üç adet immunoglobulin benzeri domain (Ig I,

II ve III), heliks yapısında olan tek bir transmembran domaini ve hücre içine uzanan tirozin kinaz aktivitesi gösteren intrasellüler domaini vardır(2, 6, 30).

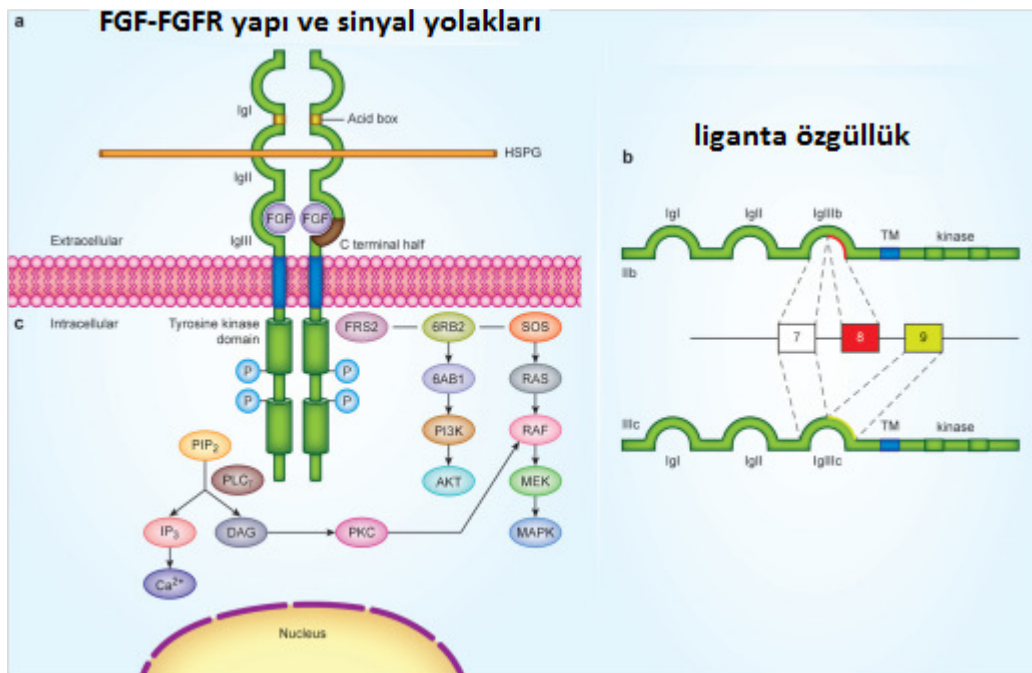
FGFR/FGF bağlanması kranial suture gelişimini ve füzyonunu çeşitli mekanizmalarla kontrol ettiği düşünülmektedir. Fonksiyon çalışmalarında, FGFR/FGF bağlanma sinyalinin, proteoblast/osteoblast farklılaşması kontrolü, farklılaşma, proliferasyon, migrasyon ve apoptozu kontrol ettiği bildirilmiştir (18, 25, 42). FGF sinyalinin Grb2/FRS2/Shp2 kompleksi ve MAP kinaz aktivasyonu ile osteoblast proliferasyonu ve farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir (43).

FGFR2 genindeki heterozigot mutasyonlar, genetik kökenli tüm kraniosinostozların yaklaşık %32'sinden, *FGFR3* %25'inden sorumlu iken *FGFR1*'nin çok daha nadir bir etken olduğu bildirilmektedir (39). *FGFR1-3*'de mutasyonları büyük çoğunluğu genin Ig II ve Ig III, bölgelerinde yer almaktadır (2). Kraniosinostoz olgularındaki genetik çalışmalar, FGFR mutasyonlarının çoğunun reseptör dimerizasyonu, ligand bağlanma aktivitesi, reseptör kinazın aktivasyonunu arttıran mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (30, 44).

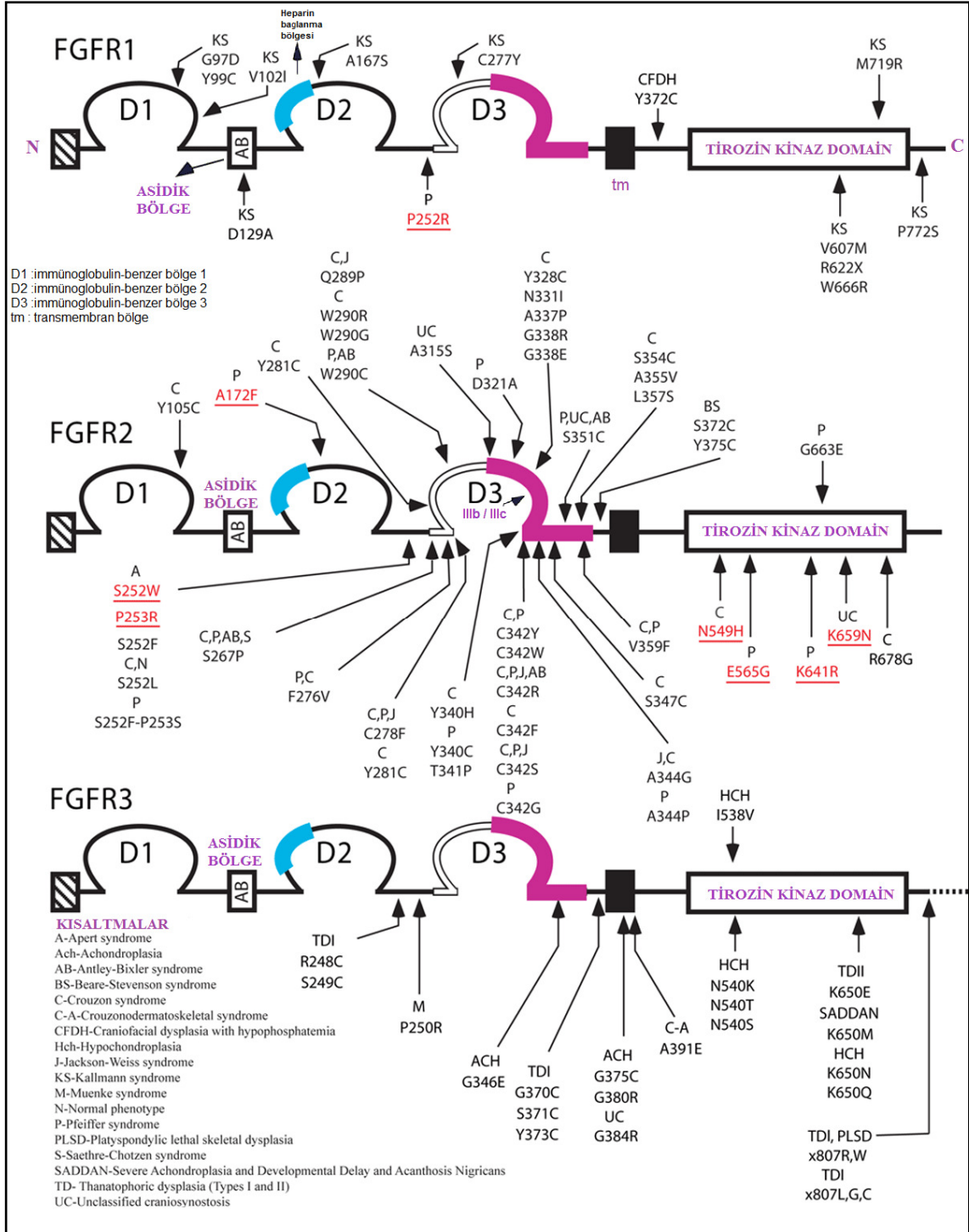
FGFR'deki fonksiyon kazanım mutasyonları, iki kategoride değerlendirilmektedir. Bunlar, ligand bağımsız ve liganda bağımlı fonksiyon kazanımı olarak belirtilmektedir. Ligand bağımsız aktivasyon mutasyonları üç olası mekanizmayla açıklanmaktadır; (i) Reseptördeki Ig domainin destabilizasyonu veya sistein rezidülerinin kazanımı ya da kaybından dolayı yan zincirleri arasında oluşan disülfid bağlarının formasyonu reseptör dimerizasyonu ile sonuçlanması, (ii) nötral ya da yüklü amino asit değişimi ile sonuçlanan yanlış anlamlı mutasyonların, membran içindeki farklı hidrojen bağlarının oluşumuna ve dimerizasyona yol açmasına neden olması, (iii) mutasyonun kinaz domainindeki enzimatik aktiviteyi yeniden düzenlemesiyle, fonksiyon kazanım mutasyonlarının oluşması. Liganda bağımlı mekanizmada ise, FGF ligandına ihtiyaç duyulmaktadır (39).

FGFR'lerin izoformlarının oluşumunda, D3 bölgesindeki (Ig IIIa, Ig IIIb ve Ig IIIc) alternatif kırılma mekanizmasının rolü olduğu bildirilmektedir(25). Hücre dışı D1 ve D1-D2 bağlantı bölgeleri ile hangi domain yapısının olgun reseptörü oluşturacağı belirlenmektedir. D3 bölgesinde gerçekleşen alternatif kırılma ile D3 bölgesinin ilk yarısında bulunan ekzonik alanda ortak olan IIIa, ikinci yarısındaki ekzonik alanda ise iki izoformdan (IIIb ve IIIc) biri oluşmaktadır. Bu izoformların eksprese oldukları

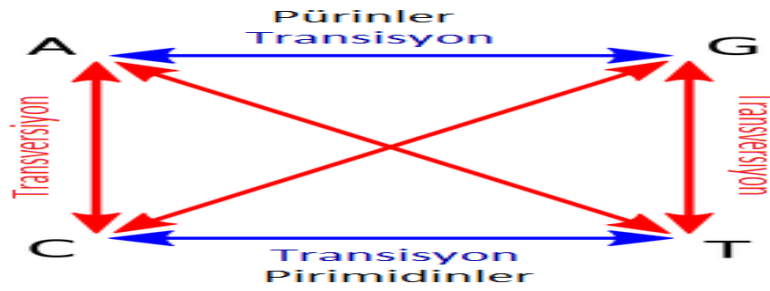
dokular FGF'yi bağlama özelliğine göre farklı dokulardır. Doku spesifik durumu açıklayan çalışmalar, b izoformunun epitelial hücelere, c izoformunun ise mezenkimal hücelere sınırlı olduğunu göstermektedir. Farklılaşmanın HSPG yapısının ve FGF sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde rolü olduğu belirtilmektedir (33-34, 39). FGFR2b izoformu FGF7 ve FGF10 ile etkileşime girerken, FGF 2, 4, 6, 8 ve 9 ise FGFR2c izoformu ile etkileşime girmektedir (25, 45). Şekil 3 ve Şekil 4'de FGFR protein yapısı, sinyal yolağı ve patolojik yanlış anlamlı mutasyonların gösterimi yapılmıştır. Şekil 5'te ise purin, pirimidin ve birbirlerine etkileşimleri gösterilmiştir.



Şekil 3: FGF-FGFR yapısı ve sinyal yollarının gösterimi (44)



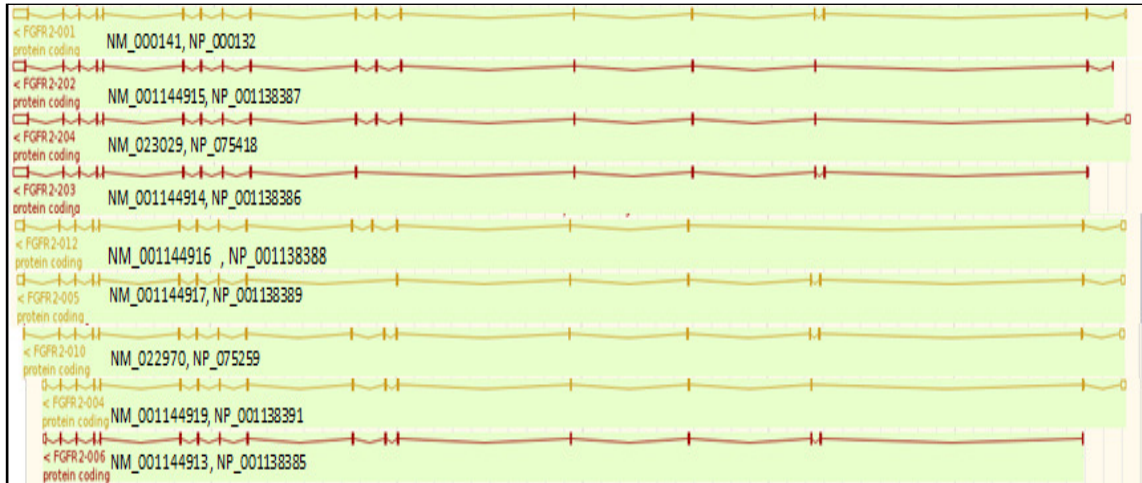
Şekil 4: FGFR protein yapısı ve patolojik yanlış anlamlı mutasyonların gösterimi
(Şekil http://www.med.nyu.edu/mohammadi/LabPage/fgfr_mut.html sitesinden düzenlenerek kullanılmıştır)



Şekil 5 : Pürin ve Primidinler ve birbirlerine değişimlerinin gösterimi
<http://rosalind.info/glossary/transitiontransversion-ratio/> sitesinden düzenlenmiştir.

2.5.1. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör 2 (*FGFR2*) Geni

FGFR2 (MIM# 176943) geni 10q26.13 bölgesinde yerleşik ve ters iplikçikten transkribe olan 18 ekzonlu bir genidir ve ilk ekzonu kodlama yapmamaktadır. Ensemble veri tabanında 9 kodlayan transkript varyantı bulunduğunu gösterilmektedir (şekil 6) (46). En büyük transkriptin (NM_000141.4) boyu 4.255 bç ve kodladığı proteinin (NP_000132.3) boyu 821 aa'dır (41, 47).



Şekil 6: *FGFR2* geninin 'http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/' de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları.

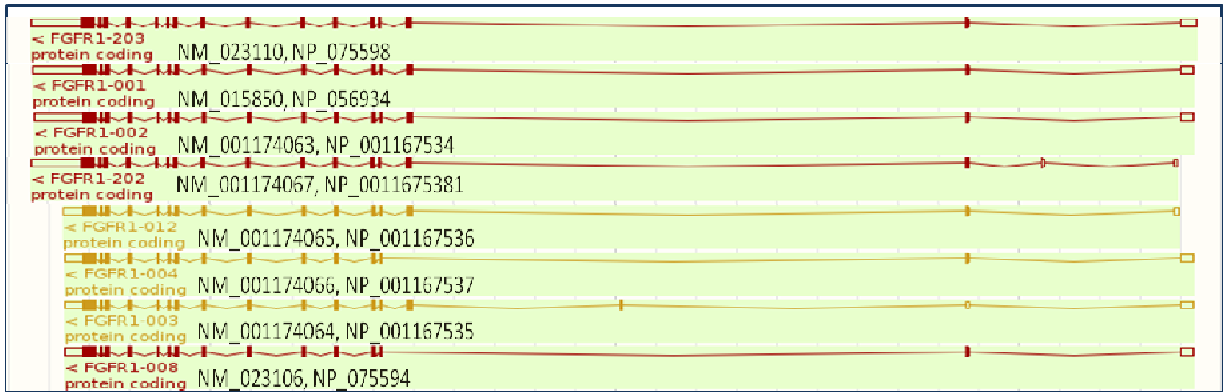
FGFR2/FGF ve HSPG moleküllerinin köprü kurarak bağlanmasıyla kompleks bir yapı oluşmaktadır. Bu yapı reseptörün dimerizasyonu, tirozin otofosforilasyonu ve hedef substratın fosforilasyonu gibi işlemlerin gerçekleşmesini sağlar. Bu yolağın aktivasyonunun hücre büyümesini düzenlediği, farklılaşma, embriyogenez ve angiogenezi etkilediği bildirilmiştir (30). Reseptör tirozin moleküllerinin otofosforilasyonu ile kendi yapısında Src homoloji2 (*SH2*) domain gibi sinyal proteinlerinin bağlanma bölgelerinin oluşumunu sağlamaktadır. Bu bağlanmanın ERK1/2 - MAPK yolağı aktive ederek, osteoblast farklılaşması gerçekleştirdiği

bildirilmiştir (30, 48-49). Şekil 4'te *FGFR2* geni ile ilişkilendirilmiş olan mutasyonlar gösterilmektedir.

2.5.2. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör 1 (*FGFR1*) Geni

FGFR1 (MIM# 136350) geni 8p11.23-p11.22 bölgesinde yerleşik ve ters iplikçikten transkribe olan 18 ekzonlu bir gendir. Genin ilk ekzonu kodlama yapmamaktadır. Ensemble veri tabanında kayıtlı görülen 8 kodlayan transkript varyantı bulunmaktadır (şekil 7) (46). En büyük transkriptin (NM_023110.2) boyu 5.900 bç ve kodladığı peptit uzunluğu (NP_075598.2) 822 aa'dır. Bu gendeki mutasyonlar, Trigonosefali, Pfeiffer sendromu ve Jackson-Weiss sendromu gibi çeşitli kraniyosinostoz tipleri ile ilişkilendirilmiştir (50-51).

FGFR1'de gösterilen heterozigot c.755C>G (p.Pro252Arg, p.P252R) mutasyonu Pfeiffer sendromu tip1 ile ilişkilendirilmiştir (52). *FGFR1*'deki heterozigot p.Pro252Arg mutasyonu ile *FGFR2*'de Apert sendromu ve *FGFR3*'te Muenke sendromu'na neden olan mutasyonlar eş pozisyondadır (2). *FGFR1*'in endotelial hücrelerde migrasyon ve proliferasyon fonksiyonu vardır (48). Şekil 4'te *FGFR1* geni ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar gösterilirken, şekil 7'de *FGFR1* geninde tanımlanmış kodlayan transkript varyantların gösterimi yapılmaktadır



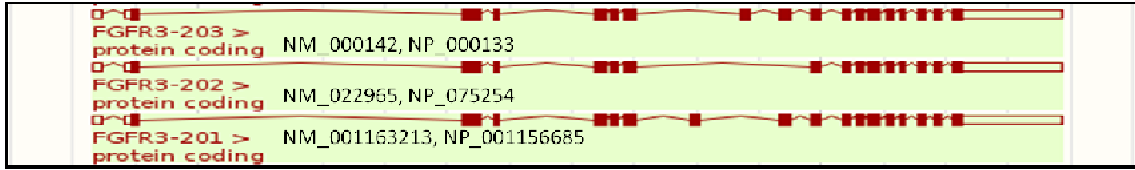
Şekil 7: *FGFR1* geninin 'http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/' de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları

2.5.3. Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör 3 (*FGFR3*) Geni

FGFR3 (MIM# 134934) geni 4p16'de yerleşik bir gendir. 18 ekzonlu bir gendir ve ilk ekzonu kodlama yapmamaktadır. Ensemble veri tabanında üç kodlayan transkript varyantı bulunduğu gösterilmektedir (şekil 8) (46). En büyük transkriptin (NM_001163213) boyu 4.293 bç ve kodladığı peptit uzunluğu (NP_001156685) 808 aa'dır.

Bu genin mutasyonları Crouzon sendromu'nun acanthosis nigricans ile giden tipinden, Muenke sendromundan ve akondroplazi, hipokondroplazi, tanatoforik displazi gibi çeşitli iskelet displazilerinden sorumludur (53-54).

FGFR3 genindeki mutasyonların kemik gelişimini endokondral osifikasyon ile etkilediği bildirilmiştir (54). Şekil 4'te *FGFR3* geni ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar gösterilirken, Şekil 8'de *FGFR3* geninde tanımlanmış kodlayan transkript varyantların gösterimi yapılmaktadır.

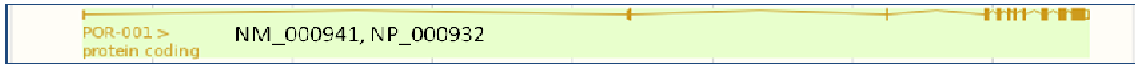


Şekil 8: *FGFR3* geninin 'http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/' de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları

2.5.4. Sitokrom P450 Oksidoredüktaz (*POR*) Geni

POR (MIM# 124015) geni, kromozomda 7q11.23 yer alan 16 ekzonlu bir gendir ve ilk ekzonu kodlama yapmamaktadır. Ensemble veri tabanında bir kodlayan transkript varyantı bulunduğu gösterilmektedir (şekil 9) (46). Transkriptin (NM_000941) boyu 2.522 bç ve kodladığı peptit uzunluğu (NP_000932) 680 aa'dır (46, 55).

P450 enzimleri iki tiptedir. İnsan genomunda P450 enzimi için 57 gen bulunmaktadır. Bu genlerin 50'si mikrozomal P450 yi kodlamakta ve 15'i hepatik ilaç metabolizmasında, 20'si kolesterol, steroid hormonları, yağ asitleri ve eikozanoid (eicosanoid) biyosentezinde rol oynamaktadır. 15'inin fonksiyonları ise tam bilinmeyen nadir (orphan) enzim sentezinde yer almaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *POR* geninde saptanan mutasyonlar ile kraniyosinostoz sendromlarından Antley-Bixler sendromu ilişkilendirilmiştir (8, 56).



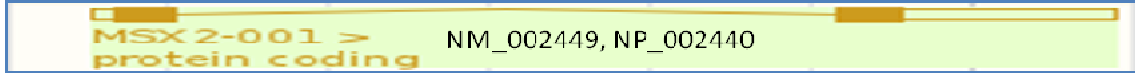
Şekil 9: *POR* geninin 'http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/' de tanımlanmış kodlayan transkript varyantı

2.5.5. MSH Homeobox 2 (*MSX2*) Geni

MSX2 (MIM#123101) geni, kromozomda 5q35.2'de yerleşik, iki ekzonlu bir gendir. Ensemble veri tabanında bir kodlayan transkript varyantı bulunduğu

gösterilmektedir (şekil 10) (46). Transkriptin (NM_002449) boyu 2.241 bç ve kodladığı peptit uzunluğu (NP_002440) 267 aa'dır (57-58).

Kraniyosinostoz ile ilişkili olduğu ilk saptanan gen *MSX2* dir ve *MSX2* genindeki c.443C>A (p.Pro148His) mutasyonu Kraniyosinostoz tip 2 ile ilişkilendirilmiştir. Bugüne kadar sadece tek bir ailede gösterilebildiğinden, sendrom ile ilişkisinin çok nadir olduğu düşünülmektedir (2, 6).



Şekil 10: *MSX2* geninin 'http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/' de tanımlanmış kodlayan transkript varyantı

2.5.6. Twist Family bHLH Transcription Factor 1 (*TWIST1*) Geni

TWIST1 (MIM#601622) geni kromozomda 7p21.1 yerleşik ve ters iplikçikten transkribe olan bir gendir. Gen iki ekzonludur ve kodlayan dizi birinci ekzondur. Ensemble veri tabanında bir kodlayan transkript varyantı bulunduğu gösterilmektedir (şekil 11) (46). Transkriptin (NM_000474) boyu 1.666 bç ve kodladığı peptit uzunluğu (NP_000465) 202 aa'dır (59-60).

Bu gendeki mutasyonlar, Kraniyosinostoz tip 1, Akrosefalosindaktili 3 ve Saethre-Chotzen sendromu ile ilişkilendirilmiştir (60). *TWIST1*'deki mutasyonlar daha çok genin *helix-loop-helix* domain kodlayan bölgesinde saptanmaktadır (2, 6). Çalışmalar, *TWIST1*'in *FGFR*'lerin ifade edilmelerini düzenleyen sütürlerin normal kapanmasında rolü olabileceğini göstermiştir (61).

TWIST1 geni FGF/FGFR kaskatı ile etkileşime girmektedir. Son zamanlarda çalışmalar *TWIST1*'in C terminal domaininin (aminoasit 183-202 arası) Runx2 yolağı üzerinden osteoblast farklılaşmasında da önemli rol üstlendiğini göstermiştir (14).



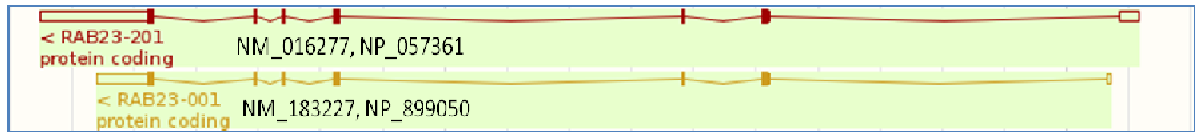
Şekil 11: *TWIST1* geninin 'http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/' de tanımlanmış kodlayan transkript varyantı

2.5.7. Rab23, member Ras Oncogene Family (*RAB23*) Geni

RAS onkogen ailesinden olan *RAB23* (MIM# 606144) geni kromozomda 6p11.2'de yerleşik olan ve ters iplikçikten transkribe olan bir gendir. *RAB23*, 8 ekzonlu bir gen olup ilk iki ekzonu kodlanma yapmamaktadır. Ensemble veri tabanında iki

kodlayan transkript varyantı bulunduğu gösterilmektedir (şekil 12). En büyük transkriptin (NM_016277) boyu 4.837 bç ve kodladığı peptit uzunluğu (NP_057361) 237 aa'dır (62-63).

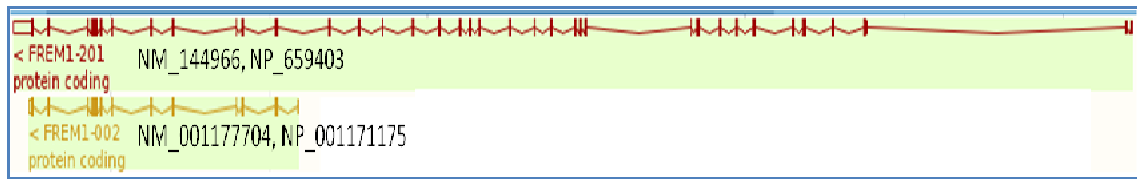
Rab proteinleri, Ras süper ailesinden hücre membranı trafiğinde çok önemli olan küçük GTPaz'lardır. RAB23 geni, Sonic hedgehog (SHH) sinyal yolağı için negatif düzenleyicileri kodlar. kraniyosinostoz sendromlarından Carpenter sendromu ile ilişkilendirilmiştir (9, 62).



Şekil 12: *RAB23* geninin 'http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/'de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları

2.5.8. FRAS1 Related Extracellular Matrix 1(FREM1)

FREM1 (MIM#608944) geni, kromozomda 9p22.3'de yerleşik ve ters iplikçikten transkribe olan bir genidir. *FREM1*, ikisi kodlamayan toplam 38 ekzondan oluşan bir genidir. Ensemble veri tabanında iki kodlayan transkript varyantı bulunduğu gösterilmektedir (şekil 13). En büyük transkriptin (NM_144966) boyu 10.086 bç, ve kodladığı protein (NP_659403) 2.179 aa uzunluğundadır (64-65). Non-sendromik trigonosefali ile ilişkilendirilmiştir (10). Çalışmalar, *FREM1* geninin kraniyal sütür gelişiminde rol aldığını göstermektedir (10, 65).



Şekil 13: *FREM1* geninin 'http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/'de tanımlanmış kodlayan transkript varyantları

2.6. Klasik Kraniyosinostoz Sendromları

Klasik kraniyosinostoz sendromlarından bazıları aşağıda yer almaktadır.

2.6.1. Apert Sendromu (AS) (Akrocefalosindaktili, Tip 1, ACS1)

Sendrom ilk olarak, Wheaton tarafından 1894 yılında, iki Apert sendromlu olgunun kraniyofasiyal kafa, kol ve bacak bulguları ile tanımlanmıştır. Ancak, Dr. Eugene Charles Apert'in 1906 yılındaki, dokuz olguluk bir seri çalışmasına

dayandırılmakta ve adını buradan almaktadır. OMIM#101200 numaralı Apert sendromu akrosefalosindaktili olarak tanımlanmış olup, el ve ayaklarda sindaktili, brakisefali, hipertelorizm, yüzün alt üçte birinde hipoplazi/orta yüzde hipoplazi, düzensiz yerleşimli dişler, gaga burun, çeşitli mental retardasyon bulguları, böbrek ve kalp anomalileri ile tanımlanan bir sendromdur (66-68). Bikoronal sinostoz ve el ve ayaklarda bilateral simetrik kompleks sindaktili görülebilmektedir. Ayrıca yarık damak ve öğrenme zorluğu diğer bulgular arasında sayılmaktadır (2, 11). Bazı çalışmalarda sendrom, sindaktili birlikteliği olan olgu grubuna tipik akrosefalosindaktili, sindaktili görülmeyen gruba ise atipik akrosefalosindaktili denilerek gruplandırılmıştır (69). El ve ayaklardaki simetrik sindaktili 3 tipe ayrılmaktadır. Tip 1’de, 2, 3 ve 4’cü parmaklar birleşik 1 ve 5’inci parmaklar ayırık, tip 2 de, 2, 3, 4 ve 5.ci parmaklar birleşik 1 ayrı, tip 3 de ise tüm parmakları içeren sindaktili görülmektedir (68).

Apert sendromu otozomal dominant kalıtım gösterir. Olguların çoğu *de novo* mutasyonlarla ortaya çıkar. Bu sendromun, kraniyosinostoz tanısı alan olguların yaklaşık %4,5’uğunu oluşturduğu bildirilmektedir (70). Görülme sıklığı canlı doğumlarda 1/65000 dir. İleri baba yaşı ile sıklığının arttığı gösterilmiştir (11, 67, 71). FGF/FGFR yolağı, spermatogenez başlangıcı ve sürdürülebilirliğinde önemli rol oynamaktadır. *FGFR2* mutasyonunun spermlerin bu sürecinde avantaj sağladığı bildirilmiştir (6, 71).

Apert sendrom’lu olguların %98’inde *FGFR2* geninde mutasyon saptanmaktadır. Özellikle iki nükleotid bölgesindeki değişimler sendromla ilişkilendirilmiştir. Saptanan nükleotid bölgesi değişimleri ve spesifik yanlış anlamlı mutasyonlar; c.755C>G (p.Ser252Trp, p.S252W) (%66) ya da c.758C>G (p.Pro253Arg, p.P253R) (%32)’dir (2, 49). p.Ser252Trp mutasyonu bazı olgularda yarık damakla giden daha ağır kraniyofasiyal fenotiple ilişkilendirilirken, p.Pro253Arg mutasyonu ile daha çok ağır sindaktili ile karakterizedir. p.Ser252Trp mutasyonu taşıyan ve hafif sindaktili bulgusu olan bir olgunun Apert sendromu’ndan daha çok Pfeiffer sendromu fenotipi ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (25).

2.6.2. Crouzon Sendromu (CRS) (Kraniyofasiyal Dizostozis)

İlk kez 1912’de Crouzon tarafından bir ailede tanımlanmıştır (72). Otozomal dominant kalıtım gösterir (OMIM #123500) (73-74). Olgularda karakteristik bir yüz görünümü (kruzonoid yüz görünümü), hipertelorizm, orta yüz hipoplazisi, proptozis, el

ve ayakların normal olması, belirgin kemerli burun ve ağızda diş yerleşiminde karışıklık görülebilmektedir. Ayrıca koronal, sagittal ve lambdoid sütürlerin erken kapanması sonucu brakisefali ve akrosefali görülebilmektedir (6, 73-74). Brakisefalik kafa yapısı en sık görülen deformitedir; bu duruma bilateral koronal sütürlerin erken kapanması sebep olmaktadır (16). Dismorfik özelliklerin derecesine göre yenidoğan veya infant döneminde tanı konabilmekte (75), durumun artmış paternal yaş ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (71, 73).

Crouzon sendromu, kraniyosinostoz tanısı alan olguların yaklaşık %4.8'ini oluşturmakta ve 1/60.000 canlı doğumda bir görülmektedir (73, 76). Crouzon sendromlu olguların yaklaşık %95'inde mutasyonların *FGFR2* geninde ekzon 7 ve 8'de (Ig IIIa ve IIIc domainini kodlayan bölgeler) saptandığı bildirilmektedir (76).

2.6.3. Akantosis Nigrigans Birlikteliği İle Crouzon Sendromu (CAN) (Crouzodermoskeletal Sendrom)

CAN sendromu (OMIM #612247), Cohen tarafından 1999'da *Crouzodermoskeletal* sendrom olarak isimlendirilmiştir. Fenotiplerin ve ilişkili genlerin farklı olması nedeniyle Crouzon sendromu'ndan ayrılmaktadır. Bu durumu açıklamak için iki ana sav ileri sürülmüştür. Birincisi, krouzonoid fenotip ile kütanoz iskelet bulgularını ve vertebral değişimlerini vurgulamaktadır. İkincisi ise bu sendrom ile ilişkili *FGFR3* genindeki yanlış anlamlı bir mutasyonun c.1172C>A (p.Ala391Glu, p.A391E) sendroma neden olduğunu açıklamaktadır (77).

Krouzonoid fenotipte iskelet bulgularına ek olarak aşağı çekik palpebral fissürler, ekzoftalmus, oküler hipertelorizm, orta yüz hipoplazisi görülmektedir. Crouzon sendromu'ndan fark işitme kaybı ve mental retardasyonun daha az sıklıkta gözlenmesidir (78).

2.6.4. Pfeiffer Sendromu (PS) (Akrosefalosindaktili Tip 5 ACS5)

1964 yılında Rudolf Pfeiffer tarafından tanımlanan, otozomal dominant kalıtım modeli gösteren Pfeiffer sendromu'nun (MIM#101600) prevalansı 1/100.000 olarak bildirilmektedir (79). Moleküler çalışmalarla *FGFR1* Ig II-III bağlantı bölgesinde c.755C>G (p.Pro252Arg, p.P252R) ve *FGFR2* genlerindeki *de novo* mutasyonlarla ilişkilendirilmiş, baba yaşının ileri olmasının sendrom için risk oluşturduğu belirtilmiştir. *FGFR2* genindeki 40'dan fazla farklı heterozigot mutasyonun Pfeiffer sendromu'na neden olduğu rapor edilmiştir (80). Pfeiffer sendromu genellikle geniş, radyale deviye el

ve ayak parmakları ve/veya büyük ayak baş parmağı, çeşitli sindaktililer, orta yüzde deformite ve brakisefali ile giden nadir bir sendromdur. Koronal sinostoz ve/veya sagittal sinostoz, düşük nazal köprü, maksiller hipoplazi, hipertorizm, proptozis gibi bazı klinik bulgularda bildirilmektedir (2, 6, 12, 66, 81-82). Bu sendrom klinik olarak 3 alt tipte değerlendirilmektedir.

2.6.4.1. Pfeiffer Sendromu Tip 1

Klasik Pfeiffer sendromu olarak tariflenir. Genelde iyi seyirlidir ve zeka gelişimi normaldir. Kraniosinostoz, brakisefali, orta yüzde hipoplazi, kısa ve geniş el ve ayak parmaklar, geniş büyük başparmak ve çeşitli sindaktililer görülmektedir (2, 6, 82).

2.6.4.2. Pfeiffer Sendromu Tip 2

Genellikle ağır klinik bulgular gösterir ve mortalitesi yüksektir. Tip2’de tüm sütürler sinostozu uğrayabilir ve yonca yaprağı (*cloverleaf skull*) kafatası oluşabilir. Ayrıca el ve ayak parmaklarında sindaktili, anomaliler görülebilir. Dirseklerde ankilozis (dirsek eklemi) gibi bazı bulgular saptanabilir (2, 6, 66, 82).

2.6.4.3. Pfeiffer Sendromu Tip 3

Yonca yaprağı kafatası görülmemesi ile tip 2 den ayrılmaktadır. Ağır proptozis görülebilir ve çeşitli viseral malformasyonlar gibi klinik belirtiler görülebilir (82).

2.6.5. Saethre Chotzen Sendromu (SCS)(Akrocefalosindaktili Tip 3;ACS3)

SCS (OMIM #101400)’un görülme sıklığı 1/25000-1/50000’dir ve otozomal dominant kalıtım gösterir (83-84). SCS, uni ya da bilateral koronal sinostoz, hipertelorizm, düşük frontal saç çizgisi, maksiler hipoplazi, fasiyal asimetri, pitoz, anormal kulak görünümü (belirgin krus’u olan küçük kulak kepçesi), elde ikinci ve üçüncü parmakların sindaktilisi görülebilmektedir. Büyük gen delesyonu mutasyonu dışındaki mutasyonlarda bilişsel fonksiyonun normal olduğu bildirilmiştir (2, 6, 14, 84). SCS’da akrocefali ya da brakisefali, çeşitli vertebral anomaliler görülebilir. Bazı olgularda metopik sütür sinostozu (trigonosefali) görülürken, daha az oranda sagittal sütür sinostozu da görülebilir. Sendrom, *TWIST1* ve *FGFR3* genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (84). SCS’da mutasyonların büyük çoğunluğu (yaklaşık %68) *TWIST1*’de “*helix-loop-helix*” (b-HLH) domain kodlayan bölgelerde saptanmaktadır (14, 85)

2.6.6. Muenke Sendromu (MUS)(MNKES)

Otozomal dominant kalıtım gösteren bu sendromun (OMIM #602849) alternatif isimlendirmesi “Muenke non-sendromik koronal kraniyosinostoz” dur ve doğumdaki oranı 7,6/1.000.000 olarak bildirilmektedir. *FGFR3* geninde saptanan mutasyonlarla özellikle c.749C>G (p.Pro250Arg, p.P250R) ile ilişkilendirilmektedir. Klinik bulgular; uni ya da bikoronal sinostoz, makrosefali, orta yüz hipoplazisi ve gelişme geriliği, brakidaktili, sağrılık ve karpal/tarsal kemik füzyonu olarak sıralanmaktadır (86).

2.6.7. Carpenter Sendromu (CRPT1)

1909 yılında Carpenter tarafından tarif edilen ve otozomal resesif kalıtım gösteren nadir bir sendromdur (MIM #201000). 6p11.2 de yer alan *RAB23* genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilen ve akrosefalosindaktili tip 2 olarak da isimlendirilen sendromda, sagittal, lambdoid, koronal ve metopik sütürlerin sinostozları görülebilmektedir. Ellerde sindaktili ile birlikte brakidaktili, ayakta preaksiyal polisindaktili ve sindaktili, konjenital kalp anomalileri, zeka geriliği görülebilmektedir (9, 87).

Tablo 2’de çeşitli kaynaklardan düzenlenen kraniyosinostoz sendromlarının tanımlandığı yılı, etkilenen sütürleri, ilişkilendirilmiş genlerle ilgili genel bilgiler bulunmaktadır (28, 88-89).

Tablo 2: Çeşitli kraniyosinostoz sendromları ile ilgili kalıtım, tanımlandığı yıl, etkilenen sütürler, ilişkilendirilmiş genler, mutasyon tipleri ve yolak bilgileri (28, 88-89).

Sendrom	Eş isim	Görülebilir bazı Semptomlar ve bulgular	Kalıtım	Yıl	Etkilenen sütürler	İlişkilendirilmiş gen/genler	Mutasyon Tipi – Yolak/Fonksiyon
Antley Bixler Sendromu	Yok	Crouzon a benzer ayrıca, koanal atrezi ve stenoz (darlık), çoklu ekstremitte anomalileri	OR	1975	Çeşitli; Koronal, Sagittal	<i>POR</i>	Fonksiyon kaybı / Retionik asit metabolizması
Apert Sendromu	Akrosefalosindaktili tip 1	El ve ayaklarda sindaktili, brakisefali, hipertelorizm, yüzün alt üçte birinde hipoplazi/orta yüzde hipoplazi	OD	1906	Çeşitli; Koronal, Sagittal ve Lambdoidal	<i>FGFR2</i>	Artmış ligand afinitesi / FGF
Carpenter Sendromu	Akrosefalosindaktili tip 2	Mental gerilik, kalp ve ekstremitte anomalileri, kısa boy, obezite, çeşitli sindaktiller	OR	1909	Çeşitli; Koronal, Metopik, Sagittal ve Lambdoidal	<i>RAB23</i>	Fonksiyon kaybı/SHH***
Crouzon Sendromu	Kraniyofasiyal dizostozis	Karakteristik bir yüz görünümü hipertelorizm, orta yüz hipoplazisi, proptozis	OD	1912	Çoklu sütür; daha çoğunlukla Koronal	<i>FGFR2, FGFR3</i>	Aktivasyon düzenleyen/FGF -
Muenke Sendromu	FGFR3 ilişkili Kraniyosinostoz	Koronal sinostoz, el veya ayakta iskelet anomalileri, işitme kaybı	OD	1997	Unilateral ya da bilateral koronal sinostoz	<i>FGFR3</i>	Artmış ligand afinitesi / FGF
Pfeiffer Sendromu	Akrosefalopoli sindaktili tip5	Geniş kısa el başparmakları ya da büyük ayak başparmakları, el veya ayak parmaklarında sindaktili	OD	1964	Çoklu ve çeşitli; daha çok koronal	<i>FGFR1, FGFR2</i>	Artmış ligand afinitesi / FGF ve Aktivasyon düzenleyen/FGF
Saethre Chotzen Sendromu	Akrosefalosindaktili tip 3	Fasiyal asimetri, düşük frontal saç çizgisi, pitoz, el veya ayak parmaklarında sindaktili, geniş büyük ayak baş parmakları	OD	1931, 1933	Koronal Sütür(ler) (bazen unilateral)	<i>TWIST1</i>	Fonksiyon kaybı/ TWIST

OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif, SHH: Sonic Hedgehog

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yürütüldü. Bu çalışmaya 1990-2014 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD Tıbbi Genetik polikliniğinde sendromik veya non-sendromik kraniyosinostoz tanısı alan, kromozom anomalilerinin dışlanmış olduğu toplam 40 olgu ile mutasyon saptanan olguların ulaşılabilen 34 aile bireyi dahil edildi.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (28.08.12 tarih ve 1374 sayı). Çalışmaya dahil edilen olgu ve aile bireylerinden bilgilendirilmiş onam alındı.

3.1.1. Sendromik ve Non-sendromik Kraniyosinostoz Olgularında Klinik İncelemeler

Klinik muayenede kraniyofasiyal ve ekstremitte anomalileri görülen olgularda, kraniyal manyetik rezonans ve kraniyal üç boyutlu bilgisayarlı tomografi incelemeleri ile malformasyonlar ve etkilenen sütürlerin karakterizasyonu gerçekleştirildi. Olgular, klinik değerlendirme ile sendromik veya non-sendromik olarak sınıflandırıldı. Sendromik veya nonsendromik kraniyosinostoz olgularında ilgili genler ve hedef bölgeleri belli bir akış şemasına uygun olarak çalışıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. DNA Eldesi

DNA izolasyonları, steril 2 ml K₃EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden özgün kit (solüsyon / manyetik boncuk bazlı sistemle) kullanılarak, firma protokollerine uygun olarak yapıldı (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche11667327001 / Magnapure Large Volume KIT, Roche03730972001).

3.2.2. DNA kalite araştırması

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin konsantrasyonları (ng/μl) ve kalite değerleri (A_{260/280}) (1,80 - 1,89) spektrofotometrede ölçülerek kayıt edildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). DNA miktarı her olgu için 10 mg olacak şekilde standartizasyon yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmasında kullanılacak DNA miktarı reaksiyon başına 200 ng/μl'ye ayarlandı. Bazı olgu DNA'larında, konsantrasyonları istenilen aralıkta olmaması, PZR reaksiyonunda

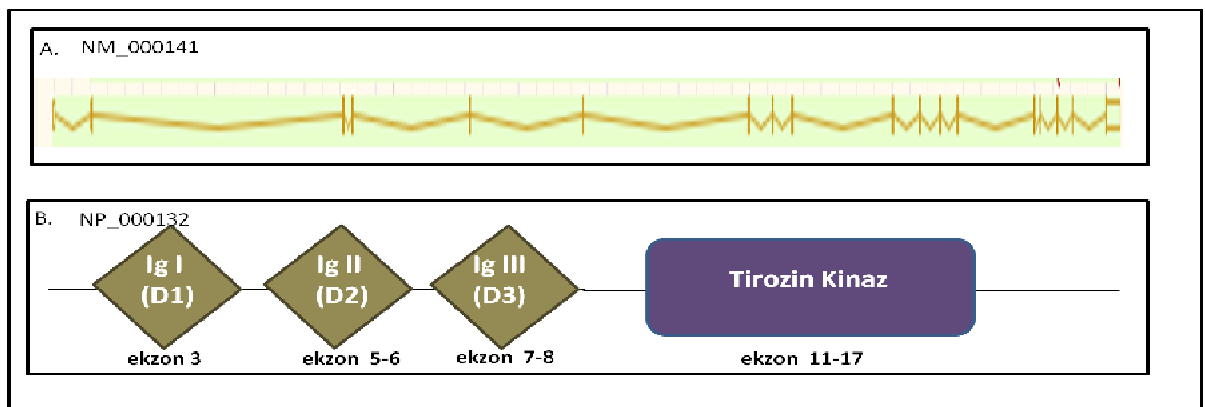
çalışmaması veya DNA’da kirlilik bulunması gibi nedenlerden dolayı alkol çöktürme işlemi yapıldı ve tekrar saflaştırıldı. Kalite değerleri spektrofotometrede ölçüldü ve kayıt yapıldı.

3.2.3. DNA’nın Ethanol kullanılarak çöktürme işlemi

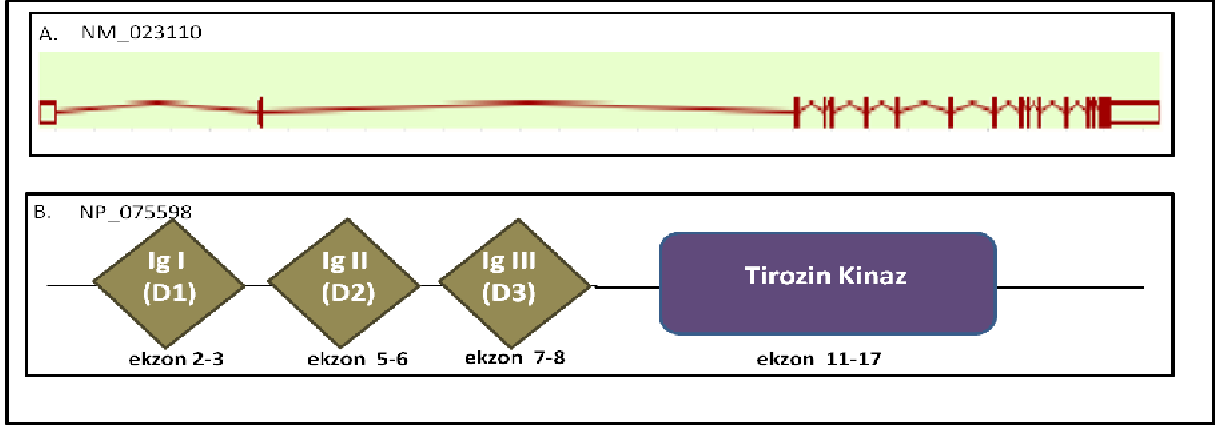
Alkol çöktürmesi uygulanacak DNA’nın 50 µl’si, 0,5 µl’lik tüplere (Axygen) alındı. üzerine 160 µl Ethanol absolut (Sigma; Reiedel-de Haen 32221), 5,5 µl Sodyum Asetat (1/10 oranında 3M, pH 5,2) ve 1,5 µl glikojen ilave edildi. Tüp içindeki karışımla 15 dak. Oda ısısında bekletildi. 13000 rpm’de 30 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı atıldı ve 300 µl %70lik ethanol eklendi. 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj gerçekleştirildi. Tüp içerisindeki sıvı atıldı ve alkol tamamen uzaklaşana kadar beklendi. Tüpe 50 µl TE tamponu / dH₂O eklendi (90) ve Kalite değerleri spektrofotometrede ölçüldü ve kayıt yapıldı.

3.2.4. Aday gen ve hedef bölgelerin karakterizasyonu

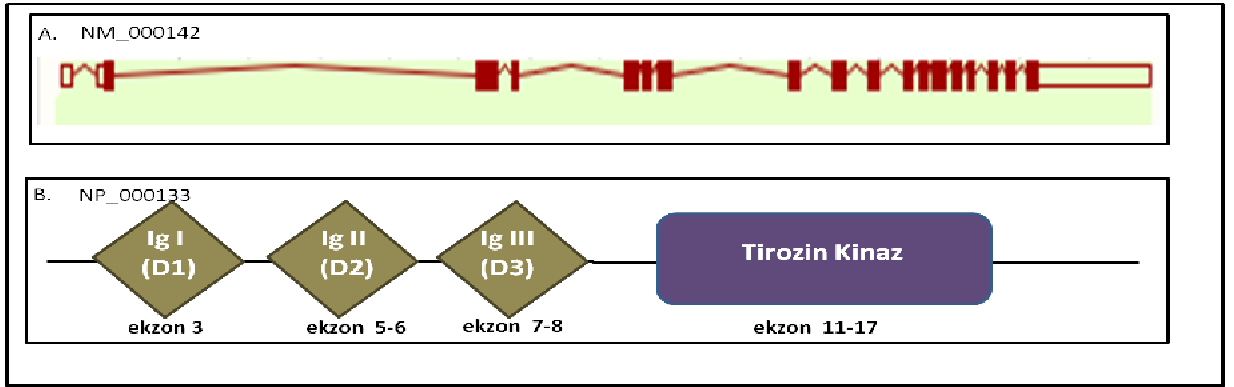
Aday genlerin transkript numaraları için İnsan Genomu Mutasyon Veri Bankası (HGMD) (91) referans olarak kullanıldı. Aday genlerin protein yapısı, domainlerin kodladığı bölgeler şekil 14 - 21’de gösterilmektedir. Ekzonik bölge açısından HGMD’den referans edilen transkriptte kapsanmayan ek kodlayan bölgeler belirlendi ve çalışma kapsamına alındı. Örneğin, *FGFR3* geninde HGMD’den referans alınan NM_000142 transkriptinde, NM_001163213.1 transkriptine göre bir kodlayan bölgenin kapsanmadığı görüldü ve bu kodlayan bölge için (ekzon 8) primer dizisi oluşturuldu (şekil 22).



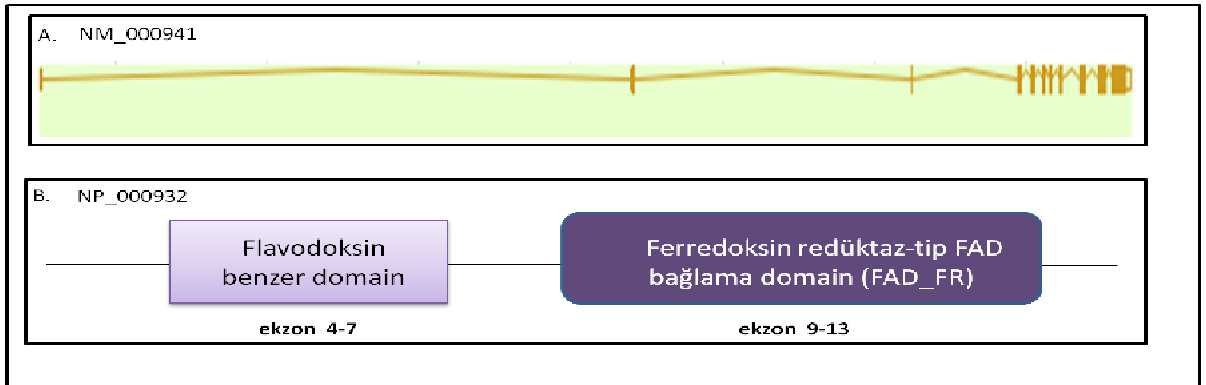
Şekil 14: A. *FGFR2* geninin NM_000141 transkripti ‘<http://www.ensembl.org>’; B. *FGFR2* proteininin (NP_000132) domain yapısı ‘<http://prosite.expasy.org>’un P21802’ için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.



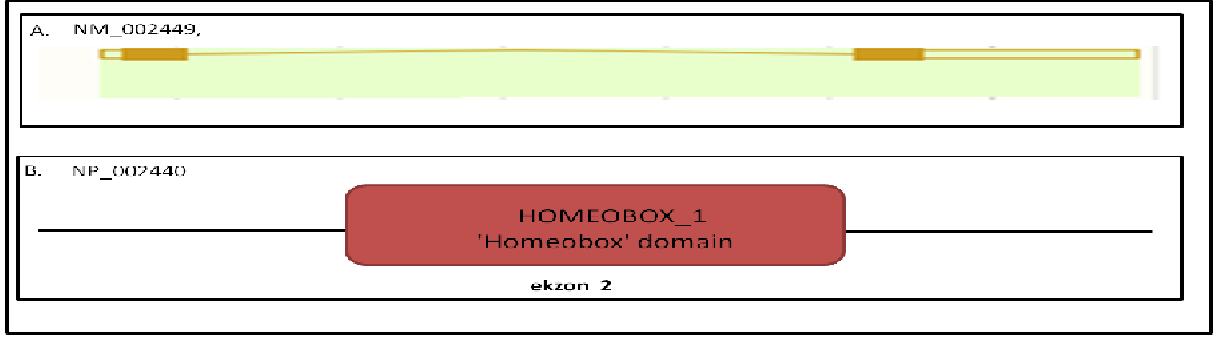
Şekil 15: A. *FGFR1* geninin NM_023110 transkripti, '<http://www.ensembl.org>'; B. *FGFR1* proteininin (NP_075598) domain yapısı '<http://prosite.expasy.org>' un P11362' için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.



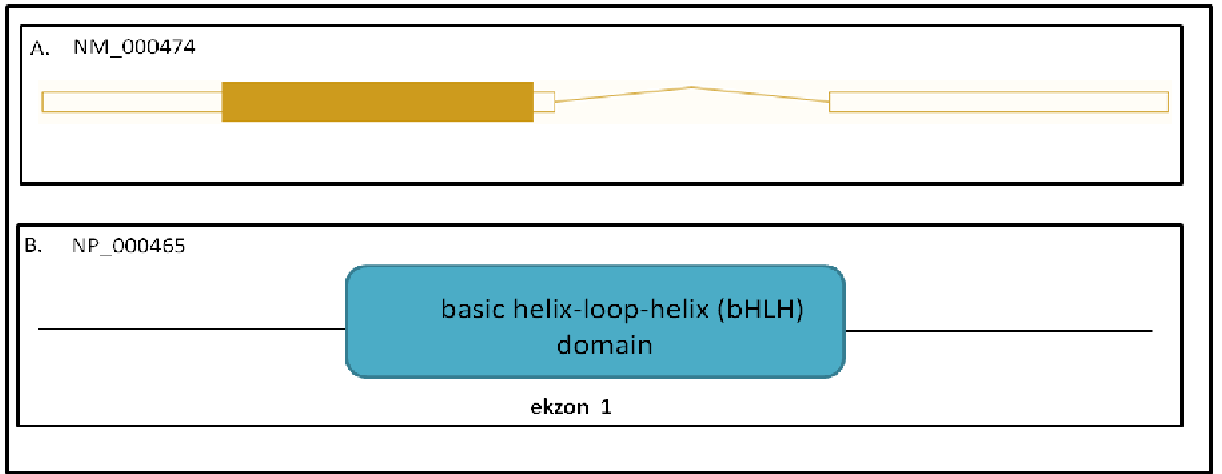
Şekil 16: A. *FGFR3* geninin NM_000142 transkripti, '<http://www.ensembl.org>'; B. *FGFR3* proteininin (NP_000133) domain yapısı '<http://prosite.expasy.org>' un P22607' için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.



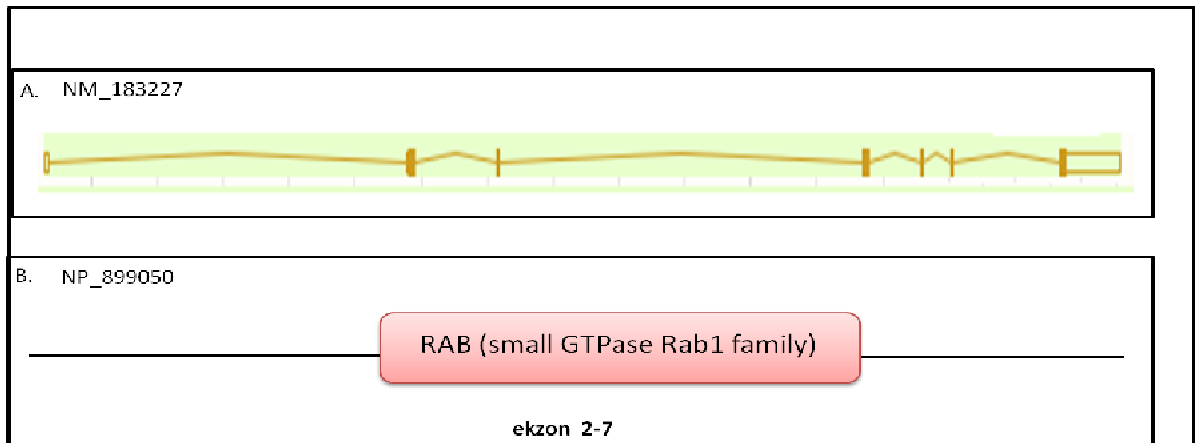
Şekil 17 : A. *POR* geninin NM_000941 transkripti, '<http://www.ensembl.org>'; B. *POR* proteininin (NP_000932) domain yapısı '<http://prosite.expasy.org>' un P16435' için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.



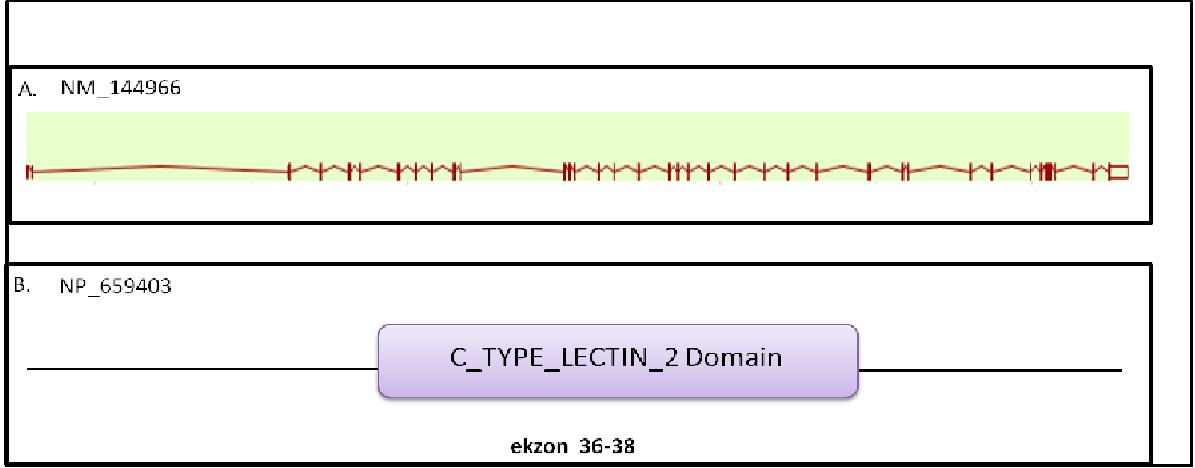
Şekil 18: A.MSX2 geninin NM_002449 transkripti, <http://www.ensembl.org>; B. MSX2 proteininin (NP_002440) domain yapısı '<http://prosite.expasy.org>'un P35548' için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.



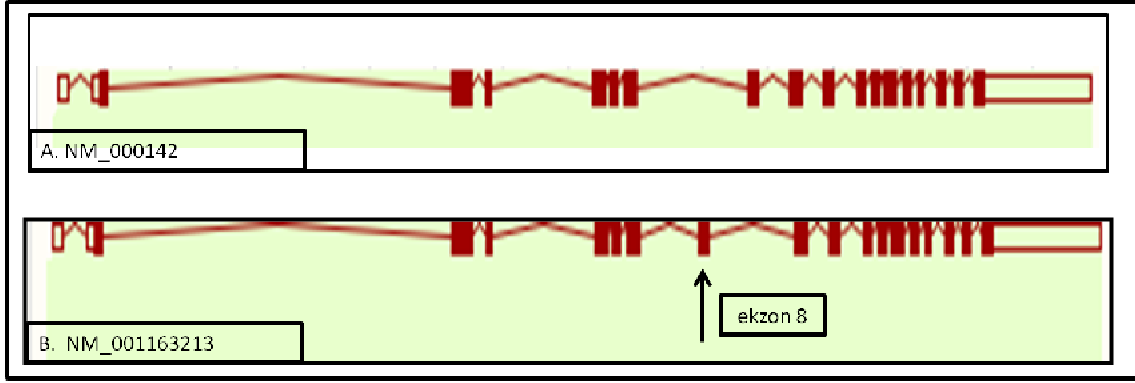
Şekil 19: A. TWIST1 geni NM_000474 transkripti '<http://www.ensembl.org>'; B. TWIST1 proteininin (NP_000465) domain yapısı '<http://prosite.expasy.org>'un Q15672 için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.



Şekil 20: A. RAB23 geni NM_183227 transkripti '<http://www.ensembl.org>'; B. RAB23 proteininin (NP_899050) domain yapısı '<http://prosite.expasy.org>'un Q9ULC3 için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.



Şekil 21: A. *FREM1* geni NM_144966 transkripti ‘<http://www.ensembl.org>’; B. *FREM1* proteinin (NP_659403) domain yapısı ‘<http://prosite.expasy.org>’un Q5H8C1 için verdiği şekil üzerinden düzenlendi.



Şekil 22: A. *FGFR3* geninin NM_000142 transkripti B. *FGFR3* geninin NM_001163213 transkripti (<http://www.ensembl.org>)

FGFR1, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* ve *RAB23* referans genlerinin genomik dizisi, varyasyonları, ekzon, intron ve polimorfik bilgileri, UTR (untranslated recent) bölgeleri NCBI Home Page (92), Ensembl Genome Browser (93), UCSC Genome Browser (94) veritabanlarında araştırıldı. Bu genlerin tanımlanmış mutasyonlarının değerlendirilmesinde, Biological Database (BIOBASE) (95), HGMD (91) ve farklı ek kaynaklardan yararlanıldı. Protein domainleri ve bu bölgeleri kodlayan amino asit ve genomik dizilere The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (96) sitesi içerisinde yer alan referans sitelerden ulaşıldı.

3.2.5. Primerlerin tasarlanması

Primerlerin tasarlanmasında dikkat edilen hususlar; seçilen primerlerin, dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış herhangi bir SNP veya tekrarlayan dizi

içermemesi, ileri, geri primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla +/- 2-5°C fark), içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18-24 nükleotid içermesine ve gen bölgesinde beklenen mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak derinlikteki intronik bölge içinde olmasına, dizi analizinde ~30-50 bazın iyi okunamayabileceği gözetilerek özen gösterildi. Özgünlük, UCSC Genome Browser (94) dan “*in silico* PZR” interaktif sistemi ile test edildi.

3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific), 25 mM MgCl₂ (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 (dH₂O) 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 T_m (Temperature 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 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.

3.2.7. PZR Saflaştırması

PZR ürünlerinin dizi analizi öncesi olan saflaştırması elde bulunan malzemelere göre 2 farklı yöntem ile yapıldı.

3.2.7.1. Spin Kolon Yöntemi ile Saflaştırma

Saflaştırma, ticari kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche 11732676001). 50 µl PZR ürünü üzerine 250µl Binding Buffer (bağlanma tamponu) eklendi. Karışım oda ısısında toplama tüpü içerisine alınan filitreli pürifikasyon tüpüne aktarıldı. 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi. Toplama

tüpünde biriken solüsyon atıldı. Pürifikasyon filtresinin üzerine 500 µl (Wash Buffer) yıkama solüsyonu eklendi. 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj gerçekleştirildi. Toplama tüpünde biriken solüsyon atıldı. Pürifikasyon filtresinin üzerine 200 µl (Wash Buffer) yıkama solüsyonu eklendi. 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj gerçekleştirildi. Toplama tüpü atıldı. Pürifikasyon filtresi steril 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılarak içerisine 50 µl Elution Buffer (Elüsyon Solüsyonu) eklendi. 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj gerçekleştirildi. 1.5 ml'lik ependorf tüpte biriken üründen 5 µl alınarak 2 µl agaroz yükleme boyası ile karıştırıldı, %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 Voltta, 20 dk yürütülerek kontrol edildi. ultraviyole ışık altında elde edilen bantlar görüntülenerek kayıt edildi. Ürünler bir sonraki işlem için +4°C'de karanlıkta saklandı.

3.2.7.2. Enzimatik Yöntem ile Saflaştırma

Saflaştırma işlemi için Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfatase (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.

3.3. Dizi Analizi

Dizi analizi, PZR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan ampikonların bir kısmı hizmet alımı olarak dış laboratuvarında (Macrogen Inc., Seoul/Kore), bir kısmı da Tıbbi Genetik A.D. laboratuvarında bulunan ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde UCSC Genome Browser (94), Ensembl Genome Browser (93) vb. çeşitli web sitelerinden yararlanıldı.

3.3.1. DNA Dizi Analizi

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

3.3.1.1. 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 dH₂O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plak (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde

hazırlandı. Karışım termal döngü cihazında yürütüldü. Protokol toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn ile denatürasyon, 50°C de 5 sn ile bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

3.3.1.2. Dizi Reaksiyon Ürünlerinin Saflaştırılması

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin temizliği için plak içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 ethanol eklendi. Plak aliminyum koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika beklendi. 3810 rpm'de 45 dak. Santrifüj yapıldı. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plak ters çevrilerek 1100 rpm'de 30 sn.'ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik ethanol eklendi. Plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plak ters çevrilerek 1170 rpm'de 60 sn.'ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon buffer'ı [(dH₂O ya da HiDi formamid (Highly Deionized formamid)) eklendi. Örnekler 95 °C de 5 dak.denatüre edildi. ve 2 dak. buz üzerinde bekletildi ve ABI3500'de yürütüldü.

3.3.1.3. Elektforez Cihazına Yükleme

Örneklerin çoğunluğuna Macrogen Inc.'de dizileme yapıldı ve analiz sonuçları web/e-mail yöntemiyle ilgili merkezden alındı. Bazı örneklerin doğrulamaları Tıbbi Genetik AD. lab.'ında gerçekleştirildi. Çalışması Tıbbi Genetik AD. lab. da yapılan örnekler için; 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 işlemi 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.

3.3.1.4. Elektforez Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Kapiller Elektforezi 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 ve değerlendirildi.

SeqScape v2.7 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra Fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işlemten 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 (92), ENSEMBL GeneSNPView (93) ve HGMD (91) gibi veritabanları kullanılarak programda işaretlendi. Daha önce karakterize edilmemiş değişimlerin *in silico* olarak patolojik olup olmadığı, *Mutation Taster* (97) ve *Prediction of functional effects of human nsSNPs* (PolyPhen-2) (98) veritabanları kullanılarak değerlendirildi. SeqScape v2.7 programında, olguda çalışılan ilgili gen bölgesinin değişimlerinin gösterimini yapan analiz genel dökümü alındı. Olguda mutasyon saptanmış ise bağımsız örnek çalışması yapılarak, tüm işlemler bir kez daha doğrulandı.

3.4. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Analizi

Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu tekniğinin genlerdeki kopya sayısı değişikliklerinin gözlemlendiği tek gen hastalıklarında delesyon ve duplikasyonları gösterebildiği için tanı koyma oranlarını yükselttiği bildirilmektedir. Teknik, prob setlerinin kullanılmasıyla lokusları, içerdiği primer çiftleri ile hedef aldığı lokusların uzunlukları, her bir lokusta hedeflenen gen bölgesindeki mutasyonların, olası delesyon ya da duplikasyonların araştırmada kullanılabilir (99-100).

MLPA tekniği ile olgulardan elde edilen ürünler, Tıbbi Genetik ABD'nin Genetik laboratuvarında ABI3500 kapiller elektroforezi kullanılarak aşağıdaki koşullarda yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme voltajı; 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı; 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi süresi (*data delay*): 250 sn. .

FSA formatındaki ham veri Coffalyser net analiz programı (v.131211.0000) kullanılarak değerlendirildi.

3.4.1. MLPA Tekniği

Bu teknikte kullanılan prob tasarımı 1 nükleotidlik farkı bile gösterebildiği ve genomik DNA örneğinin 50'den fazla hedef bölge için kopya sayısı değişikliklerini multipleks PZR tekniği kullanarak araştırılmasına olanak verdiği bildirilmiştir (100-101).

Çalışma için SALSA MLPA Kraniofasial Kit prob karışımı P080-B1 Lot.0710 kullanıldı. Kit içinde kapsanan genler ve bu genlerdeki ekzon bölgeleri tablo 3'te gösterilmektedir. P080-B1, 122 - 449 nükleotidlik 48 MLPA probu içermektedir (99). Tablo 3'te SALSA MLPA Prob karışımı P080-B1 kraniofasial kit içeriği özetlenmiştir.

Tablo 3: SALSA MLPA Prob Karışımı P080-B1 Kraniofasial kit içeriği (99)

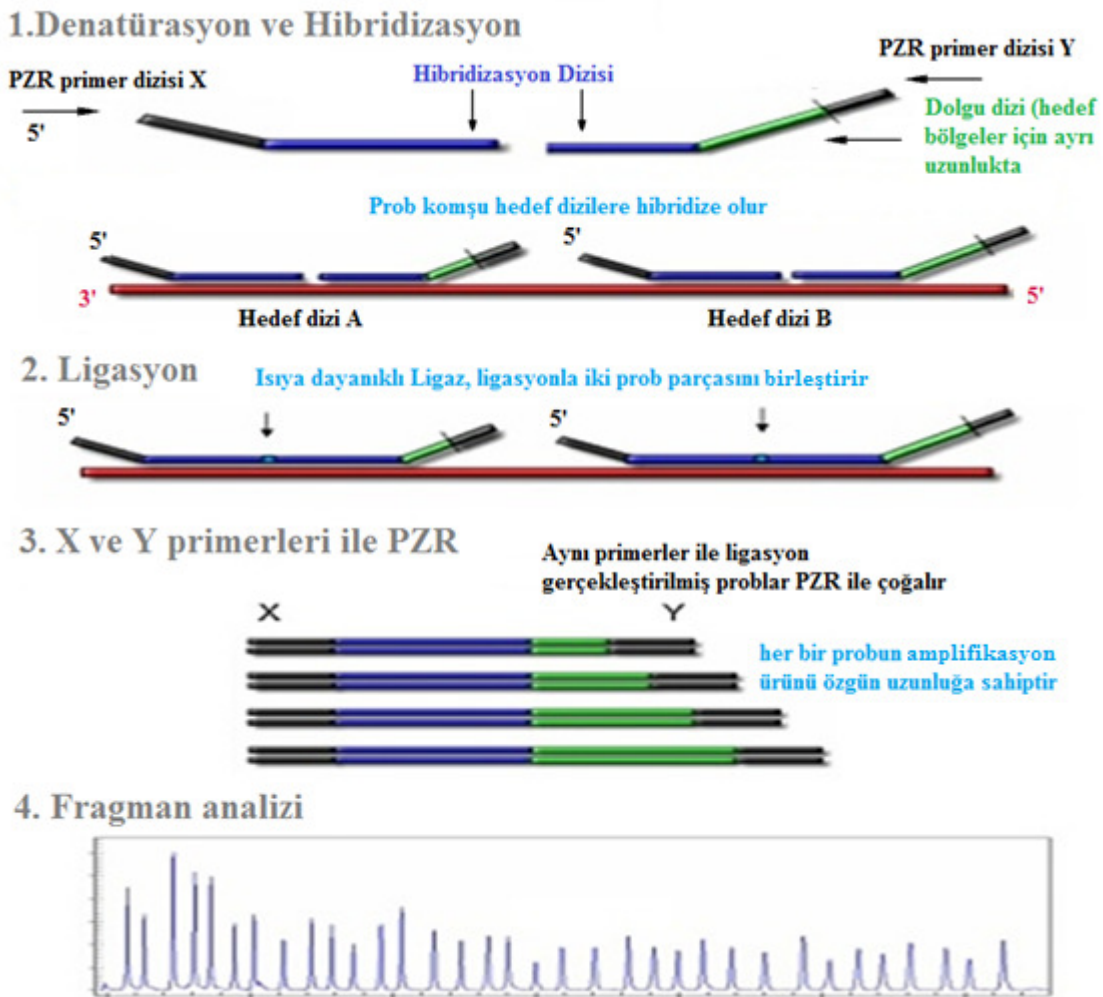
Kromozom	Gen	NM	Ekzon
12q21	ALX1	NM_006982.2	1-4
1p13.1	ALX3	NM_006492.2	1-4
11p11.2	ALX4	NM_021926.3	2-4
Xq12	EFNB1	NM_004429.4	1-5
6p21.1	RUNX2	NM_001024630.3	2,4-9
6p21.1	RUNX2	NM_004348.3	3a
7p21	TWIST1	NM_000474.3	1-2
7p21	TWISTNB	NM_001002926.1	4
8p12	FGFR1	NM_023110.2	4,8
10q26	FGFR2	NM_000141.4	8,11b
4p16.3	FGFR3	NM_000142.4	6,7
5q35.2	MSX2	NM_002449.4	1-2

3.4.1.1. MLPA çalışmasının yapılışı

Tek bir PZR protokolü ile içerisinde uygun sıcaklıkta bekletme, aktarma ve ekleme gibi pipet işlemleri ile denatürasyon, hibridizasyon ve ligasyon aşamaları DNA Engine (BIORAD)-T100 termal döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından kapiller elektroforez cihazında fragmanlar yürütüldü (99-100).

Her bir MLPA probu, hedef bölgenin komşu dizileri ile eşlenen, iki oligonükleotid primerden oluşmaktadır. Bu oligonükleotid çifti hedef dizilerine bağlandıktan sonra, enzimatik reaksiyonla ligasyon meydana gelir ve böylece oligonükleotid birleşerek bütünlük sağlanır. Bu aşamada ligasyonla bağlanmayan

oligonükleotidler PZR aşamasında çoğalamazlar (amplifiye olamazlar). PZR reaksiyonu ile çoğalan oligonükleotiddir. PZR aşamasından sonra, uzunluğu birbirinden farklı ürün (amplikon) elde edilmektedir. Ortaya çıkan her bir prob uzunluğunun birbirinden farklı olması kapiller elektroforezinde hedef bölgenin amplikonlarının uzunluk (fragmentel) olarak birbirlerinden ayrılabilir ve tanımlanabilir olmasını sağlamaktadır. Böylece, Coffalyser.Net fragman analiz programı yardımıyla hedef dizi amplikonlarının miktarları karşılaştırılmakta ve istatistiksel veri analizi gerçekleştirilmektedir. Bu işlemde referans örneklerin pik şiddetleriyle olgu örneklerinin pik şiddetleri karşılaştırılmaktadır. Örnek pik değerinin normal kabul edilmesi için 0,70-1,30 aralığı verilmektedir. 0,70 değerinin altındaki değerler delesyonu gösterirken, 1,30 değerinin üstü ise duplikasyon olarak değerlendirilmektedir. MLPA tekniğinin uygulanması ile ilgili şema şekil 23'te gösterilmektedir.



Şekil 23: MLPA protokolünün şematize aşamaları (99)

MLPA çalışmalarında hibridizasyon sonrası ligasyon işleminin olmasının tekniğin yanlış bağlanmalara karşı özgünlüğünü yükselttiği bildirilmektedir (100).

3.4.1.2. Denatürasyon ve Prob karışımı ile hibridizasyon aşaması

Denatürasyon öncesinde stok DNA'dan yoğunluğu 70ng/μl-100ng/μl olacak şekilde ~25μl miktarda çözelti hazırlanır. Prob kitinden SALSA Probe miks ve MLPA tampon çıkarılarak oda ısısında çözülmesi sağlanır. Tampon vorteks ile karıştırılır ve kısa santrifüjleme ile dibe toplanır. DNA çözeltisinden her örnek için 5μl DNA etiketlenmiş 200 μl' lik PZR tüplerine alınır ve termal döngü cihazında 98°C' de 5 dak. denatüre edilir. İnkübasyon sırasında her bir örnek için 1,5 μl MLPA tampon ve 1,5 μl prob karışım olmak üzere master miks hazırlanır ve yukarı aşağı pipetleme (pipetajla) işlemi ile iyice karıştırılır. İnkübasyon işleminin bitmesiyle tüpler 25°C'ye soğutulur ve her bir örneğe 3 μl master karışım koyulur. 95°C de 1 dakikadan sonra 37 °C de 16 saat (gece boyu) hibridizasyon işlemi gerçekleştirilir.

3.4.1.3. Ligasyon aşaması

Ligasyon aşamasında hazırlık olarak Ligaz 65 tampon A, Ligaz 65 tampon B dondurucudan çıkarılarak oda ısısında çözülmesi beklenir. Ligaz tampon karışımı için etiketlenmiş PZR tüpüne, her bir örnek için 3 μl Ligaz 65 tampon A, 3 μl Ligaz 65 tampon B ve 25 μl dH₂O hazırlanır. Karışıma her bir örnek için ayrıca 1 μl Ligaz 65 enzimi eklenir ve pipetaj ile karışması sağlanır. 37 °C'deki termal döngü cihazı 54°C de bekleme basamağına getirilerek sıcaklık 54°C'de iken her bir tüpe hazırlanan 32 μl ligaz tampon karışımı eklenir ve 54°C'de 15 dakika basamağına geçilir. Elde edilen ligasyon ürünü 4°C ' de ortalama 1 hafta kadar saklanabilir.

3.4.1.4. PZR reaksiyonu aşaması

Ön hazırlık olarak dondurucuda bekleyen SALSA PZR tamponu, SALSA PZR primerleri ve SALSA enzim dilüsyon tamponu çıkarılarak çözülmesi beklenir. Her örnek için yeni etiketlenmiş PZR tüpleri hazırlanır. PZR tampon karışımı için örnek başına ayrı bir tüpe 4 μl SALSA PZR tamponu ve 26 μl dH₂O hazırlanır ve vorteksle karıştırılır ve etiketlenmiş PZR tüplerine 30 μl olacak şekilde dağıtılır. Bu etiketlenmiş tüplerin üzerine ligasyon ürünlerinden 10'ar μl eklenir ve termal döngü cihazına yerleştirilir. Yeni boş bir tüpte PZR master miks hazırlığı yapılır. Bunun için buz üzerinde, örnek başına 2 μl SALSA PZR primeri, 2 μl SALSA enzim dilüsyon tamponu ve 5,5 μl dH₂O hazırlanır. Her bir örnek için 0,5 μl SALSA polimeraz enzimi eklenir ve

pipetaj ile karışması sağlanır. 60°C’de bekleme aşamasındaki termal döngü cihazında sonraki basamağa geçiş yapılır; 35 döngüde; 95°C de 30 saniye, 60°C de 30 saniye, 72°C de 60 saniye, 72°C de 20 dakika ve 4°C de bekleme aşamaları. 4°C’ye gelen örnekler için kapiller elektroforezine yükleme ve fragmanların yürütülmesi aşamasına geçilir.

3.4.1.5. Kapiller Elektroforez Cihazı ile Fragmanların yürütme aşaması

Boş bir miks tüpüne yürütülecek örnek başına 0.2 µl LIZ size standard (Liz-500, Lot:0904226, Applied Biosystems) ve 9 µl formamid (Highly Deionized - Hidi) konularak karıştırıldı ve kapiller elektroforezine yüklenmek için oluşturulan numaralandırılmış ABI3500 cihazı için uygun olan plakta (USA Scientific-800-522-8477) herbir kuyuya bir örnek başına 9,2 µl dağıtıldı. Üzerine 0,7 µl PZR reaksiyon ürünü plak kuyularına olgu numaralarına göre dağıtıldı. Plak kuyularının üzeri uygun septayla (AB Applied Biosystems-182901S9R) kapatılarak, Plak santrifüjünde (BIOSAN LMC300) 1200RPM de 2 dakika çevrildi. Santrifüj bitince, plak ABI3500 cihazına yerleştirildi. kapiller elektroforez cihazında yürütme ayarları düzenlenerek “Başlat” komutuyla yürütme işlemine geçildi.

Yürütme voltajı; 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı; 15 kVolts, injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi süresi (*data delay*): 250 sn. Kapiller sıcaklığı 60 °C. FSA formatındaki ham veri Coffalyser.net (v.131211.0000) kullanılarak değerlendirildi.

3.4.1.6. MLPA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

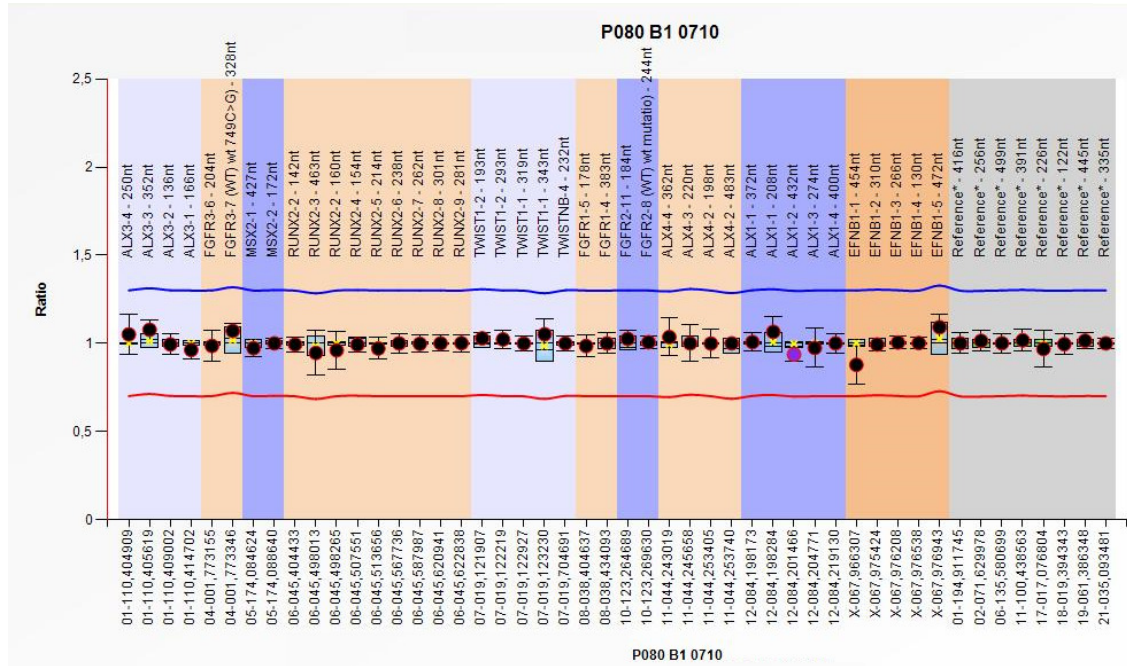
Kapiller elektroforez cihazından .fsa formatında elde edilen fragmanlar Coffalyser.Net (v.131211.0000)(MRC-Holland) programına tanıtılarak aktarıldı. Coffalyser net programının gerekli analiz ayarları (prob türü, örnek türü, kitin lot numarası ve analiz türü - Şekil 24) yapılarak örnekler yüklendi. Referans örnekler seçilerek, önce fragman analizi ardından karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapıldı. İşlem sonrasında, referans örneklere göre pik şiddeti oranları 0,7 ve altında olduğunda delesyon, 1,30 ve üstünde olduğunda duplikasyon olarak değerlendirildi (Şekil 25). Şüpheli sonuç gösteren olgular tekrar MLPA test işlemine alındı ve işlemler tekrarlandı ve Coffalyser net programında MLPA analizi gerçekleştirildi (Şekil 26).

experiment type						DNA/MLPA [default]
CE device						ABI - 3500
nr.	act.	dye	channel type	channel content	analysis method	
1	<input checked="" type="checkbox"/>	6-FAM	probes	P080-Craniofacial - L0T0710 (B1) ...	block [default]	
5	<input checked="" type="checkbox"/>	LIZ	size marker	GS500-250		

Şekil 24 :MLPA Coffalayser net programı P080 ayarları

normalization metric	peak height [default]
normalization factor (intra)	auto [default]
normalization factor (inter)	auto [default]
arbitrary ratio border (low / high)	0,70 / 1,30
sloping correction	auto (if > 15%) [default]
analysis protocol	classic [default]

Şekil 25: MLPA pik şiddeti oran ayarları



Şekil 26: MLPA normal örnek analiz sonucu ve prob bölgeleri bar grafik görüntüsü

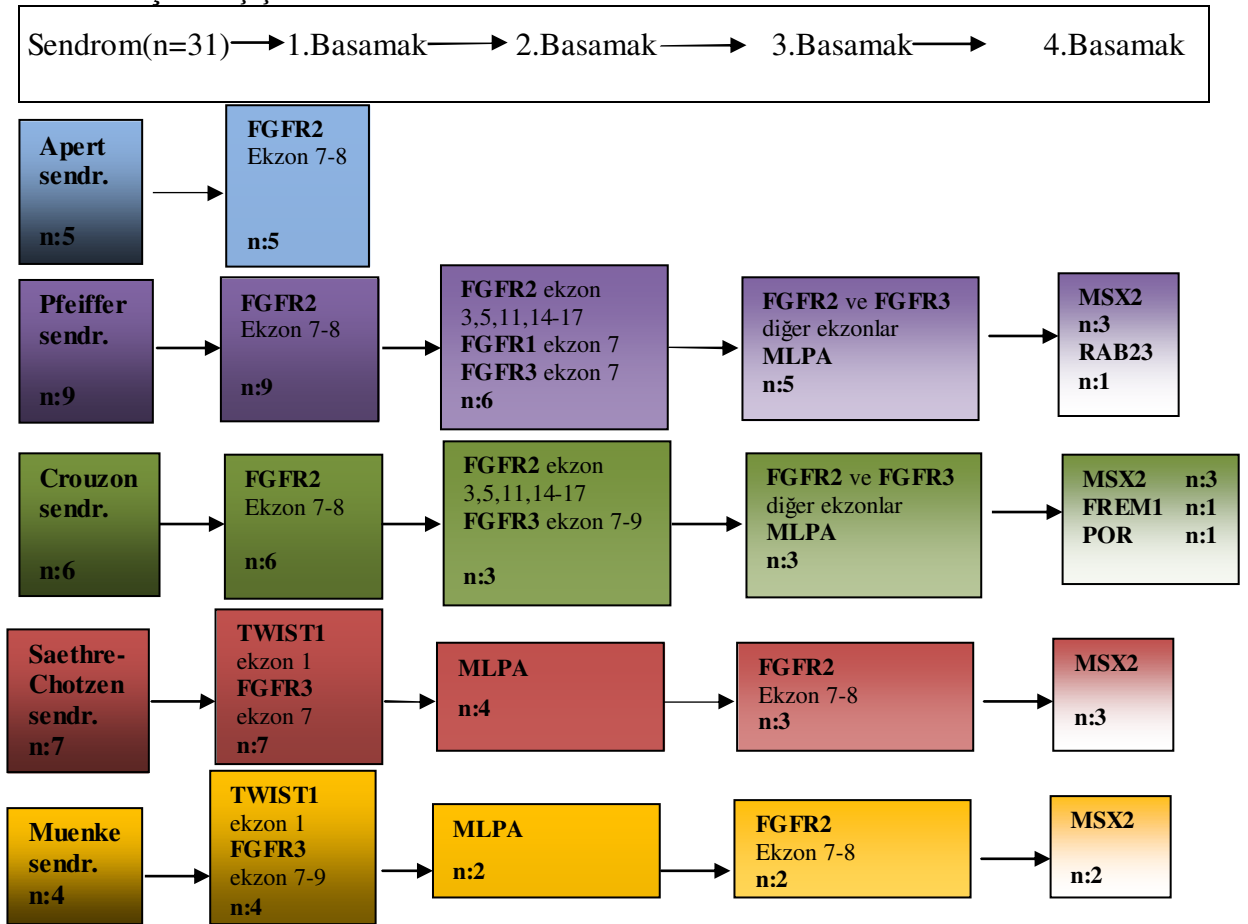
3.5. Akış Şeması

Klinik ön tanıya göre literatür bilgilerinin yönlendirmesi ile çalışma planı hazırlandı, oluşturulan akış şeması aşağıda gösterilmektedir (2).

3.5.1. Sendromik Olguların Değerlendirilmesi

Bu araştırma kapsamında, sendromik kraniyosinostoz olgularında literatürden (2) değiştirilerek düzenlenen akış şemasına göre çalışılan genler, ekzonlar ve çalışılan olgu sayısı tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4: Sendromik Kraniyosinostoz Olgularının Moleküler Etiyopatogenezini Belirlemek için Akış Şeması



3.5.2. Non-sendromik Olguların Değerlendirilmesi

Non-sendromik olgularda (n:9) öncelikle eş zamanlı olarak *FGFR3* ekzon 7-9, *FGFR2* ekzon 7 (IIIa) ve 8 (IIIc) ve *TWIST1* tüm gen dizi analizi yapıldı. Mutasyon saptanmayan olgularda delesyon ve duplikasyon tanısı için P080 kraniyofasiyal kiti ile MLPA analizi ve eş zamanlı olarak *FGFR2* ve *FGFR3* genlerinin diğer ekzonları dizilendi.

4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde kraniyosinostoz bulgusu ile değerlendirilen 40 olgu, non-sendromik (n:9) ve sendromik (n:31) olmak üzere 2 grupta incelendi. Sendromik olgulardan 9'u Pfeiffer sendromu, 6'sı Crouzon sendromu, 5'i Apert sendromu, 7'si Saethre Chotzen, 4'ü Muenke / Saethre Chotzen sendromu, ön tanısı aldı, diğer olgular ise non-sendromik grupta yer aldı. Çalışmamızdaki olguların cinsiyet dağılımı eşitti (20 dişi/ 20 erkek).

4.1. Sendromik Olgular

4.1.1. Apert Sendromu

4.1.1.1. Apert Sendromu Klinik Bulguları

Apert sendromlu olguların klinik bulguları tablo 5'te ve fotoğraf onamı veren olguların fotoğrafları Şekil 27'de gösterilmektedir.

Tablo 5: Apert sendromu ön tanılı olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları

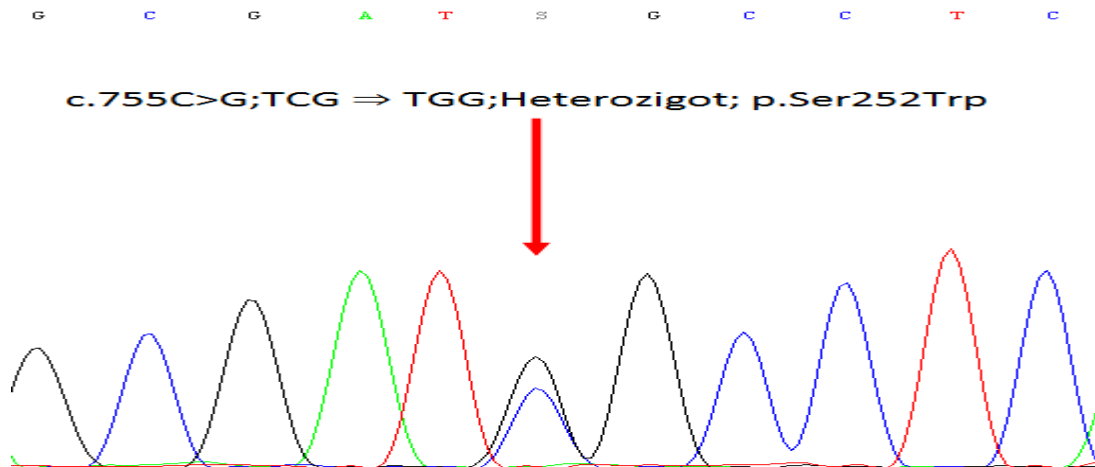
OLGULAR		AS 1	AS 2	AS 3	AS 4	AS 5	toplam
Aile öyküsü		-	-	-	-	-	0/5
Mat/pat yaş		36/38	32/38	28/36	34/36	26/30	31,2/35,6
Cinsiyet		E	E	E	E	D	4E/1D
Akraba evliliği		-	-	-	-	-	-
İlk değerlendirme yaşı		25 GH	2 ay	1 ay	1,5 yaş	27 GH	
Sefali	Sinostoz						
Brakisefali	koronal	+	+	+	+	+	5/5
Kraniyofasiyal bulgular							
Belirgin alın		+	+	+	-	+	4/5
Geniş fontanel		+	+	+	+	+	5/5
Yarı damak		-	+	-	+	-	2/5
Basık yüz		+	+	-	-	-	2/5
Fasiyal asimetri		-	-	-	+	-	1/5
Basık burun kökü		+	+	-	-	+	3/5
Antevert burun delikleri		+	-	-	-	+	2/5
Aşağı çekik palpebral fissür		+	+	-	+	+	4/5
Fasiyal hipoplazi		maksiller	midfasiyal	midfasiyal	maksiller	midfasiyal	5/5.
Hidrocefali		-	+	-	-	-	1/5
Oküler Bulgular							
Proptozis		+	+	+	+	+	5/5
Hipertelorizm		+	+	-	-	+	3/5
Ekstremité bulguları							
Sindaktili		+	+	+	+	+	5/5
Geniş el/ayak baş parmakları		+	+	-	-	+	3/5
Ayak baş parmağı deviasyonu		radiale	radiale	-	medyale	-	3/5
Eklemde hareket kısıtlılığı		-	-	-	-	+	1/5
Diğer							
Konjenital kalp anomalisi		-	-	VSD, ASD, PH	-	-	1/5
Moleküler analiz sonucu		<i>FGFR2</i> geni ekzon 7'de c.755C>G (p.Ser252Trp)					5/5



Şekil 27: Apert sendromu klinik tanısı alan ve FGFR2 c.755C>G (p.Ser252Trp) mutasyonu saptanan olgu AS2 (a ve b) ve AS4'e (Şekil c ve d) ait fotoğraflar

4.1.1.2. Apert Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları

Apert sendromu klinik tanısı ile incelenen 5 olgunun tümünde ilk basamakta dizi analizi ile değerlendirilen *FGFR2* geni ekzon 7'de c.755C>G (p.Ser252Trp) mutasyonu saptandı (Şekil 28). Olguların tümünde anne ve babalar bu mutasyon için değerlendirildi ve mutasyon taşımadıkları belirlendi. Bu sonuçlar gonadal mosaisizm dışlanamamakla birlikte, mutasyonların *de novo* oluştuğunu gösterdi.



Şekil 28: Apert sendromlu olgularda saptanan c.755C>G mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu AS 4)

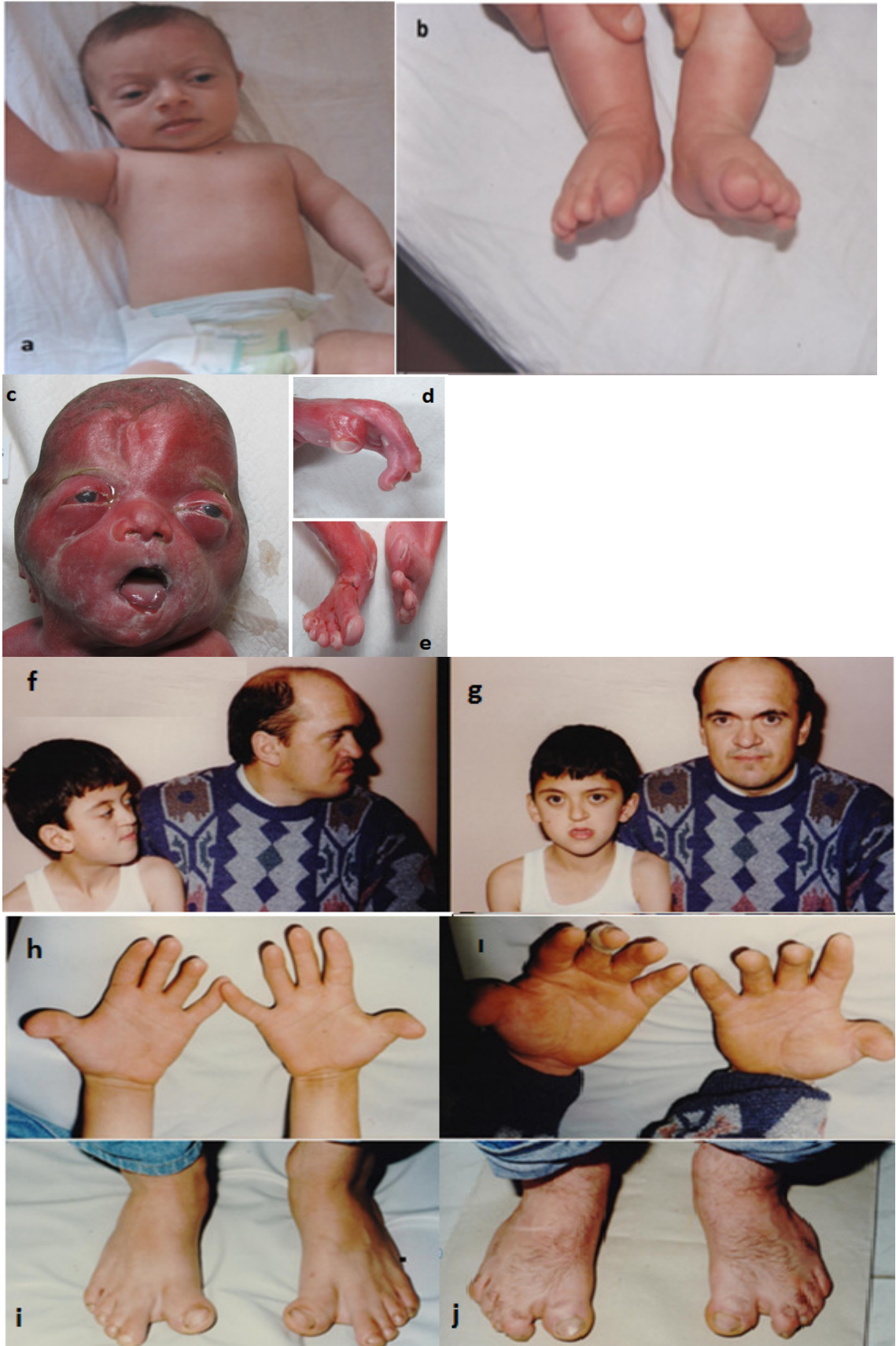
4.1.2. Pfeiffer Sendromu

4.1.2.1. Pfeiffer Sendromu Klinik Bulguları

Pfeiffer sendromlu olguların klinik bulguları tablo 6'da ve fotoğraf onamı veren olguların fotoğrafları Şekil 29'da gösterilmektedir.

Tablo 6: Pfeiffer sendromu ön tanımlı olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları

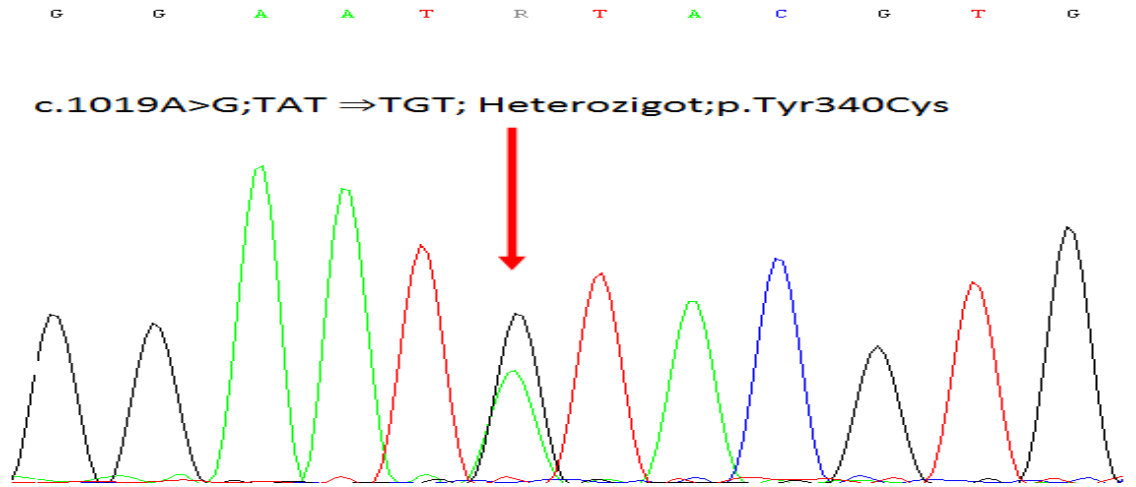
OLGULAR	PS 1	PS 2	PS 3	PS 4	PS 5	PS 6	PS 7	PS 8	PS 9	toplam	
Aile öyküsü	-	-	-	-	-	+	(pat)	-	-	-	1/9
Mat/pat yaş	32/35	32/36	27/34	39/38	30/33	28/32	26/32	21/24	22/25	28,5/32	
Cinsiyet	D	D	D	D	E	E	E	E	D	5D/4E	
Akraba evliliği	-	-	-	-	1° kuzen	-	1° kuzen	1° kuzen	-	3/9	
İlk değerlendirme yaşı	23 GH	2,5 yaş	3,5 ay	1,5 ay	6 ay	9 yaş	5 yaş	2 ay	22 GH		
Sefali	Sinostoz										
Akrosefali	Sagital+Koronal	-	+	+	-	+	-	+	-	-	4/9
Dolikosefali	Sagital	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1/9
Plagiosefali	Unikoronal	-	-	-	-	-	+	-	+	-	2/9
Yonca yaprağı	Sagital+Koronal+Lambdoid	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2/9
Kraniyofasiyal bulgular											
Makrosefali-Mikrosefali	-	-	-	makrosefali	-	-	-	-	-	-	1/9
Yüksek alın	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/9
Belirgin alın	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	5/9
Geniş fontanel	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	4/9
Yüksek dar damak	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	4/9
Fasiyal asimetri	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	5/9
Basık burun kökü	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	6/9
Gaga burun	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/9
Epikantus	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1/9
Aşağı çekik palpebral fissür	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	3/9
Yele boyun	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/9
Kısa boyun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1/9
Fasiyal hipoplazi	-	-	-	-	-	maksiller	-	midfasiyal	maksiller	3/9	
Mikro/retrognati	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1/9
Düzensiz diş	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1/9
Displastik kulak	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1/9
Oküler Bulgular											
Proptozi	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	7/9
Hipertelorizm	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8/9
Ptozis	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1/9
İris kolobomu	-	-	-	parsiyel	-	-	-	-	-	-	1/9
Ekstremité bulguları											
Sindaktili	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	5/9
Klinodaktili	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	4/9
Geniş el/ayak baş parmakları	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	7/9
Ayak baş parmağı deviasyonu	mediale	mediale	radiale	radiale	mediale	radiale	radiale	mediale	radiale	9/9	
humero-radio ulnar sinostoz	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	3/9
Simian çizgisi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1/9
Eklemdede hareket kısıtlılığı	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2/9
Genital Anomali	-	-	-	-	kriptorşidi	-	mikro penis	mikro penis	-	-	3/9.
Moleküler analiz sonucu	FGFR2 ekzon 8'de c.1019A>G p.Tyr340Cys	FGFR2 ekzon 12'de c.1646A>C p.Asn549Thr	FGFR2 ekzon 8'de c.1019A>G p.Tyr340Cys	FGFR2 ekzon 13'de c.1694A>C p.Glu565Ala	-	FGFR2 ekzon 5'te c.514_515 delGCinsTT p.Ala172Phe	-	-	FGFR2 ekzon 8'de c.1019A>G p.Tyr340Cys	6/9	



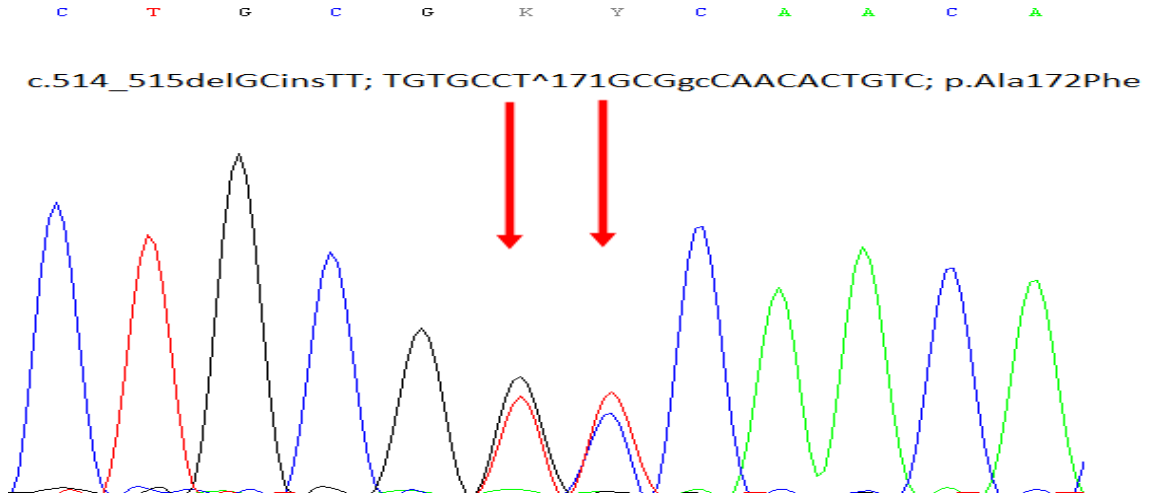
Şekil 29: Pfeiffer sendromu klinik tanısı alan ve mutasyon saptanan PS3 olgusu (a, b), PS9 (c-e) ve PS6 ve babasına (f-j) ait fotoğraflar

4.1.2.2. Pfeiffer Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları

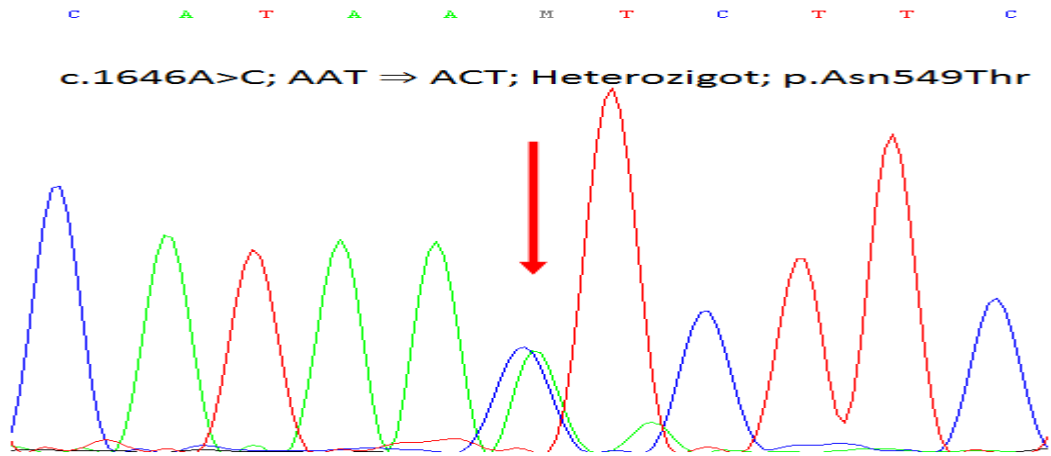
Pfeiffer sendromlu toplam dokuz olgu akış şemasına göre değerlendirildi ve altı olguda dört farklı mutasyon saptandı. Bunlardan ilk basamakta incelenen ekzon 8’de üç olguda c.1019A>G (p.Tyr340Cys, p.Y340C) mutasyonu (Şekil 30), ikinci basamakta incelenen ekzon 5’te bir olguda c.514_515delGCinsTT (p.Ala172Phe, p.A172F) mutasyonu (Şekil 31), üçüncü basamakta incelenen bir olguda ekzon 12’de c.1646A>C (p.Asn549Thr, p.N549T) ve bir olguda ekzon 13’te c.1694A>C (p.Glu565Ala, p.E565A) mutasyonu saptandı (Şekil 32-33). Bu araştırmada Pfeiffer sendrom’u klinik tanısı alan dokuz olgunun altısında (6/9) mutasyon saptandı ve mutasyonların tümü *FGFR2* geni mutasyonları idi. Olguların dördünde anne ve babalar bu mutasyon için değerlendirildi. Bir olgunun (PS6) fenotipik olarak etkilenmiş babasının da aynı mutasyonu taşıdığı saptandı. Üç olgunun (PS2, PS3 ve PS9) anne-babasının ise mutasyon taşımadığı, gonadal mosaisizm dışlanamamakla birlikte, mutasyonun *de novo* oluştuğu saptandı. İki olgunun anne babaları kan örneği vermediği için değerlendirme yapılamadı.



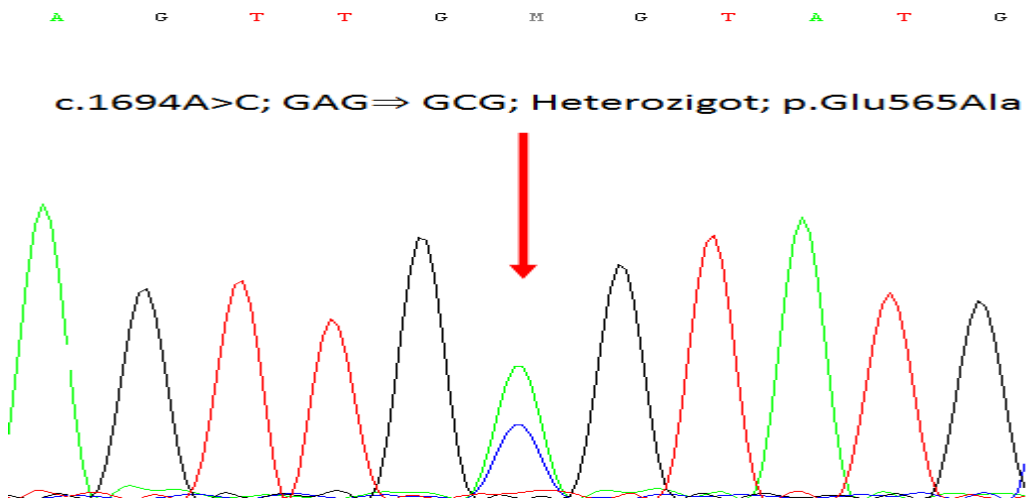
Şekil 30 : Pfeiffer sendromlu 3 olguda (PF 1, 3 ve 9) saptanan c.1019A>G mutasyonu elektroferogram görüntüsü (PF 1)



Şekil 31 : Pfeiffer sendromlu olguda (PF 6) saptanan c.514_515delGCinsTT mutasyonu elektroferogram görüntüsü



Şekil 32 : Pfeiffer sendromlu bir olguda saptanan c.1646A>C mutasyonu elektroferogram görüntüsü (PF 2)



Şekil 33 : Pfeiffer sendromlu bir olguda saptanan c.1694A>C mutasyonu elektroferogram görüntüsü (PF 4)

4.1.3. Crouzon Sendromu

4.1.3.1. Crouzon Sendromu Klinik Bulguları

Crouzon sendromlu olguların klinik bulguları tablo 7’de ve fotoğraf onamı veren olguların fotoğrafları Şekil 34’de gösterilmektedir.

Tablo 7: Crouzon sendromu ön tanı olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları

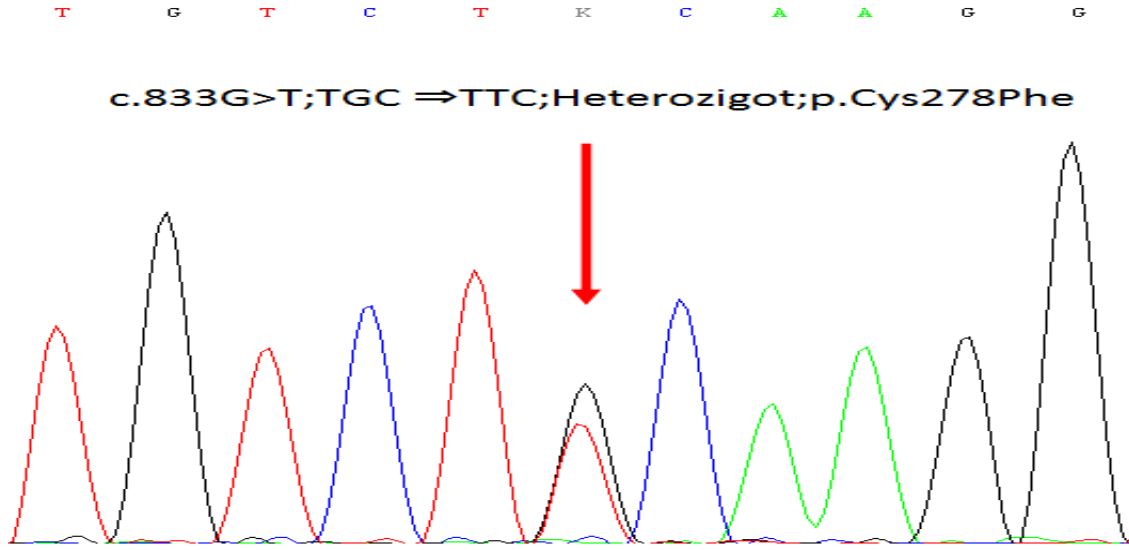
OLGULAR		CRS 1	CRS 2	CRS 3	CRS 4	CRS 5	CRS 6	toplam
Aile öyküsü		-	-	-	-	-	-	-
Mat/pat yaş		28/34	24/30	27/31	30/37	27/31	25/28	26,8/31,8
Cinsiyet		E	E	D	D	E	D	3K/3E
Akraba evliliği		1° kuzen	-	1,5° kuzen	-	1° kuzen	-	3/6
Yaş		6 yaş	14 yaş	14 yaş	2 yaş	4,5 yaş	2 ay	
Sefali	Sinostoz							
Akrosefali	Sagittal+Koronal	+	-	-	-	+	-	2/6
Brakisefali	Koronal	-	bikoronal	bikoronal	bikoronal	-	bikoronal	4/6
Kraniyofasiyal bulgular								
Makrosefali-Mikrosefali		-	-	-	-	-	mikrosefali	1/6
Fasiyal asimetri		-	-	+	+	-	-	2/6
Fasiyal hipoplazi		maksiller	midfasiyal	maksiller	-	maksiller	-	4/6
Basık yüz		-	-	-	+	-	-	1/6
Belirgin alın		+	-	-	-	-	-	1/6
Düşük alın saç çizgisi		-	-	-	-	+	-	1/6
Yüksek dar damak		+	+	-	+	-	+	4/6
Basık burun kökü		-	-	-	-	-	+	1/6
Gaga burun		-	-	-	-	-	+	1/6
Aşağı çekik palpebral fissür		-	-	-	+	+	+	3/6
Düzensiz diş		-	-	+	+	+	-	3/6
Displastik kulak		-	-	-	+	+	+	3/6
Oküler Bulgular								
Proptozis		+	+	+	+	+	+	6/6
Hipertelorizm		+	+	-	+	-	+	4/6
Strabismus		-	+	-	-	-	+	2/6
Ekstremitte bulguları								
Klinodaktili		+	-	-	-	-	-	1/6
Ayak baş parmağı deviasyonu		-	Medyale	-	-	-	-	1/6
Simian çizgisi		+	-	-	-	-	-	1/6
Diğer								
Psikomotor gerilik/MR		-	-	-	-	+	-	1/6
Moleküler analiz sonucu		-	FGFR2 ekzon 8’de c.1025G>A p.Cys342Tyr	-	FGFR2 ekzon 7’de c.833G>T p.Cys278Phe	-	FGFR2 ekzon 7’de c.833G>T p.Cys278Phe	3/6



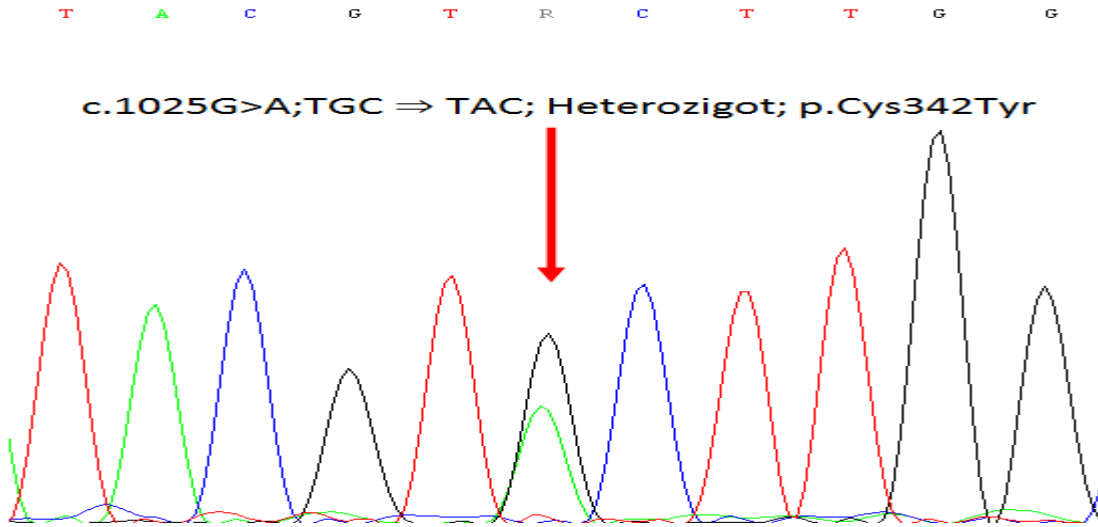
Şekil 34: Crouzon sendromu klinik tanısı alan ve mutasyon saptanan CRS 2 olgusu (a, b) ait fotoğraflar

4.1.3.2. Crouzon Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları

Crouzon sendromlu toplam altı olgu akış şemasına göre değerlendirildi ve üç olguda iki farklı mutasyon saptandı. Olguların birinde, ilk basamakta değerlendirilen *FGFR2* geninde iki olguda, ekzon 7’de c.833G>T (p.Cys278Phe, p.C278F) ve bir olguda, ekzon 8’de c.1025G>A (p.Cys342Tyr, p.C342Y) mutasyonları saptandı (Şekil 35-36). İlk aşamada mutasyon saptanmayan üç olguda moleküler analizlerde herhangi bir mutasyon saptanmadı. Bu araştırmada Crouzon sendrom’u klinik tanısı alan altı olgunun üçünde (3/6) mutasyon saptandı ve mutasyonların tümü *FGFR2* geni mutasyonları idi. Olguların ikisinde anne ve babalar bu mutasyon için değerlendirildi. İki olgunun (CRS2 ve CRS4) anne-babasının mutasyon taşımadığı gonadal mosaisizm dışlanamamakla birlikte, mutasyonun *de novo* oluştuğu belirlenmiş oldu. Bir olgunun anne babası kan örneği vermediği için, değerlendirme yapılamadı.



Şekil 35: Crouzon sendromu iki olguda saptanan c.833G>T mutasyonu elektroferogram görüntüsü (CRS 4 ve 6) (Olgu CRS 4)



Şekil 36: Crouzon sendromu bir olguda saptanan c.1025G>A mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu CRS 2)

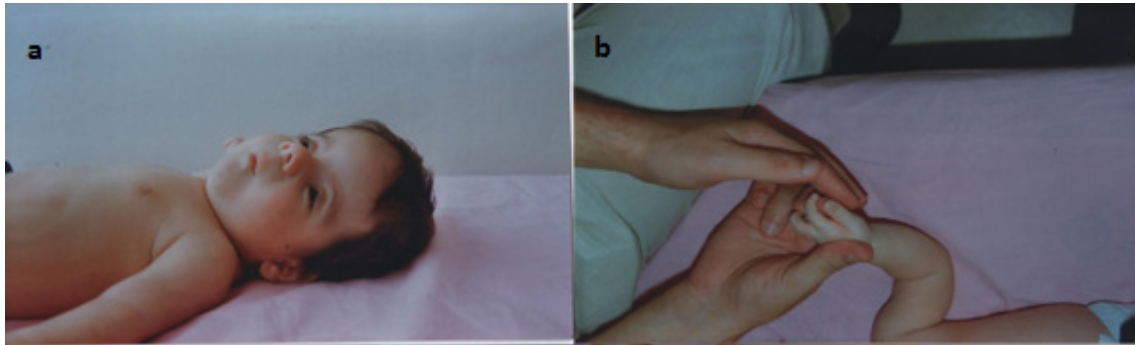
4.1.4. Saethre-Chotzen Sendromu

4.1.4.1. Saethre-Chotzen Sendromu Klinik Bulguları

Saethre-Chotzen sendromlu olguların klinik bulguları tablo 8'de ve fotoğraf onamı veren olguların fotoğrafları Şekil 37'de gösterilmektedir.

Tablo 8: Saethre-Chotzen sendromu ön tanıli olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları

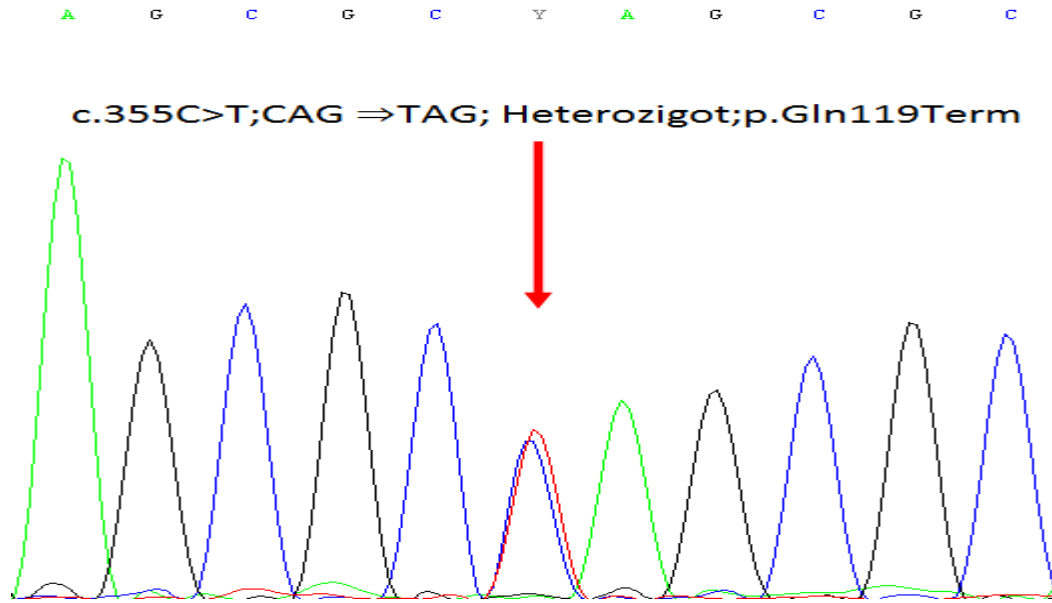
OLGULAR	SCS 1	SCS 2	SCS 3	SCS 4	SCS 5	SCS 6	SCS 7		
Aile öyküsü	-	-	-	+ (mat)	-	+ (mat)	-	2/7	
Mat/pat yaş	37/41	37/49	28/36	28/26	35/37	33/38	30/37		
Cinsiyet	E	D	E	D	D	D	D	5D/2E	
Akraba evliliği	-	-	-	1° kuzen	-	-	-	1/7	
İlk değerlendirme yaşı	3,5 yaş	7 ay	1,5 ay	3 ay	2 ay	11 ay	2,5 ay		
Sefali	sinostoz								
Brakisefali	Bikoronar	+	+	+	+	+	+	+	7/7
Kraniyofasiyal bulgular									
Makro-/Mikrosefali	-	mikrosefali	-	-	mikrosefali	-	-	-	2/7
Yüksek alın	-	-	+	-	-	-	-	-	1/7
Belirgin alın	-	-	+	-	+	+	-	-	3/7
Geniş fontanel	+	-	-	-	-	-	-	-	1/7
Düşük alın saç çizgisi	+	-	-	-	-	+	-	-	2/7
Yüksek dar damak	+	+	+	+	+	+	-	-	6/7
Basık yüz	-	+	-	-	-	-	+	-	2/7
Kaba yüz	+	-	-	-	-	-	-	-	1/7
Fasiyal asimetri	+	+	-	+	-	+	+	+	5/7
Basık burunkökü	+	-	+	+	+	+	+	+	6/7
Aşağı çekik palpebral fissür	+	-	+	+	+	+	+	+	6/7
Midfasiyal/maksiller hipoplazi	maksiller	-	maksiller	-	-	maksiller	maksiller	4/7	
Displastik kulak	-	-	+	+	-	-	-	-	2/7
Oküler Bulgular									
Proptozi	+	+	+	+	+	+	+	+	7/7
Hipertelorizm	+	+	+	+	+	+	+	+	7/7
Ptozis	+	-	+	+	+	+	+	+	6/7
Ekstremité bulguları									
Sindaktili	-	-	-	+	-	-	-	-	1/7
Baş parmak anomalisi	-	-	+	-	-	+	-	-	2/7
Moleküler analiz sonucu	-	-	TWIST1 ekzon 1'de c.355C>T p.Gln119Term	TWIST1 ekzon 1'de c.396_416, 21bp dup	TWIST1 MLPA heterozigot tüm gende delesyon	TWIST1 ekzon 1'de c.376G>T p.Glu126Term	-	-	4/7



Şekil 37: Saethre-Chotzen sendromu klinik tanısı alan ve mutasyon saptanan SCS3 olgusu (a, b) ait fotoğraflar

4.1.4.2. Saethre-Chotzen Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları

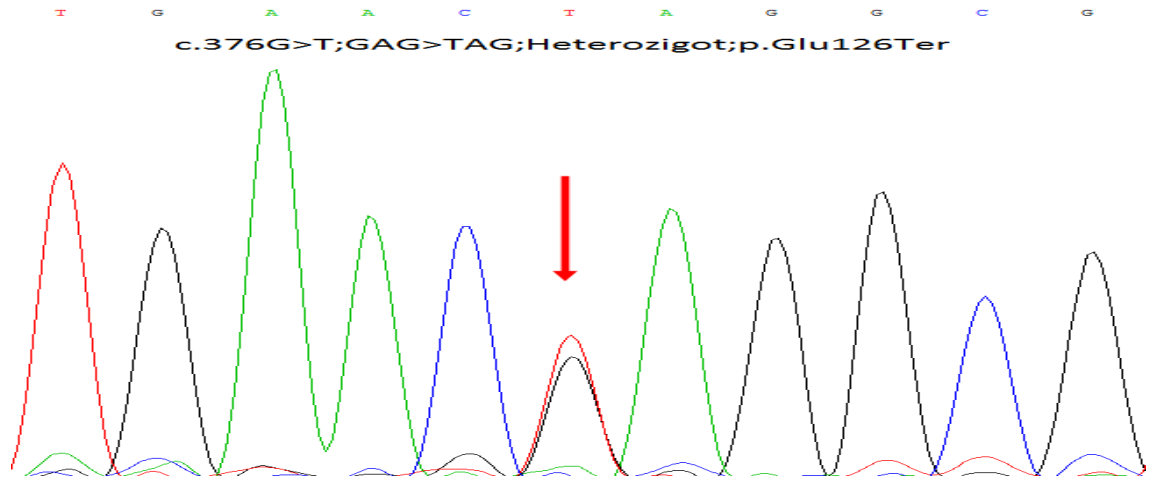
Saethre-Chotzen sendromu klinik tanılı yedi olgunun üçünde ilk basamakta dizi analizi ile değerlendirilen *TWIST1* geninde üç farklı mutasyon, ekzon 1'de c.355C>T (p.Gln119Term, p.Q119*) (Şekil 38), c.376G>T (p.Glu126Term, p.E126*) (Şekil 39) ve c.396_416, 21bp duplikasyon (Şekil 40) saptandı. İkinci basamakta bir olguda MLPA tekniği ile *TWIST1*'de tüm gen heterozigot delesyonu saptandı (Şekil 41). Bu araştırmada Saethre-Chotzen sendromu klinik tanısı alan yedi olgunun dördünde (4/7) mutasyon saptanmış oldu ve mutasyonların hepsi *TWIST1* geni mutasyonları idi. Olguların dördünde anne ve babalar bu mutasyon için değerlendirildi. İki olgunun (SCS4 ve SCS6) fenotipik olarak etkilenmiş annesinin de aynı mutasyonu taşıdığı belirlendi. bir olgunun (SCS5) anne-babasının ise mutasyon taşımadığı, gonadal mosaisizm dışlanamamakla birlikte, mutasyonun *de novo* oluştuğu saptandı. Bir olgunun anne babası kan örneği vermediği için değerlendirme yapılamadı.



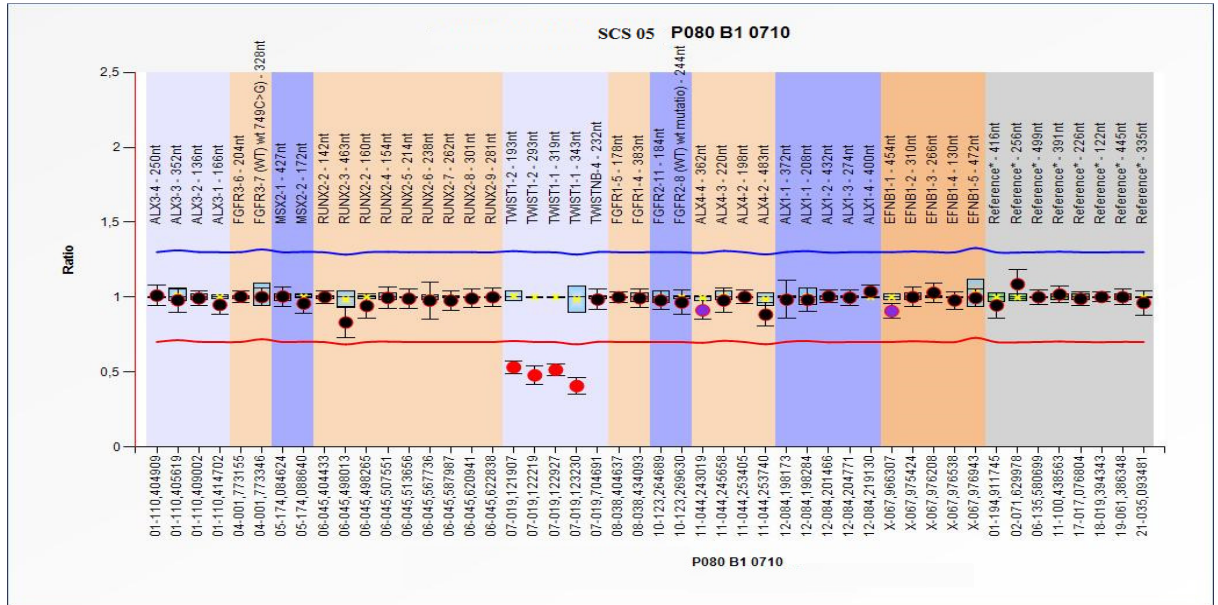
Şekil 38: Saethre-Chotzen sendromu bir olguda saptanan *TWIST1* geni ekzon 1 c.355C>T mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu SCS3)



Şekil 39: Saethre-Chotzen sendromlu bir olguda saptanan *TWIST1* geni ekzon 1 21bç'lik duplikasyon mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu SCS4)



Şekil 40: Saethre-Chotzen sendromlu bir olguda (SCS6) saptanan *TWIST1* geni ekzon 1 c.376G>T mutasyonu elektroferogram görüntüsü



Şekil 41: Saethre-Chotzen sendromlu bir olguda (SCS5) MLPA tekniği ile saptanan *TWIST1* tüm gen heterozigot delesyonu bar grafik görüntüsü

4.1.5. Muenke Sendromu

4.1.5.1. Muenke Sendromu Klinik Bulguları

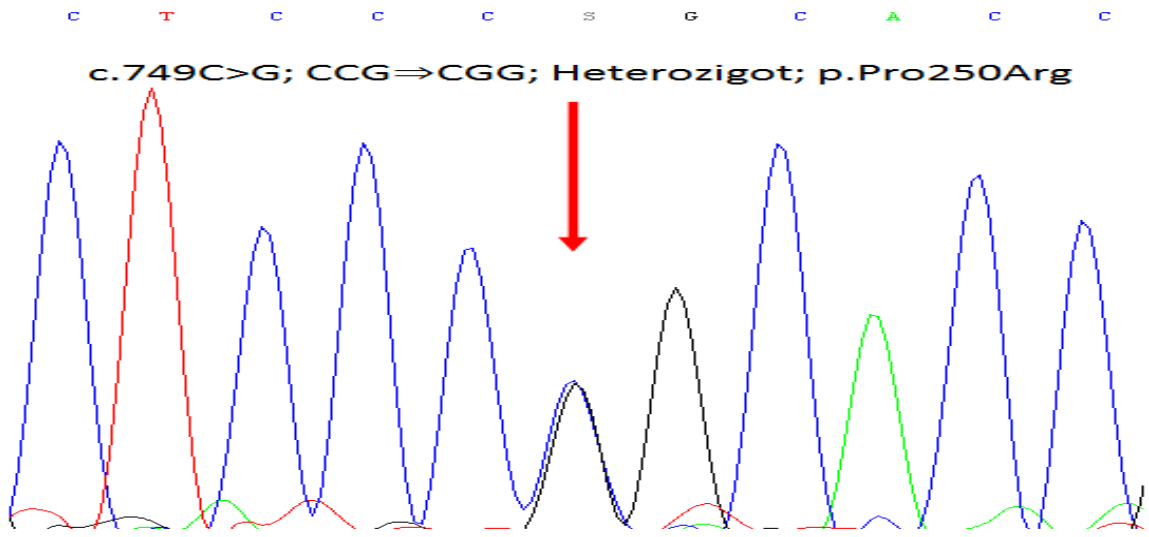
Saethre-Chatzen sendromlu olguların klinik bulguları tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 9: Muenke / Saethre-Chatzen sendromu ön tanı olguların klinik bulguları ve moleküler sonuçları

OLGULAR		MUS1	MUS2	MUS3	MUS4	toplam
Aile öyküsü		-	-	-	-	-
Mat/pat yaş		35/34	29/34	28/29	28/30	30/31,75
Cinsiyet		E	D	D	D	3D/1E
Akraba evliliği		1° kuzen	-	-	-	1/4
İlk değerlendirme yaşı		1 yaş	3,5 ay	2 ay	2,5 ay	
sefali	sinostoz					
Plagiosefali	unikoronal	+	-	-	+	2/4
Brakisefali	Bikoronal	-	+	+	-	2/4
Kraniyofasiyal bulgular						
Dar alın		+	-	-	-	1/4
Belirgin alın		-	+	+	+	3/4
Yüksek dar damak		+	-	+	+	3/4
Fasiyal asimetri		+	-	-	-	1/4
Basık burun kökü		+	+	+	+	4/4
Antevort burun delikleri		-	+	+	-	2/4
Aşağı çekik palpebral fissür		-	-	+	-	1/4
Fasiyel hipoplazi		-	midfasiyal	-	-	1/4
Displastik kulak		-	-	+	-	1/4
Oküler Bulgular						
Proptozis		-	+	+	+	3/4
Hipertelorizm		-		+	+	2/4
Ekstremitte bulguları						
Sindaktili		+	-	-	-	1/4
Klinodaktili		-	-	+	-	1/4
Diğer						
Konjenital kalp anomalisi		ASD, PDA	-	-	-	1/4
Psikomotor gerilik/MR		-	+	-	-	1/4
Moleküler analiz sonucu		-	-	FGFR3 ekzon 7'de c.749C>G p.Pro250Arg	FGFR3 ekzon 7'de c.749C>G p.Pro250Arg	2/4

4.1.5.2. Muenke Sendromunda Moleküler Analiz Sonuçları

Olguların ikisinde dizi analizi ile değerlendirilen *FGFR3* geninde mutasyonlar saptandı. Bunlar, ilk basamakta iki olguda ekzon 7'de saptanan c.749C>G (p.Pro250Arg, p.P250R) mutasyonudur (şekil 42). Bu araştırmada Muenke sendromu klinik tanısı alan dört olgunun ikisinde (2/4) mutasyon saptandı ve mutasyonların tümü *FGFR3* geni mutasyonları idi. Olguların tümünde anne ve babalar bu mutasyon için değerlendirildi ve mutasyon saptanmadı. Bu sonuçlar gonadal mosaisizm dışlanamamakla birlikte, mutasyonun *de novo* oluştuğu lehinedir.



Şekil 42: Muenke sendromunda MUS3 ve MUS4 olgularında saptanan c.749C>G mutasyonu elektroferogram görüntüsü (Olgu MUS4)

4.2. Non-sendromik Kraniosinostoz Olguları

4.2.1. Non-sendromik Kraniosinostoz Olgularının Klinik Bulguları

Non-sendromik kraniosinostoz olgularının klinik bulguları tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10: Non-sendromik kraniyosinostoz ön tanımlı olguların klinik bulguları

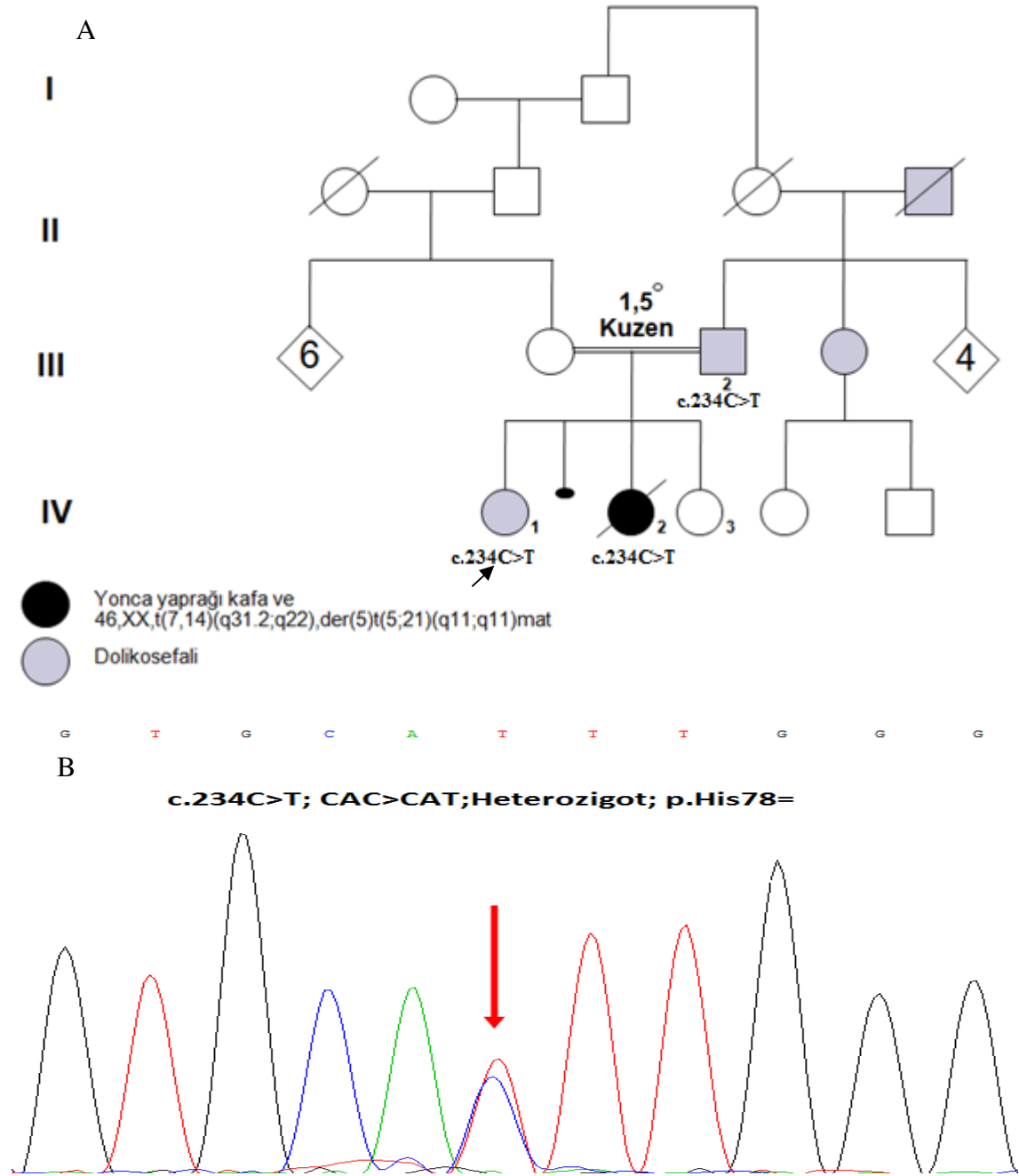
OLGULAR	NCS 1	NCS 2	NCS 3	NCS 4	NCS 5	NCS 6	NCS 7	NCS 8	NCS 9	toplam
Aile öyküsü	+ (pat, kız kardeş)	-	-	-	-	-	-	-	-	1/9
Mat/pat yaş	26/30	28/36	20/20	27/26	21/25	29/30	26/38	33/35	30/30	26,6/30
Cinsiyet	D	E	E	E	D	D	E	E	E	3D/6E
Akraba evliliği	1,5° kuzen	-	-	1,5° kuzen	1° kuzen	1,5° kuzen	1° kuzen	-	1° kuzen	6/9
İlk değerlendirme yaşı	10 gün	2,5 yaş	25 GH	2 yaş	36 GH	1 yaş	8 gün	2 yaş	5 ay	
sefali	sinostoz									
Dolikosefali	Sagittal	+	-	-	-	-	-	-	-	1/9
Skafosefali	Sagittal	-	+	-	-	-	+	+	+	4/9
Plagiosefali	koronal	-	-	+	-	+	-	-	-	2/9
Brakiosefali	Bikoronal	-	-	-	+	-	-	-	+	2/9
Kraniyofasiyal bulgular										
Çıkk/Belirgin Alın	-	-	-	-	+	+	-	-	+	3/9
Geniş fontaneler	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1/9
Yüksek/Dar damak	+	-	+	-	-	-	+	+	+	5/9
Basık burunkökü	-	+	-	+	+	-	-	-	+	4/9
Antevert burun delikleri	-	-	-	-	+	-	-	-	+	2/9
Aşağı çekik palpebral fissür	-	-	-	-	-	-	+	-	+	2/9
Kısa Boyun	-	-	-	-	-	+	-	-	+	2/9
Fasiyel hipoplazi	-	-	-	-	Mid-fasiyal	Maksiller.	-	-	-	2/9
Displastik kulak	-	-	+	-	-	-	+	-	-	2/9
Oküler Bulgular										
Proptozis / Orbitalarda Sıklık	+	-	-	+	+	+	+	-	-	5/9
Hipertelorizm	+	-	-	-	+	-	+	-	+	4/9
Ptozis	+	-	-	+	-	-	-	-	+	3/9
Strabismus	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1/9
Ekstremitte bulguları										
Sindaktili	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1/9
Geniş el/ayak baş parmakları	-	-	+	-	+	-	-	-	-	2/9
Ayak Baş Parmağı deviasyonu	-	-	-	Med. Dev.	-	-	-	-	-	1/9
Diğer										
Konjenital kalp anomalisi	2/6 sistolik üfürüm	-	-	-	-	2/6 sistolik üfürüm	2/6 sistolik üfürüm	-	-	3/9
Moleküler analiz sonucu	FGFR2 ekzon 3'te c.234C>T p.His78=	-	-	-	-	-	-	-	-	1/9

D: Dişi, E: Erkek

4.2.1.1. Non-sendromik Kraniyosinostoz Olgularında Moleküler Analiz Sonuçları

Non-sendromik kraniyosinostoz olgularının birinde (şekil 43A, IV:1), ikinci basamakta, *FGFR2* dizi analizi ile ekzon 3'te c.234C>T (p.His78=) değişimi saptandı (şekil 43B). Daha önce literatürde tanımlanmamış bu değişim, olgunun dolikosefali tanısı alan, babası (III:2) ile yonca yaprağı kafatası yapısı olan kız kardeşinde (IV:2) saptanırken sağlıklı kız kardeşinde (IV:3) saptanmadı. Daha önce karakterize edilmemiş DNA dizi değişimlerinin *in silico* analizi ile patolojik olup olmadığını değerlendiren

“Mutation Taster” programı, bu değişimin hastalık ilişkili olacağı tahminini vermektedir (97).



Şekil 43 A.NSC1 olgu aile ağacı; IV:1, IV:2 ve III:2 olgularında *FGFR2* geni ekzon 3 c.234C>T mutasyonu B.Non-sendromik kraniyosinostoz NCS1 olgusunda saptanan c.234C>T dizi analizi elektroferogram görüntüsü

Diğer non-sendromik kraniyosinostoz olgularında ise herhangi bir mutasyon saptanmadı.

4.3. Dizi /MLPA Analizi İle Saptanan Mutasyonlara Genel Bakış

Çalışmamızda DNA dizi analizi ile saptanan mutasyonların tamamı heterozigot olup otozomal dominant kalıtımla uyumlu idi. Bu mutasyonların kalıtımının araştırılması amacıyla parental inceleme planlandı, ancak mutasyon saptanan 21 ailenin dördünde anne ve baba kan örneği vermediler. 17 ebeveyn çiftinde tamamlanan çalışmada, mutasyonun dördünde ailevi (iki mat ve iki pat), diğerlerinde ise *de novo* olduğu gösterildi. Maternal kalıtım gösteren iki olguda Saethre-Chotzen sendromu (SCS4 ve SCS6), paternal kalıtım gösteren iki olgunun biri Pfeiffer sendromlu (PS6), diğer olgu ise Non-sendromik kraniyosinostoz (NSC1) olgu grubunda idi.

Bu çalışma kapsamında araştırılan 40 kraniyosinostoz olgusunun 21'inde (21/40, %52,5) fenotip ile ilişkili üç gende (*FGFR2*, *FGFR3* ve *TWIST1*) 13 farklı mutasyon saptandı. Bu mutasyonlardan yedisi yanlış anlamlı mutasyon, biri stop kodona neden olan anlamsız mutasyon, biri literatürde daha önce tanımlanmamış proteini değiştirmeyen sessiz (sinonim) mutasyon, biri 21bç'lik duplikasyon mutasyonu ve biri tüm geni içeren delesyon mutasyonu idi. Onüç mutasyonun 12'sine dizi analizi ile birine MLPA analizi ile tanı konulmuş oldu.

4.3.1. Bu çalışmada mutasyon saptanan olgulara genel bakış (Genler, Mutasyonlar ve İlişkili Fenotipler)

Bu çalışmada mutasyon saptanan 20 sendromik ve bir nonsendromik olguda; fenotip, mutasyon saptanan gen, mutasyonun görüldüğü ekzon, mutasyonun tipi ve aminoasit düzeyinde oluşan değişim tablo 11'de özetlendi.

Tablo 11: Mutasyon saptanan olgularda, fenotipler, ilişkili genler, mutasyonlar ve yol açtığı aminoasit değişimleri (n:21)

Fenotip	Gen ve NM numarası	Ekzon	Baz Değişimi	Nükleotid	AA* Değişimi
Apert sendromu n:5	<i>FGFR2</i> NM_000141.4	7	TCG-TGG	c.755C>G	p.Ser252Trp
Pfeiffer sendromu n:1	<i>FGFR2</i> NM_000141.4	5	TGTGCCT ^{^171} GCG gcCAACACTGTC	c.514_515del GCinsTT	p.Ala172Phe
Pfeiffer sendromu n:3	<i>FGFR2</i> NM_000141.4	8	TAT-TGT	c.1019A>G	p.Tyr340Cys
Pfeiffer sendromu n:1	<i>FGFR2</i> NM_000141.4	12	AAT-ACT	c.1646A>C	p.Asn549Thr
Pfeiffer sendromu n:1	<i>FGFR2</i> NM_000141.4	13	GAG-GCG	c.1694A>C	p.Glu565Ala
Crouzon sendromu n:2	<i>FGFR2</i> NM_000141.4	7	TGC-TTC	c.833G>T	p.Cys278Phe
Crouzon sendromu n:1	<i>FGFR2</i> NM_000141.4	8	TGC-TAC	c.1025G>A	p.Cys342Tyr
Muenke sendromu n:2	<i>FGFR3</i> NM_000142.4	7	CCG-CGG	749C>G	p.Pro250Arg
Saethre Chotzen sendromu n:1	<i>TWIST1</i> NM_000474.3	1	CAG-TAG	355C>T	p.Gln119Term
Saethre Chotzen sendromu n:1	<i>TWIST1</i> NM_000474.3	1	GAG-TAG	c.376G>T	p.Glu126Term
Saethre Chotzen sendromu n:1	<i>TWIST1</i> NM_000474.3	1	c.396_416, 21bp dup GAAGATCATCCC CACGCTGCC; CGCGCTG ^{^131} CGg aagatcatcccccacgctgcc GAAGATCATC	-	-
Saethre Chotzen sendromu n:1	<i>TWIST1</i> NM_000474.3	tüm gen	MLPA P080 <i>TWIST1</i> heterozigot tüm gen delesyonu	-	-
Non-sendromik kraniyosinostoz n:1	<i>FGFR2</i> NM_000141.4	3	CAC-CAT	c.234C>T	**p.His78His

AA*:Amino asit **Yeni mutasyon

5. TARTIŞMA

Kraniyosinostoz, beyin kubbesinin sütürlerinden bir veya birkaçının erken kapanması ile ortaya çıkan, 1/2100-1/2500 canlı doğumda bir gözlenen, çocukluk çağının en önemli morbidite etmenlerinden biridir (1-2, 67). Beyin kubbe sütürleri kafatasına esneklik ve beyin hacminin gelişmesine olanak sağlar. Sütürlerin erken kapanması ise kraniyofasiyal ve merkezi sinir sisteminin gelişimini olumsuz etkiler ve kraniyal ve fasiyal deformasyona/ dismorfizme yol açar. Bu malformasyon çoğunlukla izole, nadir olarak da başka bulgularla birlikte sendromik olarak gözlenir. Bu sendromlardan iyi tanımlanmış olanlar akrosefalosindaktili grubunda yer alan Apert, Pfeiffer, Crouzon, Muenke ve Saethre-Chotzen sendromlarıdır. Kraniosinostozların önemli bir bölümünü non-sendromik kraniyosinostozlar oluşturur ve sinostoz gösteren sütüre göre isimlendirilirler (sagittal, unilateral koronal, bilateral koronal, metopik ve lambdoid) (2).

Kraniyosinostoz ilişkili ilk tek gen mutasyonu, *MSX2*'de Jabs ve ark.'ları (1993) tarafından tanımlanmış (102), ancak sonraki yıllarda bu ilişki gösterilememiştir (2, 6). Reardon ve ark. (1994), Crouzon sendromu'nda *FGFR2* geninde c.1025G>A (p.Cys342Tyr) mutasyonunu (74), aynı yıl Muenke ve ark. (1994) Pfeiffer sendromlu olgularda *FGFR1* geninde c.755C>G (p.Pro252Arg) mutasyonunu bildirmişlerdir (52). Rutland ve ark. (1995), Pfeiffer sendromu'nda *FGFR2* geninde c.1021A>C (p.Thr341Pro) mutasyonunu tanımlamıştır (103). Aynı yıl Wilkie ve ark. (1995), *FGFR2* genindeki c.755C>G (p.Ser252Trp) ve c.758C>G (p.Pro253Arg) mutasyonlarının Apert sendromu ile ilişkisini göstermiştir (67). İki yıl sonra Muenke ve ark. (1997), *FGFR3* geninde c.749C>G (p.Pro250Arg) mutasyonunu tanımlamış ve aynı yıl, El Ghouzzi ve ark. (1997) Saethre-Chotzen sendromlu olgularda *TWIST1* geninde, c.376G>T (p.Glu126Term) mutasyonunu ilk kez göstermiştir (104). NCBI veri tabanında (Mayıs 2015) yapılan taramada kraniyosinostoz ilişkili gen sayısının 24'e (*ADAMTSL4, ALX4, CHST3, ERF, FBNI, FGF3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FREM1, GLI3, IGF1R, IL11RA, MCPHI, MSX2, OSTM1, RBFOX1, RUNX2, SHOC2, SOX6, TCF12, TGFBR1, TGFBR1, TWIST1*) ulaştığı gözlenmiştir (91, 105).

Bugüne kadar yayınlanmış geniş olgu seri çalışmaları, kraniyosinostoz ilişkili mutasyonların yaklaşık %32'sinin *FGFR2*, %25'inin *FGFR3* ve %19'unun *TWIST1*

geninde olduğunu göstermektedir (2). Kraniosinostozlu olguların halen önemli bir bölümünde moleküler etiyoloji aydınlatılamamış olması yeni aday genlerin varlığı veya farklı mekanizma olasılığını işaret etmektedir.

Kraniosinostozlu olgularda tanımlı genlerin araştırılmasını amaçlayan bu çalışma, European Research Area Network (E-RARE) CRANIRARE-2 destekli “Kraniofasiyal Malformasyonlara Klinik ve Genetik Yaklaşım” projesinin (112S398) bir bölümü olarak planlanmıştır. Çalışmanın başladığı 2011 yılında, kraniosinostoz ile ilişkisi kesinleşmiş sekiz gen (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREMI* ve *RAB23*) mevcuttu ve bu genlerin olgu grubumuzda belli bir akış şeması içinde dizi analizi ve MLPA tekniği ile incelenmesi, mutasyon ve mutasyon oranlarının saptanması amaçlanmıştır. Mutasyon saptanmayan olguların ise ikinci aşamada planlanacak yeni çalışmalarda fenotiple ilişkili yeni genlerin belirlenmesinde önemli bir kaynak oluşturacağı ön görülmüştü.

1990-2014 yılları arasında, İ.Ü., İ.T.F., Tıbbi Genetik AD, Tıbbi Genetik polikliniğine kayıtlı 31’i sendromik ve dokuzu non-sendromik toplam 40 kraniosinostoz olgusunda yürütülen çalışmamızda, mutasyon saptama oranı %52,5 (21/40) idi. Sendromik grupta mutasyon saptama oranı %64,5 (20/31) iken, non-sendromik grupta bu oran % 11,1 (1/9) idi. Sendromik olgularda moleküler tanı olasılığı non-sendromik olgulara göre belirgin olarak yüksek olduğundan, genel serideki sendromik olgu sayısının non-sendromik olgu sayısına kıyasla çok daha fazla olması genel seri oranını etkilemektedir. Bu nedenle, mutasyon oranlarının sendromlara göre değerlendirilmesinin daha doğru olacağı düşünülerek, mutasyon saptama oranları klinik ön tanılara göre değerlendirildi. Literatürde, Apert sendromlu olgularda, mutasyon saptama oranı %91,6 ile %100 arasında değişmektedir (106-107). Serimizde Apert sendromlu olguların tümünde, ilk basamakta *FGFR2* geninde aynı mutasyonun saptanması literatürle uyumlu idi ve klinik tanı varlığında moleküler analizin hızlı ve hedefe yönelik planlanabileceğini göstermektedir.

Apert sendromu için ilişkili bilinen tek gen *FGFR2*’dir ve bugüne kadar toplam 9 farklı mutasyon tanımlanmıştır (82, 91). Mutasyonlar arasında en sık saptananı D3 domainini kodlayan bölgede yer alan, ekzon 7 c.755C>G (p.Ser252Trp) mutasyonudur. İkinci sıklıkla olan mutasyon ise aynı domaini kodlayan bölgede ve ekzon 7’de c.758C>G (p.Pro253Arg) mutasyonudur (12, 49, 106-109) Bu iki *FGFR2* geni mutasyonu, olguların %95-98’inde gösterilmektedir (2, 12, 109). Olgularımızın

tümünde saptanan p.Ser252Trp mutasyonu, Türkiye’den 12 Apert sendromlu olguyu irdeleyen bir çalışmada (106), 11 olgunun yedisinde (%58), gösterilmiş, dördünde ise p.Pro253Arg (%33) mutasyonu saptanmıştır (106). Serimizde ikinci mutasyonun saptanmaması olgu sayısının sınırlı olması ile ilişkilendirilebilir.

FGFR2 geninde c.755C>G mutasyonu, cDNA düzeyinde 755. nükleotid olan sitozinin guanine transversiyonu sonucu, translasyonda peptit zincirinde 252. kodondaki serin aminoasidi triptofan aminoasidine dönüşmesine (p.Ser252Trp) yanlış anlamlı bir mutasyonun oluşmasına yol açmaktadır. Lemonnier ve ark.’ları (2001), Apert sendromu’nda bu mutasyonun kaspaz 8 ve çeşitli sitokinler ile PKC yolağını aktive ederek, osteoblast apoptozunu indüklediği ve prematür kranial osifikasyona yol açtığını göstermiştir (17, 110-111). Mezenkimal kök hücreler yetişkin kemik homestazi için önemli olup, fare çalışmaları, p.Ser252Trp mutasyonunun proliferasyonu azaltıp, osteoblast olgunlaşması ve erken dönem kemik matris mineralizasyonu farklılaşması ve anormal apoptoz sonucu normal kemik gelişimini değiştirdiğini göstermiştir (111). Yeh ve ark. (2013), koronal sütür periosteal fibroblastları kullanarak yaptıkları fare modeli çalışmasında, normal *FGFR2*’nin FGF2 ile aktive olmasıyla, 79 farklı genin ekspresyonunun değiştiğini ve bu genlerin hücre proliferasyonu ve göçünde rol alan MAPK, PI3K/Akt (*phosphoinositide-3-kinase / protein kinase B*) veya jak-STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) sinyal yolları üzerinde olduğunu göstermişlerdir. p.Ser252Trp mutasyonunun özellikle hücre ölümü ve hücre döngüsünde rol alan 55 farklı genin ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Bu mutasyonun, *FGFR2*’de fonksiyon kazanımı ile aşırı sinyal verme işlevi gerçekleştirerek, farklı genlerin aktivasyonuna yol açtığını göstermişlerdir (112). *FGFR2* mutasyonlarının fosfolipaz C γ , PKC α ve Src gibi çeşitli sinyal yollarını etkilemesi ile osteoblast fonksiyonu ve kranial osteogenez hızında artış meydana geldiği bildirilmiştir (113). Miraoui ve ark. (2010), p.Ser252Trp mutasyonuna sahip insan Apert osteoblastlarında transkriptomik analizlerle aktif *FGFR2*’nin EGFR ve PDGFR α üretimini ve sinyal vermesini arttırdığını ve bunun bazı osteoblast özgün genleri [*RUNX2*, (osteoblast transkripsiyon faktör); *ALP*, (Alkalin fosfataz); *COL1A1*, (tip 1 kollagen) ve *OC* (osteokalsin)] inhibe ederek, mutant hücrede anormal osteoblast fenotipine neden olduğunu saptamışlardır (38, 113).

Özgün klinik bulguları olan Apert sendromu'nda yüksek mutasyon saptama oranı ve mutasyonların %95'den fazlasının, yukarıda belirtilen iki mutasyon olması klinik ve moleküler tanıyı kolaylaştırmaktadır. Olgularda ailevi kalıtım görülmemesinin, nedeni klinik bulguların diğer kraniyosinostoz sendromlarına göre çok daha ağır olması ve ailevi kalıtıma olanak vermemesi olarak yorumlandı. Tüm *de novo* mutasyonların, baba yaşı ile arttığı bilinmektedir ve bu durum baba yaşı ile DNA tamir proteinlerinin aktivitesinin azaldığı hipotezi ile açıklanmaktadır (71,135). Apert sendromlu beş olgumuzun baba yaşı ortalaması 35,6 (yaş aralığı 30-38) idi. Glaser ve ark. (2003), yaşları 21 ile 80 arası 148 erkeğin spermelerinde p.Ser252Trp ve p.Pro253Arg mutasyon oranını farklı yaş kategorilerinde değerlendirmiş ve mutant sperm sıklığının 37 yaşında artmaya başladığını, 60 yaş üzeri gruplarda mutasyon oranının gençlere göre çok daha yüksek olduğunu, ancak Apert sendromlu çocuğu olan genç erkeklerde ise bu mutasyon oranlarının Apert sendromlu çocuğu olmayan yaşlılara göre anlamlı yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Yazarlar, spermde mutasyon sıklığında artış, mutant spermelerin seçimi, birikmiş çevresel etki, DNA tamir mekanizması ve apoptozisde azalma gibi bir çok faktörün etkin olabileceğini ileri sürmüştür (71).

Pfeiffer sendromu'nun klinik spektrumu, Apert sendromu'na göre daha geniştir. Literatürde kraniyosinostozu olmayan, ancak *FGFR1* geninde mutasyon gösterilen Pfeiffer sendromu olgusu klinik spektrumun genişliğini gösteren bir örnektir (115). Bugüne kadar bu sendrom ile ilişkili olarak *FGFR1* ve *FGFR2* gen mutasyonları gösterilmiştir. Pfeiffer sendrom'lu olgularımızda ilk basamakta *FGFR2* geni ekzon 7-8 incelendiğinde (tablo 3), dokuz olgunun üçünde ilk basamakta mutasyon saptandı ve mutasyon yakalama oranı %33,3 olarak belirlendi. İkinci basamakta, ilk basamakta mutasyon belirlenemeyen altı olguda, *FGFR1* ve *FGFR3* genlerinde ekzon 7 ve *FGFR2* geninde ekzon 3, 5, 11, 14-17 tarandığında, sadece bir olguda *FGFR2* geninde ekzon 5'de mutasyon saptandı ve bu basamakta mutasyon yakalama oranı %16,6 olarak belirlendi. Mutasyon belirlenemeyen beş olguda, üçüncü basamakta *FGFR2* ve *FGFR3* genlerinin diğer ekzonları dizilendi ve MLPA tekniği ile del/dup mutasyonları araştırılması ile beş olgunun ikisinde *FGFR2* ekzon 12 ve 13 de mutasyon saptandı. Bu şekilde, bu basamakta mutasyon yakalama oranı %40 olarak belirlendi. Bu çalışmada, Pfeiffer sendrom'lu dokuz olgunun altısında dört farklı mutasyon saptanarak, mutasyon yakalama oranı %66,6'ya ulaştı ki bu oran literatürde %55-95 arasında verilmektedir (12, 109, 116). Bugüne kadar Pfeiffer sendromu'nda OMIM ve HGMD veritabanlarına

göre mutasyonlar ağırlıklı olarak *FGFR2* geninde (%95), ikinci sıklıkla ise *FGFR1* geninde (%5) saptanmaktadır (82, 91). Cornejo-Roldan ve ark.'nın (1999), 78 olguluk serilerinde *FGFR2* geninde 40 olguda 18 farklı mutasyon saptandığı bildirilmiştir (116). Kan ve ark. (2002), 23 Pfeiffer olgusunun 21'inde *FGFR2* geninde 14 farklı mutasyon saptadıklarını bildirmişlerdir (49). *FGFR2* geni mutasyonlarının Apert sendromu'nda saptanan mutasyonlarla örtüşmemesi, aynı gendeki farklı allellerin farklı fenotiplere yol açması ile gözlenen allelik heterojenite için çok tipik bir örnek teşkil etmektedir. Çalışmamızda Pfeiffer sendromlu altı olguda saptanan dört mutasyon, daha önce yayınlanan Türk populasyonundaki beş olguluk diğer çalışmada (106) saptanan dört mutasyondan farklıdır. Pfeiffer sendromu ile ilişkili *FGFR1* ve *FGFR2* geninde, yanlış anlamlı, kırılma hatası, insersiyon ve indel mutasyonları olmak üzere 27 farklı mutasyon bildirilmiştir (91). Literatür taramasına göre *FGFR2* genindeki mutasyonlar içinde Pfeiffer sendromu'nda en sıklıkla saptanan mutasyonlar; ekzon 7'deki c.870G>T (p.Trp290Cys), ekzon 8'deki c.1019A>G (p.Tyr340Cys), ekzon 8'deki c.1024T>C (p.Cys342Arg) ve ekzon 8'deki c.1052C>G (p.Ser351Cys) mutasyonlarıdır (2, 12, 109, 117-118). Serimizde en sık (3/6) saptanan mutasyon ekzon 8 c.1019A>G (p.Tyr340Cys) mutasyonudur. Bu mutasyon ilk kez, Cornejo-Roldan ve ark.'ları tarafından (1999) tanımlanmıştır (116). Genin D3 bölgesinde yer alan bu mutasyon, cDNA düzeyinde 1019. sıradaki A>G tranzisyonu sonucu protein düzeyinde 340. kodonda yer alan tirozin aminoasiti sistein aminositine dönüşmekte, peptid yapısında yeni sistein rezidülerinin kazanımı ile disülfid bağlarında yeni bir yapılanma oluşarak reseptör dimerizasyonu ve tirozin kinaz domainlerinin ligantsız otofosforilasyonu gerçekleşmektedir. Böylece bu mutasyonun liganttan bağımsız fonksiyon kazanımına yol açtığı yorumu yapılmaktadır (12, 39, 119).

Olgularımızdan birinde saptanan *FGFR2* geni ekzon 12'de tirozin kinaz bölgesini kodlayan dizi üzerinde bulunan c.1646A>C mutasyonu, protein düzeyinde 549. pozisyondaki asparajin aminoasitini, treonin aminositine dönüştürerek (p.Asn549Thr) yanlış anlamlı bir mutasyona yol açmaktadır. Diğer olgumuzda saptanan c.1694A>C mutasyonu ilk kez Zankl ve ark. (2004) tarafından bildirilmiştir (120). Bu mutasyon, cDNA düzeyinde 1694. nükleotidde A>C transversiyonu sonucu translasyonda 565. kodondaki glutamat aminoasitini, alanin aminoasitine dönüştüren (p.Glu565Ala) yanlış anlamlı bir mutasyondur. Kinaz bölgesinde oluşan bazı mutasyonların proteinin üç boyutlu yapısını değiştirip ligant bağımsız aktivasyona yol

açtığı gösteren çalışmalar bulunmaktadır (121). Bu mutasyonu taşıyan Pfeiffer olgumuzda, ek olarak parsiyel iris kolobom bulgusu da mevcuttu. Cai ve ark. (2013), FGF/FGFR sinyal yolağında *FGFR1* ve *FGFR2*'deki spesifik nokta mutasyonlarının sinyal kaskatını etkileyerek optik disk ve optik sinir disgenezisine ve oküler koloboma yol açabileceğine dikkat çekmişlerdi (122). Olgumuzdaki kolobom bulgusu bu görüşü desteklemektedir. Pfeiffer sendrom'lu diğer bir olguda *FGFR2* geninde D2 domain bölgesinde, ekzon 5'de saptanan c.514_515delGCinsTT heterozigot indel değişimi 514. ve 515. pozisyonda delesyona uğrayan guanin ve sitozin nükleotidi yerine iki timin nükleotidinin yerleşmesi ile ortaya çıkmaktadır. Böylece protein dizisinde 172. pozisyondaki alanin aminoasidi, fenilalanin aminoasidine dönüşerek (p.Ala172Phe) yanlış anlamlı mutasyon ortaya çıkmaktadır. Literatür ile uyumlu olarak bu mutasyonu taşıyan olgumuzun da fenotipi "hafif" olarak değerlendirilmişti (49).

Pfeiffer sendrom'lu beş ve Crouzon sendrom'lu 25, toplamda 30 olgunun dahil edildiği bir çalışmada, *FGFR2* geninde 278. ve 342. pozisyondaki iki *hot spot* sistein rezidüsünde saptanan mutasyonlar olguların %60'ından (18/30) sorumlu tutulmuştur (123). Diğer bir çalışmada, Pfeiffer sendrom'lu olgularda *FGFR2* geninde 278. ve 342. pozisyondaki mutasyon oranı %42,5 (17/40) olarak gösterilmiştir (117). Türkiye'den yapılan bir çalışmada, 14 Crouzon sendromlu olgunun birinde 278. kodonda ve bir diğerinde ise 342. kodonda mutasyon saptandığı bildirilmiş, aynı çalışmada Pfeiffer sendromlu altı olgunun birinde de 342. pozisyonda mutasyon bulunduğu gösterilerek mutasyon oranının %15 olduğu gözlenmiştir (106). Mayıs 2015'te HGMD veritabanlarında *FGFR2* geninde Crouzon sendromuyla ilişkilendirilmiş 54 mutasyon bildirilmektedir. Bu 54 mutasyonun ikisi 278. ve dördü 342. pozisyondadır. Bu iki *hot spot* mutasyon dışındaki diğer mutasyonlar genin diğer ekzonlarına yayılmıştır. Pfeiffer sendromu ile ilişkili *FGFR2* geninde 27 farklı mutasyondan sadece 342. pozisyonda bir mutasyon bildirilmektedir (91). Çalışmamızda Crouzon sendromlu üç olgudan ikisinde 278. ve bir olguda 342. pozisyonda mutasyon saptanmış, Pfeiffer sendrom'lu altı olguda ise bu iki Crouzon için *hot spot* mutasyon bölgesinde mutasyon saptanmamıştır. HGMD ve serimiz bulgularına göre 278. pozisyon mutasyonları daha çok Crouzon sendromu ile ilişkili görünmektedir. Literatürde Pfeiffer sendromlu olgularda sadece üç olguda 278. pozisyonda mutasyon bildirilmektedir (7,137). Artan bilgi birikimi ile genotip-fenotip korelasyonu olup olmadığı aydınlatılabilecektir.

Crouzon sendrom'lu olgularda ilk basamakta *FGFR2* geni ekzon 7-8 incelendiğinde (tablo 3), altı olgunun üçünde yukarıda bahsi geçen iki farklı kodon noktasında mutasyon saptanarak, Crouzon sendromu'ndaki mutasyon yakalama oranı %50 olarak belirlendi. Bu oran çeşitli yayınlarda % 90'dan yüksek olarak gösterilmektedir (12, 123). Lajeunie ve ark. (2006), çalışmasında Crouzon sendromlu 60 olgunun 57'sinde (%95) *FGFR2* geninde mutasyon saptamışlar ve 12 olguda saptanan c.1025G>A (p.Cys342Tyr) mutasyonunun, %22 oranı ile en sık görülen mutasyon olduğunu bildirmişlerdir (12). Kan ve ark. (2002), 34 Crouzon sendrom'lu olgunun 26'sında *FGFR2* geninde mutasyon saptamış ve sadece bu genin analizi ile %76,4'lik mutasyon yakalama oranına ulaşmışlardır (49). Roscioli ve ark. (2013)'da 90 olgunun 66'sında (%73) *FGFR2* geninde mutasyon saptarken iki olguda (%2,2) *FGFR3* geninde mutasyon belirlemişler ve böylece %75,6'lık mutasyon yakalama oranına ulaşmışlardır (109). Kress ve ark. (2000) ise 28 Crouzon sendromlu olgunun 25'inde *FGFR2* geninde mutasyon göstererek, mutasyon saptama oranlarını % 89 olarak belirtmişlerdir (123). Nur ve ark. (2014), 14 Crouzon sendromlu olgunun sekizinde mutasyon saptayarak %57,1'lik mutasyon yakalama oranına ulaşmışlardır (106). Serimizde mutasyon saptama oranı (%50), daha önce Türkiye'den yapılan çalışma ile uyumlu bulunmuştur. Altı olgumuzdan mutasyon saptanmayan üç olguda birinci derece kuzen evliliği olması Crouzon fenotipe sahip olgularda otozomal resesif mutasyonlarla ilişkili yeni genlerin varlığını düşündürmektedir.

Crouzon sendromlu altı olgunun ikisinde saptanan *FGFR2* genindeki c.833G>T (p.Cys278Phe) mutasyonu ilk kez 1995 yılında Oldridge ve ark.'nın 6 olgusunda gösterilmiştir (124). D3 bölgesi üzerinde bulunan bu mutasyon ile cDNA düzeyinde 833. nükleotiddeki G>T transversiyonu sonucu translasyonda 278. kodonda yer alan sistein aminoasiti, fenil alanin aminositine dönüşerek yanlış anlamlı mutasyon oluşmasına yol açmaktadır (p.Cys278Phe). Sistein rezidülerinin kaybı ile D3 domaininde yer alan disülfid bağlarındaki yeni formasyon ile reseptör dimerizasyonu meydana gelmekte, tirozin kinaz domainlerinin otofosforilasyonu gerçekleşmekte ve liganttan bağımsız fonksiyon kazanımı mutasyonu gerçekleşmektedir (12, 39, 119). Çeşitli çalışmalarda p.Cys278Phe mutasyonu Crouzon dışında Pfeiffer ve çoklu sütür sinostozlu olgularda da tanımlanmıştır (49, 107, 109, 123, 125). Çalışmamızda Crouzon sendromlu diğer bir olguda *FGFR2* geninde c.1025G>A mutasyonu saptanmıştır. D3 bölgesi üzerinde bulunan bu mutasyon ile cDNA düzeyinde 1025. nükleotiddeki G>A tranzisyonu

sonucu translasyonda 342. pozisyonda yer alan sistein aminoasiti, tirozin aminositine dönüşerek mutasyon ortaya çıkması beklenmektedir (p.Cys342Tyr).

Mansukhani ve ark.'ları (2000) fare osteoblastlarında yaptıkları çalışmada p.Cys342Tyr veya p.Ser252Trp mutasyonu taşıyan farelerde, her iki mutasyonun da farklılaşmayı azaltarak, apoptozu önemli oranda arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca biyokimyasal analiz teknikleri ile, osteoblastlardaki FGF sinyali analizinde, FGF2 ligandının artışı ile apoptozun fare kalvariasında arttığını belirlemişlerdir. Bu durumun FGF sinyalinin hücre ölümünü indüklemesi sonucu osteoblastların proliferasyon ve farklılaşması gibi farklı etki oluşturduğunu bildirmişlerdir (43). Hatch ve ark. (2006), *FGFR2* genindeki p.Cys278Phe ve p.Cys342Tyr mutasyonlarının reseptördeki glikolizasyonu azalttığı, reseptör otoaktivasyonunu ise arttırdığını bildirmişlerdir. Bu durumun reseptör dimerizasyonuna yol açarak MAPK ve fosfatidylinositol 3-kinaz gibi sinyal yollarını aktif hale getirdiği ve osteoblast hücre serilerinin yıkımına neden olduğu bildirilmiştir (42). *FGFR2* geninde oluşan fonksiyon kazanım mutasyonlarının Apert sendromu'nda alternatif ligand bağlama afinitesini artırarak, Crouzon sendromu'nda ligand bağımsız otofosforilasyon, dimerizasyon ve tirozin kinaz aktivitesini arttırarak fenotipe yol açtığını bildirmişlerdir (42-43). Yeh ve ark. (2013), bilateral koronal sinostozun görüldüğü Apert ve Crouzon sendromu'nda farelerde koronal sütür periosteal fibroblastlarda *FGFR2* genindeki fonksiyon kazanım mutasyonlarından, p.Cys342Tyr ve p.Ser252Trp mutasyonlarının moleküler ve hücresel düzeyde farklı olduğunu belirtmişler, Apert ve Crouzon sendromu'na neden olan sinyal mekanizmasının farklı olmasıyla ilişkilendirmişlerdir (112).

Çalışmamızda Saethre-Chotzen sendromu olgularımızda, ilk basamakta *TWIST1* geni 1. ekzon incelenmiştir (tablo 4). Bu grupta değerlendirilen yedi olgunun dördünde mutasyon saptanmış ve mutasyon yakalama oranı %57 olarak belirlenmiştir. Roscioli ve ark. (2013), Saethre-Chotzen sendromlu 63 olgudan 39'unda *TWIST1* geninde (%62), birinde *FGFR2* geninde (%2) mutasyon saptamışlar ve mutasyon yakalama oranlarını %63,7 olarak bildirmişlerdir. (109). Wilkie ve ark. (2010), 14 Saethre-Chotzen sendromlu olgunun tümünde, *TWIST1* geninde farklı mutasyonlar saptamış ve mutasyon yakalama oranını %100 olarak vermişlerdir (7). Çalışmamızda Saethre-Chotzen sendromu için saptadığımız mutasyon yakalama oranının düşük bulunması,

örtüşen klinik bulgular nedeniyle yanlış klinik tanı olasılığı ve olgu sayısının az olması ile ilişkili olabilir.

Literatüre göre Saethre-Chotzen sendromu'na *TWIST1* ve *FGFR2* genindeki heterozigot mutasyonlar yol açmaktadır (2, 6, 15). Bugüne kadar yapılan Saethre-Chotzen sendromu ile ilgili çalışmalarda, *TWIST1* geninde 147 farklı mutasyon (yanlış anlamlı, anlamsız mutasyon, delesyon, insersiyon, duplikasyon, indel ve kompleks) bildirilmiştir (91). Literatürde *FGFR2* gen mutasyonu (c.804_809delAGTGGT) ilişkisi sadece bir olguda bildirilmiştir (134). Saethre-Chotzen sendromuna benzeyen (Saethre-Chotzen-like) bir olguda da *FGFR2* de mutasyon (c.842A>G, p.Tyr281Cys) gösterilmiştir (109). Bu durum *FGFR2* ilişkisinin son derece nadir olduğunu göstermektedir. Serimizde de Saethre-Chotzen sendromlu olgularımızda *FGFR2* geninde herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

TWIST1 genindeki c.355C>T (p.Gln119Term) ve c.376G>T (p.Glu126Term) anlamsız mutasyonları, “dur kodonu”na neden olmaktadır. Kress ve ark. (2006) c.355C>T mutasyonunu ilk kez, iki farklı aileden üç olguda tanımlamıştır (14). Roscioli ve ark.'nın (2013) serisindeki 63 Saethre-Chotzen sendromlu olgunun 39'unda *TWIST1* geninde, birinde ise *FGFR2* geninde mutasyon saptanmıştır. Bu çalışmada *TWIST1* geninde c.355C>T ve c.376G>T mutasyonları birer olguda ve gen delesyonu ise iki olguda gösterilmiştir (109). Saethre-Chotzen sendromu'nda mutasyonların yaklaşık %68'i *TWIST1* proteini basic “*helix-loop-helix*” (b-HLH) domain kodlayan bölgelerinde yer almaktadır (14, 85) HLH bölgesi protein dimerizasyonu ve DNA'ya bağlanmak için önemlidir. *TWIST1* proteini oldukça korunmuş olan iki bölge içermektedir. Bunlar, DNA bağlanma domaini ve b-HLH motif bölgesidir (25). c.355C>T ve c.376G>T mutasyonları DNA bağlanma bölgesi içinde yer almaktadır. Bu heterozigot mutasyonlar *TWIST1* geninde haploetersizliğe yol açmaktadır. Bu durumda anlamsız mutasyonların erken dur kodonuna yol açması nedeniyle translasyonun erken kesilmesi, mRNA yıkımı (decay) ya da güdük (trunke) protein üretimi sonrası güdük proteinin proteazlar ile parçalanması nedeniyle fonksiyon kaybına yol açması beklenmektedir. Anlam değiştiren mutasyon tipinin ise, proteindeki heterodimer yapısını bozarak sitoplazmada anormal lokalizasyona neden olması beklenmektedir (25). Chen ve ark.'larının (1995) farelerde yaptığı çalışmada *twist1* geninin heterozigot delesyonunun, kranial ve el/ayak defektlerine yol açtığı bildirilmiştir (126).

Saethre-Chotzen sendromlu bir olguda (SCS4) ve hafif etkilenmiş annesinde literatürde tanımlanmış c.396_416, 21bp dupGAAGATCATCCCCACGCTGCC mutasyonu saptandı. Annenin fenotipinin indeks olguya göre daha hafif olması, otozomal dominant kalımlı hastalıklarda gözlenebilen ekspresivite değişkenliği ile açıklanabilir. Wilkie ve ark. tarafından daha önce üç olguda gösterilen (127) bu mutasyon, bHLH içerisindeki helix1 ve bu bölgenin ardından gelen *loop* bölgelerini kapsamaktadır (25). El Ghouzzi ve ark. (1999), farelerde *Twist* tarafından üretilen ve b-HLH domaini içeren transkripsiyon faktörünün kranial nöral tüp morfogenezinde, kafa mezenkimi oluşmasında gerekli olduğunu göstermişler ve ayrıca farelerde heterozigot *Twist* yokluğunun kafatası defektlerine neden olduğunu bildirmişlerdir (104).

Saethre-Chotzen sendromlu bir olguda (SCS5), MLPA tekniği ile *TWIST1* geninde heterozigot tüm gen delesyonu saptanmıştır. Literatürde *TWIST1* geninde ekzonik veya tüm gen delesyon mutasyonu oranı %11-28 olarak bildirilmektedir (99-100, 128-129). Çalışmamızda, yedi Saethre-Chotzen sendromlu olgunun birinde delesyon saptanmış olması serimizde delesyon tipi mutasyon oranının %14,2 olduğu lehine yorumlanabilir.

Muenke sendromlu dört olgunun ikisinde (MUS03 ve MUS04) birinci basamak testinde, *FGFR3* geni ekzon 7'de c.749C>G (p.Pro250Arg) mutasyonu saptanmış ve mutasyon yakalama oranımız %50 olarak belirlenmiştir. *FGFR3* genindeki bu mutasyon, ilk olarak Bellus ve ark. (1996) tarafından 10 olguda yapılan çalışmada tanımlanmıştır (130-131). 1997 yılında ise Muenke ve ark.'ları sekizi izole 12'si ailevi olan 20 koronal sinostozlu olguda yaptıkları bir çalışmada, olguların tümünde p.Pro250Arg mutasyonu saptamışlardır (130). Wilkie ve ark.'larının (2010), 20 Muenke sendromlu olgunun tamamında *FGFR3* geninde mutasyon saptayarak tek gen ile %100 mutasyon yakalama oranına ulaşmalarına karşın, Kress ve ark. (2006) yedi olgunun altısında (%87,5), Roscioli ve ark. (2013) 48 olgunun 33'ünde (%68,6) bu gende mutasyon saptamışlardır (7, 14, 109). Serimizde mutasyon yakalama oranımızın literatüre göre düşük olmasının nedeni, örtüşen klinik fenotipler veya benzeri fenotipin farklı kalıtım modelleri ve yeni genlerin varlığı ile ilgili olabilir.

FGFR genlerinde oluşan bazı prolin-arjinin aminoasit değişim mutasyonları kraniosinostoz sendromlarında sıkça görülmektedir. Bunlar, Pfeiffer sendromunda *FGFR1* geninde saptanan p.Pro252Arg, Apert sendromu'da *FGFR2* geninde saptanan

p.Pro253Arg, Muenke sendromu'nda *FGFR3* geninde saptanan p.Pro250Arg mutasyonlarıdır (132).

Non-sendromik kraniyosinostoz klinik tanılı dokuz olgumuzun beşinde sagittal, ikisinde unilateral koronal, birinde bilateral koronal ve birinde de lambdoid sinostoz mevcuttu. Bu grupta değerlendirilen ve sagittal sinostoz nedeniyle dolikosefalisi olan bir olguda, *FGFR2* geninde saptanan ve daha önce literatürde tanımlanmamış olan sessiz değişimin c.234C>T (p.His78His) örneklenen etkilenmiş aile bireylerinde gösterilmesi, etkilenmemişlerde ise gösterilememesi, ve ayrıca analiz edilen tahmin programında “hastalık ilişkili” yorumunun yapılması, sagittal kraniyosinostoz ile ilişkili olduğu yönünde değerlendirilebilir. Bu rastgele bir birliktelik de olabileceği gibi, fenotip ile ilişkili de olabilir. Sinonim mutasyonlar yeni bir kırılma hatasına yol açabileceği gibi, translasyon hızını değiştirebilecek fonksiyon kayıplarına neden olabilmektedir (133). Saptanan değişimin daha kapsamlı segregasyon çalışması için, aile incelemesinde etkilenmiş baba tarafından daha fazla bireyin çalışmaya katılmasının yararlı olabileceği düşünüldü. İndeks olgunun daha ağır etkilenmiş olan kız kardeşinde (Şekil 43, IV:2) sitogenetik analizde, dengesiz bir translokasyon varlığının, annedeki dengeli translokasyonun dengesiz ürünü olduğu bilgisine ulaşıldı. Olgudaki ağır fenotipik bulguların (yonca yaprağı kafa, bilateral pitoz ve eksoftalmik görünüm, hipertelorizm, dar-yüksek damak) kromozom anomalisi ile ilişkili olduğu düşünülebilir.

Non-sendromik kraniyosinostoz olgu grubunda, dokuz olgunun birinde *FGFR2* geninde ekzon 3'de, olası mutasyon saptanmış ve mutasyon yakalama oranı serimizde %11,1 belirlenmiştir. Nur ve ark. (2014), 67 non-sendromik kraniyosinostoz olgusunda *FGFR2* geni hedef bölgelerinde yaptıkları incelemede mutasyon saptamamışlardır (106). Roscioli ve ark.'nın (2013), 242 non-sendromik kraniyosinostoz olgusunu değerlendirdiği bir çalışmada, 102 koronal sinostoz olgusunun sekizinde, biri *FGFR1*, ikisi *FGFR2*, üçü *FGFR3*, ikisi *TWIST1* genlerinde ve 94 sagittal sinostoz olgusunun ikisinde *FGFR2* geninde mutasyon saptandığı, metopik sinostozlu 41 ve lambdoid sinostozlu beş olguda ise mutasyon saptanmadığı bildirilmiştir (109). Bu çalışmada mutasyon saptama oranı %4 bulunmuştur. Kan ve ark. (2002), 73 olguluk serilerinde 36 koronal sinostoz olgusunun üçünde, *FGFR2* geninde mutasyon saptanmış, 17 metopik sinostoz, 13 sagittal sinostoz, iki lambdoid sinostoz ve beş çoklu sütür sinostozlu olguda ise mutasyon saptamadıklarını bildirmiş ve çalışmalarında mutasyon saptama oranını %4 olarak belirlenmiştir (49).

Çalışmamızdaki olgu sayısının literatürdeki serilere göre çok düşük olması, mutasyon yakalama oranımızı yükseltmiş gözükmektedir.

Araştırmamızdaki akış şemasına göre, Apert sendromlu olguların tamamında birinci basamakta mutasyon saptanmıştır. Pfeiffer sendromlu olgularda birinci basamakta olguların %33'ünde, ikinci basamakta mutasyon saptanmayanların %16'sında, üçüncü basamakta ise %40'ın mutasyon gösterilebilmiştir. Crouzon sendromlu olgularda birinci basamakta olguların %50'sinde mutasyon belirlenmiştir. Mutasyon saptanmayan Crouzon olgularında diğer basamaklarda herhangi bir mutasyon gösterilememiştir. Muenke sendromu olgularda birinci basamakta olguların %50'sinde mutasyon saptanmıştır. Mutasyon saptanmayan olgularda, diğer basamaklarda herhangi bir mutasyon gösterilememiştir. Saethre-Chotzen sendromlu olgularda birinci basamakta olguların % 42.8'inde, mutasyon saptanmayanlarda ise ikinci basamakta olguların % 25'inde mutasyon saptanmıştır. Akış şemasına göre, çalışmada yer alan diğer genlerde (*FGFR1*, *MSX2*, *POR*, *FREMI*, *RAB23*) ek bir mutasyon varlığı saptanmamıştır.

Mutasyon saptanmayan olgularda, olası otozomal resesif kalıtım varlığını araştırmak amacıyla, serimizde mutasyon saptanan ve saptanmayan sendromik ve non sendromik kraniyosinostoz olgularında akraba evliliği oranları karşılaştırıldı. Serimizdeki 31 sendromik olgunun sekizinin ebeveynlerinde 1°. ya da 1,5° derece kuzen evliliği olduğu (%25) gözlemlendi ki bu oran ülkemiz ortalaması ile uyumlu (%23) idi (135). Mutasyon saptanan ve saptanmayan olgular arasında karşılaştırma yapıldığında ise mutasyon saptanan 20 olgunun sadece birinde, akraba evliliği (%5) gözlenirken, mutasyon saptanmayan olgu grubunda 11 olgunun sekizinde (%72,7) akraba evliliği mevcuttu ve bu dikkat çekici bir fark olarak değerlendirildi. Bu oran bir başka açıdan değerlendirildiğinde, akraba evliliği ürünü olmayan 23 olgunun 19'unda (%82.6) mutasyon gösterilirken, akraba evliliği ürünü olan sekiz olgunun ancak birinde (%12,5) mutasyon gösterilebilmiştir. Bu çalışmada OD mutasyonların araştırıldığı göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen mutasyon saptama oranları akraba evliliği ürünü olmayan olgularda, akraba evliliği olanlara göre yüksektir. Bu durum, mutasyon saptanmayan akraba evliliği olan olgulardaki fenotipin otozomal resesif mutasyonlarla kalıtılan farklı yeni genlerle ilişkili olabileceği savını desteklemektedir.

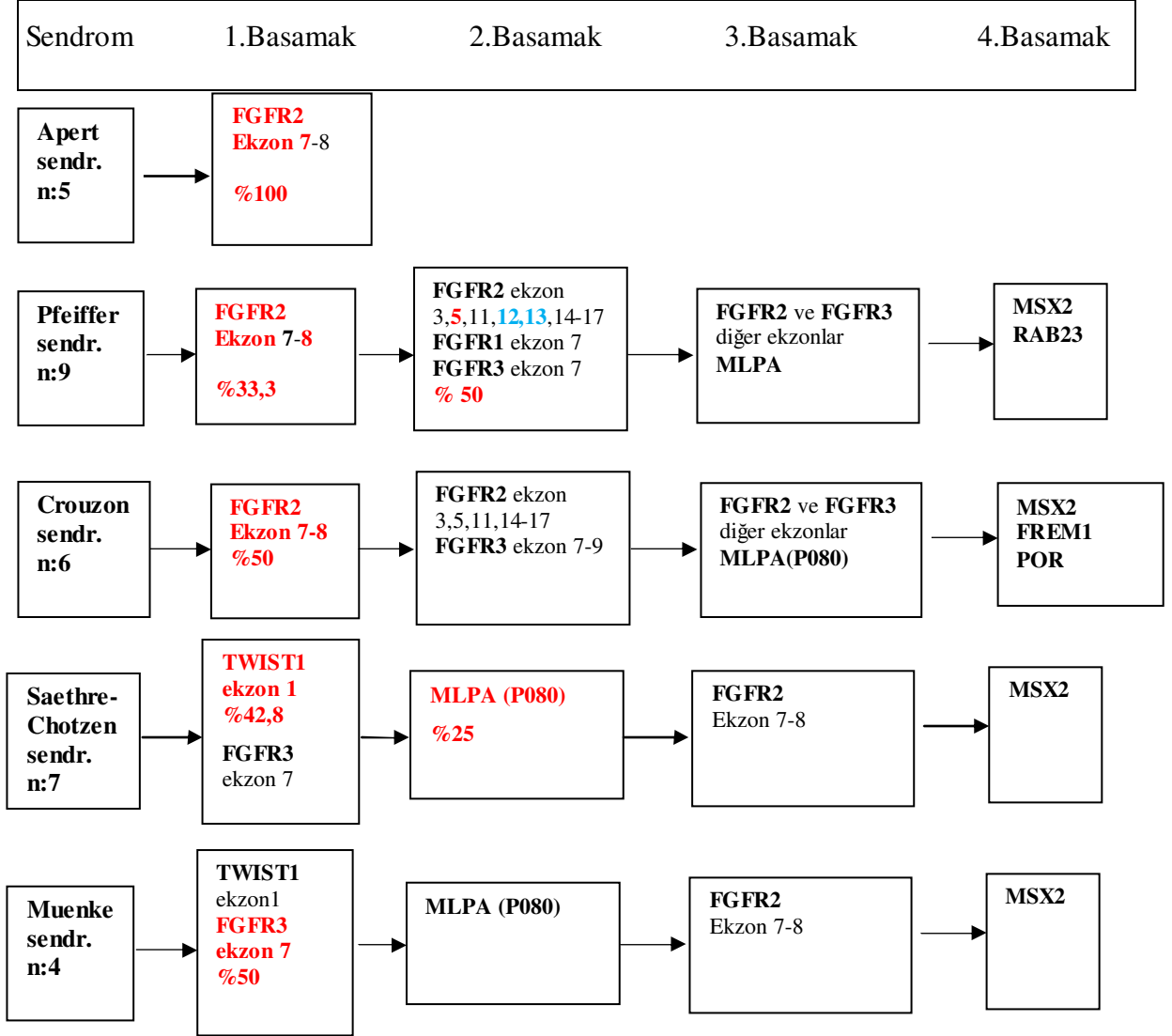
Tüm sendromik kraniyosinostoz olgularında akış şemasının aynen korunmasının, Pfeiffer sendromu'nda ise üçüncü basamakta önerilen *FGFR2* ekzon 12 -13 dizi

analizlerinin ikinci basamakta yer almasının daha uygun olacağı gözlemlendi (Tablo 12). Dördüncü basamakta yer alan *MSX2*, *POR*, *FREM1*, *RAB23* genlerinin kraniosinnozozların etyopatogenezinde çok nadir yer aldığı bilgisi ve çalışmamızda da mutasyon ilişkilendirilen olgu belirlenmediği için, akış şemamıza belirgin katkı sağlamadığı görüşüne varıldı. Sendromik ve non sendromik çoklu sütür tutulumu olan olgularda ise, üçüncü basamakta aCGH analizlerinin yer almasının uygun olacağı görüşümüz kaynaklardan destek almaktadır (2).

Çalışmamızdaki, dokuz non-sendromik olgunun, altısının ebeveynlerinde 1° ya da 1,5° kuzen evliliği olduğu (%66,6) gözlemlendi ve bu oran Türkiye ortalamasının iki katından yüksekti. Bu grupta saptanan olası mutasyon olarak değerlendirilen olgunun ailesindeki 1,5° kuzen evliliği rastgele birliktelik olup, bu çalışmada incelenmemiş otozomal resesif farklı gen mutasyonları da fenotip ile ilişkili olabilir.

Mutasyon saptanmayan, akraba evliliği olan olgularımızın öncelikle otozomal resesif yeni genlerin tanımlanması için özgün bir kohort oluşturduğunu, gelecekte planlanacak yeni projelerde, tüm ekzom/genom incelemeleri ile çok sayıda yeni genin tanımlanmasına olanak sağlayacağına inanıyoruz.

Tablo 12: Sendromik kraniyosinostoz olgularında bu çalışmada saptanan mutasyon oranları ve sonuçlara göre önerilen moleküler analiz akış şeması (mutasyon saptanan gen/ekzonlar kırmızı, akış şemasında önerilen değişiklikler mavi ile gösterilmiştir.)



6. KAYNAKLAR

1. Boulet, S. L., Rasmussen, S. A. ve Honein, M. A. (2008). A population-based study of craniosynostosis in metropolitan Atlanta, 1989-2003. *Am J Med Genet A*, 146A, 984-991.
2. Johnson, D. ve Wilkie, A. O. (2011). Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet*, 19, 369-376.
3. Önal, Çağatay. (2008). Çocukta Baş Muayenesi. *TND Pediatrik Nöroflirürji Öğretim ve Eğitim Grubu Bülteni*, 15-18.
4. Levi, B., Wan, D.C., Wong, V.W., ve ark. (2012). Cranial Suture Biology: From Pathways to Patient Care. *Journal of Craniofacial Surgery*, 23, 13.
5. Cohen, M. M., Jr. (2012). No man's craniosynostosis: the arcana of sutural knowledge. *J Craniofac Surg*, 23, 338-342.
6. Kimonis, V., Gold, J. A., Hoffman, T. L., ve ark. (2007). Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol*, 14, 150-161.
7. Wilkie, A. O., Byren, J. C., Hurst, J. A., ve ark. (2010). Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics*, 126, e391-400.
8. Huang, N., Pandey, A. V., Agrawal, V., ve ark. (2005). Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet*, 76, 729-749.
9. Jenkins, D., Seelow, D., Jehee, F. S., ve ark. (2007). RAB23 mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. *Am J Hum Genet*, 80, 1162-1170.
10. Vissers, L. E., Cox, T. C., Maga, A. M., ve ark. (2011). Heterozygous mutations of *FREM1* are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. *Plos Genetics*, 7, e1002278.
11. Slaney, S. F., Oldridge, M., Hurst, J. A., ve ark. (1996). Differential effects of *FGFR2* mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *Am J Hum Genet*, 58, 923-932.
12. Lajeunie, E., Heuertz, S., El Ghouzzi, V., ve ark. (2006). Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent *FGFR2* mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. *Eur J Hum Genet*, 14, 289-298.
13. Hoefkens, M. F., Vermeij-Keers, C. ve Vaandrager, J. M. (2004). Crouzon syndrome: phenotypic signs and symptoms of the postnatally expressed subtype. *J Craniofac Surg*, 15, 233-240; discussion 241-232.
14. Kress, W., Schropp, C., Lieb, G., ve ark. (2006). Saethre-Chotzen syndrome caused by *TWIST 1* gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet*, 14, 39-48.

15. Freitas, E. C., Nascimento, S. R., de Mello, M. P., ve ark. (2006). Q289P mutation in FGFR2 gene causes Saethre-Chotzen syndrome: some considerations about familial heterogeneity. *Cleft Palate Craniofac J*, 43, 142-147.
16. Tunçbilek, Gökhan. (2009). Kraniyofasiyal cerrahinin temel prensipleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 40, 33-44.
17. Slater, B. J., Lenton, K. A., Kwan, M. D., ve ark. (2008). Cranial sutures: a brief review. *Plast Reconstr Surg*, 121, 170e-178e.
18. Khanna, P. C., Thapa, M. M., Iyer, R. S., ve ark. (2011). Pictorial essay: The many faces of craniosynostosis. *Indian J Radiol Imaging*, 21, 49-56.
19. Cohen, M. Michael ve MacLean, Ruth E. *Craniosynostosis : diagnosis, evaluation, and management*. New York: Oxford University Press, 2000.
20. Kirmi, O., Lo, S. J., Johnson, D., ve ark. (2009). Craniosynostosis: a radiological and surgical perspective. *Semin Ultrasound CT MR*, 30, 492-512.
21. Ridgway, E. B. ve Weiner, H. L. (2004). Skull deformities. *Pediatr Clin North Am*, 51, 359-387.
22. Virchow, R. (1851). Uber den Cvertinismus, namentlich in Franken und Uber Pathologische Schadelformen. *Verb Phys Med Gesell Wurzburg*, 2, 230-256.
23. Boyadjiev, S. A. ve Consortium, Int Craniosynostosis. (2007). Genetic analysis of non-syndromic craniosynostosis. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 10, 129-137.
24. Kane, Alex A. (2004). An Overview of Craniosynostosis. *JPO Journal of Prosthetics & Orthotics*, 16, 50-55.
25. Passos-Bueno, M. R., Serti Eacute, A. E., Jehee, F. S., ve ark. (2008). Genetics of craniosynostosis: genes, syndromes, mutations and genotype-phenotype correlations. *Front Oral Biol*, 12, 107-143.
26. Hunter, A. G. ve Rudd, N. L. (1976). Craniosynostosis. I. Sagittal synostosis: its genetics and associated clinical findings in 214 patients who lacked involvement of the coronal suture(s). *Teratology*, 14, 185-193.
27. Lajeunie, E., Le Merrer, M., Bonaiti-Pellie, C., ve ark. (1995). Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am J Med Genet*, 55, 500-504.
28. Çeltikçi, E. , Börcek, A. Ö. ve Baykaner, M. K. (2013). Kraniyosinostozlar. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 23, 132-137.
29. www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db. (May 2007). Online Mendelian Inheritance In Man (OMIM)
30. Park, J., Park, O. J., Yoon, W. J., ve ark. (2012). Functional characterization of a novel FGFR2 mutation, E731K, in craniosynostosis. *J Cell Biochem*, 113, 457-464.

31. Guillemot, F. ve Zimmer, C. (2011). From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Neuron*, 71, 574-588.
32. Dienstmann, R., Rodon, J., Prat, A., ve ark. (2014). Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol*, 25, 552-563.
33. Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., ve ark. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*, 281, 15694-15700.
34. Coutu, D. L. ve Galipeau, J. (2011). Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)*, 3, 920-933.
35. Ornitz, D. M. (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*, 22, 108-112.
36. Martinez-Abadias, N., Heuze, Y., Wang, Y., ve ark. (2011). FGF/FGFR signaling coordinates skull development by modulating magnitude of morphological integration: evidence from Apert syndrome mouse models. *PLoS One*, 6, e26425.
37. Ornitz, D. M. ve Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, 2, REVIEWS3005.
38. Miraoui, H., Oudina, K., Petite, H., ve ark. (2009). Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling. *J Biol Chem*, 284, 4897-4904.
39. Mohammadi, M., Olsen, S. K. ve Ibrahimi, O. A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16, 107-137.
40. Plotnikov, A. N., Hubbard, S. R., Schlessinger, J., ve ark. (2000). Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*, 101, 413-424.
41. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/. (2014). http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000066468;r=10:121478334-121598458;t=ENST00000358487.
42. Hatch, N. E., Hudson, M., Seto, M. L., ve ark. (2006). Intracellular retention, degradation, and signaling of glycosylation-deficient FGFR2 and craniosynostosis syndrome-associated FGFR2C278F. *J Biol Chem*, 281, 27292-27305.
43. Mansukhani, A., Bellosta, P., Sahni, M., ve ark. (2000). Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol*, 149, 1297-1308.
44. Kelleher, F. C., O'Sullivan, H., Smyth, E., ve ark. (2013). Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease. *Carcinogenesis*, 34, 2198-2205.

45. Yu, K., Herr, A. B., Waksman, G., ve ark. (2000). Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14536-14541.
46. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000127948;r=7:75899200-75986855;t=ENST00000461988.
47. <http://omim.org/>.
<http://omim.org/entry/176943?search=FGFR2&highlight=fgfr2>.
48. Larsson, H., Klint, P., Landgren, E., ve ark. (1999). Fibroblast growth factor receptor-1-mediated endothelial cell proliferation is dependent on the Src homology (SH) 2/SH3 domain-containing adaptor protein Crk. *J Biol Chem*, 274, 25726-25734.
49. Kan, S. H., Elanko, N., Johnson, D., ve ark. (2002). Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Genet*, 70, 472-486.
50. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000077782;r=8:38411138-38468834;t=ENST00000447712.
51. <http://omim.org/entry/>.
http://omim.org/search?index=entry&start=1&limit=10&search=FGFR1&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc.
52. Muenke, M., Schell, U., Hehr, A., ve ark. (1994). A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet*, 8, 269-274.
53. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000068078;r=4:1793307-1808872;t=ENST00000440486.
54. <http://omim.org/entry/>. <http://omim.org/entry/134934>.
55. <http://www.omim.org/entry/>.
<http://www.omim.org/entry/124015?search=por&highlight=por>.
56. Reardon, W., Smith, A., Honour, J. W., ve ark. (2000). Evidence for digenic inheritance in some cases of Antley-Bixler syndrome? *J Med Genet*, 37, 26-32.
57. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/MSX2.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000120149;r=5:174724533-174730893;t=ENST00000239243.
58. <http://omim.org/entry/>.
<http://omim.org/entry/123101?search=MSX2&highlight=msx2>.
59. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/TWIST1.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000122691;r=7:19020991-19117672;t=ENST00000242261.
60. <http://www.omim.org/entry/>.
<http://www.omim.org/entry/601622?search=TWIST1&highlight=twist1>.

61. Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y., ve ark. (1993). Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development*, 117, 751-761.
62. <http://www.omim.org/entry/>.
<http://www.omim.org/entry/606144?search=RAB23&highlight=rab23>.
63. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/RAB23.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000112210;r=6:57186992-57222314;t=ENST00000317483.
64. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/FREM1.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000164946;r=9:14734666-14910995;t=ENST00000422223.
65. <http://www.omim.org/entry/>.
http://www.omim.org/search?index=entry&start=1&limit=10&search=FR EM1&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc.
66. Cunningham, M. L. ve Heike, C. L. (2007). Evaluation of the infant with an abnormal skull shape. *Curr Opin Pediatr*, 19, 645-651.
67. Wilkie, A. O., Slaney, S. F., Oldridge, M., ve ark. (1995). Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet*, 9, 165-172.
68. <http://omim.org/entry/Apert>.
<http://omim.org/entry/101200?search=APERT&highlight=apert>.
69. Blank, C. E. (1960). Apert's syndrome (a type of acrocephalosyndactyly)-observations on a British series of thirty-nine cases. *Ann Hum Genet*, 24, 151-164.
70. Cohen, M. M., Jr., Kreiborg, S., Lammer, E. J., ve ark. (1992). Birth prevalence study of the Apert syndrome. *Am J Med Genet*, 42, 655-659.
71. Glaser, R. L., Broman, K. W., Schulman, R. L., ve ark. (2003). The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. *Am J Hum Genet*, 73, 939-947.
72. Crouzon, Octave. (1912). Dysostose cranio-faciale hereditaire. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*, 33, 545-555.
73. <http://omim.org/crouzon>.
<http://omim.org/clinicalSynopsis/123500?search=&highlight=crouzon>.
74. Reardon, W., Winter, R. M., Rutland, P., ve ark. (1994). Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet*, 8, 98-103.
75. Hızarcıoğlu, Murat. (2004). Crouzon Sendromlu Bir Yenidoğan. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 5, 27-29.
76. Sharma, V. P., Wall, S. A., Lord, H., ve ark. (2012). Atypical Crouzon Syndrome With a Novel Cys62Arg Mutation in FGFR2 Presenting With Sagittal Synostosis. *Cleft Palate Craniofac J*, 49, 373-377.
77. <http://www.omim.org/CAN>. <http://www.omim.org/entry/612247>.

78. M.S. Raam, M. Muenke. *Uncommon Craniosynostosis Syndromes: A Review of Thirteen Conditions*. Basel: Monogr Hum Genet., 2011.
79. Vogels, A. ve Fryns, J. P. (2006). Pfeiffer syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 19.
80. Jay, S., Wiberg, A., Swan, M., ve ark. (2013). The fibroblast growth factor receptor 2 p.Ala172Phe mutation in Pfeiffer syndrome--history repeating itself. *Am J Med Genet A*, 161A, 1158-1163.
81. B.D. Solomon, H. Collmann, W. Kressc, M. Muenke. *Craniosynostosis: A Historical Overview*. BASEL: Karger, 2011.
82. <http://www.omim.org/entry/pfeiffer>.
<http://www.omim.org/entry/101600?search=pfeiffer&highlight=pfeiffer>.
83. J.J. Connerneya, D.B. Spicer. *Signal Transduction Pathways and Their Impairment in Syndromic Craniosynostosis*. Basel: Karger, 2011.
84. <http://www.omim.org/entry/SCS>.
<http://www.omim.org/entry/101400?search=chotzen&highlight=chotzen>.
85. Clauser, L. . (2002). Saethre-Chotzen syndrome.
86. <http://omim.org/entry/Muenke>.
<http://omim.org/entry/602849?search=muenke%20syndrome%20&highlight=muenke%20syndrome%20syndromic>.
87. <http://omim.org/entry/Carpenter>. <http://omim.org/entry/201000>.
88. Ranger, A., Chaudhary, N. ve Matic, D. (2010). Craniosynostosis involving the squamous temporal sutures: a rare and possibly underreported etiology for cranial vault asymmetry. *J Craniofac Surg*, 21, 1547-1550.
89. Heuze, Y. , Holmes, G. , Peter, I. , ve ark. (2014). Closing the Gap: Genetic and Genomic Continuum from Syndromic to Nonsyndromic Craniosynostoses. *Curr Genet Med Rep*, 2, 135-145.
90. Zeugin JA, Hartley JL. . (1985). Ethanol Precipitation of DNA. *Focus*, 7, 1-2.
91. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>.
92. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.
93. www.ensembl.org/genesnpview. www.ensembl.org/genesnpview.
94. <http://genome.ucsc.edu/>. <http://genome.ucsc.edu/>.
95. <http://www.biobase-international.com/>. BIOBASE.
96. <http://www.genenames.org/>. HGNC.
97. <http://www.mutationtaster.org/>. <http://www.mutationtaster.org/>.
98. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
99. MRC-Holland,<https://www.mlpa.com/>.
<https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=fNPBLedDVp38p-CxU2h0mQ..>

100. Toksoy, G. (2011). Fetal kromozom anomalilerinin tanısında multiplex ligationdependent probe amplification tekniğinin etkinliğinin araştırılması. *Doktora Tezi*,
101. Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., ve ark. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30, e57.
102. Jabs, E. W., Muller, U., Li, X., ve ark. (1993). A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell*, 75, 443-450.
103. Rutland, P., Pulleyn, L. J., Reardon, W., ve ark. (1995). Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nat Genet*, 9, 173-176.
104. el Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., ve ark. (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*, 15, 42-46.
105. www.ncbi.nlm.nih.gov/. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.
106. Nur, B. G., Pehlivanoglu, S., Mihci, E., ve ark. (2014). Clinicogenetic Study of Turkish Patients With Syndromic Craniosynostosis and Literature Review. *Pediatric Neurology*, 50, 482-490.
107. Passos-Bueno, M. R., Sertie, A. L., Richieri-Costa, A., ve ark. (1998). Description of a new mutation and characterization of FGFR1, FGFR2, and FGFR3 mutations among Brazilian patients with syndromic craniosynostoses. *Am J Med Genet*, 78, 237-241.
108. Sakai, N., Tokunaga, K., Yamazaki, Y., ve ark. (2001). Sequence analysis of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in Japanese patients with craniosynostosis. *J Craniofac Surg*, 12, 580-585.
109. Roscioli, T., Elakis, G., Cox, T. C., ve ark. (2013). Genotype and clinical care correlations in craniosynostosis: findings from a cohort of 630 Australian and New Zealand patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 163C, 259-270.
110. Lemonnier, J., Hay, E., Delannoy, P., ve ark. (2001). Increased osteoblast apoptosis in apert craniosynostosis: role of protein kinase C and interleukin-1. *Am J Pathol*, 158, 1833-1842.
111. Zhang, L., Chen, P., Chen, L., ve ark. (2015). Inhibited Wnt signaling causes age-dependent abnormalities in the bone matrix mineralization in the Apert syndrome FGFR2(S252W/+) mice. *PLoS One*, 10, e112716.
112. Yeh, E., Fanganiello, R. D., Sunaga, D. Y., ve ark. (2013). Novel molecular pathways elicited by mutant FGFR2 may account for brain abnormalities in Apert syndrome. *PLoS One*, 8, e60439.
113. Miraoui, H., Ringe, J., Haupl, T., ve ark. (2010). Increased EFG- and PDGFalpha-receptor signaling by mutant FGF-receptor 2 contributes to osteoblast dysfunction in Apert craniosynostosis. *Hum Mol Genet*, 19, 1678-1689.

114. Van Dissel-Emiliani, F. M., De Boer-Brouwer, M. ve De Rooij, D. G. (1996). Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period. *Endocrinology*, *137*, 647-654.
115. Hackett, A. ve Rowe, L. (2006). FGFR1 Pfeiffer syndrome without craniosynostosis: an additional case report. *Clin Dysmorphol*, *15*, 207-210.
116. Cornejo-Roldan, L. R., Roessler, E. ve Muenke, M. (1999). Analysis of the mutational spectrum of the FGFR2 gene in Pfeiffer syndrome. *Hum Genet*, *104*, 425-431.
117. Wilkie, A. O. (1997). Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet*, *6*, 1647-1656.
118. Robin, N. H., Falk, M. J. ve Haldeman-Englert, C. R. (1993). FGFR-Related Craniosynostosis Syndromes.
119. Robertson, S. C., Meyer, A. N., Hart, K. C., ve ark. (1998). Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*, 4567-4572.
120. Zankl, A., Jaeger, G., Bonafe, L., ve ark. (2004). Novel mutation in the tyrosine kinase domain of FGFR2 in a patient with Pfeiffer syndrome. *Am J Med Genet A*, *131*, 299-300.
121. McGillivray, G., Savarirayan, R., Cox, T. C., ve ark. (2005). Familial scaphocephaly syndrome caused by a novel mutation in the FGFR2 tyrosine kinase domain. *J Med Genet*, *42*, 656-662.
122. Cai, Z., Tao, C., Li, H., ve ark. (2013). Deficient FGF signaling causes optic nerve dysgenesis and ocular coloboma. *Development*, *140*, 2711-2723.
123. Kress, W., Collmann, H., Busse, M., ve ark. (2000). Clustering of FGFR2 gene mutations in patients with Pfeiffer and Crouzon syndromes (FGFR2-associated craniosynostoses). *Cytogenet Cell Genet*, *91*, 134-137.
124. Oldridge, M., Wilkie, A. O., Slaney, S. F., ve ark. (1995). Mutations in the third immunoglobulin domain of the fibroblast growth factor receptor-2 gene in Crouzon syndrome. *Hum Mol Genet*, *4*, 1077-1082.
125. Shotelersuk, V., Mahatumarat, C., Ittiwut, C., ve ark. (2003). FGFR2 mutations among Thai children with Crouzon and Apert syndromes. *J Craniofac Surg*, *14*, 101-104; discussion 105-107.
126. Chen, Z. F. ve Behringer, R. R. (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev*, *9*, 686-699.
127. Wilkie, A. O., Bochukova, E. G., Hansen, R. M., ve ark. (2007). Clinical dividends from the molecular genetic diagnosis of craniosynostosis. *Am J Med Genet A*, *143A*, 1941-1949.
128. Cai, J., Goodman, B. K., Patel, A. S., ve ark. (2003). Increased risk for developmental delay in Saethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening. *Hum Genet*, *114*, 68-76.

129. Gallagher, E. R., Ratisoontorn, C. ve Cunningham, M. L. (1993). Saethre-Chotzen Syndrome.
130. Muenke, M., Gripp, K. W., McDonald-McGinn, D. M., ve ark. (1997). A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet*, 60, 555-564.
131. Bellus, G. A., Gaudenz, K., Zackai, E. H., ve ark. (1996). Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat Genet*, 14, 174-176.
132. Vajo, Z., Francomano, C. A. ve Wilkin, D. J. (2000). The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev*, 21, 23-39.
133. Sauna, Z. E. ve Kimchi-Sarfaty, C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*, 12, 683-691.
134. Paznekas, W. A., Cunningham, M. L., Howard, T. D., ve ark. (1998). Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Genet*, 62, 1370-1380.
135. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=13458>
136. Intano, G. W., McMahan, C. A., McCarrey, J. R., ve ark. (2002). Base excision repair is limited by different proteins in male germ cell nuclear extracts prepared from young and old mice. *Mol Cell Biol*, 22, 2410-2418.
137. Chun, K., Teebi, A. S., Azimi, C., ve ark. (2003). Screening of patients with craniosynostosis: molecular strategy. *Am J Med Genet A*, 120A, 470-473.

7. FORMLAR

7.1. Moleküler Araştırmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

T.C.
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067)
MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM
FORMU *

Proje/ Adı: “SENDROMİK VE NON-SENDROMİK KRANİYOSİNOSTOZ OLGULARINDA *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREMI* VE *RAB23* GENLERİNDE MOLEKÜLER ANALİZLER”

Tarih:

Bu çalışmaya katılma kararı vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. Aşağıdaki **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı verirseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı: Araştırmanın amacı sizde/ aile bireylerinizde yukarıda belirtilen genetik hastalığa yol açan genetik faktörleri tanımlamaktır. Bu alışma İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir .

Yapılan epidemiyolojik ve genetik çalışmalar, bu hastalığa genetik faktörlerin yol açabileceğini düşündürmektedir. Hastalığa neden olan gen ve genlerin tanımlanabilmesi amacı ile yapılacak analizler için sizden ve ailenizin etkilenmiş ve etkilenmemiş üyelerinden kan örnekleri almamız gerekecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmada gönüllü katılım esas alınmıştır.

2. Olası riskler ve faydalar:

Kan alınması (5 ml K₃EDTA'lı mor kapaklı tüp) sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir. Size ait genetik ve kimlik bilgileri kesinlikle gizli kalacaktır. Ancak yaptığımız testlerin sizin veya ailenizin bir bireyinin gelecekte bu genetik hastalıktan etkileneceğini ortaya çıkarabileceğini belirtmek isteriz. Bu bilginin kötü yönde kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizde psikolojik sorun da yaratabilir. Sizde böyle bir gen bulunduğunu saptadığımızda bulgularımızı istediğiniz takdirde size bildireceğiz. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin iznimize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalmacaktır. Size ait kan ve doku örnekleri sadece bu proje için kullanılacaktır.

Çocuklarla ilgili açıklamalar: Çocuğunuzun bu çalışmaya katılması için tercihen her iki ebeveynin, eğer mevcut değilse bir tanesinin izin formunu imzalaması gerekmektedir.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı ailenizde saptanan genetik hastalığa neden olan veya ortaya çıkmasını kolaylaştıran genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada size veya çocuğunuza doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını henüz bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece gelecekte diğer hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizeyizdir.

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 sahiptir.

7.1.1. Hastanın/Katılımcının Beyanı

Sayın **Prof. Dr. Hülya Kayserili / Doç. Dr. Oya Uyguner / Bio.Volkan Karaman** tarafından **İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, **Prof. Dr. Hülya Kayserili / Prof. Dr. Oya Uyguner / Bio.Volkan Karaman, 0212 414 2000 / 32465 / 35067, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı**'ından arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

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

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

7.2. Gönüllü Onay Formu

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Tarih:

İmzası:

Katılımcıların:	<u>Adı Soyadı</u>	<u>Doğum tarih</u>	<u>İmza</u>	<u>Ebeveyn</u>
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----

*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

8. ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 1374

Tarih : 28.08.2012

Konu : Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER hk,

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

İlgi : DETAE Genetik Anabilim Dalının 01/08/2012 gün ve 262 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek lisans öğrencisi Volkan KARAMAN'ın yürüteceği 2012/1305-1177 dosya numaralı "Sendromik ve non-sendromik kraniyosinostoz olgularında FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST1, MSX2, POR, FREM1 ve RAB23 genlerinde moleküler analizler" başlıklı çalışma kurulumuzun 10.08.2012 tarihli 13 sayılı toplantısında 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: Tutanak

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01/08/2012		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>		Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>		Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:13	Tarih: 10/08/2012				
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında görevli Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER 'ın sorumluluğunda ve Yüksek lisans öğrencisi Volkan KARAMAN'ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir..					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *	Katılım **	İmza		
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Rukiye EKER ÖMEROĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Toplantıya Katılmadı
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Pınar SAİP	Onkoloji	İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Muhtar ÇOKAR	Deontolog	İstanbul İnsan Kaynağını Geliştirme Vakfı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ayşen BULUT	Halk Sağlığı	Emekli	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İzinli
Doç. Dr. Tufan TÜKEK	İç Hastalıkları	Okmeydanı Eğitim ve Araş. Hast. İç Hast. 1. Dahiliye Kliniği	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ünal KUZGUN	Ortopedi	Emekli	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN	Eczacılık	İ.Ü. Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK	Hukukçu	İstanbul Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Demir TIRYAKI	Biyofizik	Emekli	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
M. Kerim AKMAN	İİBF İktisat bölümü	Özel (Ekonomist)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevda ÖZEL	Biyostatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a .maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli iznin alınması gerekmektedir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Sendromik ve non-sendromik kraniosinostoz olgularında FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST1, MSX2, POR, FREM1 ve RAB23 genlerinde moleküler analizler"		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Z.Oya UYGUNER		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Genetik		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı		
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu (BAP)		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
FAZ 4		<input type="checkbox"/>		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>		
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz : Deneysel Araştırma			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

9. EKLER

9.1. *FGFR1* geninin genomik DNA primerleri

Tablo 13: *FGFR1* geninin (NM_023110.2) genomik DNA primerleri

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
FGFR1-F1	2	5'-CAG CCA GGA CCT ATG ATC T-3'	435
FGFR1-R1		5'-CCT GCA ACC ATA TCA CCT-3'	
FGFR1-F2	3	5'-GCT CAG TAG CCT CCA GTA AGT-3'	592
FGFR1-R2		5'-GTC ACC TCT CTG AGA GCC AA-3'	
FGFR1-F3	4&5	5'-CTA AGG GAG CAG TGG GA-3'	714
FGFR1-R3		5'-GCA TGT AAT CAG GAC TTC CT-3'	
FGFR1-F4	6	5'-CTC TGA TAT GGA GGG CA-3'	311
FGFR1-R4		5'-CCC TAA GAA ACC TGG ACA-3'	
FGFR1-F5	7	5'-CAT CAC TGG GAA AGC CA-3'	398
FGFR1-R5		5'-AGG AAT GAT CCC ATT CGG-3'	
FGFR1-F6	8	5'-GCA AAG AAG ATG TCA GGG A-3'	370
FGFR1-R6		5'-GCT CTC CTG CCT CTG TGT-3'	
FGFR1-F7	9	5'-GCT AGA ACT TGC CAT GGT-3'	414
FGFR1-R7		5'-GGA CAA TGG AGA GGG CA-3'	
FGFR1-F8	10&11&12	5'- GAC ATG TGC CTC TGC CAT T-3'	1294
FGFR1-R8		5'-CCT CTG CCA AAG CAG CCT -3'	
FGFR1-F9	13	5'-CCT AAG AGG AGG CAG GAG A-3'	410
FGFR1-R9		5'-CAA CGC CAC CAC AAG ATG A-3'	
FGFR1-F10	14&15&16	5'-CAG AGC AGT GTG GCA GA-3'	986
FGFR1-R10		5'-CTG TAA GGT CAG GGA CGT-3'	
FGFR1-F11	17&18	5'-GTA AGC CCG AGG AGA TGT-3'	614
FGFR1-R11		5'-GAC AGG GAC GGA CAG GT-3'	

9.2. *FGFR2* geninin genomik DNA primerleri

Tablo 14: *FGFR2* geninin (NM_000141.4) genomik DNA primerleri

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
FGFR2-F1	2	5'-GCT GGA GTG ATT TGG CA-3'	410
FGFR2-R1		5'-CAA TGC AAG GGT AGC TGA-3'	

FGFR2-F2	3	5'-CAG GCC TCC ACT GAC CT-3'	467
FGFR2-R2		5'-GAA GCT GTA TGC CTG GCA-3'	
FGFR2-F3	4	5'-CTC TTT GCG AGG GTT CCT-3'	297
FGFR2-R3		5'-CAC AGC ATG GCG CAG AA-3'	
FGFR2-F4	5	5'-CTG TTG GTA GAC ATG AAC CA-3'	413
FGFR2-R4		5'-ATG TGA TGT TCT GAA AGC TTA-3'	
FGFR2-F5	6	5'-GGT GAT TCT TCC ATA CCT-3'	337
FGFR2-R5		5'-CTT ATG GGA GAA ACA GGA-3'	
FGFR2-F6	7	5'-GTC ACT GAC AGC CCT CT-3'	412
FGFR2-R6		5'-GAA CAC TCT CTG CTG GCT A-3'	
FGFR2-F7	8	5'-GAG CTG GTC AGT GTT GCT-3'	429
FGFR2-R7		5'-GTG AGT GTG GGA TCT CAC T-3'	
FGFR2-F8	9	5'-CCA CCT TGC CTT GAG AAT-3'	433
FGFR2-R8		5'-CAC ATG GAA GCT CAC AGA A-3'	
FGFR2-F9	10	5'-CGA TAC TCT GGC TGG GCT-3'	355
FGFR2-R9		5'-GCT GAC ATC ATC ACA CCA AGA-3'	
FGFR2-F10	11	5'-GCA CTC CAT GCT TTA GTA-3'	324
FGFR2-R10		5'-GCC ATG ATA GAG TTC ACA-3'	
FGFR2-F11	12	5'-CTA AGT CTT TGG CAA CTA ACA-3'	310
FGFR2-R11		5'-GAA CTT TAA ACA TGC ACA CA-3'	
FGFR2-F12	13	5'-GCA TGG GTT GTA ATA ACT-3'	383
FGFR2-R12		5'-GGG CTT GAT CTA GCA A -3'	
FGFR2-F13	14	5'-CGG CCA CAC TGT ATT TCT-3'	571
FGFR2-R13Y		5'-CCA GTA ACT TCC AAG CTG T-3'	
FGFR2-F13Y	15	5'-CTA CAG CTT GGA AGT TAC TGG T-3'	576
FGFR2-R13		5'-CAG TTC CAC CTT CTG TGC T-3'	
FGFR2-F14	16	5'-CAG GAG GGC CCA TTT GT-3'	357
FGFR2-R14		5'-GGA AAC CAG GGG CCT TC-3'	
FGFR2-F15	17	5'-CGT CCC CAT ATT GCC TAT TA-3'	419
FGFR2-R15		5'-GGG GAT GTC CCT CTG TCT-3'	
FGFR2-F16	18	5'-CCC ACA TCT CAA GAG TTT-3'	409
FGFR2-R16		5'-CAA GTG GAG ACA ACA AGC T-3'	

9.3. *FGFR3* geninin genomik DNA primerleri

Tablo 15: *FGFR3* geninin (NM_000142.4) genomik DNA primerleri

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
FGFR3-F1	2	5'-GCC GCT TTC GTC CCT GT-3'	395
FGFR3-R1		5'-GCG GAA TCC GGG CTC TA-3'	
FGFR3-F2	3 & 4	5'-GAC CCT GGA TCT GGG TCA-3'	781
FGFR3-R2		5'-GTT GTT CCG GGG CCT TAG T-3'	
FGFR3-F3	5&6&7	5'-GAC AAG ATG TGG AGG CTC CT-3'	984
FGFR3-R3		5'-GTG TGG GGT GGC TGA GAC TT-3'	
FGFR3-F4	8	5'-GGC TGA GGA GTT GGT GGT-3'	370
FGFR3-R4		5'-CGG CCG TAA GTC ACA GGA-3'	
FGFR3-F5	9&10	5'-CTC TGG GCC AGG GGC AT-3'	819
FGFR3-R5		5'-CAT CCC TGA CGG CCC CTA-3'	
FGFR3-F6	11-15	5'-GGG TGA CAC TCT TCG TCC T-3'	1220
FGFR3-R6		5'-GCC TGG GGA CTG CAG CT-3'	
FGFR3-F7	16&17&18	5'- CTC CTG GGT GTG GTT TCT A -3'	942
FGFR3-R7		5'-GTC TCT CCA TCT GCA CTG A-3'	

9.4. *FREM1* geninin genomik DNA primerleri

Tablo 16: *FREM1* geninin (NM_144966.5) genomik DNA primerleri

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
FREM1-F1	3	5'-GGG TAA TGA AAT GGC TGC T -3'	865
FREM1-R1		5'-GCA GCG CAA TAC TAT GCC T-3'	
FREM1-F2	4	5'-GTA GGA TGG TGA CTG GGT A-3'	520
FREM1-R2		5'-GGA AAC AGG ATA CGG CTA A-3'	
FREM1-F3	5	5'-GGT GTT GAC ACC AGG GTA A-3'	941
FREM1-R3		5'-CAC TGC TAC CCA CTA GCT T-3'	
FREM1-F4	6	5'-GAG ACA ACT GGT CAA CCG TT-3'	559
FREM1-R4		5'-CAG AAC CAA CAAG CCT GCA-3'	
FREM1-F5	7	5'-GCT TCA GGT CAC TGCTAG A -3'	926
FREM1-R5		5'-GAA GGC TGT CGA AGG CT-3'	
FREM1-F6	8	5'-GAC ACT TCT CCA GCA TAT T-3'	615
FREM1-R6		5'-GTC TTA TCT CCG GCA GA-3'	
FREM1-F7	9	5'-GAA CTT GCC AAT ACC CTT T-3'	819
FREM1-R7		5'-CAA TGA GCC ACG TAC AAG-3'	
FREM1-F8	10	5'-GTG AGG GAA ATA CGG GCT -3'	745
FREM1-R8		5'-CCT TGC TCG GCT GAC TTA-3'	
FREM1-F9	11	5'-CCT TGG GTA CAT AGA ATG TA -3'	827
FREM1-R9		5'-CCT CTA GTG GTA GAA GAG A-3'	
FREM1-F10	12	5'-AGC TCC TGA ATC ATT TGA CA-3'	566
FREM1-R10		5'-CCA ATG CTG AAG ACA CTA CA-3'	
FREM1-F11	13&14	5'-GCA GTC ATG ACA AGG ATG A-3'	1317
FREM1-R11		5'-GAC TCC CTT CTC CCT GCT-3'	

FREM1-R11seq		5'-GAA ATA GAT GCC ACA CAC TT-3'	
FREM1-F12	15	5'-GAA CTT ATC CTC TTA CCA CA-3'	562
FREM1-R12		5'-CCA CTG GTA TAG CAA GTC A-3'	
FREM1-F13	16	5'-GGC ATT TGA AGG GCT GCT-3'	800
FREM1-R13		5'-CTC TCA CTT TGG AGG CCG T-3'	
FREM1-F14	17	5'-CAT TTC TTG CAA GAT GGT T-3'	625
FREM1-R14		5'-CAC AAT CAG AAA TAC TTC CAT-3'	
FREM1-F15	18	5'-GCT GTT TCA ATG CTT GTA GAA-3'	409
FREM1-R15		5'-GGA CAA TTC CAT ATG GTG GTT-3'	
FREM1-F16	19	5'-GGC TGT GCT GGA ACA GTT -3'	983
FREM1-R16		5'-GCA AGG GGG AAG TCA GAA -3'	
FREM1-F17	20	5'-CAG CCC TTG ATA GCA AGA-3'	518
FREM1-R17		5'-GAG GAA AGG CAG GAA GAT-3'	
FREM1-F18	21	5'-CCT TTG TCC TTC ATG GAA-3'	1283
FREM1-R18		5'-CCC CTA TTT CTG TGA TGT A-3'	
FREM1-F19	22	5'-GGC TAA GAA GGC ACT CT-3'	465
FREM1-R19		5'-GTT CCT CAT GCC TGA GT-3'	
FREM1-F20	23	5'-CTT TCA CGT GTG AGG GTA GA-3'	505
FREM1-R20		5'-CCC CAT GTT GAC AAA GAC TT-3'	
FREM1-F21	24	5'-CTT TGG TTG AAG CCG GT-3'	591
FREM1-R21		5'-CCA GGC AAA GCA GGT GA -3'	
FREM1-F22	25	5'-CTT CCT ACG TTC TCC AGA -3'	1243
FREM1-R22		5'-CTG CAC CAG AGC TGA AA-3'	
FREM1-F23	26	5'-CAC TGA TGA GCC TGA GA-3'	1171
FREM1-R23		5'-GAG GGG ACC ATA TCT CTT-3'	
FREM1-F24	27&28	5'-GGA CTG TCT TTA GCA GGA A -3'	1428
FREM1-R24		5'-GTA AAG CTA CTG GCT TTC CT-3'	
FREM1-F25	29	5'-CTG GTT CCT TTC CCT TCA-3'	689
FREM1-R25		5'-GCT TCA GCA ACA CGT ACA-3'	
FREM1-F26	30	5'-CCT GGA TCC CAA ATG GCT-3'	409
FREM1-R26		5'-GGG CAA AAC CTC AAA TCC A-3'	
FREM1-F27	31	5'-CTT CAG TGA GTT GGT AGC A -3'	518
FREM1-R27		5'-CAA CTA CGG CAC TGA CTT-3'	
FREM1-F28	32	5'-GAG TTT CTG GCA AAT GGC A-3'	538
FREM1-R28		5'-GGC ACT GCA TAA CTG TGC A-3'	
FREM1-F1-29Y	33 & 34	5'-GTG GGA AAT CTT AAG ATT ACA TAT GT-3'	722
FREM1-R1-29Y		5'-GGG AAG CAT TTG TGT TGG GT-3'	
FREM1-F2-29Y	35 & 36	5'-GAA GAC CCA AAG GAG GTG A-3'	857
FREM1-R2-29Y		5'-GCA GCT CTC CGC TTC CAT-3'	
FREM1-F30	37	5'-CCC ACC CTG CAG ATA CTT -3'	772
FREM1-R30		5'-GGA TGT GGA CCC TGC AT-3'	
FREM1-F30	38	5'-CCA AGT TCC TAT CCC TTG T-3'	645
FREM1-R30		5'-CTG GTG CTC CCT GAG ATT-3'	

9.5. MSX2 geninin genomik DNA primerleri

Tablo 17:MSX2 geninin (NM_144966.5) genomik DNA primerleri

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
MSX2 F1	1	5'-CCA ATC AGG GGC GAG CGT-3'	685
MSX2 R1		5'-GGA GTG TAG CGC ACG CAG A-3'	
MSX2 F2	2	5'-GAG AGA TGA CGG GGG A-3'	634
MSX2 R2		5'-CGC TTA GGG TGG TGC A-3'	

9.6. *POR* geninin genomik DNA primerleri

Tablo 18: *POR* geninin (NM_000941.2) genomik DNA primerleri

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
POR-F1	2	5'-CCA AGA CTG TGG CTG TCT T -3'	526
POR-R1		5'- GCT CAA GCA CAA TCT AGC A-3'	
POR-F2	3	5'-GAG TGG CAC GGG ACA AA-3'	374
POR-R2		5'-CAG AGC TGC TTC AGG GCT -3'	
POR-F3	4	5'-CCT TTG CCA CAG TGG CT-3'	541
POR-R3		5'-CAG TCC TGG GGA AAC GA-3'	
POR-F4	5&6	5'-CCA GCC TAA CAC GGG TGA-3'	1189
POR-R4		5'-GAG GCA GGA GAG CCC CT-3'	
POR-F5	7&8	5'-CCT GAT GCT CTG GGT TT-3	1145
POR-R5		5'-GTA CAA ACT GGG CGA GT-3'	
POR-F6	9&10	5'-CAG TTC TTT TAG GGG CCA-3'	1144
POR-R6		5'-CAG CAC CTC ACT CCC TT-3'	
POR-F7	11&12	5'-GGA CTT CCT GTC TGG TT-3'	789
POR-R7		5'-GAC TGA GTC CAC AGC CT-3'	
POR-F8	13&14&15&16	5'-GGG CTG GCT TGT GAG ATT -3'	1353
POR-R8		5'-GCC TCC AGA GGC ATG GA-3'	

9.7. *RAB23* geninin genomik DNA primerleri

Tablo 19:*RAB23* geninin (NM_183227.2) genomik DNA primerleri

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
RAB23-F1	2	5'-GGG AGG GAC CTC AGT TAT -3'	451
RAB23-R1		5'-CTA GTT GCC ACA CCT CGA-3'	
RAB23-F2	3	5'-CAG TGG TTT AAT GGG GT -3'	413
RAB23-R2		5'-CTT CAA GAG AAG CCC TT-3'	
RAB23-F3	4	5'-GAT AAA AGT TGC CCC CA-3'	442
RAB23-R3		5'-CCC AAA CCA ATC ACA TAG A-3'	
RAB23-F4	5	5'-GGG CTA GAG ATT AAT GAC TT-3'	612
RAB23-R4		5'-GAA AAC CTT ACG AGG ATG A-3'	
RAB23-F5	6	5'-GTA CTC AGA TAC TGC CCA A-3'	570
RAB23-R5		5'-GAG CCA GTG TAA GTA CAG AT-3'	
RAB23-F6	7	5'-CAA GCT GGA TGC AAC AGG T-3'	385
RAB23-R6		5'-CCA CCA GAG GTC TCA CTC TA-3'	

9.8. *TWIST1* geninin genomik DNA primerleri

Tablo 20: *TWIST1* geninin (NM_000474.3) genomik DNA primerleri

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
TWIST1-F1	1	5'-GAA TGG TTT GGG AGG ACG A-3'	1301
TWIST1-R1		5'-GAG GCA ACG GTG CCA AGT-3'	

TELİF HAKKI İZİNİ

Kaynak gösterilerek tez'den yararlanılabilir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Volkan	Soyadı	Karaman
Doğ. Yeri	İstanbul	Doğ. Tar.	09.05.77
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	42484151076
Email	karamanvolkan@yahoo.com	Tel	5424855083

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ABD.	2006
Lisans	İ.Ü. Biyoloji Bölümü	2000
Lise	Ö.Çavuşoğlu Lisesi	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İ.T.F. Tıbbi Genetik AD	2009--
2.	Ar.Gör.	İ.T.F. Tıbbi Biyoloji AD	2006-2009-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) YDS Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	54	62,5
Almanca	zayıf	zayıf	zayıf		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	67	66	65
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi