

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**SENDROMİK OLMAYAN KRANİYOSİNOSTOZLU  
PEDIATRİK OLGULARDA OLASI ADAY GENLERİN  
TÜM EKZOM DİZİLEME YÖNTEMİ İLE  
İNCELENEREK GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Elanur YILMAZ

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Özgül ALPER**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2015-933 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2018-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;**

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 02/11/2018

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. ¼zg¼l ALPER  
Akdeniz ¼niversitesi



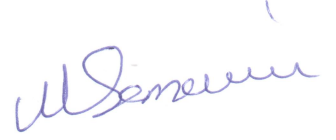
¼ye : Prof. Dr. Ercan MIHÇI  
Akdeniz ¼niversitesi



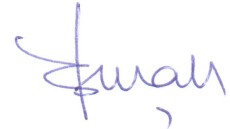
¼ye : Prof. Dr. Sibel OğUZKAN BALCI  
Gaziantep ¼niversitesi



¼ye : Prof. Dr. C. Nur SEMERCİ G¼ND¼Z  
Ankara Yıldırım Beyazıt ¼niversitesi



¼ye : Doç. Dr. ř. Burçak YOLDAş  
Akdeniz ¼niversitesi



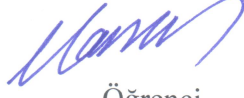
Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstit¼ M¼d¼r¼

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.



Öğrenci

Elanur YILMAZ



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Özgül ALPER

## TEŞEKKÜR

“Bu hayat ancak ilim ve fenle olur. İlim ve fen için kayıt ve şart yoktur.” diyerek yolumu aydınlatan ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK’e,

Doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren bana ve içimdeki bilim heyecanına inanan, bu doğrultuda beni teşvik eden, bilimsel bilginin kıymetini tüm deneyimleriyle aktaran değerli danışman hocam Prof. Dr. Özgül ALPER’e,

Akademik hayatımın şekilleneceği kritik bir dönemde bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN’a ve Doç. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN’a,

Tez sürecim boyunca olguları yüksek titizlikle ele alan, klinik bilgilerin toplanmasında ve değerlendirilmesinde zaman, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Prof. Dr. Ercan MIHÇI’ya ve Doç. Dr. Banu NUR’a,

“Yeni Nesil Dizileme’yi öğrenmek istiyorum” dediğimde, laboratuvarlarının kapılarını sonuna kadar açan, her soruma sabırla yanıt veren ve tüm tecrübelerini benimle paylaşan değerli Dr. Joris VELTMAN, Dr. Alexander HOISCHEN, Dr. Peer ARTS ve Radboud University Genomic Disorders ekibine,

Doktora eğitimim süresince değerli bilgiler edindiğim ve tecrübelerinden faydalandığım Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’ndaki tüm hocalarıma, asistan arkadaşlarıma, Genetik Tanı Merkezi’ndeki kıymetli biyolog arkadaşlarıma ve Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi’nden Dr. Öğr. Üyesi Durkadın DEMİR EKŞİ’ye,

Bana ikinci bir aile olan, mutluluğumu her şeyin önünde tutan ve hayatımdaki varlıklarıyla beni daha da güçlü kılan çok değerli Banu, Üner, Nova BEKÖZ’e ve Suna TÜZÜN’e,

Hayallerime ulaşabilmem için bana her zaman destek olan, inanan, güvenen ve tüm bu süreçte sevgi ve sabırlarını esirgemeyen, gücüme güç katan canım aileme, hayata bakışımı değiştiren yeğenlerime, çalışkanlıklarıyla bana her zaman ilham olan babaanneme, anneanneme ve dedelerime,

Tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Sendromik olmayan kraniyosinostoz, prematür sütür füzyonunun yol açtığı konjenital bir malformasyondur. Projemizde, hedefli ekzom dizileme analizi kullanarak, sendromik olmayan kraniyosinostozun olası genotip-fenotip ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Sendromik olmayan kraniyosinostoz tanılı olgulardan, *FGFR2* geni ekzon IIIa ve IIIc bölgelerinde mutasyon tespit edilememiş ve herhangi bir kromozomal abnormaliteye sahip olmayan 30 olgu çalışmaya dâhil edilmiştir. 21 olgu, 519 gen içeren araştırma paneli kullanılarak hedefli yeni nesil dizileme analizine alınmış ve hastalıkla ilişkili olabilecek mutasyonlar saptanmaya çalışılmıştır. Diğer 9 olguya ise, 21 olguda tespit edilen olası patojenik mutasyonların bulunduğu ekzonlar için Sanger dizileme analizi yapılmıştır. Elde edilen moleküler genetik veri, olguların klinik verisi ile karşılaştırılarak genotip-fenotip ilişkisi değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Yapılan klinik değerlendirmeler sonucunda, olguların %37'sinde sagittal sinostoz, %33'ünde koronal sinostoz, %20'sinde metopik sinostoz ve %10'unda ise multisütür sinostozu tespit edilmiştir. Ayrıca, olguların %47'sinde en az bir oküler abnormalite tespit edilmiştir. DNA dizileme analizi sonucunda, olguların yaklaşık %20'sinde *AXIN2*, *TCF12* ve *ERF* genlerine ait patolojik mutasyonlar tespit edilmiştir. *TCF12* geninde p.M260fs\*5 ve p.P369fs\*26 mutasyonu taşıyan olguların bilateral koronal sinostozu, *AXIN2* geninde p.L349fs\*24 mutasyonu taşıyan olgunun sagittal sinostozu ve *ERF* geninde p.G299fs\*9 mutasyonu taşıyan olgunun ise sağ koronal sinostozu ve kapalı fontanellere sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, Sanger dizileme sonucunda brakisefalik olan bir olgunun *TCF12* geninde c.825+5G>T splay bölge mutasyonu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Sendromik olmayan kraniyosinostoz, hem genetik hem de fenotipik olarak oldukça heterojen bir anomalidir. Bulgularımız, sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgularda genetik tanının, kapanan sütürün çeşidine göre yapılmasının daha hızlı tanıya götüreceği sonucunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** kraniyosinostoz, yeni nesil dizileme, moleküler genetik, sendromik olmayan kraniyosinostoz, genetik

## ABSTRACT

**Objective:** Non-syndromic craniosynostosis is a congenital malformation caused by the premature suture fusion. In this project, we aimed to brighten the genotype-phenotype correlations of the non-syndromic craniosynostosis by using targeted exome sequencing.

**Method:** 30 non-syndromic cases with wild genotype for *FGFR2* exon IIIa and IIIc, and normal karyotype were included in the study. Twenty-one of the cases were sequenced by using next-generation targeted exome sequencing of the research panel including 519 genes. The other nine of the cases were analyzed by using Sanger sequencing for the exons carried possibly pathogenic mutations which were identified in twenty-one of the cases. The obtained molecular genetic data were compared with the clinical data of the cases and the genotype-phenotype correlation was evaluated.

**Results:** As a result of the clinical evaluation, 37% of the cases have sagittal synostosis and followed by coronal, metopic and multisuture synostosis with 33%, 20%, and 10%, respectively. Besides, it has been determined that 47% of the cases have at least one ocular abnormality. As a result of DNA sequencing, it has been detected that 20% of the cases have pathogenic mutations in *AXIN2*, *TCF12* and *ERF* genes. It has been seen that cases with p.M260fs\*5 and p.P369fs\*26 mutations in *TCF12* gene have coronal synostosis, the case with p.L349fs\*24 mutation in *AXIN2* gene has sagittal synostosis and the case with p.G299fs\*9 mutation in *ERF* gene has unilateral coronal synostosis and closed fontanelles. In addition to these, by using Sanger sequencing, c.825+5G>T splice region mutation in *TCF12* gene was detected in a case with brachycephaly.

**Conclusion:** Non-syndromic craniosynostosis is both genotypically and phenotypically heterogeneous anomaly. Our findings revealed that screening of the genes depending on the type of closed suture in non-syndromic craniosynostosis cases may lead to a faster genetic diagnosis.

**Key words:** craniosynostosis, next generation sequencing, molecular genetics, non-syndromic craniosynostosis, genetic

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Kranyum ve Kranial Sütür Anatomisi	3
2.2. Kranial Gelişimin Embriyolojisi	6
2.3. Kraniosinostozun Biyolojik Mekanizması	7
2.3.1. Kranial Gelişimde Rol Alan Sinal Yolakları	7
2.4. Sendromik Olmayan Kraniosinostoz	17
2.4.1. Sınıflandırılması	17
2.4.2. Epidemiyolojisi	18
2.4.3. Patolojisi	19
2.5. Sendromik Olmayan Kraniosinostozun Kalıtım Özelliği	22
2.5.1. Sendromik Olmayan Kraniosinostozda Kromozomal Bulgular	23
2.5.2. Sendromik Olmayan Kraniosinostozun Moleküler Genetiği	24

2.6. Sendromik Olmayan Kraniosinostozun Epigenetiği	28
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>31</b>
3.1. Metodolojik Algoritma	31
3.2. Hasta Seçimi	32
3.3. Genomik DNA Eldesi (DNA İzolasyonu)	32
3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar	34
3.4. DNA Miktar ve Kalite Tayini	35
3.5. Yeni Nesil Dizileme (YND)	35
3.5.1. QUBIT Florometre ile DNA Miktarının Ölçümü	36
3.5.2. Kütüphane (Library) Hazırlığı	37
3.5.3. Parçalama (Digestion)	38
3.5.4. Barkod Hazırlama	38
3.5.5. Ligasyon (Bağlanma)	39
3.5.6. Pürifikasyon	39
3.5.7. Kütüphanenin Amplifikasyonu	40
3.5.8. Kütüphanenin Pürifikasyonu	41
3.5.9. Kütüphanenin QUBIT ile Ölçümü	42
3.5.10. Kütüphanenin Dilüsyonu ve Birleştirilmesi	43
3.5.11. ION Chef Robotuna Çiplerin Yerleştirilmesi	43
3.5.12. ION S5 Dizileme Cihazı	43



3.5.13. Varyant Analizi	44
<b>4. BULGULAR</b>	45
4.1. Klinik Bulgular	45
4.2. Genomik DNA Örneklerinin Hazırlanması	49
4.3. Yeni Nesil Dizileme Bulguları	49
4.3.1. Çip Analizi	49
4.3.2. YND Analiz Bulguları	50
4.4. Sanger Dizileme Analizi ile Varyantların Validasyon Testi	69
4.5. Genotip-Fenotip Korelasyon Bulguları	70
4.5.1. <i>AXIN2</i> Gen Mutasyonunun Genotip-Fenotip Korelasyonu	70
4.5.2. <i>TCF12</i> Gen Mutasyonlarının Genotip-Fenotip Korelasyonu	72
4.5.3. <i>ERF</i> Gen Mutasyonunun Genotip-Fenotip Korelasyonu	74
4.5.4. <i>FREMI</i> Gen Mutasyonlarının Genotip-Fenotip Korelasyonu	75
4.5.5. YND Analizi Sonucunda Saptanan Diğer Varyasyonlar	78
4.5.6. Sanger Dizi Analizi ile Diğer Dokuz Olguda Saptanan Bulgular	82
<b>5. TARTIŞMA</b>	83
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	95
<b>KAYNAKLAR</b>	97
<b>EKLER</b>	113
Ek1: Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli	
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	124

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 4.1.</b>	Çalışma Kapsamına Alınan Olguların Klinik Bulguları ve Genotip Verileri	46
<b>Tablo 4.2.</b>	DNA Dizileme Analizi Yapılacak Olguların Genomik DNA Miktar, Saflık ve Dilüsyon Değerleri	49
<b>Tablo 4.3.</b>	YND Aşamasında Kullanılan İki Çipin Karşılaştırmalı Ön Analizi	50
<b>Tablo 4.4.</b>	NC01 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	52
<b>Tablo 4.5.</b>	NC02 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	52
<b>Tablo 4.6.</b>	NC03 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	53
<b>Tablo 4.7.</b>	NC04 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	54
<b>Tablo 4.8.</b>	NC05 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	55
<b>Tablo 4.9.</b>	NC06 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	56
<b>Tablo 4.10.</b>	NC07 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	57
<b>Tablo 4.11.</b>	NC08 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	58

<b>Tablo 4.12.</b>	NC09 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	59
<b>Tablo 4.13.</b>	NC10 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	60
<b>Tablo 4.14.</b>	NC11 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	61
<b>Tablo 4.15.</b>	NC12 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	62
<b>Tablo 4.16.</b>	NC13 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	62
<b>Tablo 4.17.</b>	NC14 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	63
<b>Tablo 4.18.</b>	NC15 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	63
<b>Tablo 4.19.</b>	NC16 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	64
<b>Tablo 4.20.</b>	NC17 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	65
<b>Tablo 4.21.</b>	NC18 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	65
<b>Tablo 4.22.</b>	NC19 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	66
<b>Tablo 4.23.</b>	NC20 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	67

<b>Tablo 4.24.</b>	NC21 Kodlu Hastada Filtreleme Analizi Sonucu Elde Edilen Varyant Listesi	68
<b>Tablo 4.25.</b>	Fenotip ile Uyumlu Olarak Tespit Edilen Genotipik Varyasyonlar	69
<b>Tablo 4.26.</b>	Sanger Dizilemede Kullanılan Primerler ve Tm Sıcaklıkları	69
<b>Tablo 4.27.</b>	<i>FREMI</i> Geninde Tespit Edilen Varyantların Provean, SIFT ve Polyphen-2 Araçlarından elde edilen <i>in silico</i> Analizleri	77
<b>Tablo 4.28.</b>	<i>FBNI</i> Geninde Tespit Edilen Varyantların Provean, SIFT ve Polyphen-2 Araçlarından elde edilen <i>in silico</i> Analizleri	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	İnsan kafatasını oluşturan kemikler ve sütürler	3
<b>Şekil 2.2.</b>	İnsan kafatasında yer alan sütürler ve sütür gelişiminin şematik gösterimi	4
<b>Şekil 2.3.</b>	Erken sütür kapanması sonucunda oluşan farklı kafa morfolojileri	5
<b>Şekil 2.4.</b>	Osteogenezis ve Osteoklastogeneziste görev alan yolaklar	6
<b>Şekil 2.5.</b>	Kraniyal gelişimde rol alan ana sinyal yolakları	8
<b>Şekil 2.6.</b>	FGF sinyal yolağının etki mekanizması	9
<b>Şekil 2.7.</b>	Kraniyosinostozun sınıflandırılması	19
<b>Şekil 3.1.</b>	Çalışmada takip edilen metodolojik algoritma	32
<b>Şekil 3.2.</b>	Yeni nesil dizilemenin uygulama aşamaları	36
<b>Şekil 4.1.</b>	21 hastanın bir arada analizi sonucunda elde edilen varyantların gruplara göre dağılımı	51
<b>Şekil 4.2.</b>	NC17 kodlu olgunun a.fenotipi, b.radyolojik bulgusu, c.pedigri	70
<b>Şekil 4.3.</b>	Sanger dizileme ile NC17 kodlu olgunun (III), annesinin (II) ve babasının (I) karşılaştırmalı sekans sonuçları	71
<b>Şekil 4.4.</b>	NC09 ve NC16 kodlu olguların a.fenotipleri, b.radyolojik bulguları, c. pedigri	72
<b>Şekil 4.5.</b>	NC09 ve NC16 kodlu olguların a.IGV görüntüleri, b.Sanger dizileme analizi [olgu (III), anne (II) ve baba (I)], c.mutasyonların gen üzerindeki yerleşimi	73

<b>Şekil 4.6.</b>	NC14 kodlu olgunun a.radyolojik görüntüsü, b.pedigri, c.IGV görüntüsü, d.Sanger dizileme analizi, e.mutasyonun gen üzerindeki yerleşimi	74
<b>Şekil 4.7.</b>	NC03, NC06 ve NC11 kodlu olgular ve pedigrileri	76
<b>Şekil 4.8.</b>	NC03, NC06 ve NC11 kodlu olguların a.IGV görüntüleri, b.Sanger dizi analizi [olgular (III-1, III1, III-3), anneler (II-4, II-5)], c.mutasyonların gen üzerindeki yerleşimi	76
<b>Şekil 4.9.</b>	<i>FREMI</i> geninde varyasyon tespit edilen amino asitlerin türler arası korunmuşluğu	77
<b>Şekil 4.10.</b>	NC02 ve NC07 kodlu olgular ve pedigrileri	78
<b>Şekil 4.11.</b>	NC02 ve NC07 kodlu olgularda tespit edilen varyasyonların a.IGV görüntüsü, b.Sanger dizi analizi, c.varyantların gen üzerindeki lokalizasyonu	79
<b>Şekil 4.12.</b>	<i>FBNI</i> geninde varyasyon tespit edilen amino asitlerin türler arası korunmuşluğu	80
<b>Şekil 4.13.</b>	NC10 kodlu olgunun a.fenotipi, b.pedigri	81
<b>Şekil 4.14.</b>	NC30 kodlu olguda tespit edilen <i>TCF12</i> c.825+5G>T varyasyonunun elektroferogramı	82

## SİMGELER ve KISALTMALAR

bç	:	Baz çifti
BMP	:	Kemik morfojenik protein (Bone morphogenetic protein)
CLB	:	Hücre Liziz Tamponu (Cell Lysis Buffer)
dH <sub>2</sub> O	:	Distile su
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	:	Etilendiamin tetraasedik asit
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor )
FGFR	:	Fibroblast Büyüme Faktör Reseptörü
FREM1	:	FRAS1 related extracellular matrix 1
MAPK	:	Mitojen Aktivasyon Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
ml	:	Mililitre
MSX2	:	Muscle Segment Homeobox 2
NaCl	:	Sodyum Klorür
ng	:	Nanogram
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
PolyPhen-2	:	Prediction of functional effects of human nsSNPs

rpm	:	Dakikada dönüs sayısı
RUNX2	:	Runt related transcription factor 2
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SHH	:	Sonic hedgehog
sn	:	Saniye
SNP	:	Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)
TBE	:	Tris Borat EDTA
TCF12	:	Transcription faktör 12
TKM1	:	Düşük Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu
TKM2	:	Yüksek Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu
Tm	:	Temperature of Melting (Erime sıcaklığı)
TWIST1	:	Twist family bHLH transcription factor 1
USCS	:	University of California Santa Cruz
Wnt	:	Wingless-type MMTV integration site family
YND	:	Yeni nesil dizileme
$\mu$ l	:	Mikrolitre



## 1. GİRİŞ

Bebek ölümleri ve çocukluk çağı hastalıklarının temel nedenlerinden biri, embriyonik gelişim sürecindeki hatalardan kaynaklanan konjenital malformasyonlardır ve toplumda görülme sıklığı küresel boyutta yaklaşık olarak %3'dür (Kalter ve Warkany, 1983). Kafa ve yüz (kraniyofasiyal) kemikleri malformasyonları ise konjenital malformasyonların yaygın rastlanılan formları arasında yer almaktadır. Konjenital malformasyonla doğan her üç bebekten birinde görülen kraniyofasiyal anomalilerin (Gorlin ve diğ., 1990) ülkemizdeki sıklığı, kraniyal kısmı içine alan merkezi sinir sistemi anomalileri için %0,39 ve fasiyal anomaliler için ise %0,17 olarak tespit edilmiştir (Himmetoğlu ve diğ., 1996).

Kraniyofasiyal anomaliler, yüz ve kafatasındaki yumuşak doku ve kemiklerin anormal gelişim göstermesi sonucunda, değişik yüz ve kafa şekillerine sahip bebeklerin doğmasına yol açmaktadır. Özellikle kafatasındaki kemiklerin zamanından önce birleşmesi sonucunda, ilk bir yılda iki katı kadar büyümesi gereken beynin, büyümesini ve gelişmesini engelleyen bir form oluşur (Kabbani ve Raghuvver, 2004). Buna bağlı olarak gelişen sendromlar ise, kraniyofasiyal biçim bozukluklarının en yaygın ikinci formunu oluşturan kraniyosinostoz başlığı altında sınıflandırılmaktadır (Heuzé ve diğ., 2014).

Kraniyal kemiklerin farklılaşması ve birbirleriyle olan etkileşimlerini sağlayan “sütür” bölgelerinin kraniyal gelişim sürecinde erken kapanması, sendromik olan ya da olmayan kraniyosinostoz olarak tanımlanan anomalinin gelişmesiyle sonuçlanır (Richman, 1995; Ornitz ve Marie, 2002; Aviv ve diğ., 2002; Johnson ve Wilkie, 2011). Kraniyal sütürler, embriyonik dönemdeki pek çok doku ve organla kıyaslandığında oldukça geç gelişmekte (gebeliğin 16. haftası) (Mathijssen ve diğ., 1999; Johnson ve Wilkie, 2011) ve bu da prenatal dönemde kraniyosinostoz bulgusuna nadiren ya da geç rastlanılmasına sebebiyet vermektedir (Rubio, ve diğ., 2016).

Daha önce ekibimiz tarafından gerçekleştirilmiş olan Türk olgulardaki kraniyosinostozun genetiğine yönelik yapılmış olan en kapsamlı ve ilk moleküler genetik çalışmada, 33 sendromik ve 67 sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgu, *FGFR2* exon IIIa ve IIIc mutasyonları için taranmıştır (Nur ve diğ., 2014). Bu çalışmanın sonucuna göre Türk popülasyonunda *FGFR2* exon IIIa ve IIIc mutasyonlarının görülme sıklığı Apert sendromlu olgularda %91.6, Crouzon sendromlu olgularda %57 ve Pfeiffer sendromlu olgularda ise %83 olarak tespit edilmiştir. Sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgularda ise bakılan bölge açısından herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (Nur ve diğ., 2014).

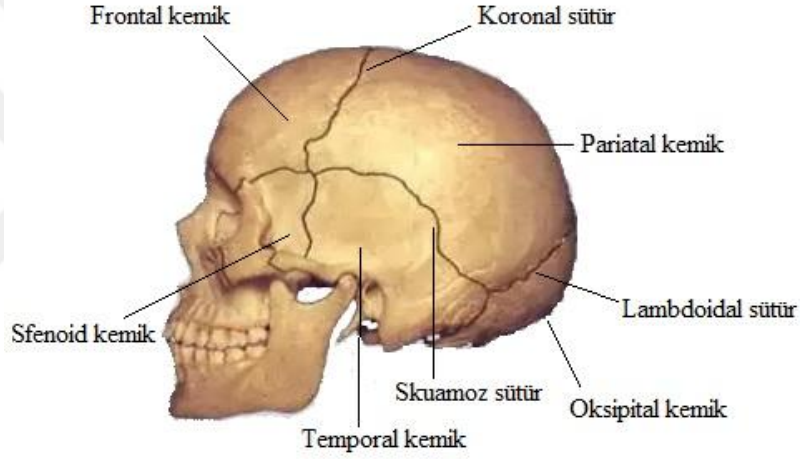
Gerçekleştirmiş olduğumuz bu tez projesi kapsamında ise, sendromik olmayan kraniyosinostoz tanısı almış 30 olgunun kapsamlı genetik taramasında, DNA dizilemedeki yeni teknolojileri kullanarak, hem Türk popülasyonunda sendromik olmayan kraniyosinostoz için öne çıkan gen ve yolları belirleyerek olası genotip-fenotip ilişkisini araştırmayı hem de hızlı ve kapsamlı analize olanak sağlayan yeni nesil dizileme metodunun tanı etkinliğini değerlendirmeyi hedefledik. Bu bağlamda, hedef genlerimizle birlikte yaklaşık olarak 500 gen daha içeren Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Panelini kullanarak 21 olguda aday genlerin tüm ekzonlarının hedefli yeni nesil genetik dizilemesini %99,3 hassasiyet ve % 99,6 özgünlükle gerçekleştirdik. Tespit edilen varyantların bulunduğu ekzonları ise, diğer dokuz olguda Sanger dizileme ile taradık.

Geçtiğimiz son 20 yılda, sendromik olmayan kraniyosinostozun genetik, epigenetik ve çevresel etmenlerden kaynaklanabilen oldukça heterojen ve multifaktöriyel bir hastalık olduğu anlaşılmış (Chumas ve diğ., 1997; Boyadjiev, 2007) ve bunun gelişimsel sonuçları olabileceği fikri öne çıkmıştır. Bu sebeple, sinostoz ve bilişsel yeteneklerdeki olası bozulmaların genetik mutasyonlarla birlikte olan korelasyonunun anlaşılabilmesine yönelik yapılacak tüm genetik çalışmaların, ileride geliştirilebilecek olan hem ailesel olgular için gen tedavilerin hem de ameliyat sonrası sütürlerin tekrar kapanmasını önleyebilecek moleküler tedavilerin geliştirilmesine yönelik alanlara önemli bilgiler sağlayacağına inanmaktayız.

## 2. GENEL BİLGİLER

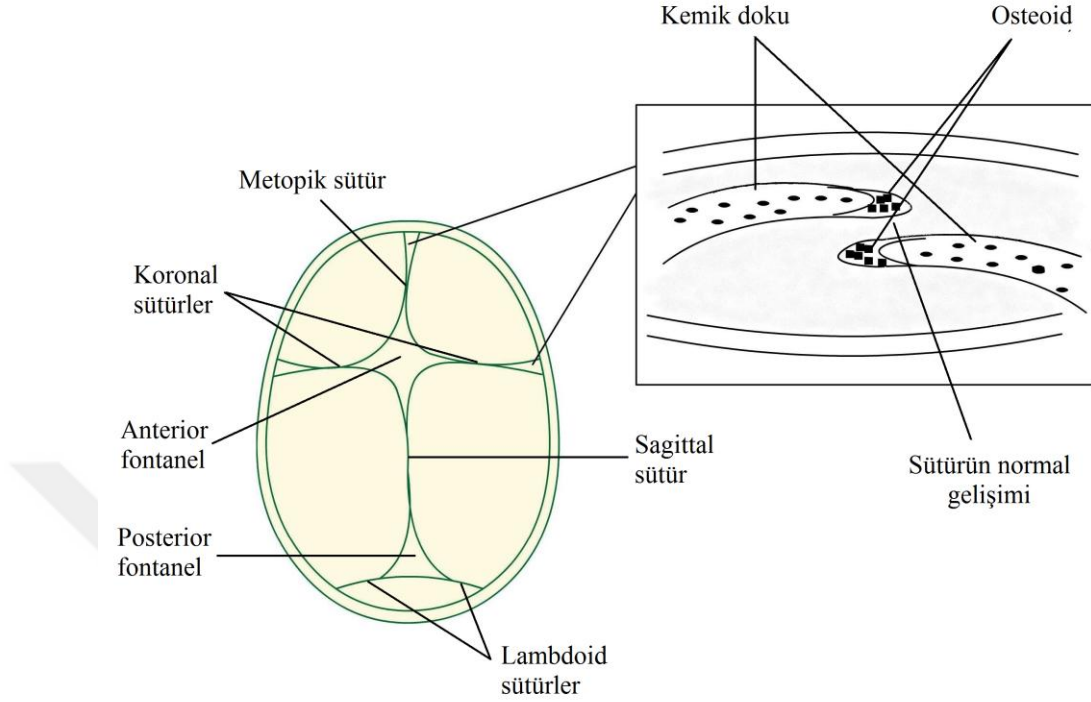
### 2.1. Kranyum ve Kranial Sütür Anatomisi

İnsan kafatası (kranyum), dokuz kranial kemikten oluşur: ikişer adet frontal, parietal ve temporal ve birer adet de etmoid, sfenoid ve oksipital kemikler (Şekil 2.1) (Beederman ve diğ., 2014). Bu kemikler, fibröz dokudan oluşan ve sütür olarak adlandırılan bağlantı bölgeleriyle birbirinden ayrılır ve sütürlerin bir araya geldiği kesişim bölgeleri ise fontanel olarak adlandırılır (Beederman ve diğ., 2014).



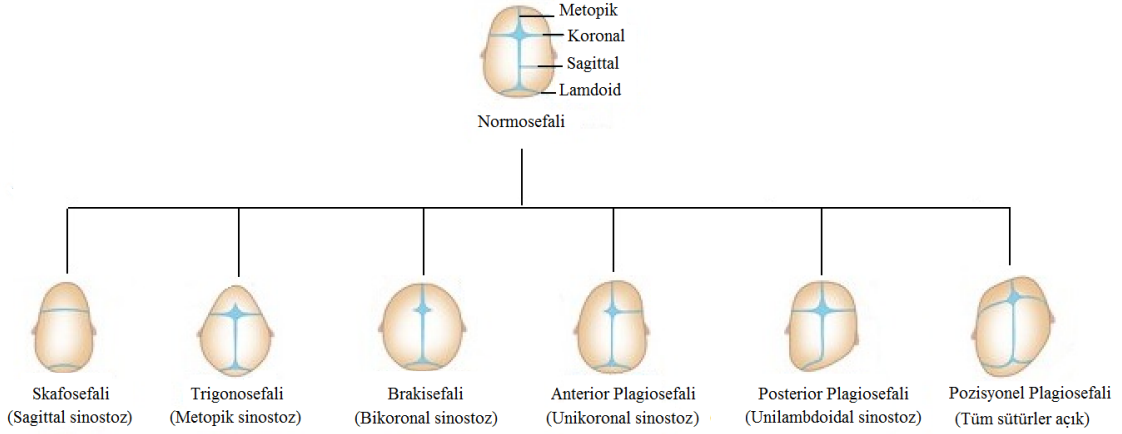
Şekil 2.1. İnsan kafatasını oluşturan kemikler ve sütürler

Kafatasındaki kemikleri birbirine bağlayan dört ana sütür vardır: sagittal, metopik, koronal ve lambdoid sütürler (Şekil 2.2). Sagittal sütür, iki parietal kemik arasında yer alırken, metopik sütür, frontal kemikler arasında; koronal sütür, frontal ve parietal kemikler arasında ve lambdoid sütür de supraoksipital ve parietal kemikler arasında yer alır (Opperman, 2000). Kemikleşme sürecinde, kranial kemikler birbirine yaklaşır ve kemik köşelerinden sütür oluşumu başlar (Opperman, 2000).



**Şekil 2.2.** İnsan kafatasında yer alan sutureler ve suture gelişiminin şematik gösterimi

Gelişim boyunca esnek olan bu sutureler, doğum kanalından geçerken kafa kemiklerinin geçici olarak üst üste gelerek doğumu kolaylaştırmasına ve beynin büyümesine paralel olarak kafatasının genişlemesine olanak sağlar (Levi ve diğ., 2012; Al-Rekabi ve diğ., 2017). Erken embriyonik süreçte başlayan bu gelişim, yetişkinliğe kadar devam edebilir (Opperman, 2000; Jin ve diğ., 2016). Embriyonik sürecin bir noktasında meydana gelen kemik gelişiminin aşırı ekspresyonu, kranial suturelerin erken kapanmasına sebep olarak morfolojik, psikolojik ve fonksiyonel abnormalitelerle birlikte görülebilen kraniosinostozu yol açabilmektedir. Kraniosinostoz ile sonuçlanan erken suture kapanması sonucu ortaya çıkan farklı kafa şekilleri Şekil 2.3'de gösterilmektedir.



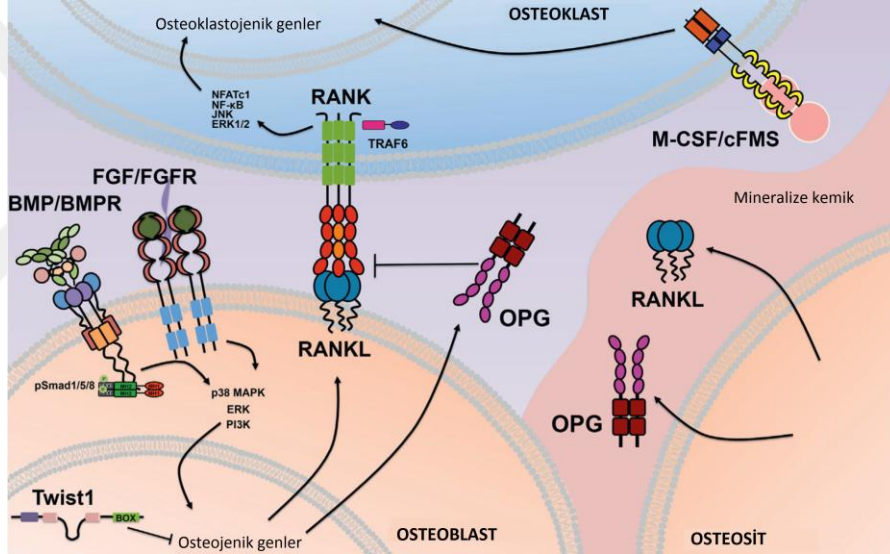
**Şekil. 2.3.** Erken sütün kapanması sonucunda oluşan farklı kafa morfolojileri

Sütün bölgesinin açık kalmasında ya da kapanmasında sütün çevresinin önemi, çeşitli çalışmalarla aydınlatılmış ve bu süreçte dura materin, osteoblast-ilişkili moleküler yolakların, osteoklast-ilişkili moleküler yolakların ve kranial sütün mezenşiminin etkin rol oynadığı gösterilmiştir (Opperman ve diğ., 1993, Opperman ve diğ., 1995, Winograd ve diğ., 1997, Levine ve diğ., 1998, Beederman ve diğ., 2014).

Dura mater, üzerindeki sütün hücre aktivitesini düzenleyecek TGF-1, TGF-2, TGF3, FGF-2, BMP-4, BMP-7, FGF-9, MSX1 ve MSX2 gibi çeşitli büyüme ve transripsiyon faktörleri salgılamaktadır (Opperman, 2000). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, dura materin sadece sütün açık ya da kapalı kalmasını değil, normal gelişim sürecinde kapanma zamanını belirleyen faktör olduğu da Levine ve ekibi tarafından gösterilmiştir (Levine ve diğ., 1998).

Osteoblast gelişimiyle ilişkili olan genler ve yolaklar, sütün homoestasisi için önemli birer rol oynarken, bu dengenin bozulması olası patolojilerin gelişmesine yol açar. Bu yolaklardan en fazla çalışılmış olanı, osteoblastların proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu ile ilişkili olan FGF sinyal yolağıdır (Wilkie, 1997). Sütün morfogenezi dâhil olan diğer ana moleküler yolaklar ise Wnt (Wingless/Integrated), TGF- $\beta$  ve Ras/ERK (Ras/Extracellular Signal-Regulated Kinase) yolaklarıdır ve bir sonraki bölümde detaylıca ele alınmıştır.

Osteoblast ilişkili yolların aksine, osteoklastların sütür gelişimine olan etkileri üzerine detaylı bilgiler kısıtlıdır. 2011 yılında Lee ve arkadaşları tarafında, iskelet homeostasinin otoimmünolojisinde önemli rol oynayan RANKL-RANK-TRAF sinyal yolağının, osteoklast aktivasyonunda ve kraniyal sütür homeostasisinde de etkin olabileceği gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2011). Ayrıca, sütürlerin dalga şeklindeki yapılarının oluşmasında da osteoklastların etken olduğu öne sürülmektedir (Byron, 2006). Bir sonraki bölümde detaylıca tartışılacak olan osteogenezis ve osteoklastogeneziste etken olan yollar, şekil 2.4’de özetlenmiştir (Maxhimer ve diğ., 2015).



Şekil 2.4. Osteogenezis ve osteoklastogeneziste görev alan yollar (Maxhimer ve diğ., 2015’den alınmıştır.)

## 2.2. Kraniyal Gelişimin Embriyolojisi

Embriyonik süreçte insan kafatası (kranium) gebeliğin 23. ve 26. günleri arasında, mezoderm ve nöral krest kökenli dokulardan gelişmeye başlar (Tubbs ve diğ., 2012; Beederman ve diğ., 2014). Kranium, viserokranium ve nörokranium olmak üzere iki temel kısma ayrılır (Ornitz ve Marie, 2015). Viserokranium, endokondral kemikleşmeyle oluşur ve yüz iskeletini oluştururken; nörokranium, intramembranöz kemikleşme süreciyle oluşur ve beyni koruyan kraniyal kemikleri oluşturur (Ornitz ve Marie, 2015). İntramembranöz kemikleşme, mezenşimal hücrelerin yoğunlaşmasıyla

başlar. Embriyonik gelişimin 8. ve 9. haftalarında, kafa kemikleri intramembranöz kemikleşme aracılığıyla oluşmaya başlar (Opperman, 2000). Gebeliğin 18. haftasında ise, komşu kraniyal kemiklerin yakınlaşmasıyla birlikte, kraniyal sütürler gelişmeye başlar (Wilkie, 1997).

Gelişim sırasında mezenşimal hücreler osteoprojenitör hücrelere, osteoprojenitör hücreler osteoblastlara ve osteoblastlar da osteositlere dönüşerek kemikleşme gerçekleşir (Heino ve diğ., 2008). Kemikleşme süreci boyunca FGF (Fibroblast büyüme faktörü) sinyal yolağı ana yolak olsa da bazı transkripsiyon faktörleri de anahtar rol oynar. Örneğin, *RUNX2* (Runt Related Transcription Factor 2) ve *OSX* (Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix, *SP7*) osteoblast gelişiminde öne çıkarırken, *TGF-β* (Transforme edici büyüme faktörü beta) kondrosit proliferasyonunun önlenmesi ve *MSX2* (Msh Homeobox 2) ise kalvaryal osteoblast farklılaşmanın inhibisyonu için gerekli transkripsiyonel faktörlerdir (Ornitz ve Marie, 2015).

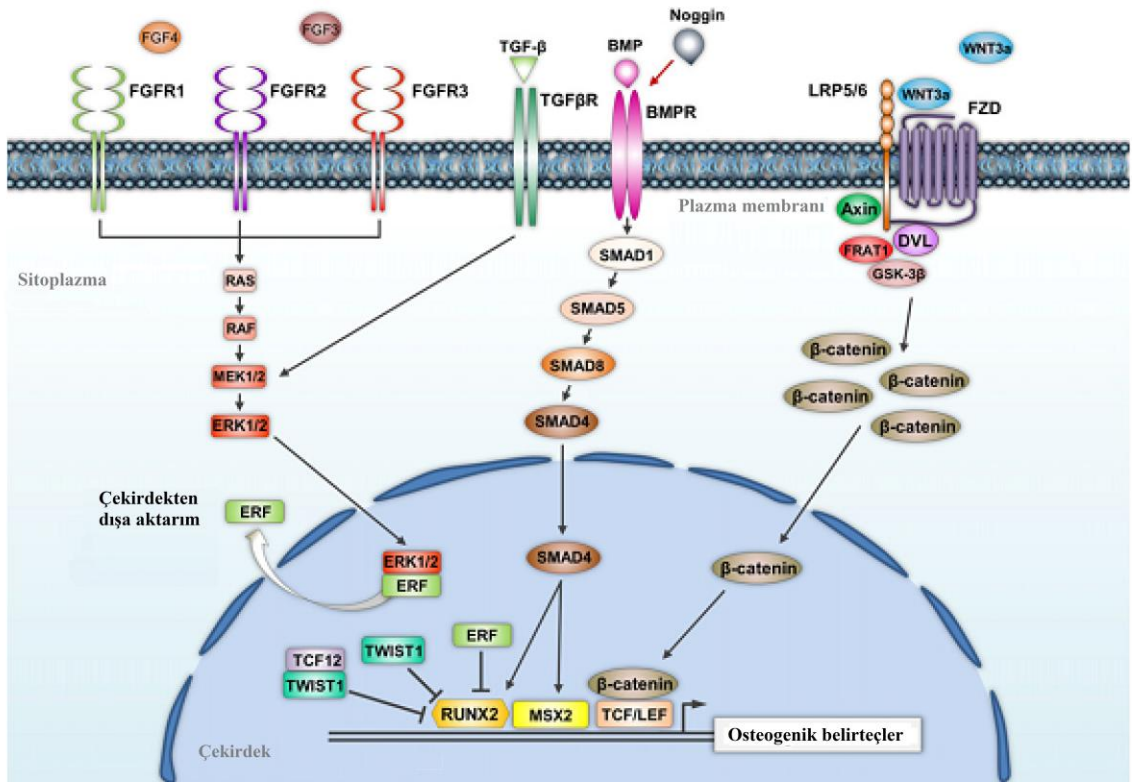
Kalvaryal morfogenez sırasında sütür mezenşimi, sağlıklı bir kraniyofasiyal gelişim için büyüme merkezi olarak işlev görür ve iskelet kök hücreleri için bir niş olarak davranır (Opperman, 2000; Zhao ve diğ., 2015; Maruyama ve diğ., 2016). Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda, sütür kök hücreleri (SuSCs) izole edilerek, bu özel hücre grubunun kalvaryal kemik oluşumundan ve kraniyofasiyal iskeletin rejenerasyonundan sorumlu olduğu anlaşılmıştır (Zhao ve diğ., 2015, Maruyama ve diğ., 2016). Sütür kök hücrelerinin yüksek seviyede *Axin2* eksprese ettiği, uzun dönemde kendini yenileme, klonal gelişim ve farklılaşmada rol oynamasının yanı sıra, iskelet tamiri ve hücre-bazlı rejeneratif terapide etkin olabilecek hücre grubu olduğu da gösterilmiştir (Maruyama ve diğ. 2016).

### **2.3. Kraniyosinostozun Biyolojik Mekanizması**

#### **2.3.1. Kraniyal Gelişimde Rol Alan Sinyal Yolakları**

Normal bir kalvaryal gelişim, sinyal yolaklarının organize çalışmasıyla yürütülebilen hayati bir süreçtir ve bu gelişimde rol alan ana yolaklardan en iyi anlaşılmış olanları FGF, TGF-β, Wnt (Şekil 2.5), Hedgehog (HH) ve Eph-Ephrin sinyal yolaklarıdır.

Özellikle nöral krest gelişiminde önemli rollere sahip olan bu yollarda meydana gelen genetik ya da epigenetik değişimler, sadece sendromik değil aynı zamanda sendromik olmayan kraniyosinostozda da sebep olabilmektedir (Mishina ve Snider, 2014). Artan osteogenezis aktivitesi sonucunda, etkilenen sütürün türüne ve sayısına göre karakteristik kafa şekilleri ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.3). Sendromik olmayan kraniyosinostozun altında yatan genetik temellerin tam olarak aydınlatılabilmesi için, özellikle kalvaryum ve sütür gelişiminde rol alan ve filogenetik olarak oldukça korunmuş olan bu yolların iyi anlaşılması büyük önem taşımaktadır.



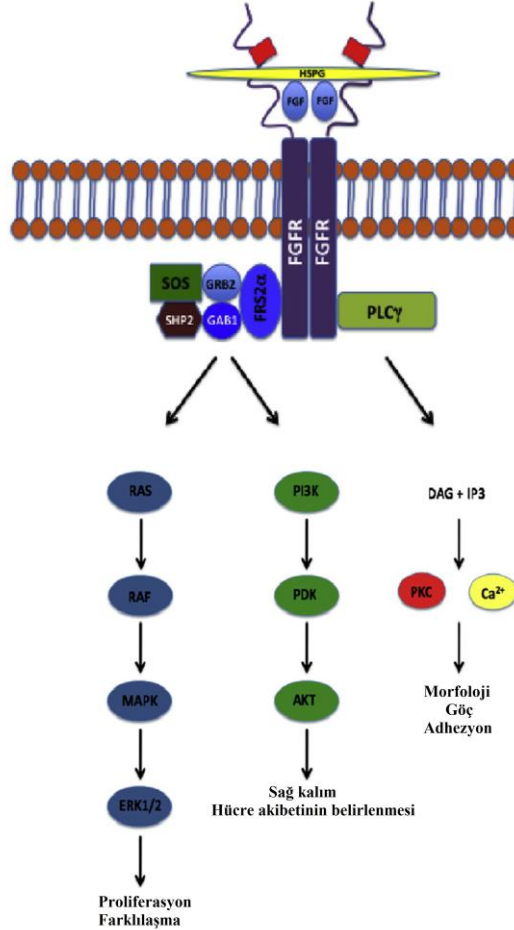
Şekil 2.5. Kraniyal gelişimde rol alan ana sinyal yolları (Katsianou ve diğ., 2016'dan alınmıştır)

### FGF Sinyal Yolağı

Kraniyal sütürlerin erken kapanmasında öne çıkan ve kraniyosinostozun etiolojisinde en iyi anlaşılmiş olan ana yolak, sıklıkla sendromik kraniyosinostoz ile ilişkilendirilmiş olan FGF sinyal yolağıdır (Lattanzi ve diğ., 2017). Hem intramembranöz hem de endokondral kemikleşmede rol alan FGF yolağı; özellikle embriyonik süreçte



proliferasyon, farklılaşma ve hücre göçü gibi önemli süreçlerde görev almaktadır (Eswarakumar ve diğ., 2005; Lattanzi ve diğ., 2012). FGF ailesinin 23 üyesi vardır ve beş farklı FGF reseptörüne bağlanarak hücrel yanıtını oluştururlar (Ornitz ve Itoh, 2015). FGF reseptörleri, iki ya da üç immünoglobulin benzeri bölge içeren hücre dışı bölge, bir transmembran bölge ve bir de sitoplazmik tirozin kinaz bölgesi içermektedir (Muenke and Schell, 1995; Eswarakumar ve diğ., 2005). Hücre yüzeyinde, kofaktör olan heparan sülfat proteoglikan varlığında FGF ligandları FGF reseptörlerine bağlanır, reseptör dimerizasyonunu ve otofosforilasyonunu takiben downstream sinyal proteinlerinin fosforilasyonu gerçekleştirilerek, hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu sağlanır (Şekil 2.6) (Powers ve diğ., 2000; Ornitz ve Itoh, 2001, Su ve diğ., 2014).



Şekil 2.6. FGF sinyal yolağının etki mekanizması (Teven ve diğ., 2014'den alınmıştır)

FGF sinyal yolağı, kraniyofasiyal iskeletin hem prenatal hem de postnatal gelişiminde rol almaktadır (Nie ve diğ.,2006). Kraniyofasiyal gelişimin embriyonik sürecinde FGFR sinyal yolağı, kraniyal nöral krest oluşumunu indükler (Teven ve diğ., 2014). Erken intramembranöz kemikleşme sürecinde; FGFR1, FGFR2 ve FGFR3'ün osteoblast öncüllerinde eş zamanlı ifadesi (ko-ekspresyonu) gerçekleşmektedir (Teven ve diğ., 2014). FGFR1 aracılı sinyal yolağı osteojenik farklılaşmayı düzenlerken, FGFR2 yolağı, kök hücre proliferasyonunu düzenlemektedir (Iseki ve diğ., 1999). Kraniyal sütürlerde FGFR2 temel olarak osteoprojenitör hücrelerden ve farklılaşan osteoblast hücrelerinden sentezlenir (Iseki ve diğ., 1999; Britto ve diğ., 2001). Kraniyosinostoz sendromunda mutasyonların en sık rastlandığı reseptör, FGFR2'dir. Reseptör aktivitesinin mutasyonlar ya da çevresel etkenler sonucunda artması, sütürlerin erken kapanmasıyla sonuçlanmaktadır. *FGFR2*'deki mutasyonların çoğunlukla iki ekzonda (IIIa ve IIIc) tespit edilmesi, IgIIIa/IIIc bölgesini mutasyonel hot-spot bölge haline getirmiştir.

FGFR genlerinde meydana gelen mutasyonlar genellikle fonksiyon kazandıran mutasyonlar olsa da, TWIST1 gibi FGF sinyal yolağı represörlerinde fonksiyon kaybettiren mutasyonlar da görülmektedir (Passos-Bueno ve diğ., 2008). Özellikle koronal sütürün erken kapanmasıyla ilişkilendirilen *TWIST1* geni, osteoprojenitör hücrelerde TWIST proteinini eksprese ederek, osteoblast farklılaşmasında ve proliferasyonunda görev almaktadır (Johnson ve diğ., 2000; Katsianou ve diğ., 2016). TWIST1, helix-loop-helix partneri TCF12 ile heterodimerizasyon gerçekleştirir ve böylelikle koronal sütürün oluşmasını indükler (Connerney ve diğ., 2006). Bu heterodimer yapı aynı zamanda osteoblast farklılaşmasında rol alan RUNX2'yi baskılar (Heuzé ve diğ., 2014) (Şekil 2.5). TWIST1'in inaktivasyonu sonucunda, RUNX2 kemik oluşumunu tetikleyerek erken sütür kapanmasına neden olmaktadır (Cox ve diğ., 2015).

FGF sinyal yolağının reseptörleri aktive olduğunda, Ras proteini GDP'nin GTP'ye çevrilmesiyle aktif konformasyonuna çevrilir (Kolch, 2000). Aktive olan Ras, bir adaptör görevi görür ve yüksek afiniteyle Raf kinazlara bağlanarak aktivasyonu gerçekleştirir (Moodie ve Wolfman,1994). Gelişim sürecinde hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında gerekli olan Raf, bir serin/treonin kinaz proteindir ve bir başka protein

kinaz olan MEK1/2 (MAPK/ERK kinaz)'yi fosforilleyerek aktiveleştirir (Kolch, 2000). Aktive olan MEK1/2, ERK1/2'yi aktivasyon bölgesinden fosforiller ve böylelikle çeşitli transkripsiyon faktörleri aracılığıyla osteoblast farklılaşması ve kemik oluşumunda yer alan bazı genlerin (*RUNX2* gibi) ekspresyonu düzenlenir (Kolch, 2000). ERK1/2'nin çekirdekte kompleks oluşturduğu *ERF* genindeki mutasyonların, ERF proteinin dozajını düşürdüğü ve sendromik kraniyosinostozu yol açtığı 2013 yılında rapor edilmiştir (Twigg ve diğ., 2013). 2017 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise sadece sendromik değil aynı zamanda sendromik olmayan kraniyosinostozda da, Ras/ERK yolağının ve *ERF* mutasyonlarının özellikle orta hat sinostozuna yol açtığı gösterilmiştir (Timberlake ve diğ., 2017).

Tüm bunların yanı sıra, normal sütür gelişiminde, sütür bölgesinin açık kalabilmesi için, mezenşimal hücrelerin farklılaşmaması gerekmektedir (Iseki ve diğ., 1999). Yüksek FGF ekspresyonu, osteogenik farklılaşmayla ilişkilidir ve sütür kapanması sırasında özellikle FGF2'nin artan ekspresyonu gözlenmiştir (Mehrra ve diğ., 1998). FGF2 aynı zamanda RANKL mRNA'sını upregüle edip M-CSF'i (Macrophage Colony-Stimulating Factor, Makrofaj Koloni-Uyarıcı Faktör) inhibe ederek osteoklast farklılaşmasını indükleyerek, osteoblast-osteoklast arasındaki iletişimi sağlayarak sütür homeostazisini gerçekleştirmektedir (Şekil 2.4) (Chikazu ve diğ., 2001).

### **TGF- $\beta$ Sinyal Yolağı**

Transforme Edici Büyüme Faktör-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) yolağı hayat boyu pek çok hücrel süreçte rol alan önemli bir yoldur. Çok çeşitli hücrelerden salgılanan TGF- $\beta$ ; proliferasyon, farklılaşma, embriyonik gelişim, anjiogenez ve yara iyileşmesini kontrol eden çok fonksiyonlu bir polipeptiddir (Derynck ve Miyazono, 2008; Nagaraj ve Datta, 2010). TGF- $\beta$  ailesi; TGF- $\beta$ , aktivin, inhibin ve BMP'leri kapsayan ve 40'tan fazla üyesi olan geniş bir büyüme faktörü ailesidir (Guo ve diğ., 2009). TGF- $\beta$ 'nın memelilerde üç izoformu bulunur; TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 ve - $\beta$ 3. Bu üç izoform da yüksek derecede homoloji göstermektedir (Katz, ve diğ., 2013). TGF- $\beta$ 'nın bağlanması, iki reseptörün aktivasyonu ile sonuçlanır: T $\beta$ R1 ve T $\beta$ R2. Bu reseptörler, transmembran özellik gösteren serin/treonin kinazlardır (Derynck ve Zhang, 2003). İki T $\beta$ R1 ve iki T $\beta$ R2'den

oluşan heterotetramerik yapı, fonksiyonel reseptörü oluşturur. T $\beta$ R2'nin T $\beta$ R1 ile birleşmesi, T $\beta$ R1'in T $\beta$ R2 tarafından çapraz fosforilasyonuna yol açar ve T $\beta$ R1'in kinaz aktivitesini açar. Böylelikle, küçük hücre içi efektör proteinler olan Smad'ların bağlanma bölgesi açılmış olur (Shi ve Massague, 2003). Smad 4, fosforile Smad2/3, ile kompleks oluşturarak hücre içine girer, RUNX2 ile MSX2'nin aktivasyonunu gerçekleştirir ve böylelikle mezenşimal hücre farklılaşması kontrol edilir (Chen ve diğ., 2012).

TGF- $\beta$  ailesinin en geniş grubunu oluşturan BMP (Bone Morphogenic Protein-Kemik Morfojenik Proteinleri)'ler, özellikle kemik ve kıkırdak oluşumunda yer alan sinyal yolağının en önemli komponentleri arasında yer almaktadır. Çeşitli BMP'lerin, multipotansiyelli mezenşimal hücrelerin osteokondrojenik hücrelere ya da osteoblast öncül hücrelerine farklılaşmasını indüklediği *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (Wan ve Cao, 2005). Kraniyofasiyal iskelet gelişiminde BMP-2, -4 ve -7'nin özellikle eksprese edildiği ve nöral krest hücrelerin oluşumu, migrasyonu ve farklılaşmasında rol aldıkları bulunmuştur (Francis-West ve diğ., 1994; Beederman ve diğ., 2013). BMP'ler de tip1 ve tip2 olarak adlandırılan serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlanırlar. Bu reseptörlerin TGF- $\beta$  reseptörlerinden farkı, ligand uyarımından da önce hem homomerik hem de heteromerik yapı oluşturabilmesidir (Nohe ve diğ., 2002). BMP ligandının bağlanmasıyla tip 2 (BMPR2) reseptör, tip 1 (BMPR1) reseptörü hücre içi juxtamembran bölgesinde transfosforile eder ve fosforile olan tip 1 reseptör, SMAD proteinlerini fosforiller (Zwijssen ve diğ., 2003). Hücre içi sinyal iletiminde BMPR1 tarafından ilk fosforillenen Smad proteinleri, SMAD1, 5 ve 8'dir ve SMAD4 ile heteromerik bir yapı oluşturarak hücre içine girip MSX2 ve RUNX2'nin transkripsiyonunu düzenler (Wan ve Cao, 2005; Katsianou ve diğ., 2016). Fare modeli üzerinden gerçekleştirilen bir çalışmada, fare nöral krest hücrelerindeki BMP-Smad sinyalindeki artışın anterior frontal sütürün erken kapanmasına yol açtığı ve bu durumun da *Bmpr1a* heterozigositesi ile düzeltilebileceği gösterilmiştir (Komatsu ve diğ., 2013). 2017 yılında yapılan bir araştırmada, *Bmpr1A*'nın, kafatası gelişiminde BMP-Smad sinyal yolağındaki ana tip 1 BMP reseptörü olduğu gösterilmiştir (Pan ve diğ., 2017). Her ne kadar bugüne kadar insanda herhangi bir *BMPRIA* mutasyonu tespit

edilememişse de, BMPR1A'nın kraniyosinostozun patogeneğinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Pan ve diğ., 2017).

Bu bilgilerin yanı sıra, kraniyosinostozlu olgular üzerinden gerçekleştirilen kapsamlı tek GWAS çalışmasının sonucunda, bazı SNP (Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotid Polimorfizmi)'lerin sendromik olmayan orta hat (sagittal ve metopik sütür bölgesi) kraniyosinostozu ile ilişkili olabileceği ve *BMP2*'nin yakınında tespit edilen SNP'in, enhancer bölgesinde yer alabileceği öne sürülmüştür (Justice ve diğ., 2012). 2016 yılında yayınlanan bir diğer çalışmada ise nadir bir *SMAD6* mutasyonu ile birlikte bulunan yaygın bir *BMP2* varyantının digenik kalıtım modeli göstererek sendromik olmayan orta hat kraniyosinostozuna yol açtığı gösterilmiştir (Timberlake ve diğ., 2016). BMP-Smad yolağının negatif düzenleyicilerinden biri olan *SMAD6*'daki mutasyonun, *BMP2*'deki varyantla (g.7125642T>C; rs1884302) birlikte bulunduğu digenik etkinin, BMP-Smad sinyal yolağını tetiklediği ve artan ekspresyonun erken sütür kapanmasıyla sonuçlandığı öne sürülmektedir (Komatsu ve Mishina, 2016; Timberlake ve diğ., 2016).

Diğer taraftan, Noggin gibi BMP sinyal yolağı inhibitörlerinin de sütür açıklığı için önemli olduğu bilinmektedir. Fare modelleri üzerinden gerçekleştirilen bir araştırmaya göre, artan FGF2 aktivitesinin Noggin ekspresyonunu downregüle ettiği böylelikle hücre içi BMP sinyaline izin verdiği ve kraniyal sütür füzyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Warren ve diğ., 2003).

### **Wnt/ $\beta$ -catenin Sinyal Yolağı**

İskelet gelişiminin ve homeostazisinin kontrol edilmesindeki ana yollardan biri olan Wnt yolağı hücre içi sinyallerini iki farklı yoldan gerçekleştirir:  $\beta$ -catenin bağımlı sinyal yolağı (kanonikal yolak) ve  $\beta$ -catenin bağımlı olmayan sinyal yolağı (kanonikal olmayan yolak). Kraniyosinostozla ilişkili olan yolak, kanonikal yolaktır (Şekil 2.5). Bu yolakta asıl hedef,  $\beta$ -catenin'in çekirdek içine girişini sağlamaktır çünkü Wnt sinyali olmadığında hücre içinde  $\beta$ -catenin; Axin, APC (Adenomatosis Poliposis Coli), PP2A (Protein Fosfat 2A), GSK3 (Glikojen Sentaz Kinaz 3) ve CK1 $\alpha$  (Kazein Kinaz 1 $\alpha$ )'dan oluşan  $\beta$ -catenin yıkım kompleksi tarafından degrade edilmektedir (Komiya ve

Habas, 2008). Hücre kültürü deneylerinden elde edilen sonuçlara göre Wnt proteinlerinin çoğu, hem hücrede  $\beta$ -catenin seviyesinin artmasını sağlamakta hem de sinyal yolağının etkinliğini arttırmaktadır (Alok ve diğ., 2017).

Wnt/ $\beta$ -catenin sinyal yolağı, sadece mezenşimal hücrelerin, osteoblastların ve osteoklastların farklılaşmasında değil aynı zamanda fonksiyonlarının kontrol edilmesinden de sorumlu olan bir yoldur (Regard ve diğ.,2012). Wnt/ $\beta$ -catenin sinyal yolağı, mezenşimal kök hücrelerin kırıkdağı oluşturan kondrositlere farklılaştığı bir ara basamağı olan endokondral kemikleşme sürecinde ağırlıklı olarak devreye giren bir sinyal yolağıdır (Regard ve diğ., 2012). Diğer taraftan, son on yıl içinde yapılan çalışmalar, Wnt sinyal yolağındaki bozulmaların da kraniyosinostozu yol açtığını ve kraniyosinostozda sadece intramembranöz kemikleşmenin değil, endokondral kemikleşmenin de önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Sahar ve diğ., 2005; Behr ve diğ., 2010; Maruyama ve diğ., 2010, Timberlake ve diğ., 2017). 2010 yılında Maruyama ve arkadaşları tarafından, Wnt/ $\beta$ -catenin yolağının direkt olarak kök hücre popülasyonunu kontrol edip yenilenme ve proliferasyonlarını düzenlerken, dolaylı olarak da FGF ve BMP yolaklarının dengesinde rol alarak kök hücrelerin soy özelleşmesini düzenlediği belirlenmiştir (Maruyama ve diğ., 2010).

Wnt proteinleri glikoproteinler olarak salgılanırlar ve Frizzled (Fzd) reseptörlerine bağlanırlar (He ve diğ., 2004). Hücre yüzeyinde Wnt'nin Fzd reseptörüne bağlanabilmesi için düşük-ağırlıklı-lipoprotein-ilişkili-protein-5/6 (LRP5/6)'ya koreseptör olarak ihtiyaç duyulmaktadır (He ve diğ., 2004). Wnt, reseptörüne bağlandığında, APC/Axin/GSK3 kompleksi engellenerek  $\beta$ -catenin'in yıkımı önlenir (Gordon ve Nusse, 2006). Wnt, Fzd/LRP5/6 kompleksine bağlandığında, Axin'in membran translokasyonu indüklenir ve LRP5/6'nın GSK3 tarafından fosforillenen sitoplazmik kuyruğuna bağlanır (Mao ve diğ., 2001, Zeng ve diğ., 2008). FZD reseptörünün sitoplazmik kısmının DVL'ye bağlanması da LRP kuyruğu ve Axin arasındaki etkileşim için bir platform oluşturur (Fiedler ve diğ., 2011). DVL aktifleştğinde, GSK3 enziminin aktivitesini inhibe ederek,  $\beta$ -catenin'in yıkımının önlenmesine katılarak,  $\beta$ -catenin'in sitoplazmadaki stabilizasyonu ve birikimini

sağlamaktadır (Hatsell ve diğ., 2003; Komiya ve Habas, 2008). Stabilize hale gelen  $\beta$ -catenin çekirdek içine girerek transkripsiyon faktörlerine bağlanmakta ve kemik gelişiminde rol alan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır (Şekil 2.5).

Wnt sinyal yolağının fonksiyonunu kaybetmesi sonucu ortaya çıkan fenotiplerdeki farklılıklar, *Wnt* genlerinin ayrı ve benzersiz ifade şekline dayanmaktadır. Yapılan protein çalışmalarında, Wnt proteinlerinin sentezlendikleri yere çok yakın sinyal verdiği görülmüş ve *Wnt* genlerinin fonksiyonunun kaybı sonucunda ortaya çıkan çeşitli fenotiplerin öncelikli nedeninin, *Wnt* genlerinin her birinin bölgesel ekspresyon farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmüştür (Nusse ve Clevers, 2017). Ayrıca, Wnt'ler, bağlandıkları reseptörler ve koreseptörler arasındaki içsel farklılıkların da çeşitli gelişimsel süreçlerde oldukça önemli olduğu görülmüştür (Nusse ve Clevers, 2017)

Son yapılan bir çalışmada Wnt sinyal yolağının özellikle negatif düzenleyicilerinde (*AXIN1*, *MESPI*, *NPHP4*, *PSMC2* gibi) meydana gelen mutasyonların osteoblast farklılaşmasını uyararak erken kemik oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Timberlake ve diğ., 2017). Bir diğer negatif düzenleyici olan Axin2'nin ise  $\beta$ -catenini downregüle ederek intramembranöz kemikleşmeyi indükleyip orta hat sinostozuna yol açtığı fare modelleri üzerinde gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Yu ve diğ., 2005; Liu ve diğ., 2007).

### **Diğer Etkileşimler**

İskelet sistemi ve kemik gelişiminde öne çıkan yolaklardan bir diğeri ise Hedgehog (HH) sinyal yolağıdır. İlk olarak *Drosophila*'da tanımlanan ligandın memelilerde üç homoloğu vardır: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) ve Desert Hedgehog (DHH) (Bijlsma ve diğ., 2004). Omurgalılarda, SHH ve IHH, iskelet sisteminin düzenlenmesindeki ana ligandlar olarak tanımlanmaktadır (Neben ve Merrill, 2015). SHH ligandı kraniyofasiyal gelişim sürecinde kraniyal nöral krest hücrelerinden köken alan iskelet yapılarının farklılaşmasında rol oynarken (Jeong ve diğ., 2004), IHH

ligandı intramembranöz ve endokondral kemikleşme sürecindeki kök hücre özelleşmesini düzenler (Neben ve Merrill, 2015). İntramembranöz kemikleşme sürecinde IHH, osteojenik bölgeden sentezlenerek osteoblast farklılaşmasının yönlendirilmesinde rol almaktadır (Jacob ve diğ., 2007; Lenton ve diğ., 2011). Fare deneyleri üzerinden gerçekleştirilen bir araştırmada, Shh'in değil ama Ihh'in osteojenik hücre farklılaşmasını düzenlemesinden dolayı kraniyosinostozda rol alabileceği öne sürülmüştür (Jacob ve diğ., 2007). Diğer taraftan, 2010 yılında yapılan bir çalışmada, metopik sinostozlu ve polisindaktilisi olan ve birbiriyle akrabalığı bulunmayan iki olguda, SHH sinyal yolağının downstream elemanlarından *GLI3*'te mutasyon tespit edilmiş ve fenotipik bulguların bu mutasyondan kaynaklandığı rapor edilmiştir (McDonald-McGinn ve diğ., 2010).

Bu yolakların yanı sıra, eritropoietin üreten hepatosellüler (Eph) reseptörler ve ephrin ligandları da embriyonik gelişim sırasında önemli role sahiptir. Özellikle de hücre adhezyonuna veya hücrelerin birbirini itmesine aracılık ederek doku organizasyonunu oluşturmada, damar gelişiminde ve nöral krest hücre göçünde Eph/ephrin sinyal yolağı kritik yolaklardan biridir (Arvanitis ve Davy, 2002). 2006 yılında yapılan bir araştırmada, sinostozun gelişmesinde doku sınırlarının da önemli olduğu ve sınırın sadece nöral krest ve mezodermden değil, osteogenik ve osteogenik olmayan sütür hücrelerinden de oluştuğu gösterilmiştir (Merrill ve diğ., 2006). 2009 yılında yapılan başka bir araştırmada ise, EphA4'ün frontal-parietal sınırdaki Twist1 efektörü olduğu ve Erk1/2 fosforilasyonu ile reseptör tirozin kinazların, Smad1/5/8 fosforilasyonu ile de BMP yolağının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Ting ve diğ., 2009). Böylelikle Twist1 efektörü olarak EphA4'ün, kalvaryal kemik büyümesi sürecinde osteogenik öncü hücreleri yönlendirdiği ve EphA sinyal yokluğunun kraniyosinostozu sebep olduğu öne sürülmüştür (Ting ve diğ., 2009).

Kraniyofasiyal gelişimin görece olarak geç evrelerinde oluşmaya başlayan sütürler, kendilerini çevreleyen dokulardan da etkilenirler (Opperman ve Rawlins, 2005). Sütürler, maruz kaldığı gerilim kuvvetine; hücre dışı matriksin yapısal proteinleri olan COLIII ve OPN'nin yanı sıra integrinler, matriks metalloproteazları upregüle edip,



metalloproteazların doku inhibitörlerinin ekspresyonunu engelleyerek de yanıt verebilmektedir (Yen ve diğ., 1990; Morinobu ve diğ., 2003; Takahashi ve diğ., 2003; Green ve diğ., 1990; Opperman ve Rawlins, 2005). Bunların yanı sıra, fibroblastlar tarafından hücre dışı matrikse salınan fibrillinler de gerilim kuvvetine karşı dokuların dirençliliği için gerekmektedir (Schaefer ve diğ., 2004).

Sütürlerin hücre dışı matriksleri, çevrelerinden gelen biyomekanik kuvvetlere dirençte ve yanıtta hızla uyum sağlayabilen yapısal moleküller ve sinyal moleküllerinden oluşan dinamik bir çevre oluşturur (Opperman ve Rawlins, 2005). Hücre dışı matriks, sütür kenarlarındaki kemik oluşumu için gerekli olan sinyal yollarının ayarlanması esnasında büyüme faktörlerinin salgılanmasından ve ayrılmasından sorumludur (Opperman ve Rawlins, 2005). Hücre dışı matriks, hücrelere sinyallerini direkt olarak reseptör görevi gören integrinler aracılığıyla iletir. 2010 yılında Bochukova ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, alfa integrin altbirim 11 (*ITGA11*) hariç tüm ITGAların sendromik kraniyosinostozlu olgularda downregüle olduğu gösterilmiştir (Bochukova ve diğ., 2010). 2011 yılında ise sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgular üzerinden yapılan bir transkriptom araştırmasında, hücre dışı matriks aracılı fokal adhezyon ile ilişkili genlerin transkriptomik düzenlenmesinin kraniyosinostozda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Stamper ve diğ., 2011). Aynı çalışmada, embriyonik gelişim sürecinde, hücre dışı matriksin makromolekül kompozisyonundaki farklılıkların da kemik doku farklılaşmasını etkilediği ve hücre dışı matriks aracılı fokal adhezyonların, sendromik olmayan tek sütür kraniyosinostozunda biyomarker olabileceği de öne sürülmüştür (Stamper ve diğ., 2011).

Embriyonik gelişimin erken aşamalarından itibaren kraniyofasiyal iskelet yapısının oluşmasında öne çıkan bu yollarda meydana gelen fonksiyon kazandıran ya da kaybettiren mutasyonlar, kraniyosinostozun da yer aldığı çeşitli patolojilerle sonuçlanmaktadır. Beynin hem prenatal hem de postnatal büyüme sürecinde, onu çevreleyen kafatasının da büyümesi gerekmektedir ve bu ikili arasındaki koordinasyon, sütürler aracılığıyla sağlanmaktadır (Twigg ve Wilkie, 2015). Gelişim sürecinde açık

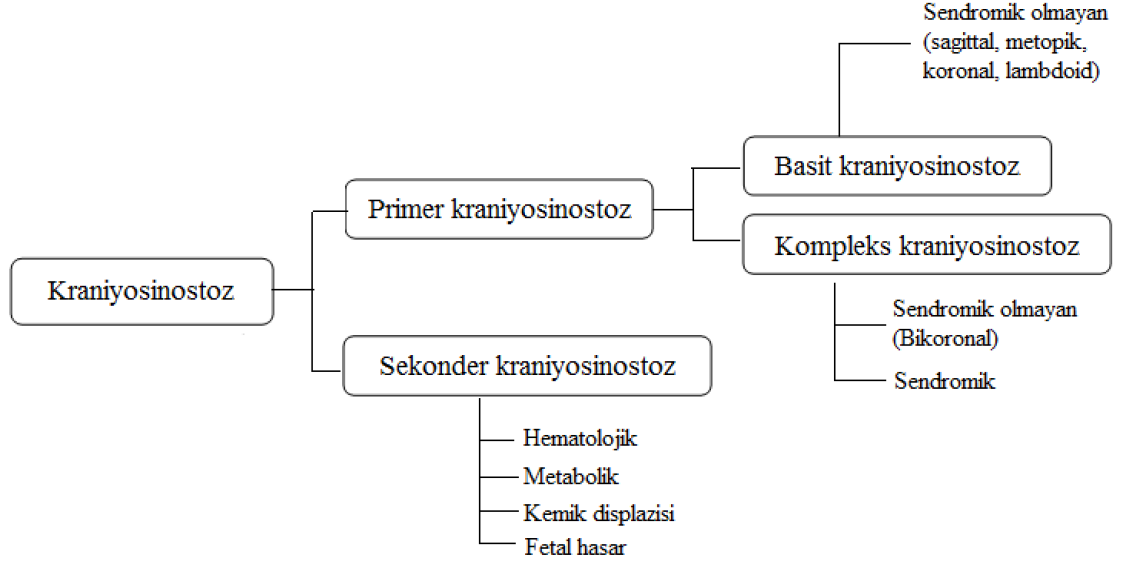
kalması gereken sütürlerin, genetik, epigenetik ya da çevresel etkenler sonucunda erken kapanması, sendromik olan ya da olmayan kraniyosinostoz ile sonuçlanmaktadır.

## **2.4. Sendromik Olmayan Kraniyosinostoz**

### **2.4.1. Sınıflandırılması**

Farklı kafa Őekillerinin oluşmasında sütürlerin rolü olabileceğine dair ilk tanımlamalara Hipokrat'ın notlarında rastlansa da, terim ve tanım olarak kraniyosinostoz ilk olarak 1830 yılında Otto tarafından kullanılmıştır (Otto, 1830). 1851 yılında ise Virchow, tek sütür sinostozlarından sonuçlanan deformatelerin sınıflandırılmasını yapmış ve Virchow kuralı olarak da tanımlanan, büyümeyi telafi etmek için kafatasının kapanan sütürün zıt yönüne doğru Őekillendiđini ifade etmiştir (Virchow, 1851). Günümüze geldiğimizde ise, aralarında Apert, Crouzon ve Pfeiffer gibi sendromların da yer aldığı 180'den fazla hastalık kraniyosinostoz ile ilişkilendirilmiştir (Panigrahi, 2011).

Kraniyosinostozun sınıflandırılmasına yönelik çeşitli öneriler bulunmaktadır ve bunlar arasında en kapsamlısı, Aviv ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre kraniyosinostoz primer ve sekonder kraniyosinostoz olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Aviv ve diğ., 2002). Sekonder kraniyosinostoz; hematolojik, metabolik, kemik displasileri ve fetal travmalar sonucunda ikincil olarak gelişen kraniyosinostoz grubunu oluşturmaktadır (Aviv ve diğ., 2002). Primer kraniyosinostoz ise kendi içinde iki gruba ayrılmaktadır: basit ve kompleks kraniyosinostoz. Basit kraniyosinostoz, genellikle tek bir sütürün sinostozu sonucu ortaya çıkan sendromik olmayan grubu temsil ederken, kompleks kraniyosinostozda sendromik kraniyosinostoz formları ve bikoronal sendromik olmayan kraniyosinostoz yer almaktadır (Aviv ve diğ., 2002) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Kraniyosinostozun sınıflandırılması (Aviv ve diğ., 2002'den uyarlanmıştır)

#### 2.4.2. Epidemiyolojisi

Kraniyosinostozun dünya çapındaki total prevalansı 2500 doğumda bir olarak tahmin edilmektedir (Cohen, 2005; Garza ve Khosla, 2012; Lattanzi ve diğ., 2017) ve olguların yaklaşık %85'ini sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgular oluşturmaktadır (Greenwood ve diğ., 2014). Sendromik olmayan kraniyosinostozun en yaygın formunu sagittal sütür sinostozu oluşturmaktadır ve bunu sırasıyla metopik, unilateral koronal, bilateral koronal ve lamboid sütür sinostozu izlemektedir (Lee ve diğ., 2012). Sendromik olmayan kraniyosinostoz, hem klinik hem de genetik olarak multifaktöriyel özelliklerin karakteristiğine sahip heterojen yapıda olup, her sütüral sinostozun (sagittal, koronal gibi) farklı bir hastalığı temsil ettiği öngörülmektedir (Şekil 2.2).

Sendromik olmayan kraniyosinostozun her ne kadar prevalansı 1/2500 olarak karşımıza çıksa da, yakın zamanda yapılan çalışmalara göre, farklı merkezlerde gözlemlenen sendromik olmayan kraniyosinostozun farklı alt tiplerinde, bu prevalansda ileriye doğru bir artış görülmektedir (Di Rocco ve diğ., 2009; Selber ve diğ., 2008; van der Meulen ve diğ., 2009). Örneğin metopik kraniyosinostozlu olgular üzerinden gerçekleştirilen retrospektif bir çalışmada, Amerika'daki görülme sıklığı 1968 yılında %3.9 iken (Shillito ve Matson, 1968), 1997 yılında %4.6 olduğu (Gardner ve diğ., 1998); Fransa'da 1998 yılında %13.8 iken (Lajeunie ve diğ., 1998), 2000 yılında bu oranın %15.6'ya

(Lajeunie ve diğ., 2001) yükseldiği görülmektedir (Di Rocco ve diğ., 2009). Hollanda'da yapılan ve 2008-2013 yılları arasında doğan 759 birey üzerinden gerçekleştirilen bir çalışmada ise, kraniyosinostozun prevalansı 10.000'de 7.2 olarak tespit edilmiştir (Cornelissen ve diğ., 2016). Cornelissen ve diğ., 1997'den 2013'e kadar geçen sürede total, sagittal ve metopik kraniyosinostozun, açık bir neden olmaksızın önemli oranda arttığını bulmuşlardır (Cornelissen ve diğ., 2016).

Türkiye'de kraniyosinostozun görülme sıklığına yönelik kapsamlı bir araştırma bulunmamakla birlikte, konjenital anomalilerin Türkiye'deki dağılımını inceleyen bir çalışmada, yedi yıl içinde kraniyosinostoz ile doğan bebeklerin oranı %0.2 olarak belirlenmiştir (Dursun ve diğ., 2014). Bu çalışmada olguların sendromik olup olmadıklarına ya da kapanan kraniyal sütüre yönelik herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, Nur ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, kraniyosinostoz tanısı alanların %67'sinin sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgular olduğu rapor edilmiştir (Nur ve diğ., 2014).

### **2.4.3. Patolojisi**

Sendromik kraniyosinostoz; ekstremit ve iskelet anomalileri, mental gelişim gerilikleri gibi diğer klinik semptomlarla birlikte seyrederken, sendromik olmayan kraniyosinostoz izole olarak görülmektedir ve bu malformasyonların en sık karşılaşılan formudur. Sendromik olmayan kraniyosinostozda, kapanan sütün çeşidine göre frontal çıkıntı ve düşük burun köprüsü gibi fasiyal dismorfizmler de gözlenebilmektedir (Garza ve Kohsla, 2012).

### **Sagittal Sütün Sinostozu**

Sendromik olmayan kraniyosinostozun en yaygın görülen formu, tüm sendromik olmayan olguların yaklaşık %45'ini içeren sagittal sütün sinostozudur (Panigrahi, 2011; Nagaraja ve diğ., 2013). 10.000'de 1.9 canlı doğum sıklığına sahiptir ve erkeklerde dişilere oranla daha sık gözlenmektedir (3,5:1 oran) (French ve diğ., 1990; Kimonis ve diğ., 2007; Boulet ve diğ., 2008; Lee ve diğ. 2012; Fonteles ve diğ., 2016). İki parietal kemik arasında yer alan sagittal sütün erken kapanması, biparietal çapın azalmasına ve

anterior-posterior çapın belirgin şekilde artmasına sebebiyet vermektedir ve bunun sonucunda oluşan kafa şekli skafosefalik (dolikosefalik) olarak (Şekil 2.3) tanımlanmaktadır (Khanna ve diğ., 2011). Kafatasının uzunluğunun artması ise; basık burun kökü, göz simetrisinde ve pozisyonunda bozulma gibi fenotipik değişikliklere yol açabilmektedir.

### **Metopik Sütür Sinostozu**

Son on yıla kadar en sık rastlanan üçüncü sinostoz tipi olarak sınıflandırılan metopik sinostozun yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda sıklığının arttığı tespit edilmesiyle birlikte, en sık rastlanan ikinci sendromik olmayan kraniyosinostoz tipi olarak ele alınmaya başlanmıştır. Her 10.000 canlı doğumda 0,8 sıklıkla rapor edilen metopik sütür sinostozunun tüm sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgularda %25 oranda görüldüğü yapılan son çalışmalarla belirlenmiştir (Lee ve diğ., 2012; Fonteles ve diğ., 2016). Sagittal sinostozun aksine, metopik sütür sinostozunda cinsiyete bağlı herhangi eğilim tespit edilmemiştir (Boulet ve diğ., 2008). İzole metopik sütür kraniyosinostozun oluşmasındaki yüksek risk faktörleri arasında çoklu gebelikler ve ileri anne yaşı gösterilmektedir (Boulet ve diğ., 2008; Lee ve diğ., 2012). Normal gelişim sürecinde ilk bir yıl içinde kapanması beklenen metopik sütürün erken kapanması sonucunda, frontal kemiklerin yanal genişlemesi kısıtlanır. Yassılaştıran frontal kemikler ve parieto-okspital bölgenin çıkıntı yapması sonucunda üçgen görünümlü kafa şekli ortaya çıkar ve bu sebeple de değişen kafa şekli trigonosefalik olarak (Şekil 2.3) tanımlanmaktadır (Khanna ve diğ., 2011). Değişen kafa şeklinden dolayı, hipotelorizm ve etmoidal sinüs hipoplazisi de olgularda görülebilmektedir (van der Meulen, 2012).

### **Koronal Sütür Sinostozu**

Çift halinde bulunan koronal sütür sinostozunun sınıflandırılması kapanan sütünöre göre sağ ya da sol unilateral veya bilateral sinostoz olarak yapılmaktadır. Diğer sendromik olmayan kraniyosinostoz türleriyle kıyaslandığında, sendromik olmayan koronal sinostozun, diğerlerinden daha sıklıkla genetik nedenlerden kaynaklandığı görülmektedir (Wilkie ve diğ., 2010). Canlı doğumda görülme sıklığı 10.000'de 0.7 olan koronal sinostozlu olgular, tüm sendromik olmayan kraniyosinostozlu olguların %17'sini

oluşturmaktadır (Boulet ve diğ., 2008). Unilateral koronal sinostozda kapanan sütünle aynı hizadaki (ipsilateral) frontoparietal kemiğin yassılaştırılması ve karşı taraftaki (kontralateral) kemiğin frontal çıkıntı yaparak büyümesi sonucu oluşan kafa şekli plagiosefali (Şekil 2.3) olarak adlandırılmaktadır (Senarath-Yapa ve diğ., 2012). Bilateral koronal sinostozun görüldüğü ve kafanın anterior-posterior aksisinin kısaldığı, yanal ve dikey uzamanın görüldüğü durumlarda ise kafa şekli brakisefali olarak (Şekil 2.3) tanımlanmaktadır (Senarath-Yapa ve diğ., 2012).

### **Lambdoid Sütür Sinostozu**

Diğer sütün sinostozlarıyla kıyaslandığında, klinikte en az karşılaşılan ve nadiren genetik olarak tespit edilebilen lambdoid sütün sinostozu, 10.000 canlı doğumda 0.7 sıklıkla görülmekle birlikte, yapılan bir popülasyon çalışması sonucunda sıklığının giderek azaldığı görülmüştür (Boulet ve diğ. 2008). Öte yandan, lambdoid sinostoz ile pozisyonel plagiosefali (Şekil 2.3) arasındaki şekilsel klinik benzerlik, tanıya götüren ayrımı zorlaştırmakta ve bu malformasyonun daha seyrek rapor edilmesiyle sonuçlanmaktadır (Fonteles ve diğ., 2016). Bu sebeple, lambdoid sinostozdan şüphelenildiğinde en iyi sonuç, radyolojik olarak alınmaktadır. Lambdoid sütün de koronal sütün gibi çift olarak bulunur ve tek sütün erken kapanması sonucunda da, tıpkı unilateral koronal sinostozda olduğu gibi plagiosefali (Şekil 2.3) bir kafa görünümü ortaya çıkmaktadır (Senarath-Yapa ve diğ., 2012). Bilateral füzyonda ise oksisefali, akrosefali ya da turrisefali olarak adlandırılan, bilateral oksipital deformiteye, parietal düzleşme sonucu küçük posterior kraniyal fossa ve bunu telafi edecek şekilde bregmada büyümeye sebebiyet vermektedir (Kim ve diğ., 2016). Lambdoid sütün sinostozunun gelişmesinde obstetrik faktörlerin de rol oynadığı, uterus kasılmalarının başlaması ile servikal genişleme arasındaki sürenin uzaması sonucunda intra üterin basıncın artarak lambdoid sütün erken kapanmasına yol açtığı gösterilmiştir (Shahinian ve diğ., 1998). Lambdoid sütün en sık rastlanılan formu sagittal sütün sinostozuyla birlikte görüldüğü çoklu sütün sinostozudur ve yaklaşık olarak sendromik olmayan kraniyosinostozlu olguların %8'ini oluşturmaktadır (Boulet ve diğ., 2008).

## 2.5. Sendromik Olmayan Kraniosinostozun Kalıtım Özelliği

Basit ya da izole olarak da tanımlanan sendromik olmayan kraniosinostozlu olguların sadece %8'i aileseldir ve otozomal dominant kalıtım modeli görülmektedir (Boyadjev, 2007). Diğer taraftan; haployetersizlik, eksik baskınlık ve değişken ekspresivite de olgularda ve ailelerde görülebilmektedir (Lajeunie, ve diğ., 2005; Governale, 2015). Herhangi bir moleküler ya da sitogenetik tanının yapılmadığı yerde ve aile öyküsü olmayan hastalarda, kardeşlerdeki tekrarlama riskinin sagittal ve metopik için %2, unikoronal için %5, bikoronal ve multisütür sinostozu için %10 olduğu söylenmektedir (Johnson ve Wilkie, 2011). Çoğunlukla *de novo* mutasyonlar sonucu görülse de, *FGFR2* mutasyonu için gerçek mozaik bir birey de yakın zamanda tanımlanmıştır (Goriely, ve diğ., 2010; Johnson ve Wilkie, 2011). Öte yandan, *EFNB1* (NM\_004429.4) mutasyonları için de mozaisizmin %19 civarlarında olduğu ve hastaların mozaisizm açısından da çok dikkatli incelenmesi gerektiği gündeme gelmektedir (Twigg, ve diğ., 2006; Johnson ve Wilkie, 2011).

Son yıllarda, özellikle de yeni nesil dizileme teknolojisindeki gelişmelerle birlikte, Facioscapulohumeral müsküler distrofi tip 2 (OMIM #158901) (Lupski, 2012) ve kraniosinostoz gibi hastalıklarda, digenik kalıtım modeli de dikkatleri çekmiştir. Artan sayıda mutasyonlarla birlikte genetik ve allelik paternler arasındaki epistatik etkileşim, kompleks fenotipik değişimlerlerle sonuçlanmaktadır (Lupski, 2012). Diğer taraftan; *MSX2*, *IGFRI*, *ALX4* ve *ERF* gibi bazı nükleer genlerindeki eksik penetransın da kraniosinostoz gelişiminin ana nedenlerinden biri olabileceği ve sendromik olmayan sagittal kraniosinostozlu olguların yaklaşık olarak %10'unda gözlendiği belirlenmiştir (Cunningham ve diğ., 2011; Jansen ve diğ., 2013; Twigg ve diğ., 2013). Eksik penetransın yanı sıra, iki lokuslu kalıtım paterni de yakın bir zamanda rapor edilmiştir (Timberlake ve diğ., 2016). Bu çalışmada, *BMP2* geninde bulunan yaygın bir allelin, *SMAD6* genindeki nadir bir mutasyonla birlikte bulunduğu, sendromik olmayan orta hat kraniosinostozuna yol açtığı belirtilmiş ve değişen BMP sinyal yolağının, genetik tanısı konulamamış kraniosinostozlu olgulardaki nedenlerden biri olabileceği fikrini kuvvetlendirmiştir (Timberlake ve diğ., 2016). Literatürde yer alan tüm bu sonuçlar bir

arada değerlendirildiğinde, kraniyosinostozun oligogenik, multifaktöriyel ve heterojen bir hastalık olduğu açıkça görülmektedir.

### **2.5.1. Sendromik Olmayan Kraniyosinostozda Kromozomal Bulgular**

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, sadece moleküler düzeydeki anomalilerin değil, kromozomal değişimlerin de kraniyosinostozun gelişmesinde rolü olduğu görülmektedir. Kraniyosinostozlu olgularda, kromozom 16 ve 19 hariç tüm kromozomlarda delesyon ve duplikasyonlar tespit edilmiş ve meydana gelen bu kromozomal değişimlerin sıklıkla orta hat kraniyosinostozuyla (metopik ve sagittal sütür bölgesi) ilişkili olduğu görülmüştür (Lattanzi ve diğ., 2012). Kromozomal değişimler sonucu ortaya çıkan erken sütür kapanmasının sıklıkla metopik sinostozlu olgularda saptandığı, kromozomal delesyon ve duplikasyonların metopik sinostozlu olgularda sırasıyla ~%60 ve ~%50 sıklığa sahip olduğu düşünülmektedir (Passos-Bueno ve diğ., 2011). Bu oranlar, sagittal ve lambdoid sinostozda %20 ve %40 olarak görülürken, koronal sinostozlu olgularda en sık rastlanan değişimin %20 sıklık ile delesyonlar olduğu belirtilmiştir (Passos- Bueno ve diğ., 2011). Metopik sinostozun da görüldüğü Jacobsen sendromlu olgularda G-bandlama kullanılarak yapılan konvansiyonel sitogenetik analizin uygulandığı bir araştırmada, trigonosefali ve sindaktilinin kromozom 11q23.3'ün distalindeki ve 11q24.1'in proksimalindeki 124 ile 128 Mb aralığında değişen kromozomal bölgedeki delesyonlardan kaynaklanabileceği önerilmiştir (Penny ve diğ., 1995; Mattina ve diğ., 2009, Passos-Bueno ve diğ., 2011). Yapılan bir diğer çalışmada ise, kromozom 19p13.12–p13.2 aralığındaki bölgede yer alan 642kb, 700kb ve 2,2Mb'lık mikrodelesyonların, gelişme geriliği ve kraniyosinostozu yol açabileceği, mikrodizin ile analiz edilen üç olguda gösterilmiştir (Lyon ve diğ., 2015). Bu çalışmaların yanı sıra, kromozom 7p21 (3 ile 12 Mb aralığında) (Johnson ve diğ., 1998; Kress ve diğ., 2006) ve 22q11.2 (McDonald-McGinn ve diğ., 2005; Yamamoto ve diğ., 2006) delesyonları, en az iki kraniyosinostozlu olguda gösterilen bölgeler olmuştur (Lattanzi ve diğ., 2012). Öte yandan, literatürdeki kromozomal değişimlerin çoğu genellikle birer olgu üzerinden gösterilmektedir.



Bu çalışmaların yanı sıra, tek sütür sinostozlu izole olgulardaki nadir görülen kopya sayısı değişimlerinin, kraniyal gelişimde önemli olabileceğini öne süren bir araştırmada, sendromik olmayan kraniyosinostozlu 186 olgu, tüm genom karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array-CGH) ve FISH yöntemleri kullanılarak submikroskopik delesyon ve duplikasyonlar için analiz edilmiştir (Mefford ve diğ., 2010). Yapılan bu çalışmada, *RUNX2* genini içeren 1.1 Mb'lık duplikasyon, metopik sinostozdan ve hipodontiadan etkilenen ve kuzen olan iki olguda gösterilmiştir. Ayrıca olguların %7,5'inde, daha önce rapor edilmemiş ve 0.04 ve 3.92Mb aralığında değişen boyutlarda en az bir nadir delesyon ve duplikasyon olduğu tespit edilmiştir (Mefford ve diğ., 2010).

Delesyon ve duplikasyonlar sonucunda değişen gen dozajından dolayı, kraniyosinostozdan etkilenen olgularda kromozomal değişimlerin olup olmadığını belirlemek amacıyla konvansiyonel sitogenetik analizler rutin olarak uygulanmaktadır. Bunlara ilave olarak, mikrodizin ve FISH yöntemleri kullanılarak, konvansiyonel analizden kaçabilecek mikrodelesyon ve mikroduplikasyonların belirlenmesi de hem olguların hem de aday bölgelerin tanımlanması açısından önemlidir.

### **2.5.2. Sendromik Olmayan Kraniyosinostozun Moleküler Genetiği**

Sendromik olmayan kraniyosinostozun fenotipik karakterizasyonuna yönelik bilgiler eksik ve altında yatan nedenler halen tam olarak bilinmemektedir (Boyadjiev, 2007; Passos-Bueno ve diğ.,2008; Lattanzi ve diğ., 2012; Timberlake ve diğ., 2017). Sahip olduğu heterojen karakterden dolayı, sendromik olmayan kraniyosinostoz genetik açıdan ele alındığında, hastalığın tanısına götürecektir genetik/genomik nedenlerin büyük çoğunlukla bilinmediği görülmektedir. Daha çok tek gen hastalıkları şeklinde seyreden sendromik kraniyosinostozla kıyasla izole formda, hastalıkla ilişkilendirilmiş genlerdeki mutasyonlara ve yapısal kromozomal değişimlere nadiren rastlanmaktadır (Lattanzi ve diğ., 2012).

Otozomal dominant kraniyosinostozun kalıtımına yönelik ilk gen *MSX2* (Muscle Segment Homeobox 2; OMIM:123101) genidir. TGF- $\beta$  sinyal yolağında da bahsedildiği gibi, homeobox genlerinden olan *MSX2*, embriyonik gelişimde hücre proliferasyonu

ve farklılaşmayı kontrol eden transkripyonel bir regülatördür (Hill ve diğ., 1989; Han ve diğ., 2007). Özellikle de kraniyal nöral krest hücrelerinin osteogenezisi için gerekli olan *MSX2* geninin neden olduğu kraniyosinostoz, ilk olarak 1993 yılında, üç kuşak boyunca kraniyosinostozdan etkilenmiş bir ailede tespit edilmiştir (Jabs ve diğ., 1993). *MSX2* geninin evrimsel olarak oldukça korunmuş homeodomain bölgesindeki fonksiyon kazandıran bir mutasyon sonucunda, Prolin amino asidinin Histidin amino asidine değişimi (p.Pro148His) sonucu ortaya çıkan fenotip daha sonra Boston tip kraniyosinostoz (OMIM #604757) olarak tanımlanmıştır (Jabs ve diğ., 1993; Ma ve diğ., 1996). Bu çalışmadan yaklaşık 20 yıl sonra, Boston-tip kraniyosinostozlu ikinci bir aile, Janssen ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve bu ailede de p.Pro148Leu mutasyonu tespit edilmiştir (Janssen ve diğ., 2013). Bu iki aile dışında, herhangi bir kraniyosinostozlu olguda *MSX2* mutasyonu tespit edilememiştir. Diğer taraftan, 2000 yılında yapılan bir çalışmada, *MSX2* gen dozajının insan kafatası gelişiminde önemli olduğu, fonksiyon kazandıran mutasyonların kraniyosinostoz, fonksiyon kaybettiren mutasyonların ise genişlemiş parietal foramenlere yol açtığı gösterilmiştir (Wilkie ve diğ., 2000). *MSX2* gen dozajının kraniyofasiyal gelişimdeki önemi, kraniyosinostozlu olgularda tespit edilen kopya sayısı artışına yönelik çalışmalarla da desteklenmiştir (Shiihara ve diğ., 2004; Bernardini ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2007; Kariminejad ve diğ., 2009). Her ne kadar *MSX2* gen mutasyonları günümüzde kraniyosinostozdan ziyade sıklıkla kafatası kemikleşme bozukluğunun nedeni olarak tanımlansa da, kraniyosinostozlu ailede ilk tanımlandığı dönemde, moleküler genetik analizlerin gücünü arttıran ve kalvaryal gelişimde önemli rol oynayan bir genin tanımlanmasının önünü açmıştır (Wilkie ve diğ., 2007).

Günümüze kadar kraniyosinostoz ile ilişkilendirilmiş ve birden fazla olguda tespit edilerek etkisi teyit edilmiş 57 nükleer gen bulunmaktadır (Twigg ve Wilkie, 2015). Bu sayı, geliştirilen yeni nesil teknolojiler sayesinde her geçen gün artsa da, sendromik olmayan kraniyosinostozun genetik nedeni halen çoğunlukla bilinmemektedir. Özellikle sendromik kraniyosinostozda tespit edilen genlerde görülen yanlış anlamlı ve anlamsız gibi mutasyonlara, sendromik olmayan kraniyosinostozda nadiren rastlanmaktadır (Lattanzi ve diğ., 2012).

Genel olarak ele alındığında, sendromik olmayan kraniyosinostozlu bireylerin sadece küçük bir kısmında (%25) *FGFR2*, *TWIST1*, *FREMI*, *LRIT3* ve *EFNA4* genlerine ait nadir mutasyonlar saptanmıştır (Justice, ve diğ., 2012). 2016 yılında Ye ve arkadaşları tarafından, sendromik olmayan kraniyosinostozun en yaygın formu olan sagittal sinostozlu olgularla (n=93) yapılan bir çalışmada *FGFR1-3*, *TWIST1*, *RAB23* ve *BMP2* genleri taranmıştır. Amerika'da 2008 yılında doğan olgularda, bu genlere ait varyasyonlar, olguların yaklaşık %1'inde belirlenmiş ve bu sebeple de sendromik olmayan sagittal sinostoz bu genlerdeki mutasyonların (yanlış anlamı ve çerçeve kayması) daha düşük oranda (%1) neden olduğu belirtilmiştir. (Ye ve diğ., 2016).

2013 yılında, *TWIST1* geninde mutasyon bulunmayan Saetre-Chatzen sendromlu olgular üzerinden yapılan bir çalışmada, bilateral koronal sinostozlu olguların %32'sinde ve unilateral koronal sinostozlu olguların %10'unda *TCF12* (OMIM#600480) gen mutasyonları belirlenmiştir (Sharma ve diğ., 2013). Bu çalışmanın ardından, farklı popülasyonlarda sendromik olan ya da olmayan koronal sinostozlu olgularda *TCF12* geni taranmış ve %4 ile %21 sıklıkla bu gende mutasyonlar tespit edilmiştir (Di Rocco ve diğ., 2014; Paumard-Hernandez ve diğ., 2015; Goos ve diğ., 2016; Lee ve diğ., 2017). 2017 yılında yapılan bir başka çalışmada ise, Wnt yolak inhibitörlerinden olan *AXINI*, *MESPI1*, *NPHP4*, *PSMC2*, *PSMC5* ve *DVL3* genlerindeki çeşitli mutasyonların sagittal ve metopik sütür sinostozuna yol açtığı gösterilmiştir (Timberlake ve diğ., 2017).

Sendromik olmayan kraniyosinostoz için belirlenen bu genlerin dışında, sendromun gelişmesine yol açabilecek diğer bazı aday genler, transgenik fare modelleri oluşturularak belirlenmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, farklı transkripsiyon faktörleri ve büyüme faktör reseptörlerinde görülen bir takım genetik mutasyonların da prematür füzyonla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Garza ve Khosla, 2012). Örneğin fare modeliyle yapılan çalışmalar, *TGF-β* (NM\_000660.5) mutasyonlarının da sütür füzyonunda işe karıştığını göstermektedir (Hunenko ve diğ., 2001; Garza ve Khosla, 2012). Sendromla ilişkilendirilebilecek bir diğer önemli gen ise, *RUNX2* genidir. *RUNX2* (runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2; NM\_001015051.3) geni, kemik ve kıkırdak gelişimi ve korunması için gerekli bir transkripsiyon faktörü olan *RUNX2*

proteinini kodlar (Komori, 2010). Bu proteinin, osteoblastlara etki ederek kemik gelişimi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Biyolojik süreçte, *RUNX2* geninin aktivasyonu, çekirdekdeki TWIST-TCF12 heterodimerizasyonu ile baskılanır (Katsianou ve diğ., 2016). 2010 yılında yayınlanan klinik bir araştırmada, metopik sinostoz bulgusu olan birinci derece kuzenlerde *RUNX2* genini içeren 6p21 bölgesinin 1.1 Mb'lık heterozigot duplikasyonu tespit edilmiştir. Ancak, bu olguların *RUNX2* geni ekspresyon analizi çalışmasında anlamlı bir bulgu saptanmamıştır (Mefford ve diğ., 2010).

Hem sendromik hem de sendromik olmayan kraniyosinostoz için belirlenen bu genlerin dışında, sendromun gelişmesine yol açabilecek diğer bazı aday genler, transgenik fare modelleri oluşturularak araştırılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, farklı transkripsiyon faktörleri ve büyüme faktör reseptörlerinde görülen bir takım genetik mutasyonların da prematür füzyonla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Garza ve Khosla, 2012). Örneğin, hayvan deneyleriyle gerçekleştirilen araştırmalardan elde edilen genlerden biri, kromozom 11p15.1'de lokalize olan *NELLI* (NEL-like protein 1; NM\_001288713.1) genidir. *NELLI* geninin normalden fazla ekspresyonunu gösteren transgenik farelerde, kraniyal sütürlerin aşırı büyümesinin insan kraniyosinostozundaki gibi olduğu gösterilmiş ve bu çalışmanın sonucunda *NELL1*'in kemik oluşumunda önemli bir role sahip olabileceği düşüncesi öne çıkmıştır (Aghaloo ve diğ., 2006; Zhang ve diğ., 2002). Komatsu ve diğerleri tarafından 2013 yılında yayımlanan bir çalışmada ise, kemik morfojenik protein (BMP) sinyalinin kraniyal nöral krest hücrelerindeki BMP tip1 reseptör (*BMPRIA*;NM\_004329.2) üzerinden gerçekleşen yolağının, farelerde prematür sütür füzyonuna yol açtığını gösterilmiştir. Bu bulgularının sonucunda, Smad-bağımlı BMP yolağının aktivitesindeki artışın, BMP sinyali üzerinden kraniyosinostozu sebebiyet verebileceğini ve BMP'nin erken tanı için potansiyel bir stratejik protein olabileceğini belirtmişlerdir (Komatsu ve diğ., 2013). Diğer taraftan, 2016 yılında yayınlanan bir çalışmanın sonucunda, *BMP2* geninde yaygın olarak bulunan bir varyantın *SMAD6* genindeki nadir bir mutasyonla birlikte bulunmasının da kraniyosinostozu yok açtığı ve iki genli kalıtım modeli sergilediği gösterilmiştir (Timberlake et al., 2016).

Yapılan son çalışmalar ışığında, kraniyosinostozlu olguların yaklaşık %11'inin *de novo* mutasyonlar sonucu kaynaklandığı, ailesel olan sagittal ve/veya metopik sinostozlu olgularda ise *TWIST1*, *TCF12*, *ERF* ve *MSX2* gen mutasyonlarının ise yaklaşık olarak %18 oranında tanıya götürdüğü tespit edilmiştir (Timberlake ve Persing, 2018). Bu genlerin yanı sıra, 190 farklı gende meydana gelecek patojenik mutasyonların sendromik olmayan kraniyosinostoz oluşumuna katıldığı düşünülmektedir (Timberlake ve Persing, 2018).

## 2.6. Sendromik Olmayan Kraniyosinostozun Epigenetiği

Kraniyosinostozun gelişiminde, genetik etkenlerin yanı sıra, epigenetik etkenler de önemli rol oynamaktadır ve bu değişimler temel olarak iki gruba ayrılmaktadır: mekanik güçler ve dış çevre etkileşimleridir (Percival ve Richtsmeier, 2011). Çoklu gebelik, yüksek doğum ağırlığı, düşük pelvik lokalizasyonu, oligohidroamniyos gibi mekanik güçler, belli sinyal yollarındaki gen ekspresyon paternini etkileyerek kraniyosinostozu neden olabilmektedir (Oppenheimer ve diğ., 2012). 2017 yılında yapılan bir çalışmada, kapalı ve açık sütürlerdeki sinyalleşme mekanizmasının birbirinden farklı olduğu ve bunun da hücre dışı çevredeki sert substratlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (Barreto ve diğ., 2017). Gen ekspresyon profilindeki değişimler sonucunda BMP6 yolağında yer alan *IGF1*, *TSHZ2*, *MMP9*, *IL1 $\beta$* , *WIF1*, *BMP6* ve *NOX1* genlerinin kapalı sütürlerden alınan hücrelerde çevresel sert substratlara bağlı olarak upregüle oldukları görülmüştür (Barreto ve diğ., 2017). Yapılan bu çalışma, erken osteogenezis ve sütür kemikleşmesinde, anormal hücre dışı çevrenin gen düzenlenmesindeki etkisini aydınlatmıştır (Barreto ve diğ., 2017).

Epigenetik araştırmalar için ikiz çalışmaları, özellikle de tek yumurta ikizleri üzerinden yapılan çalışmalar, çevresel faktörlerin etkisinin değerlendirilebildiği kıymetli biyolojik kaynaklardır (Boomsma ve diğ., 2002; Plomin ve diğ., 2013; Røysamb ve diğ., 2016). Genetik olarak birbirinin aynısı olan tek yumurta ikizleriyle yapılan çalışmalar, hem maternal kökenli intraüterin biyolojik faktörler hem de ekzojenik faktörler elenerek, epigenetik farklılıkların fenotipe olan etkisinin değerlendirilebilmesine imkân sağlamaktadır. Öte yandan, özellikle çoklu gebeliklerde intraüterin büyümenin

kısıtlanmasının erken sütür füzyonuyla sonuçlanabildiği de gösterilmiştir (Sanchez-Lara ve diğ., 2010). Yapılan bir çalışmada, tek yumurta ikizlerinden birinde metopik kraniyosinostoz tespit edilirken, diğesinde herhangi bir sütür ya da kemik abnormalitesi saptanmamış ve bu durumun da uterus içindeki yerleşimden ve çeşitli baskılara maruz kalım farklılıklarından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Magge ve diğ., 2017). Fare ve sıçanlar üzerinden gerçekleştirilen bir başka çalışmada, artan gerilim varlığında kraniyal sütürlerde Tbx2 geninin ekspresyonunun artarak değişmiş kemik oluşumuna yol açtığı, Cx43 geninin ekspresyonunun ise azaldığı gösterilmiştir (Borke ve diğ., 2003). Bu çalışmalar ışığında, intraüterin kısıtlamaların, gen ekspresyon değişikliklerine yol açarak, özellikle sendromik olmayan kraniyosinostozun patogenezinde etken olabileceği düşünülmektedir.

Prenatal periyotta; Vitamin D eksikliği (McCarthy ve Reid, 1980; Shashi ve Hart, 2002), hipertiroidizm (Menking ve diğ., 1972; Shashi ve Hart, 2002), sigara kullanımı (Alderman ve diğ., 1994; Carmichael ve diğ., 2008), retinoik asit gibi teratojenlere maruz kalım (Lammer e diğ., 1985; Aleck ve Bartley, 1997; Percival ve Richtsmeier, 2011; Shashi ve Hart, 2002) gibi maternal kökenli çevresel etkenler de, kraniyosinostozun gelişimine katkı sağlayabilmektedir. Diğertaraftan, son yıllarda yapılan çalışmalar, artan baba yaşının da konjenital kraniyofasiyal malformasyonlarda artan risk oluşturduğunu göstermiştir (Goriely ve Wilkie, 2012; Barik ve diğ., 2013). Yaşlanmayla birlikte spermler *de novo* mutasyon sıklığının artması, bazı monogenik hastalıkların ortaya çıkmasında artan bir faktör oluşturmaktadır ve bu durum “bencil spermatogonyal seçim” hipotezi olarak tanımlanmaktadır.

Kraniyosinostozun gelişimindeki bir diğerepigenetik faktör ise, mikroRNA (miRNA)'lardır. Günümüze kadar yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda, miRNA'ların osteoblast farklılaşmasına rol oynadığı gösterilmiştir. Wang ve Xu, 2010 yılında miR-27'nin Wnt sinyalinin modüle ederek osteoblast farklılaşmasını arttırdığını göstermiştir (Wang ve Xu, 2010). Potter ve Rhodes tarafından gerçekleştirilen başka bir araştırmada ise, açık sütürlerdeki miRNA ekspresyon profilinin kapalı sütürlerle kıyaslanması sonucunda, kapanan sütürlerde 31 miRNA'nın artan ekspresyonu ve 9 miRNA'nın da

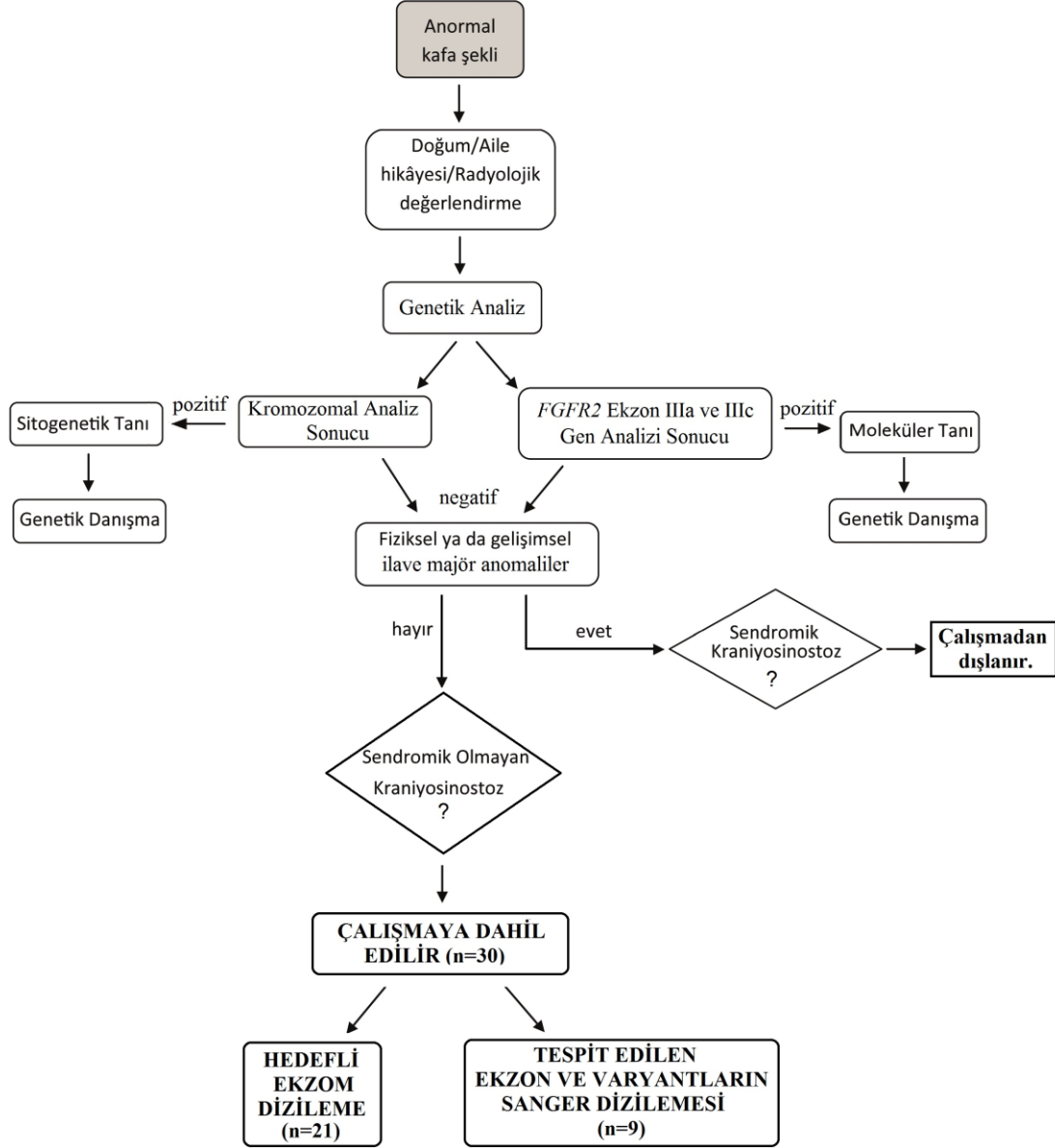
azalan ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir (Potter ve diğ., 2011). 2013 yılında miR-145'in, Klf4 ve Sp7'yi hedefleyerek osteoblast farklılaşmasını inhibe ettiği Jia ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Jia ve diğ., 2013). 2014 yılında fare kemik iliği stromal kök hücreleri kullanılarak yapılan bir araştırmada, bu hücrelerdeki miR-338-3p ekspresyonunun osteoblastik farklılaşma sürecinde önemli oranda down-regüle olduğu gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2014). Buna ilaveten, miR-338-3p'nin artan ekspresyonunun Osterix (Osx) gibi osteoblast farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonunu inhibe edebildiği ve Runx2 ve Fgfr2'yi hedefleyerek gen ekspresyonlarını baskılayabildiği gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2014). Ayrıca, çeşitli miRNA'ların, mezenşimal kök hücrelerin farklılaşmasının düzenlenmesiyle olan ilişkileri de araştırılmış ve özellikle Mir133b'nin kranial sütür oluşumdaki önemli yollardan biri olan FGF sinyal yolağında rol oynadığı gösterilmiştir (Ding ve diğ., 2016).

Literatürdeki tüm bu bilgiler bir arada ele alındığında, hem genetik hem de çevresel faktörlerin sendromik olmayan kraniosinostozun gelişim sürecinde işe karıştığı görülmektedir (Wilkie, 1997; Boyadjiev, 2007; Ko, 2016). Özellikle sendromik olmayan kraniosinostozun oluşum mekanizmasında yer alan süreçler bir arada değerlendirildiğinde, erken sütür kapanmasının altında yatan biyolojik mekanizmaları aydınlatmaya yarayan her biyolojik ve klinik çalışma, tanısı konulamamış olguların nedeninin aydınlatılmasında, önemli birer kaynak haline gelmektedir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Metodolojik Algoritma

Çalışmamız kapsamında uygulanan metodolojik algoritma, şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil. 3.1. Çalışmada takip edilen metodolojik algoritma



### 3.2. Hasta Seçimi

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Genetik bilim dalından hastanemizin Genetik Tanı Merkezi'ne yönlendirilen ve sendromik olmayan kraniyosinostoz ön tanısı konan hastalar çalışma için değerlendirmeye alınmıştır. Projemiz, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (180/15.04.2015 nolu karar) onaylanmıştır. Gönüllülük esasına dayanan çalışmamıza, aydınlatılmış etik onam formunu imzalayan olgular ve aile bireyleri dahil edilmiştir. Seçilen olguların ilk değerlendirmeleri, *FGFR2* geninin ekzon IIIa ve IIIc bölgesinde mutasyon bulunmayan ve herhangi bir kromozomal abnormalite tespit edilemeyenler olarak yapılmıştır. Klinik bulguları arasında Apert, Crouzon, Saethre-Chotzen, Pfeiffer ve Muenke sendromları gibi tanımlanmış klasik kraniyosinostoz sendromlarıyla uyumlu değişimlere sahip olan olgular çalışmadan dışlanmıştır. Bunların yanı sıra, herhangi bir ağır hayati bulgu beklenmeyen sendromik olmayan kraniyosinostozun tek tedavisinin ameliyat olmasından dolayı, opere olan olgular listelenmiş ve herhangi bir klinik tarafından sendromik bulgular açısından takip edilip edilmediği değerlendirilmiştir. Toplamda sendromik olmayan kraniyosinostoz ön tanısıyla uyuşan 30 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Çalışmamızdaki olgular, doğumu takip eden ilk bir yıl içerisinde kraniyosinostoz tanısı almış olgulardır. Çalışma kapsamına dâhil edilen 30 olgunun 21 tanesi Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli ile taranmıştır. Geri kalan 9 tanesi de yeni nesil dizileme analizden elde edilen ve öne çıkan genler ve mutasyonlar için Sanger dizileme ile taranmıştır.

### 3.3. Genomik DNA Eldesi (DNA İzolasyonu)

Çalışma kapsamına alınan olgulardan K<sub>2</sub>EDTA'lı tüplere (BD Vacutainer®) 4-6 ml olacak şekilde alınan periferik kan örnekleri, DNA izolasyonu işlemine kadar +4°C'de saklanmıştır. Toplanan kan örneklerinden yapılan DNA izolasyonu, laboratuvarımızda kullanılmakta olan enzimatik olmayan modifiye metod ile gerçekleştirilmiştir.

Bu protokolün iş akışı ise şu şekildedir:

1. K<sub>2</sub>EDTA'lı steril tüplere alınan kan, alt üst edilerek homojenize edilir.
2. Kan örneğinin 3 ml'si, 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarılır.
3. Üzerine 3 katı hacimde CLB 1X solüsyonu eklenir ve tüp, yavaşça karıştırılır. Oda sıcaklığında dakikada devir sayısı (rpm) 3000 olacak şekilde 10 dakika santrifüj edilir.
4. Süpernatant atılır. Pellet elle vurularak homojenize edilir ve üzerine 5 ml TKM1 solüsyonundan eklenir. Vorteksle karıştırılarak homojenize edildikten sonra, oda sıcaklığında 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
5. Santrifüj işleminin sonunda süpernatant atık kabına dökülür. Pellet elle vurularak homojenize edilir ve üzerine 1.5 ml TKM2 eklenir ve vortekslenir.
6. Tüpe 100µl %10 SDS solüsyonlarından eklenir ve yavaşça alt üst edilerek karıştırılır.
7. Tüp içindeki pellet tamamen homojenize olana kadar, 65°C'lik su banyosunda 30-60 dakika süreyle inkübasyona bırakılır.
8. İnkübasyondan sonra tüpe 570 µl 6 M'lık NaCl eklenir.
9. Beyaz köpüklü bir görünüm elde edene kadar vorteksle karıştırılır.
10. Oda sıcaklığında 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
11. Süpernatant, içinde 4.5 ml soğuk %96 etanol bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır.
12. Tüp alt üst edilerek gDNA'nın kondanse olması sağlanır.
13. Presipite olan gDNA, içinde 500 µl %70 etanol bulunan 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine mikropipet aracılığıyla aktarılır.
14. Tüp 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
15. Tüp içerisinde pellet halinde bulunan DNA, süpernatantı uzaklaştırarak 10-15 dakika etüvde kurutulur.
16. Üzerine 300 µl Tris EDTA eklenerek DNA'nın çözülmesi sağlanır.
17. Elde edilen gDNA örneklerinin spektrofotometre ile optik dansite ölçümleri alınır ve saklama süresi göz önüne alınarak -20°C ya da +4°C'li soğutuculara kaldırılır.

### 3.3.1. Kullanılan Solüsyonlar

#### CLB 1X [Hücre Liziz Tamponu]

- 0.32 M Sükroz (Merck, Almanya)
- 10mM Tris HCl pH 7.6 (Sigma, ABD)
- 5mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Almanya)
- %1 Triton-X (Sigma, ABD)

Distile suda, yukarıdaki derişimlere sahip olacak şekilde hazırlanan tampon, sterilize edilerek kullanılmış ve +4 °C’de saklanmıştır.

#### TKM1 [Tris-Potasyum-Magnezyum Solüsyonu (Düşük Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu)]

- 10mM Tris HCl pH 7.6 (Sigma, ABD)
- 10mM KCl (Reidel-de Haen, Almanya)
- 10mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Almanya)
- 2 mM EDTA pH 8.0 (Sigma, ABD)

Distile suda, yukarıdaki derişimlere sahip olacak şekilde hazırlanan tampon, sterilize edilerek kullanılmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

#### TKM2 [Tris-Potasyum-Magnezyum Solüsyonu (Yüksek Konsantrasyonlu Tuz Solüsyonu)]

- 10mM Tris HCl pH 7.6 (Sigma, Almanya)
- 10mM KCl (Reidel-de Haen, Almanya)
- 10mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Almanya)
- 0.4mM NaCl (Carlo Erba, İtalya)
- 2 mM EDTA pH 8.0 (Sigma, Almanya)

Distile suda, yukarıdaki derişimlere sahip olacak şekilde hazırlanan tampon, sterilize edilerek kullanılmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

### **%10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi**

1 gram SDS (Q-Biogene, ABD) 10 ml distile suda çözüldükten sonra filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

### **6 M NaCl**

35.06 gram NaCl (Carlo Erba, İtalya) 100 ml distile suda çözülmüş ve otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklanarak kullanılmıştır.

### **%70'lik Etanol**

70 ml %99'lük etanol, 30 ml distile su ile dilüe edilerek hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

### **3.4. DNA Miktar ve Kalite Tayini**

Elde edilen genomik DNA'ların miktar ve kalite tayini Nano-Drop cihazı ile belirlenmiştir. DNA'nın sulandırıldığı solüsyon ile kalibrasyonu yapılan spektrofotometre cihazına, örnekten 1 µl konularak, hem miktarı hem de saflığı not edilmiştir.

### **3.5. Yeni Nesil Dizileme (YND)**

Hedefli ekzom dizilemenin gerçekleştirileceği çalışmamızda, Dismorfoloji ve Displazi Araştırma (DDA) Gen Paneli (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Bu panel, 519 gen (Ek Tablo 1) içermektedir. Amplikonların uzunlukları ortamala olarak 200 bp'dir. Yeni nesil dizileme analizi, Ion S5 System cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de şematize edilen YND'nin kapsamlı iş akışı aşağıda anlatılmaktadır.



**Şekil 3.2.** Yeni nesil dizilemenin uygulama aşamaları

### 3.5.1. QUBIT Florometre ile DNA Miktarının Ölçümü

QUBIT florometre (Invitrogen, ABD) ile DNA miktar ölçümü için, dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, USA) kullanılmış ve kit protokolünde belirtilen adımlar uygulanmıştır. Ölçüme başlamadan önce reaktifler (kimyasallar) vortekslenmiş ve 1:200 oranındaki çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. 198 µl çalışma solüsyonuna 2 µl DNA örneği eklenmiştir. Kalibrasyonunun yapılacağı standart 1 ve standart 2 olarak adlandırılan solüsyonlar ise 190/10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. İlk olarak standart 1 ve standart 2 ölçülerek, en yüksek ve en küçük değer aralığı tanımlanmıştır. Ardından örneklerin ölçümüne geçilerek, elde edilen sonuçlara göre tüm DNA'lar, 5 ng/ µl'ye gelecek şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltilmiştir.

### 3.5.2. Kütüphane (Library) Hazırlığı

Kütüphane hazırlığı IonAmpliseq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu iş akışında, gerekli kimyasallar çıkartılarak buz üzerinde erimeye bırakılmış ve çalışmanın bu aşaması, soğuk rak üzerinde devam etmiştir. Kullanılan dismorfoloji ve displazi paneli, tüm hedef bölgeleri tanıyan primerlerin yer aldığı iki havuza (pool) sahiptir ve her bir havuzun PZR'si (polimeraz zincir reaksiyonu) ayrı ayrı yapılmıştır. PZR reaksiyonu hazırlanırken kullanılan solüsyon ve miktarları ile uygulanan PZR protokolü şu şekildedir:

#### PZR Karışımı (1 hasta örneği için)

5X Ion AmpliSeq HiFi Mix	2 µl
2X Ion AmpliSeq Primer Havuzu	5 µl
gDNA (10ng/ µl)	1 µl
Nükleaz içermeyen su	2 µl

### **PZR Protokolü:**

Bu aşamada örnekler; her bir döngü için 99°C’de 2 dk, 99°C’de 15 sn ve 60 °C’de 12 dk kalacak şekilde 13 döngülük ısı tepkime için PZR cihazına konmuştur. Tepkime sonunda örnekler cihazdan alınana kadar 4°C’de beklemeye bırakılmıştır. PZR işleminin ardından bir örneğe ait olan iki PZR reaksiyonu (her havuz için bir tane) 96’lık well platede bir araya getirilmiş ve toplam 20 µl’lik hacme ulaşılmıştır.

### **3.5.3. Parçalama (Digestion)**

Bu aşamada da buz üzerinde çalışılarak, Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır.

- 20 µl PZR ürünlerinin üzerine 2 µl FuPa Reagent (Life Technologies, ABD) eklenerek toplam hacimde 22 µl’ye ulaşılmıştır.
- Plate vortekslenip kısa çöktürme santrifüjü yapılmıştır.
- Thermal cyler cihazında şu protokol uygulanır: 50°C’de 20 dk, 55°C’de 20 dk ve 60°C’de 20 dk. Reaksiyon sonucunda örnekler en fazla 1 saat 4°C’de bekletilmiştir.

### **3.5.4. Barkod Hazırlama**

Ligasyon (bağlanma) aşamasında kullanılacak olan barkodlar için IonXpress Barcode Adapters Kit (Life Technologies, ABD) (-20°C) kullanılarak bir karışım hazırlanmıştır. Böylelikle her bir barkod, adaptör ve su kullanılarak 1:4 oranında dilüe edilmiştir.

### **Barkod-Adaptör Miksi**

Ion P1 Adapter	2 µl
IonXpressBarcode X	2 µl
Nükleaz içermeyen Su	4 µl
Toplam hacim	8 µl

### 3.5.5. Ligasyon (Bağlanma)

Barkodların DNA örneklerine bağlanması için Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, ABD) (-20 °C) kullanılmıştır. Bu aşamada buz üzerinde çalışılarak hazırlanan miks her bir örneğe tek tek eklenmiştir. Kit içinde yer alan solüsyonlar ve miktarları ise şu şekildedir:

Switch Solution	4 µl
Dilue Barkod-Adaptör Miksi	2 µl
DNA Ligaz	2 µl
Parçalama (Dijesyon) Ürünü	22 µl
Toplam hacim	30 µl

Plate, vortekslenip kısa bir çöktürme santrifüjü yapıldıktan sonra thermal cyler cihazına yüklenir. Bu aşamada örnekler; 22°C’de 30 dk, 68°C’de 5 dk ve 72°C 5 dk olacak şekilde ısı döngüye alınır. İşlem sonucunda örnekler, 10°C’de bekletilebilir.

### 3.5.6. Pürifikasyon

Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA) (+4 °C) ve DynaMAG 96’lık well plate ile manyetik beadler (boncuklar) ve manyetik bir rak aracılığıyla, örneklerin pürifikasyonu gerçekleştirilir. Bu aşamada takip edilen iş akışı ise şu şekildedir:

1. AMPure XP Reagent reaktifi oda sıcaklığına getirilir.
2. Beadler (boncuklar) iyice vortexlenir ve tamamen homojenize bir şekilde dağılına kadar yavaşça pipetaj yaparak kullanılır.
3. Taze %70’lik etanol hazırlanır. Örnek başına, 230 µl saf Etanol (>%99) + 100 µl nükleaz içermeyen su kullanılır.
4. Her well üzerine 45 µl (toplam hacmin 1,5X katı olacak şekilde) Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) eklenir ve üzeri strip kapak ile kapatılır.
5. Plate 1000-1500 rpm’de 15-20 sn kadar vortekslenir ve ardından 5 sn quick spin yapılır.
6. Plate oda sıcaklığında 5 dk bekletilir.

7. Bu sırada ION Ampliseq Library Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) içinde yer alan Platinum PCR SUPER MIX ve Amplification Primer MIX -20°C'den çıkarılarak, buz üzerinde erimeye bırakılır.
8. İnkübasyon sonrası, plate manyetik standa/raka alınır.
9. Karışım tamamen temizlenene kadar (yaklaşık 2 dk) bekletilir.
10. Çok kanallı pipet kullanılarak beadlere tutunan DNA'lardan oluşan pelletten zarar vermeden süpernatantlar atılır.
11. 150 µl taze %70'lik etanol eklenir.
12. Plate, rak üzerinde hareket ettirilerek (1-12 sütunlardan alınıp 2-dış sütun hizasına yerleştirilerek) yıkama yapılır. Bu aşama 3 kere tekrarlanır. Her bir adım için 15 sn beklenir.
13. Son yıkama adımı sonrasında plate 1-12 sütun hizasına geri getirilir ve 1 dk beklenir.
14. Beadler tamamen kuyucuk çeperlerine yapıştıktan sonra pelletten zarar vermeden süpernatantlar atılır.
15. 12-14. adımlar tekrar edilir.
16. 10-100 µl çok kanallı pipet kullanılarak tüplerin dibinde kalan etanol damlacıkları da uzaklaştırılır. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için plate ağzı açık şekilde 3 dk oda sıcaklığında manyetik stant üzerinde bekletilir (1-12 sütun hizasında) ve ardından bir sonraki aşamaya geçilir.

### **3.5.7. Kütüphanenin Amplifikasyonu**

Bu aşamada, Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, ABD) (-20 °C) kullanılmıştır.

Platinum PCR Süper Karışım Hi Fi .....50 µl  
Amplifikasyon Primer Karışımı .....2 µl

1. Örnek sayısından bir fazla olacak şekilde karışım, buz üzerinde hazırlanır, vortex ve kısa santrifüj yapılır.
2. 52'şer µl beadlere bağlı örneklerin bulunduğu well'lere dağıtılır.
3. Plate vortexlenir ve kısa santrifüj yapılır.



4. Plate tekrar manyetik standı alınır. 2 dk veya temizlenene kadar bekletilir.
5. 52 µl süpernatant, pellete dokunmadan alınıp, plate üzerindeki boş well'lere buz üzerinde aktarılır.
6. Thermal cycler cihazında, toplamda beş döngü olacak şekilde; 98°C'de 2 dk, 98°C'de 15 sn ve 64°C'de 1 dk şeklinde uygulanan PZR protokolü kullanılarak örnekler amplifiye edilir. İşlem sonucunda örnekler 4°C'de bekletilebilir.

### **3.5.8. Kütüphanenin Pürifikasyonu**

Amplifiye olan kütüphane, DynaMAG 96'lık well plate magnet ve Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, ABD) (+4 °C) kullanılarak, iki aşamalı olarak pürifiye edilir:

- Bir önceki pürifikasyon aşamasında kullanılan AMPure XP (Beckman Coulter, ABD) kimyasalı kullanılır.
- Beadler iyice vortexlenir ve tamamen homojen bir şekilde dağılına kadar yavaşça pipetaj yaparak dağıtılır.
- Taze %70'lik etanol hazırlanır.

#### **Aşama 1**

1. Kuyucukların üzerine 25 µl Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, ABD) eklenir. (0.5X)
2. Vortex veya pipetaj yapılarak iyice karışması sağlanır.
3. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrası plate, magnetik standı alınır
5. Karışım tamamen temizlenene kadar (yaklaşık 5 dk) bekletilir.
6. Pellete temas etmeden süpernatantın tamamı yeni kuyucuklara alınır.

Bu aşamada istenilen kütüphane süpernatant içerisinde yer almaktadır.

## Aşama 2

Plate magnetik standdan normal rak üzerine alınır.

1. Her kuyucuğun üzerine 60 µl Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, ABD) eklenir (örneğin 1.2 katı hacimde olacak şekilde miktar belirlenir).
2. Vortex veya pipetaj yapılarak iyice karışması sağlanır.
3. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrası plate, tekrar magnetik standda alınır.
5. Karışım tamamen temizlenene kadar (yaklaşık 3 dk) bekletilir.
6. Pellete zarar vermeden süpernatant atılır. Amplikonlar bu kez beadlere bağlanmıştır.
7. Her kuyucuğa 100 µl taze %70'lik etanol eklenir.
8. Plate 1-12 sütunlardan alınıp 2-dış sütun hizasına yerleştirilerek yıkama işleme gerçekleştirilir. Bu aşama üç kez tekrar edilir. Her bir aşamada yaklaşık 15 sn kadar beklenir.
9. Pellete zarar vermeden süpernatant atılır.
10. 7-9. adımlar tekrar edilir.
11. Süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra plate magnetik standda 1 dk bekletir ve çok kanallı pipet kullanılarak kuyucukların dibinde kalan etanol damlacıkları da uzaklaştırılır.
12. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için kuyucuklar ağzı açık şekilde 3 dk oda sıcaklığında bekletilir.
13. Magnet üzerinde kuyucuklarda yer alan pelletin üzerine 50 µl Low TE eklenir.
14. Vortexleme ve kısa santrifüj yapılır.
15. Plate Magnet üzerine yerleştirilir.
16. Süpernatantın tamamı, yeni kuyucuklara aktarılır. İstenilen kütüphane artık bu süpernatant içerisinde.

### 3.5.9. Kütüphanenin QUBIT ile Ölçümü

Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, ABD) kullanılarak oluşturulan kütüphanenin ölçümü gerçekleştirilmiştir:

1:200 oranındaki çalışma solüsyonu hazırlanır:

- 1 µl Qubit Reagent X Örnek Sayısı
- 199 µl Qubit Buffer X Örnek Sayısı

Qubit Assay tüplere, 190 µl Working Solution + 10 µl Library örneği eklenir ve vortekslenir. Qubit'te ölçüm yapılır. Bu aşamada kütüphane örneğimizin Qubit sonucununun 300-1000 ng/ml arası olması gerekmektedir.

### **3.5.10. Kütüphanenin Dilüsyonu ve Birleştirilmesi**

Bu işlem Ion Chef cihazına çipler yükleme yapılmadan hemen önce yapılmıştır.

1. Qubit ölçümü sonrası tüm örnekler 18 ng/ml'ye, nükleaz içermeyen su ile dilüe edilir.
2. Dilue edilmiş örneklerden ilk 11 örneğin her birinden 25'er µl alınıp çip 1 için tek bir tüpte birleştirilir. Diğer 10 örnek de aynı şekilde çip 2 için birleştirilir.
3. Vortex ve spin down yapılır.

### **3.5.11. Ion Chef Robotuna Çiplerin Yerleştirilmesi**

21 örneğin DDA paneli kullanılarak gerçekleştirilecek olan yeni nesil dizilemesi için iki adet 540 çipleri kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan en az 45 dk önce Ion PGM™ Hi-Q Chef Reagents Cartridge -20°C'den çıkarılarak oda ısısına getirilmiştir. Oda ısısında tutulan Hi-Q CHEF Supplies kitte yer alan boş tip rakı, yeni tip kartuşu (Ion Chef™ Hi-Q Tip Cartridge), PZR plate'i, plate seali, reaksiyonlar sırasında kullanılacak solüsyonlar Ion Chef içindeki ilgili bölümlere yerleştirilmiştir. Robotun santrifüj bölmesinin içerisine ise toplama tüpleri dikkatlice yerleştirilmiş ve üzerilerine kapakları kapatılmıştır. Zenginleştirme kartuşunun yerleştirilmesinin ardından çip adaptörü çipe, barkodu görülecek şekilde takılmıştır. 45 dk önce çıkarılan Hi-Q Reagents Cartridge yerine yerleştirilir ve sonra poolları koyduğumuz örnek tüpleri yerleştirilmiştir. Tüm reaktiflerin doğru yerde olup olmadıkları kontrol edildikten sonra, Ion Chef robotu çalıştırılmıştır.

### **3.5.12. Ion S5 Dizileme Cihazı**

Ion Chef robotunun çiplere yükleme işlemini tamamlamasının ardından, örneklerin yer aldığı birinci çip bekletilmeden Ion S5 dizileme cihazına yüklendi. Çip 2 ise

kurumaması için, kapaklı bir kutuya koyularak +4°C'ye kaldırılmıştır. Birinci çipin dizileme işlemi tamamlandıktan sonra ikinci çip cihaza yüklenerek, örneklerin DNA dizilemesi gerçekleştirilmiştir.

### **3.5.13. Varyant Analizi**

519 gen ve 12,547 ampikon tarayan Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Paneli v2 (Ion AmpliSeq, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilen hedefli yeni nesil dizilemenin sonucunda, elde edilen diziler Torrent Suite Software (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak GRCh37/hg19 referans genomuna göre haritalanmış ve varyantlar çağırılmıştır. Elde edilen Varyant Çağırma Dosyası (VCF:Variant Calling File) The Ingenuity Variant Analysis (QIAGEN, ABD) programına yüklenerek, filtreleme ve aday varyantları tespit etme işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, kodlanmayan bölgede bulunan varyantlar ile sinonim varyantlar elenmiş ve sekans okuma kalitesi >99 olan varyantlar seçilmiştir. Daha sonra dbSNP, 1000 Genome ve ExAC gibi popülasyon bazlı ekzom ve genom verileri içeren veri tabanlarında Minör Allel Frekansı (MAF) < %1 olan varyantlar filtrelenerek değerlendirmeye alınmıştır. Kraniyosinostoz bulgusuyla uyumlu olabileceği tespit edilen varyantlar, hem olgularda hem de ulaşılabilen aile bireylerinde Sanger dizileme ile doğrulanmıştır. Bulgular kısmında detayları verilen olası patojenik varyantların Sanger dizilemesinde üreticinin protokolü takip edilerek BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD) kullanılmış ve ABI 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, ABD) cihazında ürünler yürütülmüştür. Dizilenen örneklerin görüntülenmesi BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences, ABD) programı ile gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Klinik Bulgular

Akdeniz Üniversitesi Pediatrik Genetik bilim dalı tarafından kraniyosinostoz tanısı konan ve ebeveynleri tarafından onam formu imzalanan 30 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Bu olgulardan dokuzu kız (%30), 21'i ise erkektir. YND (yeni nesil dizileme) analizine alınan olgularda ise kızların erkeklere olan oranı 6:15'dir. Çalışma grubunda yer alan olguların yaş ortalaması ise  $4,59 \pm 3,4$  olarak hesaplanmıştır. Yapılan YND analizi sonucunda olası patojenik varyasyon tespit edilen olgular, tekrar Pediatrik Genetik polikliniğine çağırılarak ekibimizde yer alan hekimlerimiz tarafından kapsamlı klinik değerlendirmeye alınmıştır. Bu değerlendirmede, Tablo 4.1'de yer alan kriterlerin olguda gözlenip gözlenmediği değerlendirilmiş ve ilave bulgular listelenmiştir. Olgulardan altı tanesinin ailesi hastanemize kapsamlı klinik değerlendirmeye gelmeyi kabul etmiştir. Ulaşılamayan olguların, hasta kayıt dosyalarında yer alan bilgilerden faydalanılarak, Tablo 4.1.'de yer alan klinik izlem tablosu doldurulmuştur.

**Tablo 4.1.** Çalışma kapsamına alınan olguların klinik bulguları ve genotip verisi

<b>OLGULAR</b>	NC1	NC2	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10	NC11
<b>Anomaliler</b>											
<b>Oküler</b>											
Proptosis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Hiptelozom	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Strabismus	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Dar Göz Çukuru	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diğer	-	-	-	-	-	-	-	hipermetropi	-	-	-
<b>Kraniyofasiyal</b>											
	fasiyal asimetri										
<b>Kafa Büyüklüğü</b>	n/a	n/a	n/a	49 (<3p)	n/a	49,6 (75p)	49,8 (<50-75p)	n/a	47,5 (75-90p)	48,2 (75-90p)	49 (25-50p)
Normosefali	n/a	n/a	-	-	n/a	+	-	-	+	+	+
Mikrosefali	n/a	n/a	-	+	n/a	-	+	-	-	-	-
Makrosefali	n/a	n/a	+	-	n/a	-	-	-	-	-	-
Baş Çevresi (cm)	n/a	n/a	n/a	49 (<3p)	n/a	49,6 (75p)	49,8 (<50-75p)		47,5 (75-90p)	48,2 (75-90p)	49 (25-50p)
<b>Kafa Şekli</b>											
Skafosefali	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Plajiosefali	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Trigonosefali	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Brakisefali	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Oksisefali (koni şeklinde kafa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Turrisefali (Kulekafa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yonca yaprağı kafa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Fasiyal Bulgular</b>											
Düz Yüz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Frontal çıkıntı	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Geniş anterior fontanella	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrosetali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Orta Yüz Hipoplazisi	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Displastik Kulak	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Stenotik dış kulak	-	-	-	-	-	-	- (helix kavırımı)	-	-	-	-
Kanallar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Armut şekilli burun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Düşük burun köprüsü	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
Damak abnormalitesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ekstremiteler</b>	bilateral calcaneoalgus; halluks valgus ayakta dismorfizm (baş parmak) Klinodaktili										
Çoklu eklem kontraktürleri	-	-	-	-	ellerde +	-	-	-	-	-	-
Radyohumeral sinostozis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Femoral kontraktürleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Femoral eğrilik	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sindaktili	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geniş parmaklar	-	-	-	-	-	-	+	(geniş ayak başparmağı)	-	-	-
Kamptodaktili	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rocker bottom feet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boy kısalığı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Diğer Bulgular</b>	serebral palsi, dizartik konuşma pectus excavatum DMD takipli										
İşitme Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kalp defekti	-	-	-	PDA	-	-	-	-	-	-	PFO
Genital anomali	-	-	-	-	eğik penis	-	-	-	-	-	-
CNS yapı abnormalitesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nöbet	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Gelişme geriliği	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Erken ölüm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cinsiyet</b>	K	E	E	K	E	E	E	K	K	E	E
<b>Boy</b>	n/a	n/a	n/a	n/a		115,5 (50p)	127,5 (25p)		106 (97p)	97,5 (25p)	93 (50-75p)
<b>Kilo</b>	n/a	n/a	n/a	n/a	16	20 (25-50p)	22,3 (5p)		17 (75p)	13,7 (10p)	13 (25p)
<b>Yaş (yıl)</b>	9	7	6	14	6	6	9	5	3,5	3,5	2,5
<b>Prenatal dönem ilaç</b>	n/a	n/a	n/a		n/a	-	-	n/a	-	-	n/a
<b>Doğum Büyüklüğü (kg)</b>	n/a	n/a	n/a	2,75	n/a	3,6	2,95	n/a	3,8	3,61	4,5
<b>Sporadik</b>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	+	+	n/a	+	+	n/a
<b>Ailesel olgu</b>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	-	-	n/a	-	-	n/a
<b>Anne yaşı (yıl)</b>	n/a	n/a	n/a	37	n/a	36	29	n/a	33	29	37
<b>Baba yaşı (yıl)</b>	n/a	n/a	n/a	41	n/a	42	36	n/a	46	33	43
<b>Kromozomal Analiz</b>	46,XX	46,XY	46,XY	46,XX	46,XY	46,XY	46,XY	46,XX	46,XX	46,XY	46,XY
<b>FGFR2 analizi</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>DDA panel analizi</b>	-	FBN1	FREM1	-	-	FREM1	FBN1	-	TCF12	TCOF1	FREM1
<b>Tespit edilen mutasyon</b>	-	p.H1187R	p.P1802L	-	-	p.G1493R	p.G301V	-	p.M260fs*5	p.P589fs*7	p.S1296R

**Tablo 4.1.** Çalışma kapsamına alınan olguların klinik bulguları ve genotip verisi (devamı)

OLGULAR	NC12	NC13	NC14	NC15	NC16	NC17	NC18	NC19	NC20	NC21
<b>Anomaller</b>										
<b>Oküler</b>										yukarı çekik p
Proptosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertelorizm	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Strabismus	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Dar Göz Çukuru	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Diğer	-	-	düşük sol göz	-	-	-	-	-	-	kaba yüz görü
<b>Kraniyofasiyal</b>	kalsifiye sefal hematom									
<b>Kafa Büyüklüğü</b>	50 (50p)	48 (25p)	n/a	n/a	44 (25-50p)	55,9 (>97p)	n/a		50,5 (75-90p)	n/a
Normosefali	+	+			-	-	-		+	-
Mikrosefali	-	-			+	-	-		-	+
Makrosefali	-	-			-	+	+		-	-
Baş Çevresi (cm)		48 (25p)	n/a		44 (25-50p)	55,9 (>97p)	n/a		50,5 (75-90p)	n/a
<b>Kafa Şekli</b>										
Skafosefali	+	-	-	-	-	+	+		+	-
Plajiosefali	-	-	sağ koronal	-	-	-	-		-	-
Trigonosefali	-	-	-	+	-	-	-		-	-
Brakisefali	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Oksisefali (koni şeklinde kafa)	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Turrisefali (Kulekafa)	-	-	-	-	-	-	-		-	-
Yonca yaprağı kafa	-	-	-	-	-	-	-		-	-
<b>Fasiyal Bulgular</b>										
Düz Yüz	-	-	-		+	+	-		-	-
Frontal çıkıntı	+	-	+		+	+	+		+	+
Geniş anterior fontanella	-	-	-		-	-	-		-	-
Hidrocefali	-	-	-		-	-	-		-	-
Orta Yüz Hipoplazisi	-	-	-		+	+	-		-	-
Displastik Kulak	-	-	-		+	+	-		-	-
Stenotik dış kulak	-	-	-		-	-	-		-	-
Kanallar	-	-	-		-	-	-		-	-
Armut şekilli burun	belirgin burun +					+				
Düşük burun köprüsü	-	-	+		+	+	+		+	+
Damak abnormalitesi	-	-	-		+	-	-		-	-
<b>Ekstremiteler</b>	genü valgum deformitesi				Bilateral simian +					
Çoklu eklem kontraktürleri	-	-	-		-	-	-		-	-
Radyohumeral sinostozis	-	-	-		-	-	-		-	-
Femoral kontraktürleri	-	-	-		-	-	-		-	-
Femoral eğrilik	-	-	-		-	-	-		-	-
Sindaktili	-	-	-		-	-	-		-	-
Geniş parmaklar	-	-	-		-	-	-		-	-
Kamptodaktili	-	-	-		-	-	-		-	-
Rocker bottom feet	-	-	-		-	-	-		-	-
Boy kısalığı	-	-	-		-	-	-		-	-
<b>Diğer Bulgular</b>				hipotiroidi						
İşitme Testi	-	-	-		-	-	-		-	-
Kalp defekti	-	-	-		-	-	-		-	-
Genital anomali	-	-	-		-	-	-		-	penoskrotal hy
CNS yapı abnormalitesi	-	-	-		-	-	-		-	-
Nöbet	-	-	-		-	-	-		-	-
Gelişme geriliği	-	-	-		-	-	-		-	+
Erken ölüm	-	-	-		-	-	-		-	-
<b>Cinsiyet</b>	E	E	E	E	K	E	K	E	E	E
<b>Boy</b>	107 (>97p)	85 (50p)	72 (10-25p)	n/a	88 cm	90,97 L	n/a	n/a	99 (90p)	91 (10-25p)
<b>Kilo</b>	17 (75-90 p)	12 (25-50p)	9 (10-25p)	n/a	11	18,5	n/a	n/a	16 (75-90p)	12 (10-25p)
<b>Yaş (yıl)</b>	3,2	4	1	3	2,5	3	2,5	15	3	3
<b>Prenatal dönem ilaç</b>	-	n/a	euthyrox	n/a	-	-	n/a	n/a	-	n/a
<b>Doğum Büyüklüğü (kg)</b>	3,98	n/a	n/a	n/a	3,7	4	n/a	n/a	-	2,7
<b>Sporadik</b>	+	n/a	n/a	n/a	-	+	n/a	n/a	-	-
<b>Ailesel olgu</b>	-	n/a	n/a	n/a	+(baba +)	-	n/a	n/a	anne+ dayı+	amca CRN+, M
<b>Anne yaşı (yıl)</b>	30	33	n/a	n/a	37 (40)	35	n/a	n/a	n/a	32
<b>Baba yaşı (yıl)</b>	32	33	n/a	n/a	38 (41)	39	n/a	n/a	n/a	36
<b>Kromozomal Analiz</b>	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY	46,XX	46,XY	46,XX	46,XY	46,XY	46,XY
<b>FGFR2 analizi</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>DDA panel analizi</b>	-	-	ERF	-	TCF12	AXIN2	-	-	-	-
<b>Tespit edilen mutasyon</b>	-	-	p.G299fs*9	-	p.P369fs*26	p.L349fs*24	-	-	-	-

**Tablo 4.1.** Çalışma kapsamına alınan olguların klinik bulguları ve genotip verisi (devamı)

OLGULAR	NC22	NC23	NC24	NC25	NC26	NC27	NC28	NC29	NC30
<b>Anomaliler</b>									
<b>Oküler</b>		hipotelorizm							
Proptosis	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Hipertelorizm	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Strabismus	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Dar Göz Çukuru	-	gökük göz çukuru	-	-	-	-	-	-	-
Diğer	batan güneş n	telekantus	-	-	-	-	-	-	-
<b>Kraniyofasiyal</b>				dismorfik yüz		dismorfik yüz			
<b>Kafa Büyüklüğü</b>	n/a	50,5 (75-90p)	56,5 (>97p)	38,5 (<3p)	n/a	n/a	47,7 (10-25p)	n/a	n/a
Normosefali	n/a	+	-	-	n/a	n/a	+	n/a	n/a
Mikrosefali	n/a	-	-	+	n/a	n/a	-	-	+
Makrosefali	n/a	-	+	-	n/a	n/a	-	-	-
Baş Çevresi (cm)	n/a	50,5 (75-90p)	56,5 (>97p)	38,5 (<3p)	n/a	n/a	47,7 (10-25p)	n/a	n/a
<b>Kafa Şekli</b>									
Skafosefali	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Plajiosefali	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Trigonosefali	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Brakisefali	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Oksisefali (koni şeklinde kafa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Turrisefali (Kulekafa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yonca yaprağı kafa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Fasiyal Bulgular</b>									
Düz Yüz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frontal çıkıntı	+	-	-	-	+	+	-	+	+
Geniş anterior fontanella	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Hidrocefali	?	-	-	-	-	-	-	-	-
Orta Yüz Hipoplazisi	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Displastik Kulak	-	-	-	bilateral düşük ve kü	-	-	-	-	-
Stenotik dış kulak	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanallar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Armut şekilli burun	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Düşük burun köprüsü	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Damak abnormalitesi	-	-	-	mikrognathi	-	-	-	-	-
<b>Ekstremiteler</b>									
Çoklu eklem kontraktürleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Radyohumeral sinostozis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Femoral kontraktürleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Femoral eğrilik	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sindaktili	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geniş parmaklar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kamptodaktili	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rocker bottom feet	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boy kısalığı	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Diğer Bulgular</b>	kutis marmor	baş-boyun hiperemik, Pitriazis alba	of hiperemik, prema	konjenital hipotiroidi					
İşitme Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kalp defekti	-	-	sekundum ASD, PFO	geniş asd	-	-	-	-	-
Genital anomali	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CNS yapı abnormalitesi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nöbet	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelişme geriliği	-	-	-	mental gg +	-	-	-	-	-
Erken ölüm	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cinsiyet</b>	E	K	E	K	E	E	E	K	E
<b>Boy</b>	n/a	101 (75-90p)	114 cm (75-90 p)	74 cm (3p)	n/a	n/a	91,5 (90p)	n/a	n/a
<b>Kilo</b>	n/a	15,3 (50-75p)	19 kg (50-75p)	7,4 kg (<3p)	n/a	n/a	12,8 (25-50p)	n/a	n/a
<b>Yaş (yıl)</b>	2,5	3	5	1	2,5	2,5	2,5	3	4
<b>Prenatal dönem İlaç</b>									
<b>Doğum Büyüklüğü (kg)</b>	3,8	3,8	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<b>Sporadik</b>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<b>Ailesel olgu</b>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<b>Anne yaşı (yıl)</b>	n/a	34	25	n/a (madde bağımlı)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<b>Baba yaşı (yıl)</b>	n/a	37	31	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<b>Kromozomal Analiz</b>	46, XY	46, XX	6,XY inv(9) (p11q13)	XY inv(9) (p11q13)	46, XY	46, XY	46, XY	46, XX	46, XY
<b>FGFR2 analizi</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AXIN2 (Ekzon 4)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TCF12 (Ekzon 10)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	c.825+5G>T/+
<b>TCF12 (Ekzon 13)</b>	n/a	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>FREMI (Ekzon 23)</b>	n/a	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>FREMI (Ekzon 26)</b>	n/a	Gln/+; p.Asp1597Asp/p	p.Asp1597Asp/p	p.Ala1595Ala/+;	Gln/+; p.Asp1597A	p.Asp1597A	97Asp/p.Asp1597A	p.Asp1597A	a/p.Ala1595Ala;
<b>FREMI (Ekzon 30)</b>	n/a	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ERF (Ekzon 4)</b>	n/a	-	327Ser/+; p.Ala410;	-	-	-	7Ser/+; p.Ala410;	-	27Ser/+; p.Ala410;
<b>FBNI (Ekzon 9)</b>	n/a	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>FBNI (Ekzon 29)</b>	n/a	-	-	-	3464-5G>A	-	-	-	-
<b>Tanı</b>									c.825+5G>T/+



## 4.2. Genomik DNA Örneklerinin Hazırlanması

Çalışma kapsamına alınan 30 sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgunun, genomik DNA örneklerinin miktarı ve saflığı Nanodrop spektrofotometre ile ölçülmüştür. YND analizine alınan olguların DNA'ları ayrıca QUBIT ile de ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir (Tablo 4.2)

**Tablo 4.2.** DNA dizileme analizi yapılacak olguların genomik DNA miktar, saflık ve dilüsyon değerleri

Hasta No	YND'ye Alınanlar	NanoDrop DNA Ölçümü	Saflık (260/280)	QUBIT DNA Ölçümü	Dilüsyon			Kütüphane Ölçümü	Dilüsyon		
					Toplam	DNA	SU		Toplam	DNA	SU
NC1	+	24,5	1,87	31,2	31,2	5	26,2	1102	1102	10	1092
NC2	+	10,4	2,03	15	15	5	10	998	998	10	988
NC3	+	11,3	2,04	14,8	14,8	5	9,8	986	986	10	976
NC4	+	294,8	1,83	30,8	30,8	5	25,8	1018	1018	10	1008
NC5	+	12,6	1,86	14,7	14,7	5	9,7	1118	1118	10	1108
NC6	+	17,2	2,03	18,9	18,9	5	13,9	910	910	10	900
NC7	+	18	1,97	14,4	14,4	5	9,4	1140	1140	10	1130
NC8	+	26,9	1,92	41,6	41,6	5	36,6	1446	1446	10	1436
NC9	+	84,2	1,81	12,1	12,1	5	7,1	996	996	10	986
NC10	+	49,7	1,94	41,9	41,9	5	36,9	1038	1038	10	1028
NC11	+	19	1,92	17,7	17,7	5	12,7	894	894	10	884
NC12	+	56,3	1,86	36,6	36,6	5	31,6	906	906	10	896
NC13	+	15,3	1,82	29,9	29,9	5	24,9	1100	1100	10	1090
NC14	+	42,4	1,83	37,1	37,1	5	32,1	1104	1104	10	1094
NC15	+	13,2	1,93	11,2	11,2	5	6,2	550	550	10	540
NC16	+	20,6	1,96	31,3	31,3	5	26,3	1516	1516	10	1506
NC17	+	62,3	1,87	49,3	49,3	5	44,3	1372	1372	10	1362
NC18	+	47,7	1,75	49,7	49,7	5	44,7	1190	1190	10	1180
NC19	+	233	1,85	25,3	25,3	5	20,3	758	758	10	748
NC20	+	39,8	1,68	31,7	31,7	5	26,7	1182	1182	10	1172
NC21	+	11,8	1,65	12,8	12,8	5	7,8	1080	1080	10	1070
NC22	-	28,6	1,72	-	-	-	-	-	-	-	-
NC23	-	17,5	1,88	-	-	-	-	-	-	-	-
NC24	-	20,6	1,98	-	-	-	-	-	-	-	-
NC25	-	27,3	1,96	-	-	-	-	-	-	-	-
NC26	-	22,1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
NC27	-	57,4	1,89	-	-	-	-	-	-	-	-
NC28	-	21,9	1,84	-	-	-	-	-	-	-	-
NC29	-	34,9	1,82	-	-	-	-	-	-	-	-
NC30	-	44,6	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-

## 4.3. Yeni Nesil Dizileme Bulguları

### 4.3.1. Çip Analizi

Yapılan yeni nesil dizileme (YND) analizi sonucunda, kullanılan çiplerin doluluk oranları ve yüklenen örneklerin okuma kalite değerleri kontrol edilmiştir. Yapılan bu kontrol sonucunda, YND işleminin başarıyla gerçekleştiği ve örneklerin analiz edilebilir durumda olduğu görülmüştür. Karşılaştırmalı sonuçlar Tablo 4.3'de özetlenmektedir.

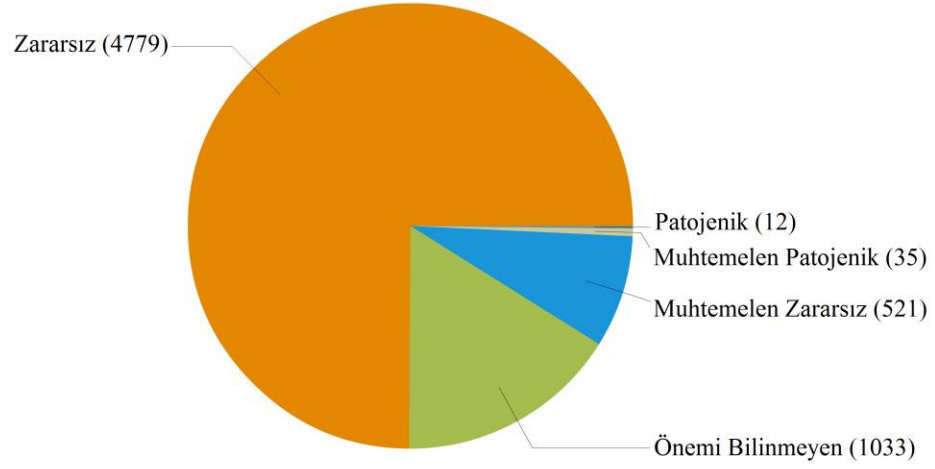
**Tablo 4.3.** YND aşamasında kullanılan iki çipin karşılaştırmalı ön analizi

Özellikler	Çip 1	Çip 2
Çipin doluluğu	85%	89%
Çipin Klonalitesi	74%	73%
Total Okuma Kalitesi	85%	89%
Toplam Okuma Sayısı	80,818,727	87,463,447
Ortalama Baz Uzunluğu (bp)	207	207

#### 4.3.2. YND Analiz Bulguları

Ion S5 Sistemi (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ile yapılan DNA dizileme işlemini takiben, Torrent Suite Software (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) programı kullanılarak; elde edilen genotip GRCh37/hg19 referans genomuna eşleştirilmiş ve varyantlar çağırılmıştır. Varyantların tanımlanması ve filtrelenmesi için The Ingenuity Variant Analysis (QIAGEN, CA, USA) programı kullanılmıştır. İlk olarak kodlanmayan bölgelerde yer alan ve sinonim değişim ile sonuçlanan varyantlar elenmiştir. Daha sonra dbSNP, 1000G ve ExAC gibi popülasyon bazlı veri tabanlarında >1% minor allel frekansına (MAF) sahip olan varyantlar çıkarılmış ve geriye kalan varyantların genotiple olan uyumlulukları değerlendirilmiştir.

21 hastanın bir arada analiz edilmesi sonucunda elde edilen 6380 varyantın genel dağılımı şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** 21 hastanın bir arada analizi sonucunda elde edilen varyantların gruplara göre dağılımı

Çalışmamız kapsamında genotiplenen 21 olguda; filtreleme analizleri sonucunda tespit edilen varyantların buldukları genler, lokalizasyonları, meydana gelen nükleotid değişimleri, genomdaki bölgeleri, protein varyantları ve çeşitli popülasyon veri tabanlarındaki karşılaştırma durumlarını içeren bilgiler Tablo 4.4 – Tablo 4.24’de listelenmiştir.

**Tablo 4.4.** NC01 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
2	73679163	TGTCATTCTTATGAGCAGG		ALMS1	Ekzonik	Delesyon	p.N1845_I1889del	çerçevede				
3	39176660	C	T	TTC21A	Ekzonik	SNV	p.A939V; p.A987V	yanlış anlamlı	79015599	0.220	0.805	0.739
5	37108520	C	T	C5orf42	Ekzonik	SNV	p.G3098R	yanlış anlamlı	144081297	0.020	0.094	0.086
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçevede	398123604			
7	37934146	TA	CT	NME8	Ekzonik	Substitüsyon	p.I493T	çerçevede	386712272			
7	75608844	G	A	POR	Ekzonik	SNV	p.A105T	yanlış anlamlı	375997962		0.003	0.003
13	39263714	T		FREM2	Ekzonik	Deletion	p.T747fs*17	çerçeve kayması	113570727			
13	39424253	CT	GC	FREM2	Ekzonik	Substitution	p.T2153S	çerçevede	35252750			
16	2152387	AC	GG	PKD1	Ekzonik	Substitution	p.F3066L	çerçevede	372874584			
17	10304948	T	A	MYH8	Ekzonik	SNV	p.D948V	yanlış anlamlı	772677984		0.001	0.001
17	72308362	C	T	DNAI2	Ekzonik	SNV	p.P560L; p.P572L	yanlış anlamlı	151241589	0.319	0.231	0.143
21	47754563	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.I56V; p.I174V	yanlış anlamlı	891027114			0.007
21	47808772	G	A	PCNT	Ekzonik	SNV	p.A1194T; p.A1076	yanlış anlamlı				
22	26166900	G	C	MYO18B	Ekzonik	SNV	p.W547C	yanlış anlamlı	111737555		0.011	0.005

**Tablo 4.5.** NC02 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	22175460	C	T	HSPG2	Ekzonik	SNV	p.R2504H; p.R2505H	yanlış anlamlı	62642517	0.240	0.082	0.087
1	110607465	C		ALX3	Ekzonik	Delesyon	p.G113fs*80	çerçeve kayması				
1	110613033	G	C	ALX3	Ekzonik	SNV	p.P68A	yanlış anlamlı	12756321		0.006	0.003
2	27672926	C	T	IFT172	Ekzonik	SNV	p.R1330H	yanlış anlamlı	202236985		0.002	0.003
2	166740365	A	C	TTC21B	Ekzonik	SNV	p.I1208S	yanlış anlamlı	189519760	0.040	0.022	0.014
4	2828992	C	T	SH3BP2	Ekzonik	SNV	p.A183V; p.A212V; p.	yanlış anlamlı	35313240	0.399	0.562	0.515
4	88583745	G	A	DMP1	Ekzonik	SNV	p.R272H; p.R256H	yanlış anlamlı	145237146	0.120	0.182	0.189
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçevede	398123604			
9	94486078	C	T	ROR2	Ekzonik	SNV	p.A900T	yanlış anlamlı	202213533	0.040	0.010	0.009
11	102477377	G	T	MMP20	Ekzonik	SNV	p.T281N	yanlış anlamlı				
11	102477395	A	G	MMP20	Ekzonik	SNV	p.V275A	yanlış anlamlı				
12	76740149	G	A	BBS10	Ekzonik	SNV	p.P539L	yanlış anlamlı	71452272			
13	39430314	C	T	FREM2	Ekzonik	SNV	p.T2326I	yanlış anlamlı	143704990	0.739	0.829	0.718
15	48779301	T	C	FBN1	Ekzonik	SNV	p.H1187R	yanlış anlamlı	2985686		0.001	0.001
16	89350038	G	A	ANKRD11	Ekzonik	SNV	p.A971V	yanlış anlamlı	376970693			
19	46914921	G	A	CCDC8	Ekzonik	SNV	p.H383Y	yanlış anlamlı	145149242	0.938	0.940	0.979

**Tablo 4.6.** NC03 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	220359055	C	T	RAB3GAP2	Ekzonik	SNV	p.R603H	yanlış anlamlı	745677533		0.002	0.002
2	73679163	TGTCATTCTTATGAGCAGG	T	ALMS1	Ekzonik	Deletion	p.N1845_I1889del	çerçevede				
2	166606326	C	T	GALNT3	Ekzonik	SNV	p.V569I	yanlış anlamlı	146521644	0.499	0.680	0.669
2	220420990	C	T	OBSL1	Ekzonik	SNV	p.R1454Q	yanlış anlamlı	183329050	0.479	0.884	0.835
4	2833665	T	C	SH3BP2	Ekzonik	SNV	p.S513P; p.S456P; p	yanlış anlamlı	145949614		0.037	0.036
4	15554883	T	C	CC2D2A	Ekzonik	SNV	p.I814T	yanlış anlamlı	369305472		0.005	0.007
4	79204025	G	T	FRAS1	Ekzonik	SNV	p.A387S	yanlış anlamlı	760917123		0.001	0.002
5	13914743	A	T	DNAH5	Ekzonik	SNV	p.N402K	yanlış anlamlı	140782270	0.140	0.149	0.151
5	176638368	G	A	NSD1	Ekzonik	SNV	p.E990K; p.E721K	yanlış anlamlı	138673583		0.019	0.018
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitution	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
6	109803084	C	T	ZBTB24	Ekzonik	SNV	p.R49Q	yanlış anlamlı	147441359	0.439	0.664	0.654
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitution	p.E34L	çerçevede	398123604			
7	37934146	TA	CT	NME8	Ekzonik	Substitution	p.I493T	çerçevede	386712272			
<b>9</b>	<b>14756374</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>FREM1</b>	<b>Ekzonik</b>	<b>SNV</b>	<b>p.P338L; p.P1802L</b>	<b>yanlış anlamlı</b>	<b>750699682</b>		<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
9	35800823	C	A	NPR2	Ekzonik	SNV	p.P446T	yanlış anlamlı				
12	109962288	G	A	UBE3B	Ekzonik	SNV	p.D850N	yanlış anlamlı	770314364		0.002	0.003
12	133248888	G	C	POLE	Ekzonik	SNV	p.F569L	yanlış anlamlı	147438050			0.001
14	61113224	G	A	SIX1	Ekzonik	SNV	p.P211L	yanlış anlamlı	374638294		0.002	0.004
15	43339451	T	C	UBR1	Ekzonik	SNV	p.I526V	yanlış anlamlı				
17	10535836	G	A	MYH3	Ekzonik	SNV	p.A1638V	yanlış anlamlı				0.001
17	16203290	C	A	PIGL	Ekzonik	SNV	p.L142M	yanlış anlamlı	115958467	0.220	0.498	0.494
17	54671859	G	A	NOG	Ekzonik	SNV	p.G92E	yanlış anlamlı	199566527	0.080	0.190	0.163
18	2922094	G	C	LPIN2	Ekzonik	SNV	p.R760G	yanlış anlamlı				
18	10979655	T	G	PIEZO2	Ekzonik	SNV	p.H55P	yanlış anlamlı	145948919	0.419	0.755	1.116
19	42866695	G	A	MEGF8	Ekzonik	SNV	p.E1935K; p.E2002K	yanlış anlamlı				0.003
20	6759115	A	T	BMP2	Ekzonik	SNV	p.R190S	yanlış anlamlı				0.000
20	9288522	G	A	PLCB4	Ekzonik	SNV	p.A21T	yanlış anlamlı	765989447		0.001	0.000

**Tablo 4.7.** NC04 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	22205601	T	C	HSPG2	Ekzonik	SNV	p.N787S; p.N786S	yanlış anlamlı	143736974	0.180	0.666	0.657
1	24671406	C	A	GRHL3	Ekzonik	SNV	p.P434H; p.P485H; p.P485L	yanlış anlamlı	142369311	0.719	0.773	0.782
2	73679163	CTGTCAATTCCTTATGAGCAGGAC		ALMS1	Ekzonik	Delesyon	p.N1845_I1889del	çerçevede				
2	233345474	C	A	ECEL1	Ekzonik	SNV	p.R702L; p.R700L	yanlış anlamlı	117012322	0.240	0.278	0.263
5	13914743	A	T	DNAH5	Ekzonik	SNV	p.N402K	yanlış anlamlı	140782270	0.140	0.149	0.151
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
6	51920425	G	A	PKHD1	Ekzonik	SNV	p.P599L	yanlış anlamlı	199941159		0.009	0.005
7	295970	T	A	FAM20C	Ekzonik	SNV	p.S410T	yanlış anlamlı	148276213	0.339	0.482	0.557
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçevede	398123604			
7	21847576	C	T	DNAH11	Ekzonik	SNV	p.T3414M	yanlış anlamlı	779964310		0.006	0.003
7	42005564	G	A	GLI3	Ekzonik	SNV	p.A1036V	yanlış anlamlı	774552566		0.007	0.006
9	131403068	G	A	WDR34	Ekzonik	SNV	p.R113W	yanlış anlamlı	199920288		0.014	0.010
11	71155086	T	C	DHCR7	Ekzonik	SNV	p.I92V	yanlış anlamlı				
16	3807376	T	A	CREBBP	Ekzonik	SNV	p.Y1166F; p.Y1204F	yanlış anlamlı	200346970		0.013	0.013
16	84193314	G	T	DNAAF1	Ekzonik	SNV	p.R259I; p.R7I	yanlış anlamlı				
17	39975563	C	A	FKBP10	Ekzonik	SNV	p.P277T	yanlış anlamlı	138089753		0.004	0.005
21	47754488	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.S31G; p.S149G	yanlış anlamlı	111737555		0.011	0.005
22	50659189	TC	CT	TUBGCP6	Ekzonik	Substitüsyon	p.E1200R	çerçevede				
22	50659194	C	A	TUBGCP6	Ekzonik	SNV	p.L1198F	yanlış anlamlı				0.000
22	50659196	A	C	TUBGCP6	Ekzonik	SNV	p.L1198V	yanlış anlamlı	765989447		0.001	0.000

**Tablo 4.8.** NC05 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembölü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
2	73679163	TGTCATTCTTATGAGCAGG		ALMS1	Ekzonik	Delesyon	p.N1845_11889del	çerçevede				
2	110920663	C	T	NPHP1	Ekzonik	SNV	p.G211E; p.G329E; p	yanlış anlamlı	148112800	0.020	0.001	0.000
3	58110119	G	C	FLNB	Ekzonik	SNV	p.G1262A	yanlış anlamlı	111330368	0.240	0.546	0.493
3	145828192	T	C	PLOD2	Ekzonik	SNV	p.K128E	yanlış anlamlı	200569129	0.020	0.067	0.065
4	80905990	CG	GT	ANTXR2	Ekzonik	Substitüsyon	p.A280P; p.A357P	çerçevede	386676514			
5	149755362	G	A	TCOF1	Ekzonik	SNV	p.V518I; p.V595I	yanlış anlamlı	75583421	0.240	0.766	0.755
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
6	57061345	A	C	RAB23	Ekzonik	SNV	p.S101A	yanlış anlamlı	45479896	0.399	0.635	0.620
7	21828869	A	T	DNAH11	Ekzonik	SNV	p.D3312V	yanlış anlamlı	72657389	0.260	0.564	0.345
9	136419629	G	A	ADAMTSL2	Ekzonik	SNV	p.V364I	yanlış anlamlı	35767802			
11	44146484	C	T	EXT2	Ekzonik	SNV	p.R297C; p.R330C	yanlış anlamlı	146098187		0.030	0.028
12	49444178	A	T	KMT2D	Ekzonik	SNV	p.S1065T	yanlış anlamlı	750176209		0.002	0.003
12	88519133	C	T	CEP290	Ekzonik	SNV	p.R360Q	yanlış anlamlı	188164241	0.120	0.302	0.519
12	124172609	A	G	TCTN2	Ekzonik	SNV	p.Q258R; p.Q259R	yanlış anlamlı	151318349	0.020	0.055	0.056
12	133248857	G	T	POLE	Ekzonik	SNV	p.H580N	yanlış anlamlı	371149234		0.013	0.014
13	39451374	G	T	FREM2	Ekzonik	SNV	p.A2889S	yanlış anlamlı				
16	2152387	AC	GG	PKD1	Ekzonik	Substitüsyon	p.F3066L	çerçevede	372874584			
17	56285493	A	C	MKS1	Ekzonik	SNV	p.F380V; p.F370V; p	yanlış anlamlı	774595103		0.002	0.001
22	50659189	TC	CT	TUBGCP6	Ekzonik	Substitüsyon	p.E1200R	çerçevede				
22	50659196		C	TUBGCP6	Ekzonik	İnserisyon	p.L1198fs*23	çerçeve kayması				
22	50659196	A	C	TUBGCP6	Ekzonik	SNV	p.L1198V	yanlış anlamlı	765989447		0.001	0.000

**Tablo 4.9.** NC06 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
2	73679163	CTGTCATTCTTATGAGCAGG		ALMS1	Ekzonik	Delesyon	p.N1845_I1889del	çerçevede				
4	5630290	C	T	EVC2	Ekzonik	SNV	p.E628K; p.E548K	yanlış anlamlı	186197620	0.100	0.104	0.087
4	80905990	CG	GT	ANTXR2	Ekzonik	Substitüsyon	p.A280P; p.A357P	çerçevede	386676514			
4	88929377	C		PKD2	Ekzonik	Delesyon	p.S166fs*67	çerçeve kayması				
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
6	143792536	C	G	PEX3	Ekzonik	SNV	p.P158R	yanlış anlamlı	199781957	0.060	0.026	0.024
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçevede	398123604			
7	37934146	TA	CT	NME8	Ekzonik	Substitüsyon	p.I493T	çerçevede	386712272			
7	92135637	C	T	PEX1	Ekzonik	SNV	p.A609T; p.A401T	yanlış anlamlı				
8	62557164	T	C	ASPH	Ekzonik	SNV	p.E187G; p.E159G; p.E	yanlış anlamlı	117730298	0.300	0.812	0.808
<b>9</b>	<b>14776167</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>FREM1</b>	<b>Ekzonik</b>	<b>SNV</b>	<b>p.G1493R; p.G29R</b>	<b>yanlış anlamlı</b>	<b>536683402</b>			
10	70776025	G	C	KIF1BP	Ekzonik	SNV	p.L573F	yanlış anlamlı				
13	32910582	A	T	BRCA2	Ekzonik	SNV	p.K697I	yanlış anlamlı				
13	39265585	G	T	FREM2	Ekzonik	SNV	p.M1368I	yanlış anlamlı				
16	2152387	AC	GG	PKD1	Ekzonik	Substitüsyon	p.F3066L	çerçevede	372874584			
17	59482061	C		TBX2	Ekzonik	Delesyon	p.A330fs*38	çerçeve kayması				
17	71196786	C	G	COG1	Ekzonik	SNV	p.D384E	yanlış anlamlı	777144980		0.001	0.001
17	71197450	G	A	COG1	Ekzonik	SNV	p.R495Q	yanlış anlamlı	149030357		0.004	0.005
20	9438077	G	A	PLCB4	Ekzonik	SNV	p.E993K; p.E1005K	yanlış anlamlı	199973230		0.009	0.008
20	10629267	C	T	JAG1	Ekzonik	SNV	p.G500D	yanlış anlamlı				
21	47754488	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.S31G; p.S149G	yanlış anlamlı	111737555		0.011	0.005
22	20784797	A	G	SCARF2	Ekzonik	SNV	p.F374S	yanlış anlamlı	577707701	0.020	0.012	0.007
22	26159253	T	C	MYO18B	Ekzonik	SNV	p.V32A	yanlış anlamlı	200574321	0.060	0.025	0.033
22	26176101	G	A	MYO18B	Ekzonik	SNV	p.R716Q	yanlış anlamlı	201070289	0.060	0.046	0.045



**Tablo 4.10.** NC07 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	120459251	G	T	NOTCH2	Ekzonik	SNV	p.H2032N	yanlış anlamlı	143236410	0.020	0.098	0.103
1	231411199	C	T	GNPAT	Ekzonik	SNV	p.A570V; p.A631V	yanlış anlamlı	142487190	0.020	0.052	0.045
2	20192876	C	T	MATN3	Ekzonik	SNV	p.R486H	yanlış anlamlı	745976322		0.002	0.003
3	189604185	C	G	TP63	Ekzonik	SNV	p.T449S; p.T447S; p.T357	yanlış anlamlı	747305746		0.007	0.007
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
8	90993017	T	C	NBN	Ekzonik	SNV	p.N60S; p.N142S	yanlış anlamlı	769414		0.013	0.017
9	136419629	G	A	ADAMTSL2	Ekzonik	SNV	p.V364I	yanlış anlamlı	35767802			
10	50740647	G	A	ERCC6	Ekzonik	SNV	p.R122C	yanlış anlamlı				0.001
10	89487046	G	A	PAPSS2	Ekzonik	SNV	p.V296M; p.V291M	yanlış anlamlı	45467596	0.639	0.790	0.799
11	103086535	C	A	DYNC2H1	Ekzonik	SNV	p.T2927K	yanlış anlamlı				
11	103107198	A	G	DYNC2H1	Ekzonik	SNV	p.Q3250R	yanlış anlamlı	140830294	0.240	0.295	0.263
12	85674230	G	T	ALX1	Ekzonik	SNV	p.R64L	yanlış anlamlı	115596276	0.160	0.439	0.428
12	88512301	C	T	CEP290	Ekzonik	SNV	p.R557H	yanlış anlamlı	184018899	0.060	0.064	0.043
13	39265512	G	A	FREM2	Ekzonik	SNV	p.R1344H	yanlış anlamlı	143044921	0.200	0.371	0.368
<b>15</b>	<b>48818413</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>FBN1</b>	<b>Ekzonik</b>	<b>SNV</b>	<b>p.G301V</b>	<b>yanlış anlamlı</b>	<b>142888621</b>	<b>0.020</b>	<b>0.016</b>	<b>0.019</b>
16	3779115	T	C	CREBBP	Ekzonik	SNV	p.N1940S; p.N1978S	yanlış anlamlı	112906840	0.220	0.883	0.491
16	84209590	G	A	DNAAF1	Ekzonik	SNV	p.D348N; p.D584N	yanlış anlamlı	142345677	0.240	0.215	0.224
16	89347441	G	A	ANKRD11	Ekzonik	SNV	p.P1837S	yanlış anlamlı	145906515	0.200	0.405	0.418
18	10759519	G	A	PIEZO2	Ekzonik	SNV	p.P1215S	yanlış anlamlı				
21	47754488	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.S31G; p.S149G	yanlış anlamlı	111737555		0.011	0.005
22	50659189	TC	CT	TUBGCP6	Ekzonik	Substitüsyon	p.E1200R	çerçevede				

**Tablo 4.11.** NC08 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	22168801	TG	CA	HSPG2	Ekzonik	Substitüsyon	p.S2995G; p.S2996G	çerçevede				
2	73679163	TGTCATTCTTATGAGCAGG		ALMS1	Ekzonik	Delesyon	p.N1845_I1889del	çerçevede				
2	73828490	G	A	ALMS1	Ekzonik	SNV	p.R4015Q	yanlış anlamlı	768365250		0.001	0.000
4	1806629	C	T	FGFR3	Ekzonik	SNV	p.P449S; p.P451S; p.F	yanlış anlamlı	61735104	0.419	0.327	1.030
5	58270525	G	C	PDE4D	Ekzonik	SNV	p.A663G; p.A677G; p	yanlış anlamlı	575611627	0.020	0.042	0.038
5	122725761	T	C	CEP120	Ekzonik	SNV	p.K345R; p.K371R	yanlış anlamlı	114281792	0.319	0.341	0.355
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
6	51920494	G	A	PKHD1	Ekzonik	SNV	p.T576I	yanlış anlamlı				
6	70944597	C	T	COL9A1	Ekzonik	SNV	p.R477Q; p.R720Q	yanlış anlamlı	192467838	0.040	0.045	0.044
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçevede	398123604			
9	136403493	G	A	ADAMTSL2	Ekzonik	SNV	p.G86R	yanlış anlamlı	771175767		0.007	0.007
10	112724286	C	T	SHOC2	Ekzonik	SNV	p.S57F	yanlış anlamlı	536611911	0.020	0.009	0.009
12	49374329	G		WNT1	Ekzonik	Delesyon	p.G162fs*37	çerçeve kayması				0.000
16	68721547	C	T	CDH3	Ekzonik	SNV	p.T513M; p.T568M	yanlış anlamlı	149493245	0.020	0.015	0.010
20	6758938	A	T	BMP2	Ekzonik	SNV	p.R131S	yanlış anlamlı	140417301	0.020	0.059	0.065
21	47754488	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.S31G; p.S149G	yanlış anlamlı	111737555		0.011	0.005
22	50659520		C	TUBGCP6	Ekzonik	Insertion	p.L1090fs*104	çerçeve kayması				
22	50659520	A	C	TUBGCP6	Ekzonik	SNV	p.L1090V	yanlış anlamlı				

**Tablo 4.12.** NC09 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	21904131	TC	CT	ALPL	Ekzonik	Substitüsyon	p.V445A; p.V467A; p	çerçeve				
1	110607465	C		ALX3	Ekzonik	Delesyon	p.G113fs*80	çerçeve kayması				
2	39213110	G	A	SOS1	Ekzonik	SNV	p.S1286F	yanlış anlamlı	374341202		0.003	0.002
2	88874534	T	C	AK3; LOC10192	ncRNA; Ekzonik	SNV	p.K823E; p.K672E	yanlış anlamlı	374540128		0.003	0.003
2	170068598	C	T	LRP2	Ekzonik	SNV	p.D2054N	yanlış anlamlı	138269726	0.040	0.110	0.098
3	93769677	G	A	ARL13B	Ekzonik; ncRNA	SNV	p.G369E; p.G281E; p	yanlış anlamlı	146264035	0.100	0.146	0.134
4	2828992	C	T	SH3BP2	Ekzonik	SNV	p.A183V; p.A212V; p	yanlış anlamlı	35313240	0.399	0.562	0.515
4	80905990	CG	GT	ANTXR2	Ekzonik	Substitüsyon	p.A280P; p.A357P	çerçeve	386676514			
5	60195519	C	T	ERCC8	Ekzonik	SNV	p.R65K; p.R218K; p.R	yanlış anlamlı	755615008		0.003	0.002
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçeve	61748654			
6	51915066	C	A	PKHD1	Ekzonik	SNV	p.R723L	yanlış anlamlı	150597050	0.260	0.175	0.141
7	2552883	ATGG		LFNG	Ekzonik	Delesyon	p.D55fs*141	çerçeve kayması				
7	2552886		ATGG	LFNG	Ekzonik	Insertion	p.E56fs*2	çerçeve kayması				
9	136419629	G	A	ADAMTSL2	Ekzonik	SNV	p.V364I	yanlış anlamlı	35767802			
11	65307288	G		LTBP3	Ekzonik	Delesyon	p.L1105fs*73; p.L115	çerçeve kayması				
11	103107198	A	G	DYNC2H1	Ekzonik	SNV	p.Q3250R	yanlış anlamlı	140830294	0.240	0.295	0.263
11	119535970	C		NECTIN1	İntronik; Ekzonik	Delesyon	p.R348fs*21	çerçeve kayması				
15	33445948	G	A	FMN1	Ekzonik	SNV	p.R390W	yanlış anlamlı	144328486	0.040	0.056	0.067
<b>15</b>	<b>57524581</b>	<b>AT</b>		<b>TCF12</b>	<b>Ekzonik; İntronik</b>	<b>Delesyon</b>	<b>p.M41fs*5; p.M90fs*</b>	<b>çerçeve kayması</b>				
15	90645514	G	A	IDH2	promoter; 5'UTR; Ekzonik	SNV	p.R37C	yanlış anlamlı				
16	343689	T	C	AXIN1	ncRNA; Ekzonik	SNV	p.H662R	yanlış anlamlı	755869194		0.002	0.002
16	2152387	AC	GG	PKD1	Ekzonik	Substitüsyon	p.F3066L	çerçeve	372874584			
16	2161150	G	A	PKD1	Ekzonik	SNV	p.R1340W	yanlış anlamlı	143690392	0.200	0.245	0.262
17	59482061	C		TBX2	Ekzonik	Delesyon	p.A330fs*38	çerçeve kayması				
17	71196737	A	C	COG1	Ekzonik	SNV	p.N368T	yanlış anlamlı	781144941		0.002	0.001
22	24717510	C	T	L-ADORA2A; S	ncRNA; Ekzonik	SNV	p.L188F	yanlış anlamlı	56168869	0.339	0.723	0.789
22	50659189	TC	CT	TUBGCP6	Ekzonik	Substitüsyon	p.E1200R	çerçeve				

**Tablo 4.13.** NC10 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
2	149227542	G	A	MBD5	Ekzonik	SNV	p.S677N	yanlış anlamlı	114314967	0.120	0.247	0.224
2	169985338	C	T	LRP2	Ekzonik	SNV	p.M4601I	yanlış anlamlı	34564141	0.759	0.759	0.726
2	239975292	A	G	HDAC4	Ekzonik	SNV	p.Y1027H	yanlış anlamlı	747881579		0.001	0.001
4	5578101	G	C	EVC2	Ekzonik	SNV	p.S1046R; p.S966R	yanlış anlamlı	73074138	0.759	0.376	0.378
4	5630442	A	G	EVC2	Ekzonik	SNV	p.M577T; p.M497T	yanlış anlamlı	113869406	0.599	0.226	0.249
4	5747063	G	A	EVC	Ekzonik	SNV	p.D312N	yanlış anlamlı	115275195	0.060	0.215	0.194
5	13944492	G	A	DNAH5	Ekzonik	SNV	p.T19M	yanlış anlamlı	757712771		0.006	0.005
5	112176317	A	G	APC	Ekzonik	SNV	p.R1676G; p.R1658G	yanlış anlamlı	370560998		0.013	0.013
5	112178690	C	A	APC	Ekzonik	SNV	p.P2467T; p.P2449T	yanlış anlamlı	372305287		0.013	0.012
5	127744469	G	A	FBN2	Ekzonik	SNV	p.P326S	yanlış anlamlı	28763954	0.319	0.656	0.650
5	149755341	C		TCOF1	Ekzonik	Deletion	p.P512fs*7; p.P589fs*7	çerçeve kayması				
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitution	p.Q813R; p.Q897R	çerçeve	61748654			
6	51887634	A	G	PKHD1	Ekzonik	SNV	p.V1782A	yanlış anlamlı				
6	51918923	T	C	PKHD1	Ekzonik	SNV	p.K626R	yanlış anlamlı	117122807	0.859	0.303	0.265
6	135787184	C	T	AHI1	Ekzonik	SNV	p.A173T	yanlış anlamlı	146416468	0.200	0.398	0.413
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitution	p.E34L	çerçeve	398123604			
7	21657343	A	G	DNAH11	Ekzonik	SNV	p.Q1401R	yanlış anlamlı	199629774	0.260	0.257	0.214
8	68107785	C	G	CSPP1	Ekzonik	SNV	p.P1208R; p.P863R	yanlış anlamlı	527426163	0.040	0.019	0.018

**Tablo 4.14.** NC11 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	21904131	T	C	ALPL	Ekzonik	SNV	p.V445A; p.V467A; p.V522A	yanlış anlamlı				
2	73828538	G	A	ALMS1	Ekzonik	SNV	p.R4031K	yanlış anlamlı	34879202	0.479	0.851	0.883
2	233349588	G	A	ECEL1	Ekzonik	SNV	p.H328Y	yanlış anlamlı	117596666	0.160		0.223
5	13811775	T	C	DNAH5	Ekzonik	SNV	p.Q2463R	yanlış anlamlı				0.001
5	127622491	T	C	FBN2	Ekzonik	SNV	p.M2311V	yanlış anlamlı	57826072			
6	51483961	T	C	PKHD1	Ekzonik	SNV	p.Q4048R	yanlış anlamlı				
6	132172368	A	C	ENPP1	Ekzonik	SNV	p.K173Q	yanlış anlamlı	200926632			
<b>9</b>	<b>14792834</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>FREM1</b>	<b>Ekzonik</b>	<b>SNV</b>	<b>p.S1296R</b>	<b>yanlış anlamlı</b>	<b>764899314</b>		<b>0.006</b>	<b>0.003</b>
12	31249861	C	G	DDX11	Ekzonik	SNV	p.Q541E; p.Q567E	yanlış anlamlı				
13	39263714	T		FREM2	Ekzonik	Delesyon	p.T747fs*17	çerçeve kayması				
16	53682949	C	T	RPGRIP1L	Ekzonik	SNV	p.R744Q	yanlış anlamlı				
16	72042682	A	C	DHODH	Ekzonik	SNV	p.K7Q	yanlış anlamlı	187380885	0.379	0.359	0.307
19	8669931	G	C	ADAMTS10	Ekzonik	SNV	p.S134T	yanlış anlamlı	34201045			7.091
19	39993560	T	G	DLL3	Ekzonik	SNV	p.F172C	yanlış anlamlı	35313240	0.399	0.562	0.515
22	26304347	G	A	MYO18B	Ekzonik	SNV	p.R1736H; p.R1737H	yanlış anlamlı				
X	2856155	C	T	ARSE	Ekzonik	SNV	p.G449S; p.G379S; p.G424S	yanlış anlamlı	187670434	0.040	0.051	0.053

**Tablo 4.15.** NC12 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	110607465	C		ALX3	Ekzonik	Delesyon	p.G113fs*80	çerçeve kayması				
1	120278017	C	T	PHGDH	Ekzonik	SNV	p.A248V	yanlış anlamlı	201782441	0.040	0.035	0.038
2	73679163	TGTCATTCTTATGAGCAGG		ALMS1	Ekzonik	Delesyon	p.N1845_I1889del	çerçeve				
2	166755204	C	T	TTC21B	Ekzonik	SNV	p.R981H	yanlış anlamlı	142022626	0.040	0.017	0.014
4	4864701	C	T	MSX1	Ekzonik	SNV	p.P248L	yanlış anlamlı				0.003
4	5687098	C	T	EVC2	Ekzonik	SNV	p.R192Q; p.R272Q	yanlış anlamlı	895732435			
4	122782740	G	T	BBS7	Ekzonik	SNV	p.A87E	yanlış anlamlı				
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçeve	61748654			
7	37934146	TA	CT	NME8	Ekzonik	Substitüsyon	p.I493T	çerçeve	386712272			
8	62546254	C	T	ASPH	Ekzonik	SNV	p.E279K; p.E289K; p.E	yanlış anlamlı	182264222	0.020	0.001	0.002
8	67988721	A	G	CSPP1	Ekzonik	SNV	p.K71R	yanlış anlamlı	200158932	0.100	0.093	0.080
12	49425964	G	T	KMT2D	Ekzonik	SNV	p.P4175Q	yanlış anlamlı	200315963		0.048	0.054
<b>15</b>	<b>48782174</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>FBN1</b>	<b>Ekzonik</b>	<b>SNV</b>	<b>p.A986T</b>	<b>yanlış anlamlı</b>	<b>112287730</b>	<b>0.020</b>	<b>0.151</b>	<b>0.126</b>
16	84189298	C	T	DNAAF1	Ekzonik	SNV	p.H229Y	yanlış anlamlı	35496754	0.439	0.209	0.175
17	78184366	C	T	SGSH	Ekzonik	SNV	p.R465Q	yanlış anlamlı				0.004
18	2922094	G	C	LPIN2	Ekzonik	SNV	p.R760G	yanlış anlamlı				
21	43161357	T	C	RIPK4	Ekzonik	SNV	p.M666V	yanlış anlamlı				

**Tablo 4.16.** NC13 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
3	39152345	G	A	TTC21A	Ekzonik	SNV	p.R91Q	yanlış anlamlı	560783750	0.120	0.046	0.034
4	5624670	T	C	EVC2	Ekzonik	SNV	p.T699A; p.T619A	yanlış anlamlı	368922820			
5	13701536	T	C	DNAH5	Ekzonik	SNV	p.I4450V	yanlış anlamlı				0.001
5	13788886	C	A	DNAH5	Ekzonik	SNV	p.L2862F	yanlış anlamlı	118141250	0.319	0.161	0.111
5	13902220	T	C	DNAH5	Ekzonik	SNV	p.T558A	yanlış anlamlı	796450097			
5	149759096	T	C	TCOF1	Ekzonik	SNV	p.V810A; p.V887A	yanlış anlamlı	782189523		0.001	0.001
5	174156168	T	C	MSX2	Ekzonik	SNV	p.M129T	yanlış anlamlı	10734685			0.092
7	21924014	A	G	DNAH11	Ekzonik	SNV	p.M4165V	yanlış anlamlı				
7	37923923	T	C	NME8	Ekzonik	SNV	p.I338T	yanlış anlamlı	150737854	0.719	0.904	0.750
8	145737816	C	T	RECQL4	Ekzonik	SNV	p.R1005Q	yanlış anlamlı	145099978	0.240	0.171	0.171
11	46898771	T	C	LRP4	Ekzonik	SNV	p.I1086V	yanlış anlamlı				
13	95034749	G	A	GPC6	Ekzonik	SNV	p.V412M	yanlış anlamlı	35574298			
15	90177084	G	A	KIF7	Ekzonik	SNV	p.R809W	yanlış anlamlı	59259783; 71592255			42.261
16	72042682	A	C	DHODH	Ekzonik	SNV	p.K7Q	yanlış anlamlı	117287351	0.220	0.063	0.070
18	42643107	G	A	SETBP1	Ekzonik	SNV	p.R1412Q	yanlış anlamlı	566936959	0.040		0.026
19	11687351	C	T	ACP5	Ekzonik	SNV	p.V148M	yanlış anlamlı				

**Tablo 4.17.** NC14 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	156106117	A	C	LMNA	Ekzonik	SNV	p.T424P; p.T312P; p.	yanlış anlamlı				
2	27706794	G	A	IFT172	Ekzonik	SNV	p.T116I	yanlış anlamlı	751230602		0.002	0.002
2	158626933	A	T	ACVR1	Ekzonik	SNV	p.F246Y	yanlış anlamlı	763667205		0.011	0.009
4	2834080	C	T	SH3BP2	Ekzonik	SNV	p.R505W; p.R534W;	yanlış anlamlı	148761331	0.419	0.477	0.438
4	79293958	G	A	FRAS1	Ekzonik	SNV	p.A986T	yanlış anlamlı	111554790	0.100	0.036	0.034
4	88534398	C	T	DSPP	Ekzonik	SNV	p.R354C	yanlış anlamlı	61731011	0.300	0.455	0.424
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçevede	398123604			
7	37934146	TA	CT	NME8	Ekzonik	Substitüsyon	p.I493T	çerçevede	386712272			
7	133160118	C	T	EXOC4	Ekzonik	SNV	p.R407C	yanlış anlamlı	781398971		0.006	0.002
8	119122328	C	G	EXT1	Ekzonik	SNV	p.E320Q	yanlış anlamlı				0.000
10	89503294	C	T	PAPSS2	Ekzonik	SNV	p.R458W; p.R463W	yanlış anlamlı	756961458		0.001	0.002
11	46329436	C	G	CREB3L1	Ekzonik	SNV	p.P134R	yanlış anlamlı	774972826		0.007	0.003
11	63978242	G	A	FERMT3	Ekzonik	SNV	p.R107H	yanlış anlamlı	138704967		0.036	0.038
11	103327069	A		DYNC2H1	Ekzonik	Delesyon	p.K4212fs*11; p.K42	çerçeve kayması				
12	102046556	G	A	MYBPC1	Ekzonik	SNV	p.V543I; p.V499I; p.	yanlış anlamlı				
12	102147154	C	T	GNPTAB	Ekzonik	SNV	p.E1200K	yanlış anlamlı	137853825	0.499	0.355	0.293
14	92959940	G	A	SLC24A4	Ekzonik	SNV	p.V594I; p.V549I; p.	yanlış anlamlı	4900130	0.519	0.837	0.937
15	48782072	T	C	FBN1	Ekzonik	SNV	p.T1020A	yanlış anlamlı	111801777	0.060	0.046	0.047
19	39994735	C	G	DLL3	Ekzonik	SNV	p.P226R	yanlış anlamlı	145191532	0.100	0.077	0.067
<b>19</b>	<b>42753372</b>	<b>CT</b>		<b>ERF</b>	<b>Ekzonik</b>	<b>Delesyon</b>	<b>p.G224fs*9; p.G299</b>	<b>çerçeve kayması</b>	<b>587777007</b>			
21	47786722	C	T	PCNT	Ekzonik	SNV	p.R827C; p.R945C	yanlış anlamlı	147358856	0.040	0.053	0.050
22	50659189	TC	CT	TUBGCP6	Ekzonik	Substitüsyon	p.E1200R	çerçevede				

**Tablo 4.18.** NC15 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
2	233349588	G	A	ECEL1	Ekzonik	SNV	p.H328Y	yanlış anlamlı	77728226	0.419	0.723	0.707
4	88929453	G	A	PKD2	Ekzonik	SNV	p.A190T	yanlış anlamlı				0.003
4	128814964	G	T	PLK4	Ekzonik	SNV	p.E789D; p.E830D; p.E798D	yanlış anlamlı				
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	148998067	0.459	0.834	0.812
7	21856151	G	A	DNAH11	Ekzonik	SNV	p.A3467T	yanlış anlamlı				2.168
12	49433883	G	A	KMT2D	Ekzonik	SNV	p.P2557L	yanlış anlamlı	189888707	0.859	0.849	0.834
13	39424253	CT	GC	FREM2	Ekzonik	Substitüsyon	p.T2153S	çerçevede	35252750			
14	92471371	TCTT		TRIP11	Ekzonik	Delesyon	p.E981fs*22; p.E982fs*22	frameshift				
16	2156459	G	A	PKD1	Ekzonik	SNV	p.R2477C	yanlış anlamlı	376283361	0.100	0.192	0.112
17	17701346	A	G	RAI1	Ekzonik	SNV	p.N1695S	yanlış anlamlı				
19	11687215	G	A	ACP5	Ekzonik	SNV	p.A193V	yanlış anlamlı	756201795		0.002	0.001

**Tablo 4.19.** NC16 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	110607465	C		ALX3	Ekzonik	Delesyon	p.G113fs*80	çerçeve kayması				
2	27693802	G	C	IFT172	Ekzonik	SNV	p.T562S	yanlış anlamlı	61743977	0.280	0.721	0.630
2	39241107	G	A	SOS1	Ekzonik	SNV	p.P655L	yanlış anlamlı	56219475	0.319	0.793	0.762
2	170030537	G	A	LRP2	Ekzonik	SNV	p.R3636W	yanlış anlamlı	747833963		0.011	0.013
2	170093682	C	T	LRP2	Ekzonik	SNV	p.S1541N	yanlış anlamlı				
2	220422698	C	T	OBSL1	Ekzonik	SNV	p.V1213M	yanlış anlamlı	201555617	0.040	0.051	0.046
3	33107024	C	T	GLB1	Ekzonik	SNV	p.W209*; p.W131*; p.W	yanlış anlamlı				
3	129233375	C	T	IFT122	Ekzonik	SNV	p.A894V; p.A1044V; p.	yanlış anlamlı	147341636		0.018	0.018
5	37243166	T	C	C5orf42	Ekzonik	SNV	p.K209R	yanlış anlamlı	770630520		0.023	0.018
5	112173884	C	T	APC	Ekzonik	SNV	p.P865S; p.P847S	yanlış anlamlı	192620988	0.080	0.009	0.008
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçeve	61748654			
6	43020213	G	A	CUL7	Ekzonik	SNV	p.S105F; p.S157F	yanlış anlamlı	755714598		0.003	0.002
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçeve	398123604			
7	37934146	TA	CT	NME8	Ekzonik	Substitüsyon	p.I493T	çerçeve	386712272			
8	144808572	C	T	FAM83H	Ekzonik	SNV	p.R1020Q	yanlış anlamlı	117987215	0.300	0.720	0.603
8	144809158	G	A	FAM83H	Ekzonik	SNV	p.R825W	yanlış anlamlı				0.001
8	145737373	C	T	RECQL4	Ekzonik	SNV	p.G1105D	yanlış anlamlı	36078464	0.359	0.543	0.464
9	136419629	G	A	ADAMTSL2	Ekzonik	SNV	p.V364I	yanlış anlamlı	35767802			
12	31237921	AG		DDX11	Ekzonik	Delesyon	p.N143fs*16; p.N169fs*	çerçeve kayması	749934019		0.003	0.002
12	49431352	T	G	KMT2D	Ekzonik	SNV	p.K3263Q	yanlış anlamlı	770844822		0.004	0.001
12	88480233	C	G	CEP290	Ekzonik	SNV	p.D1413H	yanlış anlamlı	183655276	0.180	0.352	0.214
13	32936770	C	T	BRCA2	Ekzonik	SNV	p.P2639L	yanlış anlamlı	774723315		0.002	0.001
13	39263319	G	A	FREM2	Ekzonik	SNV	p.R613H	yanlış anlamlı	145673360		0.002	0.003
<b>15</b>	<b>57535736</b>	<b>TCACCTC</b>		<b>TCF12</b>	<b>Ekzonik</b>	<b>Delesyon</b>	<b>p.P311fs*26; p.P150fs*</b>	<b>çerçeve kayması</b>				
16	1652418	C	T	IFT140	Ekzonik	SNV	p.V108M	yanlış anlamlı	146128830	0.280	0.693	0.733
16	89351211	G	T	ANKRD11	Ekzonik	SNV	p.S580Y	yanlış anlamlı	558841201	0.080	0.027	0.023
17	59482061	C		TBX2	Ekzonik	Delesyon	p.A330fs*38	çerçeve kayması				
20	61470065	G	A	COL9A3	Ekzonik	SNV	p.A606T	yanlış anlamlı	142792529	0.459	0.938	0.906
21	47754488	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.S31G; p.S149G	yanlış anlamlı	111737555		0.011	0.005
22	50659189	TC	CT	TUBGCP6	Ekzonik	Substitüsyon	p.E1200R	çerçeve				



**Tablo 4.20.** NC17 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	22165337	A	T	HSPG2	Ekzonik	SNV	p.F3377L; p.F3378L	yanlış anlamlı	763509219		0.002	0.002
1	110607465	C		ALX3	Ekzonik	Delesyon	p.G113fs*80	çerçeve kayması				
2	73679163	TGTCATTCTTATGAGCAGG		ALMS1	Ekzonik	Delesyon	p.N1845_I1889del	çerçeve				
2	170028637	C		LRP2	Ekzonik	Delesyon	p.T3718fs*78	çerçeve kayması				
2	240061430	C	T	HDAC4	Ekzonik	SNV	p.V310I	yanlış anlamlı	745380683		0.003	0.009
3	129202469	G	A	IFT122	Ekzonik	SNV	p.G488S; p.G540S; p	yanlış anlamlı	758194778		0.007	0.003
4	5687098	C	T	EVC2	Ekzonik	SNV	p.R192Q; p.R272Q	yanlış anlamlı	895732435			
5	36958270	G	A	NIPBL	Ekzonik	SNV	p.V99I	yanlış anlamlı	779888500		0.003	0.001
6	108370594	C	T	OSTM1	Ekzonik	SNV	p.R271Q	yanlış anlamlı	529443538		0.001	0.001
7	2552886		ATGG	LFNG	Ekzonik	İnseriyon	p.E56fs*2	çerçeve kayması				
9	140126535	T	A	SLC34A3	Ekzonik	SNV	p.S33T	yanlış anlamlı				
11	103114464	A	T	DYNC2H1	Ekzonik	SNV	p.T3295S; p.T3288S	yanlış anlamlı	755279762		0.004	0.002
11	103157038	C	A	DYNC2H1	Ekzonik	SNV	p.R3656S; p.R3649S	yanlış anlamlı	763800155		0.006	0.004
13	39424253	CT	GC	FREM2	Ekzonik	Substitüsyon	p.T2153S	çerçeve	35252750			
<b>17</b>	<b>63537586</b>	<b>AG</b>		<b>AXIN2</b>	<b>Ekzonik</b>	<b>Delesyon</b>	<b>p.L349fs*24</b>	<b>çerçeve kayması</b>				
22	50659189	TC	CT	TUBGCP6	Ekzonik	Substitüsyon	p.E1200R	çerçeve				
22	50659618	G	A	TUBGCP6	Ekzonik	SNV	p.S1057F	yanlış anlamlı	753385673		0.002	0.002

**Tablo 4.21.** NC18 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	21889760	G	A	ALPL	Ekzonik	SNV	p.R152H; p.R75H; p.R97H	yanlış anlamlı	763521960		0.002	0.002
1	162740121	G	A	DDR2	Ekzonik	SNV	p.M441I	yanlış anlamlı	61748654			
2	220421417	C	G	OBSL1	Ekzonik	SNV	p.E1365D	yanlış anlamlı	141298701	0.419	0.630	0.624
2	220431674	C	T	OBSL1	Ekzonik	SNV	p.R671H	yanlış anlamlı				
4	5755542	C	A	EVC	Ekzonik	SNV	p.T449K	yanlış anlamlı	7868941			
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçeve				0.001
7	42005678	G	A	GLI3	Ekzonik	SNV	p.P998L	yanlış anlamlı	10734685			0.092
9	94495608	T	C	ROR2	Ekzonik	SNV	p.T245A	yanlış anlamlı	374980152			
10	50667105	T	C	ERCC6	Ekzonik	SNV	p.Q1413R	yanlış anlamlı	554627987	0.699		0.045
10	50678717	T	C	ERCC6	Ekzonik	SNV	p.M1097V	yanlış anlamlı	201809886	0.020	0.010	0.007
10	101977883	C	T	CHUK	Ekzonik	SNV	p.V268I	yanlış anlamlı				
11	46890165	C	T	LRP4	Ekzonik	SNV	p.R1646Q	yanlış anlamlı				
15	33357262	A	G	FMN1	Ekzonik	SNV	p.L463P; p.L686P	yanlış anlamlı				
15	33446947	A	C	FMN1	Ekzonik	SNV	p.S57A	yanlış anlamlı	5827423; 397774965			99.997
20	9288522	G	A	PLCB4	Ekzonik	SNV	p.A21T	yanlış anlamlı	762094769		0.004	0.003
20	34022196	C	T	GDF5; GDF5OS	Ekzonik	SNV	p.F203L; p.K339K	yanlış anlamlı	72549255	0.399	0.401	0.396
21	47851753	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.Q2792R; p.Q2674R	yanlış anlamlı	36228864; 558152425			40.474
22	20784050	T	A	SCARF2	Ekzonik	SNV	p.T425S	yanlış anlamlı				

**Tablo 4.22.** NC19 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	22159784	G	A	HSPG2	Ekzonik	SNV	p.T3691I; p.T3692I	yanlış anlamlı	149159881	0.100	0.114	0.101
1	110607465	C		ALX3	Ekzonik	Delesyon	p.G113fs*80	çerçeve kayması				
2	73677634	C	T	ALMS1	Ekzonik	SNV	p.P1328L	yanlış anlamlı	764135588		0.001	0.001
2	233350938	G	T	ECEL1	Ekzonik	SNV	p.D142E	yanlış anlamlı	144928688	0.319	0.957	0.806
3	184090724	A	T	THPO	Ekzonik	SNV	p.T213T; p.Y208N; p.T	yanlış anlamlı; synonymo	1042348	0.020	0.055	0.052
5	13914743	A	T	DNAH5	Ekzonik	SNV	p.N402K	yanlış anlamlı	140782270	0.140	0.149	0.151
6	43010858	A	G	CUL7	Ekzonik	SNV	p.I1223T; p.I1139T	yanlış anlamlı	77965460	0.319	0.108	0.099
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçeve	61748654			
6	50807925	G	T	TFAP2B	Ekzonik	SNV	p.A333S	yanlış anlamlı	140210899	0.060	0.029	0.025
6	51918923	T	C	PKHD1	Ekzonik	SNV	p.K626R	yanlış anlamlı	117122807	0.859	0.303	0.265
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçeve	398123604			
8	62430637	G	A	ASPH	Ekzonik	SNV	p.T649I; p.T620I	yanlış anlamlı	774561119		0.001	0.000
11	45935935	G	A	PEX16	Ekzonik	SNV	p.T209I	yanlış anlamlı				0.000
12	85674221	A	G	ALX1	Ekzonik	SNV	p.H61R	yanlış anlamlı	115440539	0.479	0.731	0.735
16	2152387	AC	GG	PKD1	Ekzonik	Substitüsyon	p.F3066L	çerçeve	372874584			
16	89347612	C	T	ANKRD11	Ekzonik	SNV	p.A1780T	yanlış anlamlı	75362060	0.339	0.462	0.486
16	89348938	C	T	ANKRD11	Ekzonik	SNV	p.A1338T	yanlış anlamlı	753576509		0.002	0.002
17	10298626	C	T	MYH8	Ekzonik	SNV	p.V1596I	yanlış anlamlı	61730807	0.020	0.065	0.070
17	59482061	C		TBX2	Ekzonik	Delesyon	p.A330fs*38	çerçeve kayması				
18	2925359	C	T	LPIN2	Ekzonik	SNV	p.E601K	yanlış anlamlı	61735393	0.519	0.790	0.854
19	12768915	T	C	MAN2B1	Ekzonik	SNV	p.N424S; p.N423S	yanlış anlamlı				0.000
21	47754488	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.S31G; p.S149G	yanlış anlamlı	111737555		0.011	0.005

**Tablo 4.23.** NC20 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
2	69420513	G	A	ANTXR1	Ekzonik	SNV	p.R467H	yanlış anlamlı	775313544		0.001	0.001
2	73679163	TCTGTTCATTCTTATGAGCAGGA		ALMS1	Ekzonik	Delesyon	p.N1845_I1889del	çerçevede				
2	73716978	C	T	ALMS1	Ekzonik	SNV	p.A2632V	yanlış anlamlı	1027248513			0.001
3	145806488	T	C	PLOD2	Ekzonik	SNV	p.N297S	yanlış anlamlı				
4	5578101	G	C	EVC2	Ekzonik	SNV	p.S1046R; p.S966R	yanlış anlamlı	73074138	0.759	0.376	0.378
4	5630442	A	G	EVC2	Ekzonik	SNV	p.M577T; p.M497T	yanlış anlamlı	113869406	0.599	0.226	0.249
4	88929377	C		PKD2	Ekzonik	Delesyon	p.S166fs*67	çerçeve kayması				
5	37183115	T	G	C5orf42	Ekzonik	SNV	p.Q1723P	yanlış anlamlı				
6	43012613	C	T	CUL7	Ekzonik	SNV	p.A1017T; p.A1101T	yanlış anlamlı	34916226	0.080	0.046	0.045
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
6	132211530	G	C	ENPP1	Ekzonik	SNV	p.R886T	yanlış anlamlı	8192683	0.300	0.400	0.393
6	135787184	C	T	AH11	Ekzonik	SNV	p.A173T	yanlış anlamlı	146416468	0.200	0.398	0.413
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçevede	398123604			
7	21639624	A	G	DNAH11	Ekzonik	SNV	p.R963G	yanlış anlamlı	185803317	0.020	0.002	0.001
7	21894071	A	C	DNAH11	Ekzonik	SNV	p.K3734Q	yanlış anlamlı	114257197	0.799	0.241	0.248
8	70667845	T	C	SLCO5A1	Ekzonik	SNV	p.M358V	yanlış anlamlı	34036248	0.080	0.139	0.133
9	94486774	T	G	ROR2	Ekzonik	SNV	p.K668Q	yanlış anlamlı				
11	95546226	G	C	CEP57	Ekzonik	SNV	p.Q102H; p.Q111H	yanlış anlamlı	117321017	0.399	0.586	0.584
15	33446971	T	C	FMN1	Ekzonik	SNV	p.N49D	yanlış anlamlı	16965807	0.919	0.091	0.302
15	33447024	C	G	FMN1	Ekzonik	SNV	p.G31A	yanlış anlamlı	5002279	0.919	0.098	0.303
16	84203639	A	T	DNAAF1	Ekzonik	SNV	p.E166V; p.E402V	yanlış anlamlı	144034147	0.040	0.019	0.013
16	88871951	C	T	CDT1	Ekzonik	SNV	p.R198C	yanlış anlamlı	140700251	0.100	0.032	0.031
17	29298435	G	A	RNF135	Ekzonik	SNV	p.R115K	yanlış anlamlı	111902263	0.759	0.202	1.258
17	59560453	C	G	TBX4	Ekzonik	SNV	p.S406C; p.S405C	yanlış anlamlı	140662248	0.100	0.077	0.088
19	11685989	G	A	ACP5	Ekzonik	SNV	p.R272C	yanlış anlamlı	147025508	0.200	0.288	0.308
21	43161357	T	C	RIPK4	Ekzonik	SNV	p.M666V	yanlış anlamlı	189683529	0.100		0.042
21	47836653	C	T	PCNT	Ekzonik	SNV	p.P2156L; p.P2274L	yanlış anlamlı	886056514			

**Tablo 4.24.** NC21 kodlu hastada filtreleme analizi sonucu elde edilen varyant listesi

Kromozom	Pozisyon	Referans Allel	Örnek Allel	Gen Sembolü	Gen Bölgesi	Varyasyon Tipi	Protein Varyantı	Translasyon Etkisi	dbSNP ID	1000 Genom %	ExAC %	gnomAD %
1	120279854	G	A	PHGDH	Ekzonik	SNV	p.V304M	yanlış anlamlı	149175408		0.002	0.005
4	5667334	C	A	EVC2	Ekzonik	SNV	p.A225S; p.A305S	yanlış anlamlı	150367317	0.040	0.056	0.054
4	5667343	A	T	EVC2	Ekzonik	SNV	p.F222I; p.F302I	yanlış anlamlı	138728350	0.040	0.056	0.054
4	80905990	CG	GT	ANTXR2	Ekzonik	Substitüsyon	p.A280P; p.A357P	çerçevede	386676514			
6	43014298	TT	CC	CUL7	Ekzonik	Substitüsyon	p.Q813R; p.Q897R	çerçevede	61748654			
6	86160170	A	G	NT5E	Ekzonik	SNV	p.M105V	yanlış anlamlı	756522878		0.006	0.008
7	193657	G	A	FAM20C	Ekzonik	SNV	p.G153D	yanlış anlamlı	751592577			0.006
7	21582963	GA	TT	DNAH11	Ekzonik	Substitüsyon	p.E34L	çerçevede	398123604			
7	37934146	TA	CT	NME8	Ekzonik	Substitüsyon	p.I493T	çerçevede	386712272			
9	14805066	T	A	FREM1	Ekzonik	SNV	p.Q1120L	yanlış anlamlı	143844459	0.080	0.114	0.103
9	14805094	G	A	FREM1	Ekzonik	SNV	p.H1111Y	yanlış anlamlı	200339767	0.080	0.115	0.102
12	48371412	G	A	COL2A1	Ekzonik	SNV	p.P977S; p.P1046S	yanlış anlamlı				
13	39264381	A	G	FREM2	Ekzonik	SNV	p.N967S	yanlış anlamlı	138726274		0.013	0.011
13	39424253	CT	GC	FREM2	Ekzonik	Substitüsyon	p.T2153S	çerçevede	35252750			
16	2152387	AC	GG	PKD1	Ekzonik	Substitüsyon	p.F3066L	çerçevede	372874584			
16	72055077	C	T	DHODH	Ekzonik	SNV	p.A191V	yanlış anlamlı	371527785		0.018	0.008
16	88901747	C	T	GALNS	Ekzonik	SNV	p.V258I; p.V264I; p.V73I	yanlış anlamlı	779257235		0.008	0.004
17	10544420	T	C	MYH3	Ekzonik	SNV	p.Y716C	yanlış anlamlı				0.000
17	33904939	T	A	PEX12	Ekzonik	SNV	p.R34S	yanlış anlamlı	147530802	0.220	0.574	0.586
17	63554639	G	A	AXIN2	Ekzonik	SNV	p.P34S	yanlış anlamlı	574154714	0.020	0.001	0.000
18	57103282	C	T	CCBE1	Ekzonik	SNV	p.R360Q	yanlış anlamlı	200219373	0.040	0.019	0.014
19	42856489	G	T	MEGF8	Ekzonik	SNV	p.E1010D; p.E1077D	yanlış anlamlı				
19	42872728	G	A	MEGF8	Ekzonik	SNV	p.R2132Q; p.R2065Q	yanlış anlamlı	201140958	0.100	0.076	0.038
20	9424868	C	A	PLCB4	Ekzonik	SNV	p.S941Y; p.S953Y	yanlış anlamlı	148347249	0.260	0.362	0.322
21	47754488	A	G	PCNT	Ekzonik	SNV	p.S31G; p.S149G	yanlış anlamlı	111737555		0.011	0.005
22	41527475	G	A	EP300	Ekzonik	SNV	p.V456I	yanlış anlamlı	775990510		0.005	0.004
22	50659189	TC	CT	TUBGCP6	Ekzonik	Substitüsyon	p.E1200R	çerçevede				

## YND Analizi Sonucunda Tespit Edilen Olası Patojenik Mutasyonlar

Yapılan filtreleme analizleri sonucunda yedi olguda (%33.4) tespit edilen, kraniyosinostoz fenotipiyle uyumlu olası patolojik varyantlar Tablo 4.25’de, fenotipik etkileriyle birlikte listelenmiştir. Daha önceden rapor edilen ve ilk defa tez çalışmamız kapsamında rapor edilecek olan bu varyantlardan altısı, çeşitli araştırmacılar tarafından kraniyosinostoz ile ilişkisi gösterilmiş üç gende (*FREMI*, *TCF12*, *ERF*) yer almaktadır. Bir olgu da ise, daha önce sadece fare modelleri üzerinden kraniyosinostozu yol açtığı gösterilen *AXIN2* genine ait patolojik bir varyant tespit ederek, *AXIN2* genini ilk defa kraniyosinostozlu bir olguda gösterilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2018).

**Tablo 4.25.** Fenotip ile uyumlu olarak tespit edilen genotipik varyasyonlar

HASTA NO	ETKİLENEEN SÜTÜR	FENOTİP	GEN	NM#	MUTASYON	PhyloP	DURUMU	Referans
NC17	Sagittal	Skafosefali	<i>AXIN2</i>	NM_004655.4	p.L349fs*24	4.479	yeni	Yılmaz ve diğ., 2018
NC14	Unilateral Koronal	Plagiosefali	<i>ERF</i>	NM_006494.3	p.G299fs*9	1.568	rapor edilmiş	Twigg ve diğ., 2013
NC3	Sagittal	Skafosefali	<i>FREMI</i>	NM_144966.5	p.P1802L	3.586	yeni	-
NC6	Metopik	Trigonosefali	<i>FREMI</i>	NM_144966.5	p.G1493R	5.937	yeni	-
NC11	Sagittal	Skafosefali	<i>FREMI</i>	NM_144966.5	p.S1296R	5.846	rapor edilmiş	ExAC’te 4 kez
NC9	Bilateral Koronal	Brakisefali	<i>TCF12</i>	NM_207036.1	p.M260fs*5	3.192	rapor edilmiş	Sharma ve diğ., 2013
NC16	Bilateral Koronal	Brakisefali	<i>TCF12</i>	NM_207036.1	p.P369fs*26	6.166	yeni	-

## 4.4. Sanger Dizi Analizi ile Varyantların Validasyonu

YND analizi sonucunda tespit edilen varyasyonlar hem olgularda hem de olguların ulaşılabilen aile bireylerinde Sanger dizileme ile teyit edilmiştir. Bu aşamada primerler Primer3 programı kullanılarak araştırmacı tarafından tasarlanmış ve UCSC Genome Browser’ın In Silico PCR aracı kullanılarak, primerlerin doğru bölgeyi tanıyıp tanımadığı doğrulanmıştır. Sanger dizilemede kullanılan primerlere ait bilgiler Tablo 4.26’da belirtilmiştir.

**Tablo 4.26.** Sanger dizilemede kullanılan primerler ve Tm Sıcaklıkları

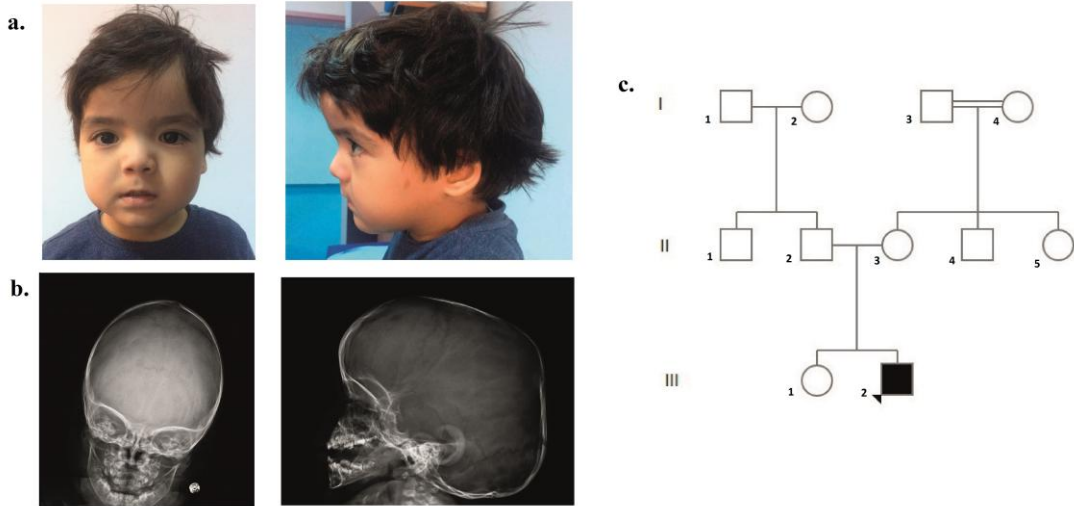
GEN	EKZON	İLERİ YÖNLÜ (F) PRİMER	GERİ YÖNLÜ (R) PRİMER	Tm	Mg (25mM)
<i>TCF12</i>	10	5'-CTAGGTTGGAAAAGGGAGGA-3'	5'-AGTGAGGACAAAGTGTGCTG-3'	58°C	1.4 mM
<i>TCF12</i>	13	5'-CTCCATGTGAACGGATTGT-3'	5'-ATGAAITCAAGAGGAAGGCTCT-3'	58°C	2 mM
<i>AXIN2</i>	4	5'-CTATACCTCTCCCAATCCAC-3'	5'-CTGGAGACATGTGACACTCCT-3'	57.5°C	1.7 mM
<i>ERF</i>	4	5'-GTCTTCTCATCCTCATCACTG-3'	5'-TGGTGTCTTCCGAGTCTATCC-3'	59°C	1.4 mM
<i>FREMI</i>	23	5'-GTTGAATTTACCCATGTTGAC-3'	5'-GCCTAATTACCTCTTCCACA-3'	58°C	1.4 mM
<i>FREMI</i>	26	5'-TTCACATCTCTGGCAAATGA-3'	5'-GATCTGCCCTTGATTTTCA-3'	57.7°C	1.4 mM
<i>FREMI</i>	30	5'-CCTCAAATCCAACACCTCTC-3'	5'-CTGGATCCCAAATGGCTTAT-3'	58.5°C	1.4 mM
<i>FBN1</i>	9	5'-TGTTCTTAAAGAGGGCAGTCA-3'	5'-CTGTGTGAAAGAAGCAGCAT-3'	58.7°C	1.4 mM
<i>FBN1</i>	29	5'-GATGAGATCCAAGATCGTGAG-3'	5'-CCCACCTTTAACATGGTCATT-3'	57.9 °C	1.4 mM

## 4.5. Genotip-Fenotip Korelasyon Bulguları

### 4.5.1. AXIN2 Gen Mutasyonunun Genotip-Fenotip Korelasyonu

Çalışmamız kapsamında, sagittal sinostozu olan bir olguda, ilk defa *AXIN2* (NM\_004655.4) gen mutasyonu tespit edilmiştir. Daha önce fare modelleriyle kraniyosinostozu olan etkisi gösterilmiş bu gende bulduğumuz patolojik çerçeve kayması mutasyonu, literatürde ilk defa bir insanda kraniyosinostoz nedeni olarak tespit edilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2018).

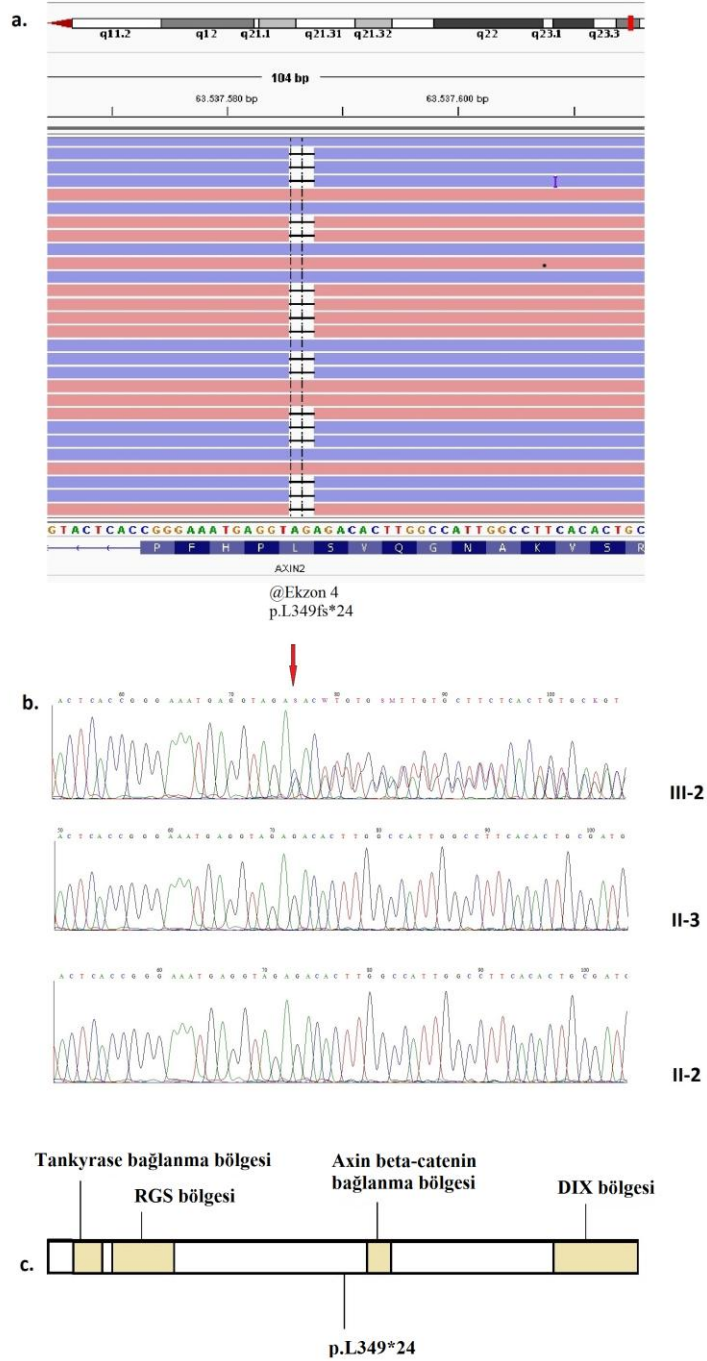
Yapılan kapsamlı klinik incelemeler sonucunda (Tablo 4.1) skafosefalisi ile uyumlu olarak makrosefalik olan (55.9 cm; >97 percentile) olguda; frontal çıkıntı, yüksek anterior saç hattı, düşük burun köprüsü, bilateral epikantus ve düşük yerleşimli kulak bulgusu gözlenmiştir. Kraniyosinostoz ile ilişkili olabilecek sindaktili, geniş parmaklar, gelişme geriliği ve damak abnormalitesi gibi bulgular olguda izlenmemiştir. Olgunun fenotipik ve radyolojik görüntüleri ile pedigrisi Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. NC17 kodlu olgunun a. fenotipi, b. radyolojik bulgusu, c. pedigrisi

Filtreleme analizleri sonucunda tespit edilen p.L349fs\*24 (c.1045\_1046delCT) mutasyonu, hem olguda hem de ebeveynlerinde Sanger dizileme ile analiz edilmiş ve mutasyonun *de novo* olduğu belirlenmiştir. YND analizi sonucunda tespit edilen

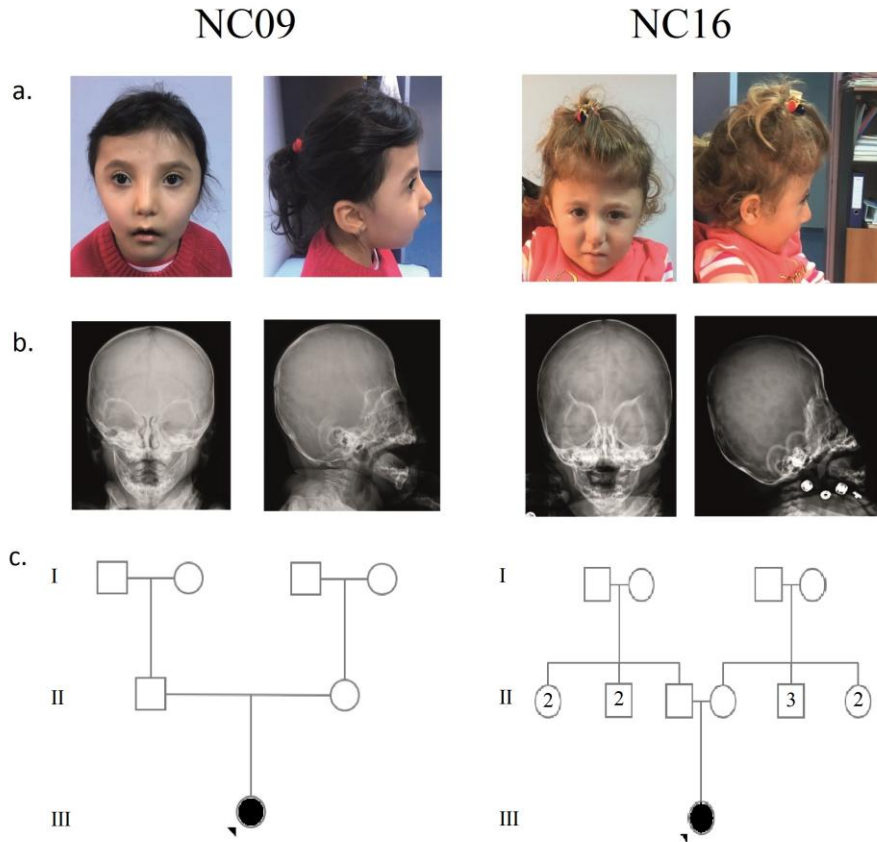
p.L349fs\*24 mutasyonunun IGV görüntüsü, Sanger dizi analizi sonuçları ve mutasyonun gen üzerindeki yerleşimi Şekil 4.3’de yer almaktadır.



Şekil 4.3. Sanger dizileme ile NC16 kodlu olgunun (III), annesinin (II) ve babasının (I) karşılaştırmalı sekans sonuçları

#### 4.5.2. *TCF12* Gen Mutasyonlarının Genotip-Fenotip Korelasyonu

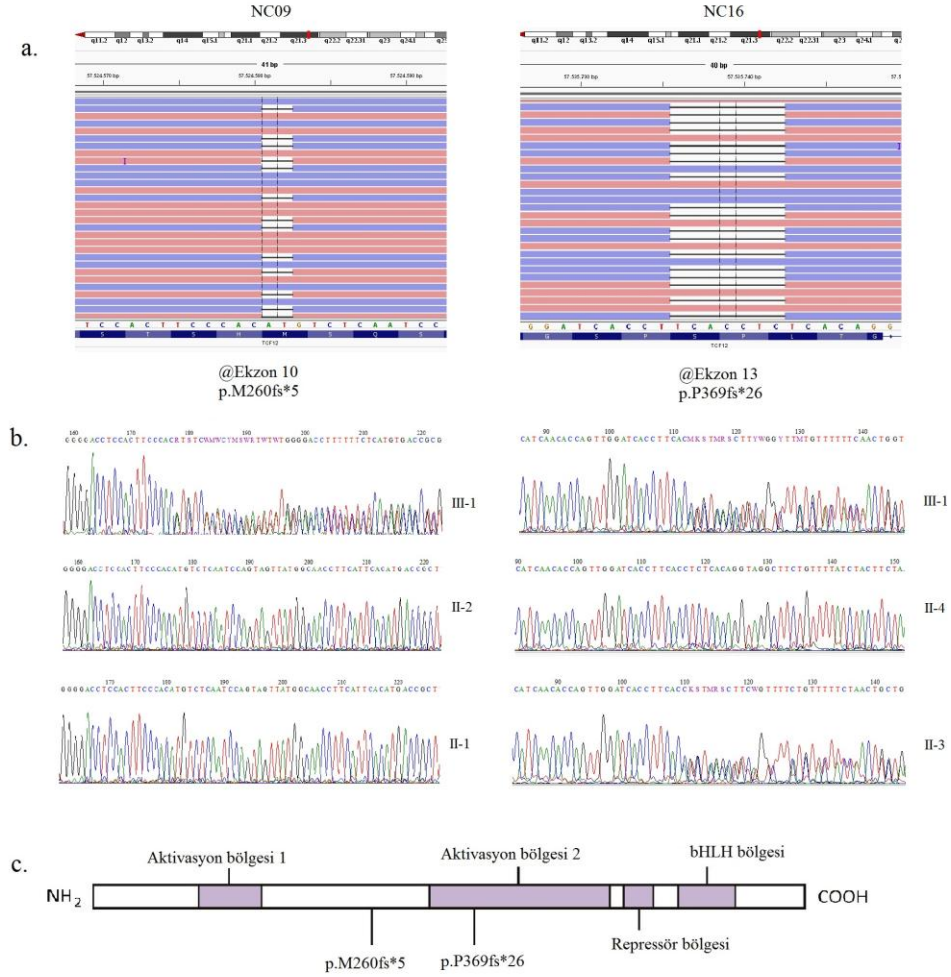
Çalışmamız kapsamında, bilateral koronal sinoztozu olan iki olguda farklı *TCF12* (NM\_207036.1) mutasyonları tespit edilmiş ve olgular tekrar kapsamlı klinik değerlendirmeye alınmıştır. İki olgunun da ortak olarak brakisefalik kafa şekline, düz yüze, frontal çıkıntıya, orta yüz hipoplazisine ve düşük burun köprüsüne sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.1; Şekil 4.4). Tanı aldıktan sonra kalvaryal şekillendirme operasyonu geçiren 3,5 yaşındaki NC09 kodlu olgunun baş çevresi 75-90 persentil ile normosefalik olarak değerlendirilirken, operasyon geçirmemiş olan 2,5 yaşındaki NC16 kodlu olgunun baş çevresi 25-50 persentil ile mikrosefalik olarak kaydedilmiştir. NC09 kodlu olgudan farklı olarak, NC16 kodlu olgumuzun ayrıca gizli yarık damağa ve ellerde de bilateral palmar crease'e sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. NC09 ve NC16 kodlu olguların a. fenotipleri, b.radyolojik bulguları, c. pedigrisi



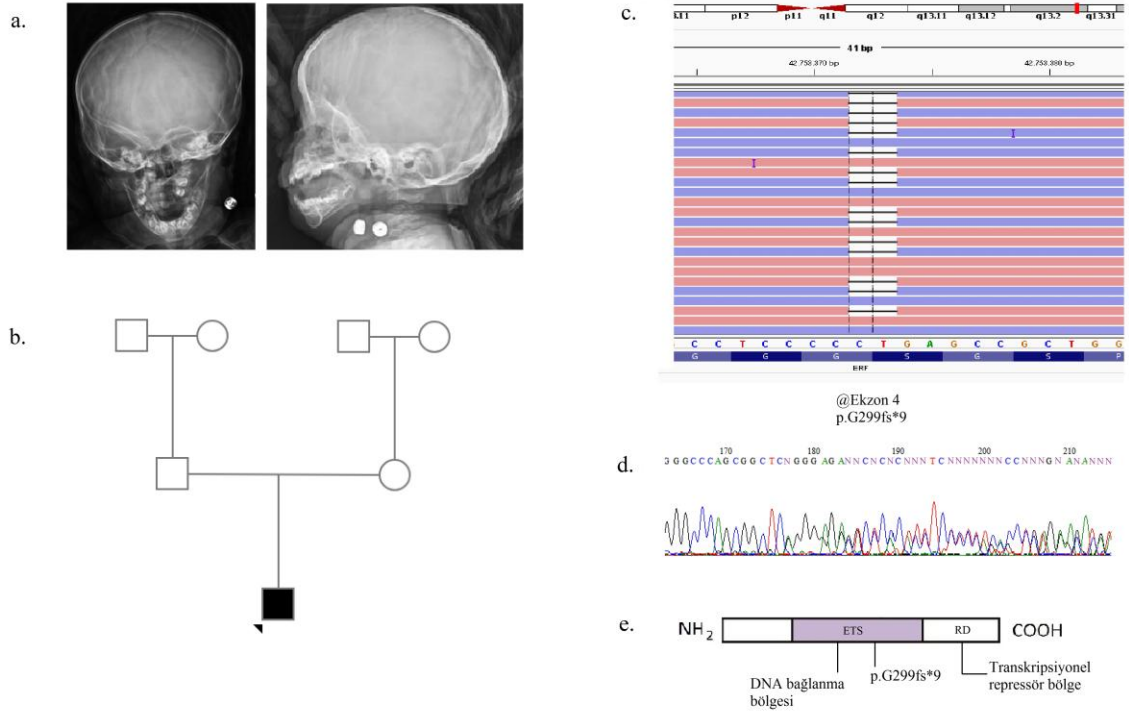
YND analizinden elde edilen verinin filtrelenmesi sonucunda, NC09 kodlu olguda daha önce rapor edilmiş patojenik p.M260fs\*5 (c.778\_779delAT) mutasyonu ve NC16 kodlu olguda ise yeni p.P369fs\*26 (c.1102\_1108delTCACCTC) patojenik varyasyonu tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Hem mutasyonların doğrulanması hem de mutasyonun ailesel segregasyonunu belirlemek amacıyla Sanger dizileme yapılmıştır. Yapılan dizileme ve doğrulama (konfirmasyon) analizinin sonucunda, NC09 kodlu olguda belirlenen p.M260fs\*5 mutasyonunun *de novo* olduğu, NC16 kodlu olguda belirlenen p.P369fs\*26 mutasyonunun ise paternal kalıtım gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5). Yapılan fiziki muayene sonucunda, NC16 kodlu olgunun babasının da dismorfik yüz ve brakisefali ile uyumlu kafa şekline sahip olduğu gözlenmiş ve novel p.P369fs\*26 patojenik varyasyonunun ailesel olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.5.** NC09 ve NC16 kodlu olguların a. IGV görüntüleri, b.Sanger dizileme analizi, c. Mutasyonların gen üzerindeki yerleşimi

### 4.5.3. *ERF* Gen Mutasyonunun Genotip-Fenotip Korelasyonu

YND analizine aldığımız NC14 kodlu olgumuzda, yapılan filtreleme analizi sonucunda, *ERF* geninde (NM\_006494.3) daha önceden rapor edilmiş olan p.G299fs\*9 (c.891\_892delAG) patolojik mutasyonu saptanmıştır. Opere olan olgunun klinik dosyası incelendiğinde; olgunun unilateral (sağ) koronal sinostoza, kapalı fontanellere, sol frontal kemik displazisine, düşük sol göze ve basık burun köküne sahip olduğu görülmüştür. Olgunun Antalya dışında yaşaması ve aileye ulaşılamamasından dolayı, kapsamlı klinik incelemeye alınamamıştır. Olgunun kraniyal radyolojik görüntüsü ile mutasyonun IGV görüntüsü, Sanger dizileme ile doğrulanması ve mutasyonun gen üzerindeki konumu Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. NC14 kodlu olgunun a. radyolojik görüntüsü, b. Pedigri, c. IGV görüntüsü, d.Sanger dizileme analizi, e. Mutasyonun gen üzerindeki yerleşimi

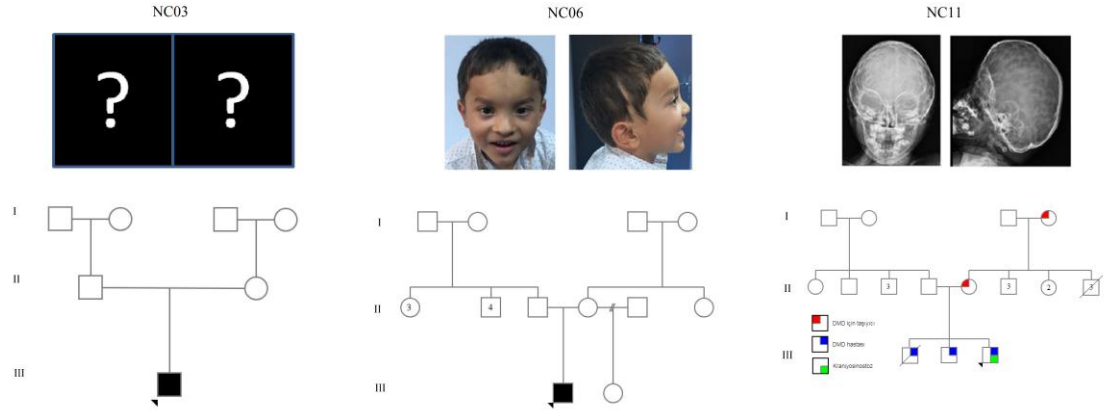
#### 4.5.4. *FREMI* Gen Mutasyonlarının Genotip-Fenotip Korelasyonu

Çalışmamız kapsamında YND analizine alınan üç olguda (Şekil 4.7), daha önce kraniyosinostoz ile ilişkisi gösterilmiş olan *FREMI* geninde (NM\_144966.5) olası patojenik, yanlış anlamlı mutasyonlar tespit edilmiştir. *FREMI* geninde p.P1802L, c.5405C>T varyasyonu tespit edilen NC03 kodlu olgumuz, ailenin Antalya dışında yaşaması nedeniyle hasta kayıt dosyası incelenerek klinik değerlendirmeye alınabilmiştir. NC03 kodlu olgunun skafosefalisi olduğu, anterior fontanelinin erken kapandığı ve dolikosefalik (skafosefalik) yüz görünümüne sahip olduğu bilgisine ulaşılmıştır.

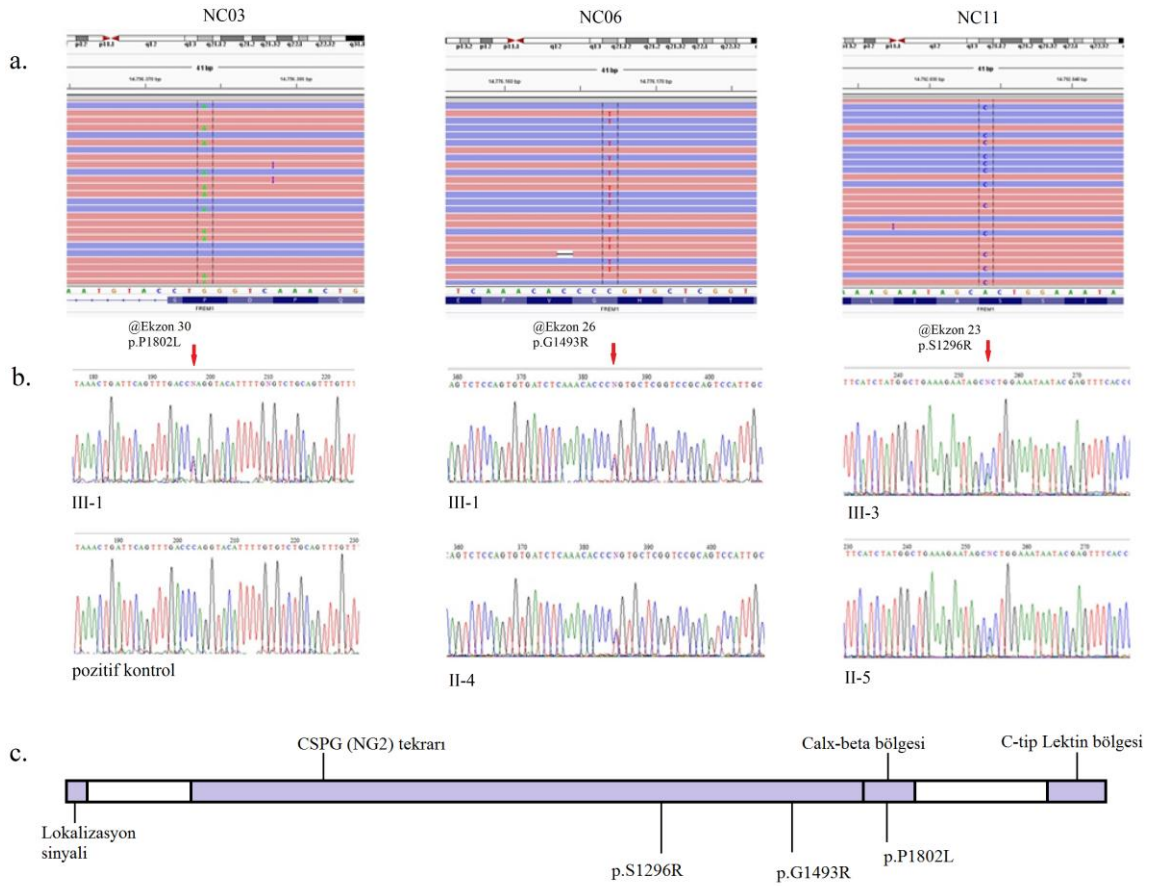
Fenotiple uyumlu olabilecek varyasyon tespit edilen olgulardan NC06 kodlu olgumuz ise kapsamlı klinik değerlendirmeye alınabilmiştir. Metopik sinostoz tanısı konan NC06 kodlu olgumuzda ayrıca frontal çıkıntı, hipertelorizm, displastik kulak, düşük burun köprüsü ve klinodaktili gözlenmiştir (Tablo 4.1).

*FREMI* geninde fenotiple uyumlu olabilecek p.S1296R (c.3888T>G) varyasyonu tespit edilen bir diğer olgumuz ise NC11 kodlu olgumuzdur. Skafosefalik olduğu kraniyal grafisinden tespit edilen olgunun ailesi, hastanemizin Pediatrik Genetik bilim dalı tarafından kapsamlı klinik değerlendirme için tekrar çağırılmış fakat aile gelmemiştir. NC11 kodlu olgunun klinik takip dosyası incelendiğinde olguda; frontal çıkıntı, proptosis, minimal pseudohipertorifi olduğu ve olgunun Düchen Kas Distrofisi (DMD) için takipli olduğu görülmüştür.

Sanger dizileme ile hem varyantların validasyonları hem de ulaşılabilen ebeveynlerin DNA'ları analiz edilerek, kalıtım paterni belirlenmiştir (Şekil 4.8). NC06 kodlu olgunun ebeveynlerinden alınan DNA örnekleri analiz edildiğinde, *FREMI* geninin 26. ekzonunda tespit edilen p.G1493R (c.4477G>A) varyasyonunun, olgunun annesinden kalıtıldığı belirlenmiştir. NC11 kodlu olgunun annesinin daha önceden çalışma için onay verdiği DNA'sı Sanger dizileme ile p.S1296R (c.3888T>G) varyantı için analiz edildiğinde, bu varyasyonun da olgunun annesinden kalıtıldığı bulunmuştur. NC03 kodlu olgunun ebeveynlerinin DNA'sına ulaşamadığı için analiz edilememiştir.



Şekil 4.7. NC03, NC06 ve NC11 kodlu olgular ve pedigrileri



Şekil 4.8. NC03, NC06 ve NC11 kodlu olguların a. IGV görüntüleri, b.Sanger dizi analizleri [olgular (III-1, III-3, III-5), anneler (II-4, II-5)], c. Mutasyonların gen üzerindeki yerleşimi

Olgularda tespit edilen *FREMI* varyasyonlarının, proteine olan etkilerini belirleyebilmek için Mutation Taster, Provean, SIFT ve PolyPhen-2 *in silico* tahmin programları kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda her üç varyant da zarar verici olarak belirlenmiş ve skorlarıyla birlikte Tablo 4.27’de analiz sonuçları belirtilmiştir.

**Tablo 4.27.** *FREMI* geninde tespit edilen varyantların Provean, SIFT ve PolyPhen-2 araçlarından elde edilen *in silico* analizleri

FREMI	Mutation Taster		Provean		SIFT		Polyphen-2	
	Skor	Tahmin	Skor	Tahmin	Skor	Tahmin	Skor	Tahmin
p.P1802L	98	Hastalık Yapıcı	-9.07	Zararlı	0.003	Zarar Verici	0.997	Muhtemelen Zarar Verici
p.G1493R	125	Hastalık Yapıcı	-3.99	Zararlı	0.019	Zarar Verici	1.000	Muhtemelen Zarar Verici
p.S1296R	110	Hastalık Yapıcı	-3.54	Zararlı	0.003	Zarar Verici	0.991	Muhtemelen Zarar Verici

Varyasyon tespit edilen amino asitlerin türler arası korunmuşluğu, Şekil 4.9.’da gösterilmiştir.

p.S1296R													
İnsan	M	G	E	T	R	I	I	S	S	A	I	L	S
Rhesus	M	G	G	T	R	I	I	S	S	A	I	L	S
Fare	V	G	D	T	R	V	L	S	S	A	V	L	S
Köpek	M	G	E	T	R	I	I	S	S	A	V	L	S
Fil	M	G	E	T	R	I	I	S	N	A	V	L	S
Tavuk	M	G	E	T	R	I	I	S	S	A	V	L	S
Xenopus	M	G	E	T	-	-	I	S	S	A	I	L	S

p.G1493R													
İnsan	N	G	L	R	T	E	H	G	V	F	E	I	T
Rhesus	N	G	L	R	T	E	H	G	V	F	E	I	T
Fare	N	G	L	G	T	Q	R	G	V	F	E	I	T
Köpek	N	G	L	G	T	K	R	G	V	F	E	I	T
Fil	N	G	L	R	T	K	H	G	V	F	E	V	T
Tavuk	N	G	L	R	T	K	H	G	T	F	M	I	S
Xenopus	N	G	L	K	T	K	H	G	I	M	N	I	A

p.P1802L													
İnsan	K	L	I	Q	F	D	P	G	g	t	a	c	a
Rhesus	K	L	I	Q	F	D	P	G	g	t	a	c	a
Fare	K	L	L	Q	F	D	P	G	g	t	a	c	g
Köpek	K	L	I	Q	F	D	P	G	g	t	a	c	g
Fil	K	L	I	Q	F	D	P	G	g	t	a	t	g
Tavuk	K	L	I	Q	F	D	P	G	g	t	a	=	=
Xenopus	R	L	I	Q	F	D	P	G	g	t	a	-	t

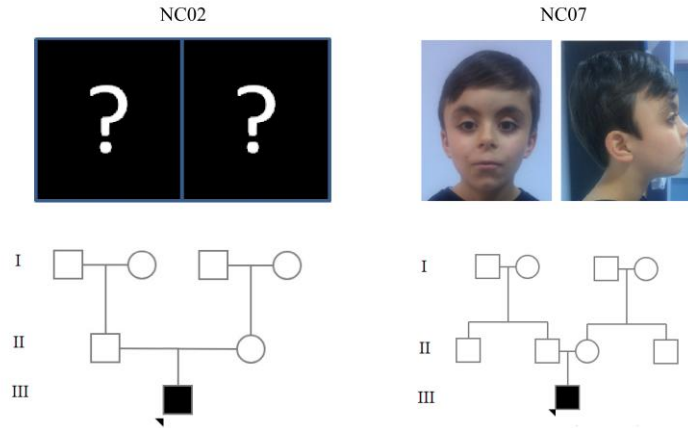
**Şekil 4.9.** *FREMI* geninde varyasyon tespit edilen amino asitlerin türler arası korunmuşluğu (bilgiler UCSC Genome Browser’den alınmıştır)

#### 4.5.5. YND Analizi Sonucunda Saptanan Diğer Varyasyonlar

Bu yedi olgunun haricinde iki olguda, daha önce Marfanoid kraniyosinostoz (OMIM # 182212) ile ilişkilendirilmiş *FBNI* geninde olası patojenik mutasyonlar saptanmıştır. Başka bir olguda ise, kraniyosinostozun da klinik olarak görülebildiği bir olguda rapor edilen Treacher Collins sendromuyla ilişkilendirilmiş *TCOF1* geninde olası patolojik mutasyon tespit edilmiştir.

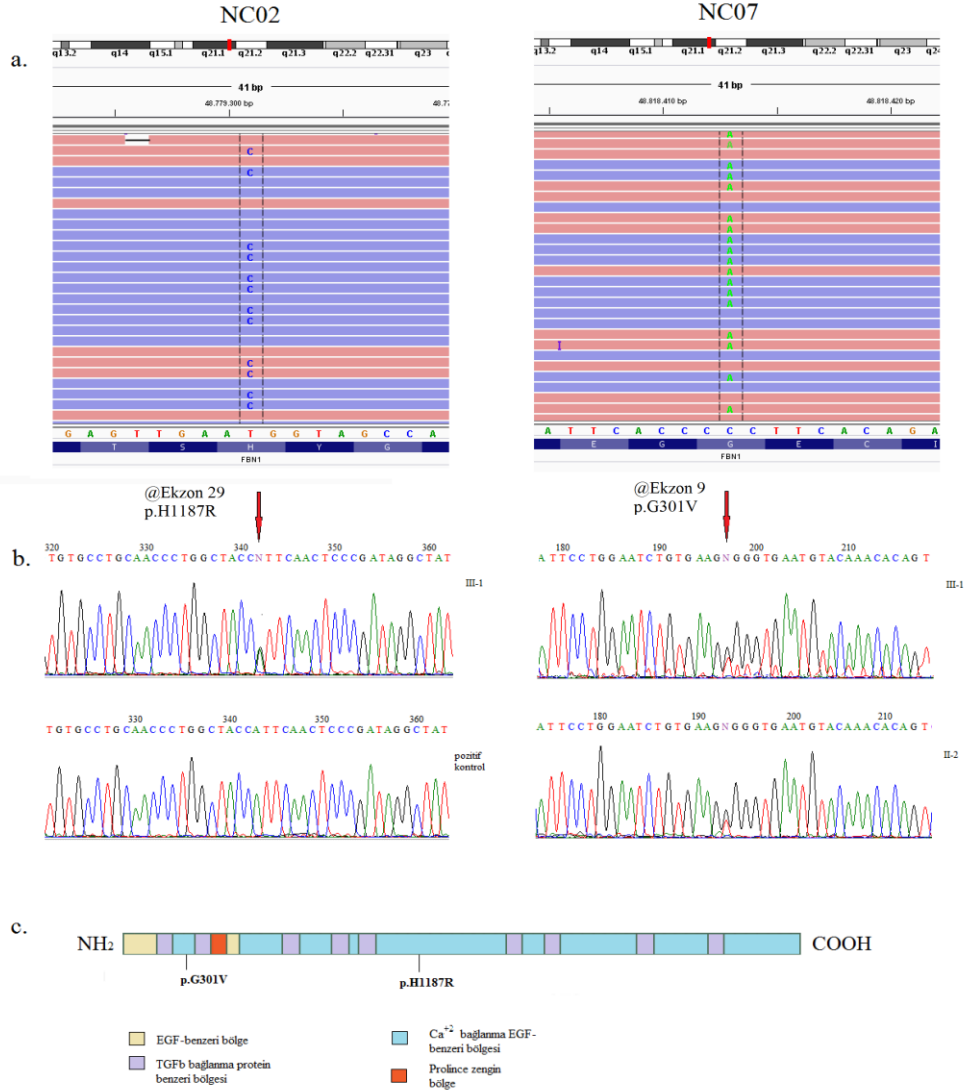
#### *FBNI* Gen Mutasyonlarının Genotip-Fenotip Korelasyonu

DDA paneli kullanılarak yapılan yeni nesil DNA dizileme analizi sonucunda, iki olguda (NC02 ve NC07, şekil 4.10) daha önce Marfanoid kraniyosinostoz ile ilişkilendirilmiş, *FBNI* (NM\_000138.4) geninde olası etken varyantlar (p.H1187R ve p.G301V) belirlenmiştir. NC07 kodlu olgunun hastanemize tekrar çağırılarak detaylı klinik incelemesi yapılabildiği (Tablo 4.1). NC02 kodlu olgunun ise hasta takip dosyası incelenerek klinik değerlendirmesi yapılmıştır. Bu bağlamda, NC02 kodlu olguda metopik sütün sinostozu olduğu, trigonosefali operasyonu geçirdiği ve frontal çıkıntıya sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, mikrosefali olan NC07 kodlu olgunun belirgin metopik sinostozunun yanı sıra brakisefali olduğu da gözlemlenmiştir. Olguda eşlik eden diğer bulgular ise; hafif proptozis, orta yüz hipoplazisi, kapalı geniş anterior fontanella, stenotik dış kulakta helix kıvrımlarında artma, düşük burun köprüsü, geniş ayak başparmakları ve pectus excavatumdur (göğüs kafesi çöküklüğü). Yapılan incelemeler sonucunda her iki olguda da Marfanoid bulgulara rastlanmamıştır.



Şekil 4.10. NC02 ve NC07 kodlu olgular ve pedigrileri

YND sonucu belirlenen varyantların IGV görüntüleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir. NC07 kodlu olguda belirlenen *FBNI* geninin 9. ekzonunda yer alan p.G301V varyasyonunun validasyonu ve aile segregasyonunu belirlemek için Sanger dizileme yapılmıştır. Bu analiz sonucunda, aynı varyantın olgunun babasında da olduğu ve paternal kalıtım paterni gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.11). *FBNI* geninde olası etken değişim saptanan NC02 kodlu olgumuzda p.H1187R amino asit değişimi, Sanger dizileme ile doğrulansa da (Şekil 4.11) olgunun Antalya dışında yaşaması ve ebeveynlerinin DNA’sına ulaşamamasından dolayı varyasyonun kalıtım paterni analiz edilememiştir.



**Şekil 4.11.** NC02 ve NC17 kodlu olgularda tespit edilen varyasyonların a. IGV görüntüsü, b. Sanger validasyonları, c. varyantların gen üzerindeki lokalizasyonu

Olgularda tespit edilen *FBNI* varyasyonlarının, proteine olan etkilerini belirleyebilmek için Provean, SIFT ve PolyPhen-2 *in silico* tahmin programları kullanılmıştır. Mutation taster programıyla yapılan analizler sonucunda hastalık yapıcı olabileceği belirlenen varyasyonların; Provean, SIFT ve PolyPhen-2 araçları kullanılarak yapılan analizler sonucunda zararsız olabileceği belirlenmiş ve skorlarıyla birlikte Tablo 4.28’de analiz sonuçları belirtilmiştir.

**Tablo 4.28.** *FBNI* geninde tespit edilen varyantların Provean, SIFT ve PolyPhen-2 araçlarından elde edilen *in silico* analizleri

FBNI	Mutation Taster		Provean		SIFT		Polyphen-2	
	Skor	Tahmin	Skor	Tahmin	Skor	Tahmin	Skor	Tahmin
p.G301V	109	Hastalık yapıcı	-2.04	Nötral	0.212	Tolere edilebilir	0.043	Zararsız
p.H1187R	29	Hastalık yapıcı	-0.07	Nötral	0.187	Tolere edilebilir	0.017	Zararsız

Ayrıca, varyasyon tespit edilen amino asitlerin türler arası korunmuşluğu da Şekil 4.12.’de gösterilmiştir.

p.G301V													
İnsan	T	I	P	G	I	C	E	G	G	E	C	T	N
Rhesus	T	I	P	G	I	C	D	G	G	E	C	T	N
Fare	T	I	P	G	V	C	D	G	G	E	C	T	N
Köpek	T	I	P	G	I	C	D	G	G	E	C	T	N
Fil	T	I	P	G	I	C	D	G	G	E	C	T	N
Tavuk	T	I	P	G	I	C	D	G	G	E	C	S	N
Xenopus	I	I	P	G	I	C	E	S	G	E	C	A	N

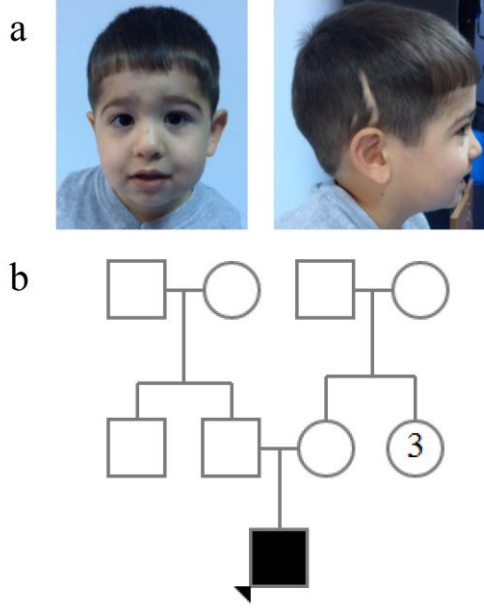
p. H1187R													
İnsan	C	N	P	G	Y	H	S	T	P	D	R	L	F
Rhesus	C	N	P	G	Y	H	S	T	P	D	R	L	F
Fare	C	N	P	G	Y	H	P	T	M	D	R	L	F
Köpek	C	N	P	G	Y	H	S	T	P	D	R	L	F
Fil	C	N	P	G	Y	H	A	T	P	D	R	L	F
Tavuk	C	N	P	G	Y	H	S	T	A	D	K	L	H
Xenopus	C	N	S	G	Y	Q	T	T	P	D	W	K	G

**Şekil 4.12.** *FBNI* geninde varyasyon tespit edilen amino asitlerin türler arası korunmuşluğu (bilgiler UCSC Genome Browser’den alınmıştır)



### ***TCOF1* Gen Mutasyonlarının Genotip-Fenotip Korelasyonu**

YND analizine aldığımız bir diğer olgumuzda (NC10) ise *TCOF1* geninde (NM\_001135243.1) p.P589fs\*7 çerçeve kayması mutasyonu tespit edilmiştir. *TCOF1* geni, daha önce Treacher Collins sendromuyla ilişkilendirilmiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, *TCOF1* geninde mutasyon taşıyan ve kraniyosnostozu da olan Treacher Collins sendromlu bir olgunun rapor edildiği görülmüştür. Yapılan klinik değerlendirme sonucunda, kalvaryal şekillendirme geçiren olgunun trigonosefalik kafa şekline sahip olmasının yanı sıra, epikantusunun olduğu görülmüştür. Ameliyat öncesinde proptozisi olduğu kaydedilen olgunun, klinik değerlendirme sırasında proptozisten artık etkilenmediği belirlenmiştir (Şekil 4.13). Daha önceden çekilmiş olan ekokardiyografisinde ise patent foramen ovaleye sahip olduğu tespit edilmiştir.



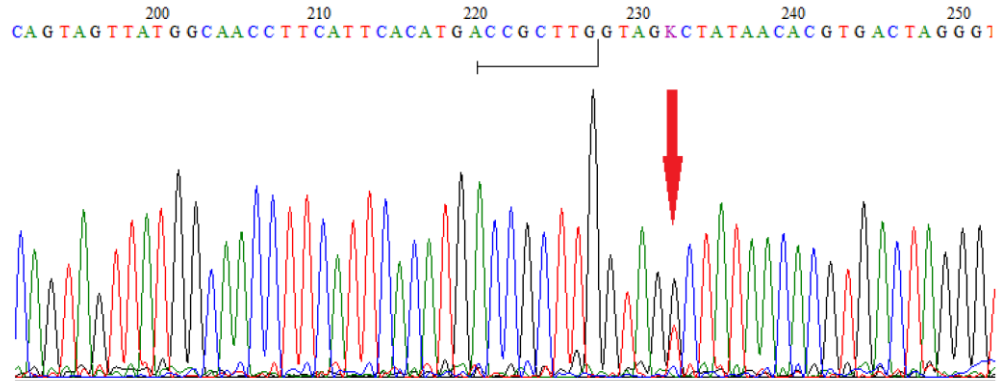
**Şekil 4.13.** NC10 kodlu olgunun a. fenotipi b. Pedigiri

NC10 kodlu olgumuzda Treacher Collins sendromuyla ilişkili herhangi bir bulgu tespit edilememiş ve *TCOF1* genindeki p.P589fs\*7 mutasyonunun tesadüfi bulgu olduğu düşünülerek Sanger dizilemeye alınmamıştır.

#### 4.5.6. Sanger Dizi Analizi ile Diğer 9 Olguda Saptanan Bulgular

Çalışmamız kapsamında, 21 olguluk YND çalışma grubumuz içinde belirlenen olası patolojik mutasyonların bulunduğu ekzonların (Tablo 4.25), diğer dokuz olguda Sanger dizileme ile taranması planlanmıştır. NC22 kodlu olgunun DNA'sı ile sadece *AXIN2* geninin 4. ekzonu ve *TCF12* geninin 10. ekzonu çalışılabilmiş, diğer bölgelerde DNA miktarının yetersizliğinden dolayı sonuç alınamamıştır. Geri kalan sekiz olgunun *AXIN2* (ekzon 4), *TCF12* (ekzon 10 ve 13), *ERF* (ekzon 4), *FREMI* (ekzon 23, 26 ve 30) ve *FBNI* (ekzon 9 ve 29) genlerinin hedef bölgeleri (Tablo 4.25) taranmıştır.

Yapılan Sanger dizileme sonucunda, NC30 kodlu olgunun *TCF12* geninin 10. intronunda c.825+5G>T splays bölge varyasyonu tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Bilindiği gibi splays bölgeler, ekzon-intron sınırlarıdır ve bu bölgelerde meydana gelen DNA değişiklikleri, primer transkriptin işleme sürecini bozarak proteinin yapısını değiştirebilir (Hawkins, 1988). Çalışmamız kapsamında tespit edilen varyasyon, ExAC ve 1000 Genome gibi popülasyon veri tabanlarında yer almamakla birlikte Mutation Taster programında yapılan *in silico* analizi sonucunda, splays bölge değişimine yol açabileceği ve hastalık etkeni olabileceği görülmüştür. Varyasyonun korunmuşluğunu gösteren PhyloP değeri ise 5.764'dır. c.825+5G>T varyasyonunun splays bölgede olmasından dolayı Provean, SIFT ve PolyPhen-2 araçlarıyla analizi yapılamamıştır.



**Şekil 4.14.** NC30 kodlu olguda tespit edilen *TCF12* c.825+5G>T varyasyonunun Sanger dizileme görüntüsü

Taranan diğer olgularda, kraniyosinostoz fenotipiyle uyumlu olabilecek olası patojenik herhangi bir varyasyon tespit edilememiştir.

## 5. TARTIŞMA

Konjenital anomalilerin toplumlardaki görülme sıklığı; etnik köken, coğrafik bölge, sosyoekonomik düzey, çevresel faktörler ve beslenme özelliklerine göre değişiklik göstermektedir (Dursun ve diğ., 2014). Konjenital anomalilerin dünya çapında görülme sıklıları %1,07 (Japonya) ile %4,3 (Çin) arasında değişmektedir (Temtamy ve diğ., 1998; Francine ve diğ., 2014). Amerika'daki görülme sıklığı %2-3 arasında değişen (Francine ve diğ., 2014) konjenital anomalilerin ülkemizdeki sıklığı ise %0.29 ile %5,85 arasındadır (Himmetoğlu ve diğ., 1996; Göynüner ve diğ., 2005; Kurdoğlu ve diğ., 2009; Tomatır ve diğ., 2009; Çakmak ve diğ., 2012; Özler ve diğ., 2014). Sendromik olan ya da olmayan kraniyosinostozlu olguların konjenital anomaliler arasındaki görülme sıklığına dair ayırıcı bir çalışma olmamakla birlikte, Avrupa kökenli 10 yıllık retrospektif bir analize göre, kraniyosinostozun tüm konjenital anomaliler arasındaki görülme sıklığı 10.000 doğumda 1.75 olarak belirlenmiştir (Loane ve diğ., 2011).

Kraniyosinostozun ülkemizdeki görülme sıklığına dair bilgiler ise yetersizdir. 1996 yılında Himmetoğlu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, kraniyal kısmı içine alan merkezi sinir sistemi anomalilerinin görülme sıklığı %0,39 olarak tespit edilmiştir (Himmetoğlu ve diğ., 1996). 2010 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise konjenital anomalilerin oranının %2.07 olduğu tespit edilmiş ve kraniyal kısmı da içine alan merkezi sinir sistemi anomalilerinin görülme sıklığı %0.51 olarak belirlenmiştir (Oztarhan ve diğ., 2010). Yeni doğan yoğun bakım ünitesindeki konjenital anomalilerin araştırıldığı başka bir çalışmada ise kraniyosinostozlu olguların sınıflandırılmaksızın görülme sıklığı %0.2 olarak tespit edilmiştir (Dursun ve diğ., 2014). Kraniyosinostozun küresel boyuttaki prevalansının yaklaşık olarak her 2000-2500 doğumda bir olduğunu ele aldığımızda (Johnson and Wilkie, 2011; Lattanzi ve diğ., 2017), Dursun ve arkadaşlarının ulaştığı sonuç, ülkemizdeki görülme sıklığının literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir.

Bilindiği gibi sendromik olmayan kraniyosinostoz; genetik, epigenetik ya da çevresel etkenlerin rol oynadığı, gen-gen ya da gen-çevre etkileşimine sahip multifaktöriyel bir

hastalıktır (Chumas ve diğ., 1997; Boyadjeiev, 2007). Her ne kadar 2000-2500 canlı doğumda 1 olarak görülse de, kraniyosinostoz ile ilgili olarak farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar, kraniyosinostozun artan sıklığına işaret etmektedir (Selber ve diğ., 2008; Di Rocco ve diğ., 2009; van der Meulen ve diğ., 2009, Cornelissen ve diğ., 2016). Prenatal dönemde sendromik olmayan kraniyosinostozun ultrasona (US) dayalı olan tanısı yaklaşık olarak 16-20. haftalar arasında konabilse de, özellikle gelişmiş US aletlerinin kırsal kesimlerde yaygın olarak bulunamamasından dolayı hamilelik süresince saptanamamaktadır (Johnson ve Wilkie, 2011).

Günümüzde kraniyosinostoz ile ilişkilendirilmiş 180'den fazla sendrom bulunmaktadır (Panigrahi 2011). Olgularda karşılaşılabilen belli başlı klinik bulgular, direkt olarak sendromla ilişkilendirilse de, bazı bulguların sendromla mı ilişkili yoksa ailesel fenotipik farklılıklardan mı kaynaklandığı tartışılan konular arasında yer almaktadır. Klinik bulguların şiddetinin, embriyonik dönemdeki sütürün kapanma zamanıyla orantılı olduğu, daha erken kapanan sütürlerin daha ağır klinik bulgulara yol açtığı düşünülmektedir (Aviv ve diğ., 2002). Erken kapanan her sütür, karakteristik kafa şekliyle sonuçlanır ve bu füzyondan dolayı oluşan yeni kafa şekli sıklıkla orta yüz hipoplazisi ve dismorfik (asimetrik) yüz görünümüyle sonuçlanabilmektedir (Wang ve diğ., 2016). Bunun yanı sıra artan intrakraniyal basınçtan dolayı baş ağrıları da olgularda görülebilmektedir (Cohen ve Persing, 1998).

Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmamızda, klasik kraniyosinostoz sendromlarının (Apert, Crouzon, Pfeiffer, Saethre-Chotzen ve Muenke gibi) görülmediği, el ve ayaklarda sindaktili, eklem abnormaliteleri, mental retardasyon ve Chiari malformasyonları gibi majör bulgular tespit edilmeyen olgular, sendromik olmayan kraniyosinostoz olarak sınıflandırılmıştır. Bulgular kısmındaki Tablo 4.1'de yer alan klinik değerlendirme formu kullanılarak, kraniyosinostozun yanı sıra olgularda görülen diğer olası anomaliler, araştırma ekibimizdeki klinisyenlerimizle birlikte araştırılmış ve tespit edilen değişimler not edilmiştir. Bu klinik değerlendirme formunda fenotipik bulgular; oküler, kraniyofasiyal, ekstremiteler bulguları ve diğer bulgular olarak alt kategorilere ayrılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda, olguların %47'sinde en az bir oküler abnormalite tespit edilmiştir. En sık görülen abnormalite %17 ile

hipertelorizm olurken, bunu sırasıyla %13 ile strabismus ve %10 ile proptosis takip etmektedir.

Sütür sinostozlarına göre olgular değerlendirildiğinde; %37 ile çalışma grubunda en yaygın tespit edilen, sagittal sütür sinostozu olmuştur. Bunu sırasıyla %33 ile koronal sinostozis (%23 bilateral, %10 unilateral), %20 ile metopik sinostoz ve %10 ile multisütür sinostozu takip etmiştir. Lambdoid sinostoz ise, çalışmaya dâhil edilen hiçbir olguda tespit edilmemiştir. Ayrıca; olguların %57'sinde frontal çıkıntı, %37'sinde düşük burun köprüsü, %17'sinde orta yüz hipoplazisi ve %13'ünde displastik kulak bulguları saptanmıştır. Sadece birer olguda tespit edilen ekstremitte bulguları ise bilateral calcaneovalgus, geniş ayak başparmağı, ayak başparmak eğriliği, klinodaktili, ellerde çoklu eklem kontraktürleri ve genu valgum deformitesidir. Bununla birlikte; farklı sütür sinostozlarına (metopik, koronal ve sagittal) ve farklı gen mutasyonlarına (*FREMI*, *TCF12* ve *AXIN2*) sahip olan dört olguda (NC06, NC09, NC16 ve NC17) ortak olarak hipertelorizm, frontal çıkıntı ve düşük burun köprüsü görülmüştür.

Yeni nesil dizilemeye alınan olgulardan, bilateral koronal sinostozu olan altı olgunun ikisinde (NC09 ve NC16) *TCF12* gen mutasyonları tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar, ekzon 10'da yer alan p.M260fs\*5 ve ekzon 13'de yer alan p.P369fs\*26 mutasyonlarıdır. İki olgunun fenotipik değerlendirmesinde; hipertelorizm, düz yüzlülük, frontal çıkıntı, orta yüz hipoplazisi ve düşük burun köprüsü ortak olarak görülen fenotipik özelliklerdir. Diğer yandan, NC16 kodlu olgunun farklı olarak gizli yarı damak ve bilateral palmar crease'e sahip olması dikkat çekmiştir. Ayrıca, ebeveynlerinden alınan DNA'ların Sanger dizilemesi sonucunda, NC16 kodlu olgunun babasında da aynı mutasyon olduğu belirlenmiştir. Klinik değerlendirme sonucunda babanın; brakisefalik kafa şekline, frontal çıkıntıya, yüksek frontal saç çizgisine, sınırdan bilateral düşük kulaklara ve düz yüze sahip olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, iki yönlü kafa grafisi çekilen babanın kraniyosinostozu sahip olmadığı, sütürlerinin seçilebilir olduğu görülmüştür. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, *TCF12* gen mutasyonlarının eksik penetrans gösterdiği ve mutasyonlu olguların yaklaşık %50'sinin kraniyosinostozu sahip olmadan kraniyofasiyal anomali özellikleri gösterdiği belirtilmiştir (Sharma ve diğ., 2013). *TCF12* geninin 10. ve 13. ekzonlarının Sanger dizileme ile tarandığı diğer dokuz

olgunun birinde (NC30) daha *TCF12* geninin 10. intronunda c.825+5G>T/+ splay bölge mutasyonu tespit edilmiştir. NC30 kodlu olgunun klinik dosyası incelendiğinde, olgunun bilateral koronal sinostozise, frontal çıkıntıya ve orta yüz hipoplazisine sahip olduğu görülmüştür.

FGF sinyal yolağının anlatıldığı kısımda da (2.4.1) değinildiği üzere, *TWIST1* ile heterodimerizasyon gerçekleştiren *TCF12*, osteoblast farklılaşmasında ve proliferasyonunda rol alır. *TCF12* (OMIM#600480) geni, 2013 yılında Sharma ve arkadaşları tarafından *TWIST1* gen mutasyonu bulunmayan Saethre-Chotzen sendromlu olgular üzerinden yaptıkları araştırmanın sonucunda tanımlanmıştır (Sharma ve diğ., 2013). İngiltere ve Hollanda merkezli 347 olgu üzerinden gerçekleştirilen bu çalışmada, toplamda 38 heterozigot (%11) *TCF12* mutasyonu kaydedilmiştir (Sharma ve diğ., 2013). Yapılan bu çalışmanın sonucunda, bilateral koronal sinostozu olan olguların %32'sinde, unilateral koronal sinostozu olan olguların ise %10'unda *TCF12* gen varyantları tespit edilmiştir (Sharma ve diğ., 2013). Koronal sinostozlu olgularda elde edilen *TCF12* gen mutasyonlarından sonra Di Rocco ve arkadaşları, *FGFR3* ve *TWIST1* genlerinde mutasyon tespit edilemeyen Fransız ve Portekiz kökenli koronal sinostozlu ailesel olgularda *TCF12* genini taramış ve beş ailenin dördünde mutasyon tespit etmiştir (Di Rocco ve diğ.,2014). 2015 yılında ise Paumard-Hernandez ve arkadaşları, İspanyol kraniyosinostozlu olgularda *TCF12* genini taramış ve olguların %21'inde *TCF12* varyantları bulmuşlardır. 2016 yılında yapılan bir başka çalışmada ise, Hollanda'daki dört ailede kromozom 15'te *TCF12* gen bölgesini de içeren üç büyük kalıtsal delesyon (84.9 kb, 8.6 kb ve 5.4 kb uzunluğunda) ve bir büyük kalıtsal duplikasyon (11.3 kb) tanımlanmışlardır (Goos ve diğ., 2016). Bu çalışma, sadece nokta mutasyonlarının değil aynı zamanda büyük kromozomal yeniden düzenlenmelerin de *TCF12* kaynaklı kraniyosinostozda rol oynadığını göstermiştir (Goos ve diğ., 2016). Bu çalışmaların ardından, *TWIST1* geninin basic helix-loop-helix (bHLH) ortağını kodlayan *TCF12*'nin, koronal sinostozun sık rastlanılan genetik nedeni olduğu netlik kazanmış ve *TCF12*-ilişkili kraniyosinostoz (OMIM #615314) başlığı altında olgular sınıflandırılmaya başlanmıştır (Paumard-Hernandez ve diğ., 2015; Goos ve diğ. 2016). 2017 yılında Avustralya ve Yeni Zelanda'dan yapılan bir başka çalışmada ise 309 olgunun 22'sinde *TCF12* mutasyonu tespit edilmiş ve bu olguların 16 tanesinin

sendromik olmayan koronal sinostozlu olgular olduğu vurgulanmıştır (Lee ve diğ., 2017). Böylelikle *TCF12* gen mutasyonlarının özellikle koronal sütürle olan ilişkisi netlik kazanmıştır. Yapılan tüm bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde koronal sinostozlu olgularda *TCF12* gen varyantlarının kapanan sütürün bilateral ya da unilateral olmasına göre %4 ile %21 oranları arasında sıklığa sahip olduğu görülmektedir (Paumard-Hernandez ve diğ., 2015). Gerçekleştirmiş olduğumuz projemiz kapsamında bilateral koronal sinostozlu olan üç olgumuzda *TCF12* gen mutasyonu tespit edilmiş ve mutasyon görülme sıklığı literatürdeki sıklıkla da örtüşen %10 olarak bulunmuştur.

YND'ye aldığımız 21 olgudan bir diğesinde (NC17) saptadığımız *AXIN2* gen mutasyonunun, insanda sagittal sütür sinostozuna neden olabileceği literatürde ilk defa tez çalışmamızda gösterilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2018). Geçtiğimiz 20 yılda, çeşitli araştırmacılar tarafından Wnt sinyal yolağı inhibitörlerinden Axin2'nin (Axis Inhibitor 2) inaktivasyonu sonucunda, osteoblast farklılaşması ve proliferasyonunun uyarıldığı hem *in vivo* hem de *in vitro* modeller üzerinde gösterilmiştir (Yu ve diğ., 2005; Liu ve diğ., 2007). Axin2, kraniyal nöral krest hücrelerinden (Jho ve diğ., 2002) ve gelişen sütürlere eksprese edilmektedir (Yu ve diğ., 2005). Fare modeli üzerinden gerçekleştirilen bir araştırmada, kafa morfogenezisi için gerekli olan Axin2'de meydana gelen mutasyonların, intramembranöz kemikleşmenin ana moleküllerinden biri olan  $\beta$ -catenin'in aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Yu ve diğ., 2005). Bunun yanı sıra, sütür mezenşiminde yer alan kök hücrelerin, Axin2 eksprese eden kök hücre popülasyonundan oldukları ve özellikle kalvaryal gelişim esnasında kök hücrelerin klonal genişleme, farklılaşma ve uzun süreli kendini yenileyebilen hücreler oldukları gösterilmiştir (Maruyama ve diğ., 2016). Ayrıca bu hücrelerin orta hat sütür bölgesinde yer aldıkları ve hasar tamiri ile iskelet rejenerasyonuna katıldıkları da belirlenmiştir (Maruyama ve diğ., 2016). Axin2'nin kraniyal gelişimdeki rolü ve fonksiyon kaybı sonucunda kraniyosinostozu yol açtığı çeşitli çalışmalarla desteklense de, bugüne kadar hiçbir kraniyosinostozlu olgu da *AXIN2* genine ait mutasyon saptanamamıştır. NC17 kodlu olgumuzda saptadığımız p.L349fs\*24 patolojik mutasyonunun (c.1045\_1046delCT; NM\_004655.3), gerek literatüre gerekse de kraniyosinostozun global ölçekteki tanısına yönelik önemli bilgiler sağlayacağını düşünmekteyiz (Yılmaz ve diğ., 2018).

Tez projemiz kapsamında YND çalıştığımız olgularda mutasyon tespit edilen bir diğer gen ise *FREMI* geni olmuştur. İkiisi sagittal sinostozlu (NC3 ve NC11) ve biri metopik sinostozlu (NC6) üç olguda, üç farklı yanlış anlamli olası patojenik varyasyon tespit edilmiştir (p.S1296R, p.G1493R ve p.P1802L). 2011 yılında *FREMI* geninin hem insanda hem de farede metopik sinostozu yol açabileceği yapılan bir araştırma sonucunda gösterilmiştir (Vissers ve diğ., 2011). Fare modeli üzerinden gerçekleştirilen bu çalışmada, gelişen interfrontal suture bölgesinde *Frem1* mRNA'sının ekspresyonu gösterilmiş ve bunun üzerine *FREMI* geninin intrasütural mezenşimal hücrelerdeki ekspresyonunun FGF'leri ya da reseptörlerine olan afinitelerini modüle edebileceği ve izole metopik kraniyosinostozu yol açabileceği önerilmiştir (Vissers ve diğ., 2011). Metopik sinostozun tanımlanmış en iyi etkenlerinden birisi kromozom 9p22.3'teki 8Mb'lık bir bölgenin monozomisi ile ilişkilendirilen 9p delesyon sendromudur (OMIM #158170). Bu delesyona sahip olan olgularda trigonosefalinin yanı sıra görülebilen klinik özellikler arasında ise mental retardasyon, hipertelorizm, orta yüz hipoplazisi ve uzun filtrum listelenmektedir (Alfi ve diğ., 1973; Swinkels ve diğ., 2008; Vissers ve diğ., 2011). Vissers ve arkadaşlarının yapmış oldukları KSV (Kopya Sayısı Varyasyonları, CNV) analizi sonucunda, beş olguda 9. kromozomun *FREMI* genini içeren bölgesinde delesyon ve duplikasyonlar tespit edilmiştir. Daha sonra Hollandalı 104 metopik sinostozlu olguda *FREMI* genini dizileyen araştırmacılar, üç olgunun ikisinde p.Glu1500Val ve bir olguda da p.Arg498Glu mutasyonlarını saptamışlardır (Vissers ve diğ., 2011). Diğer taraftan, bugüne kadar *FREMI* geninde mutasyon taşıyan metopik sinostozlu başka olguların rapor edilememiş olması, geni kraniyosinostoz için aday gen konumunda bırakmıştır.

Çalışmamız kapsamında NC06 ve NC11 kodlu olgularda tespit edilen *FREMI* gen varyantlarının (sırasıyla p.G1493R ve p.S1296R) maternal kalıtım göstermesi, bu varyantların ailesel birer polimorfizm olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, kraniyosinostozda eksik penetrans özelliğinin de gözlenmesi (*TCF12*'de olduğu gibi), ebeveynlerde bulunan bu varyasyonların fenotipe yansımamış olabileceğini, eksik penetranstan da kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Üçüncü olgunun (NC03) hem klinik hem de ebeveynlerinin genetik analizi gerçekleştirilemediği için varyasyonun



kalıtım paterni belirlenememiştir. Elde edilen bulgular bir arada değerlendirildiğinde ve *FREMI* geninin ülkemizdeki profilinin bilinmediği göz önünde bulundurulduğunda, *FREMI* geninin kraniyosinostozlu olgulardaki patojenitesinin belirsizliğini koruduğunu düşünmekteyiz.

YND ile analiz ettiğimiz olgularımızdan NC14 kodlu olgumuzda ise 2013 yılında kraniyosinostozu yol açtığı gösterilen *ERF* geninde daha önce rapor edilmiş olan p.G299fs\*9 mutasyonunu saptadık. Tezin 2.4.1. kısmında yer alan FGF sinyal yolağında da bahsedildiği üzere, ERF proteini, RAS-MEK-ERK yolağının ana moleküllerinden biri olan ERK1/2 kinazların önemli bağlanma hedeflerinden biridir (von Kriegsheim ve diğ., 2009). ERK1/2 sinyal yolağının aktivasyonunun kraniyosinostozu yol açtığının bilinmesi, *ERF* genini kritik aday genlerden biri haline getirmiştir (Twigg ve diğ., 2013). *ERF* geni ERK1/2 aracılı fosforilasyon ile düzenlenir ve ERK1/2 sinyal yolağına direkt olarak bağlanan inhibe edici ETS transkripsiyon faktörünü kodlar. ERF proteinin dozajının azalması sonucu oluşan ERK1/2 sinyal yolağının aktivasyonunun kraniyosinostozu yol açabileceği daha önceden gösterilmiştir (Twigg ve diğ., 2013). Sendromik olan ve olmayan kraniyosinostozlu 412 olgu üzerinden yapılan bir araştırmada, 12 olgunun *ERF* geninde yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlar saptanmıştır (Twigg ve diğ., 2013). Bu çalışmada yer alan olguların iki tanesinin sagittal, sekiz tanesinin çoklu sütür ve birinin lambdoid sinostozlu olduğu belirtilirken, bir olgunun ayırt edilemeyen sinostozu olduğuna değinilmiştir. Bu çalışmada, hem sendromik hem de sendromik olmayan üç olguda, bizim olgumuzda da tespit edilen p.G299fs\*9 mutasyonu rapor edilmiş ve birinin ailesel olduğu gösterilmiştir (Twigg ve diğ., 2013). Çoğunluklu olarak sendromik olan olgularda tanımlansa da sendromik olmayan olgularda da rastlanmasından dolayı ERF-ilişkili kraniyosinostoz olarak tanımlanmış ve görölme sıklığı %6 olarak belirlenmiştir (Twigg ve diğ., 2013). İlk defa bir Türk olguda gösterdiğimiz *ERF* gen mutasyonu, olgumuzun Antalya dışında yaşaması ve aileye ulaşılamaması nedeniyle, kapsamlı klinik değerlendirmeye alınamamıştır. Hasta dosyası incelendiğinde olgunun unilateral koronal sinostozu (sağ koronal sütür sinostozu), kapalı fontanelle, sol frontal kemik displazisine, düşük sol göze ve basık burun köküne sahip olduğu görölmüştür. *ERF* gen mutasyonunun YND ile

çalıştığımız 21 olgunun birinde tespit edilebilmesi, literatürle uyumlu olarak (Twigg ve diğ., 2013) yaklaşık olarak %5 gibi bir orana sahip olabileceğini öngörmemizi sağlamaktadır. Daha fazla olgu üzerinden yapılacak taramaların, *ERF* genotiplerinin Türk popülasyonundaki yüzdesini daha büyük doğrulukla ortaya koyacağı kanaatindeyiz.

Kraniyosinostoz ile ilişkilendirilmiş bu değinilen genlerin haricinde, iki olgumuzda olası patojenik *FBNI* mutasyonları belirledik. Özellikle Marfan sendromuyla (OMIM #154700) ilişkilendirilen Fibrillin 1 (*FBNI*) gen mutasyonlarının kraniyosinostoz bulgusu da olan Marfan sendromlu hastalarda da rapor edilmesiyle, Marfanoid kraniyosinostoz sendromu (Shprintzen-Goldberg sendromu, OMIM #182212) tanımlanmış ve *FBNI*'in erken kraniyofasiyal ve merkezi sinir sisteminin gelişiminde rolü olduğu öne sürülmüştür (Sood ve diğ., 1996). Olgularımızdan iki tanesinde *FBNI* mutasyonu tespit edilmiş ve detaylı klinik incelemeye alınabilen bir olguya (NC07) Marfan sendromu tanısı konamamıştır. Bununla birlikte, özellikle pectus excavatum (göğüs kafesi çöküklüğü) bulgusunun Marfan sendromlu olgularda da yaygın olarak görülmesi (Fraser ve diğ., 2017), hem kraniyosinostozlu hem de pectus excavatumlu olgularda *FBNI* mutasyonunun rolü olup olmayacağını düşündürmektedir. Bununla birlikte, p.G301V varyasyonunun olgunun babasında da tespit edilmesi ve babanın klinik değerlendirmesinin yapılmamış olması, varyasyonun ailesel bir polimorfizm olabilme ihtimalini gündeme getirmiştir. Olgunun ana variant dosyası tekrar incelendiğinde, *FBNI* geninde iki intronik ve bir sinonim değişim daha görülmüş ve patojenik açıdan anlamlı bulunmamıştır. *FBNI* mutasyonu tespit ettiğimiz diğer olgumuzun Antalya dışında yaşaması ve aileye ulaşamamasından dolayı klinik değerlendirmeye alınamamış ve benzer özellikler gösterip göstermediği incelenememiştir. Diğer taraftan, kraniyosinostoz ve pectus excavatumun *FBNI* varyasyonuna sahip olan bir olguda bir arada görülebilmesinin ve *FBNI* varyasyonlarının kraniyosinostozda fonksiyon kazandıran mutasyonlar olarak görülmesinin klinik ve genetik olarak önem taşıyabileceğini düşünmekteyiz.

Sendromik olsun ya da olmasın, kalıtsal olduğu düşünölen hastalıkların gelişiminde rol oynayan genlerin tespit edilebilebilmesi, hastalığın tedavisine yönelik gerek küçük molekül tasarımı ilaçların gerekse de gen tedavilerin önünü açabilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Son 10 yıl içindeki DNA dizileme teknolojisinin hızlı artışı ve insan genomunu dizilemenin maliyetinin giderek azalması, çok daha fazla sayıda olgunun hem kısa sürede hem de hızlı bir şekilde taranmasına olanak sağlamaktadır. Böylelikle hastalıkla ilişkilendirilebilecek yeni gen ve mutasyonların tanımlanması hızlanmakta ve erken tanıya giden yol kısalmaktadır. Bu yüzden de DNA dizilemesinde yüksek kapasite ile çalışan sistemlerin kullanılması çok daha fazla sayıda bilginin kısa sürede elde edilebilmesinin önünü açmaktadır.

DNA dizileme teknolojisindeki gelişmelerle birlikte her geçen yıl kraniyosinostoza neden olduğu düşünölen genlerin sayısı artmaktadır. Günümüzde özellikle sendromik kraniyosinostoz ile ilişkilendirilmiş 50'den fazla gen bulunmaktadır ve bunlardan 20 tanesi (*ASXL1, CDC45, COLEC11, EFNBI, ERF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IHH, ILI1RA, MEGF8, MSX2, POR, RAB23, RUNX2, SKI, TCF12, TWIST1, WDR35, ZIC1*) daha fazla sayıda olguda bulunmasından dolayı ana genler olarak sınıflandırılmıştır (Twigg ve Wilkie, 2015).

Gerek ölkemizde gerekse de küresel anlamda, kraniyosinostozun genetik tanısında ilk olarak FGFR1-3 ve TWIST1 genlerine odaklanılmaktadır (Mathijssen, 2015). Diğer sütür tiplerine kıyasla daha fazla oranda genetik alt yapıya dayanmasından dolayı, özellikle koronal sütür sinostozlu sendromik ya da sendromik olmayan olgularda bulunan genler, diğer tek sütür sinostozlu olgularda da taranmakta fakat düşük tanı imkanı sağlamaktadır (Clarke ve diğ., 2018). Geçtiğimiz yıllarda kraniyosinostoz için öne çıkan altı genin (*FGFR2, FGFR3, TWIST1, TCF12, ERF* ve *EFNBI*), olguların yaklaşık %20'sini aydınlatabildiği görölmüştür (Wilkie ve diğ., 2010). Öte yandan, 2017 yılında 40 kraniyosinostozlu olgu üzerinden yapılan bir araştırmada tüm ekzom ve tüm genom dizileme analizi gerçekleştirilmiş ve olguların %37.5'inin genetik nedeni aydınlatılabilmıştır (Miller ve diğ., 2017). Kraniyosinostozun altında yatan moleküler nedenlerin çok çeşitli olmasından dolayı, hızlı tanıya gidebilmek için mümkün olan en fazla sayıda genin taranması, tanı yüzdesini arttırmaktadır. Bu yüzden de, özellikle

sendromik olan olgularda da tanımlanan genlerin hedefli gen panellerine eklenerek, panel içindeki gen sayısının artırılmasının özellikle ailesel ve sendromik olmayan orta hat sinostozlu olguların tanısında yüksek başarı sağlayacağı, fakat sporadik gelişen olgularda aynı oranın yakalanamayacağı düşünülmektedir (Timberlake ve Persing, 2018).

Ülkemizde, kraniyosinostozlu olgular üzerinden yapılan moleküler çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Ekibimiz tarafından gerçekleştirilmiş olan Türk olgulardaki kraniyosinostozun genetiğine yönelik yapılmış olan ilk moleküler genetik çalışmada, Türk popülasyonunda *FGFR2* exon IIIa ve IIIc mutasyonlarının görülme sıklığı Apert sendromlu olgularda %91.6, Crouzon sendromlu olgularda %57 ve Pfeiffer sendromlu olgularda ise %83 olarak tespit edilmiştir. Sendromik olmayan kraniyosinostozlu olgularda ise bakılan bölge açısından herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (Nur ve diğ., 2014). 2015 yılında yayınlanan bir yüksek lisans tezinde ise, kromozom anomalisi bulunmayan 40 sendromik olan ve olmayan kraniyosinostozlu olgu ve ailesinde, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREMI* ve *RAB23* genleri DNA dizi analizi ve MLPA yöntemleri ile taranmıştır (Karaman, 2015). Bu çalışmanın sonucunda, Apert tanılı olguların %100'ünde, Pfeiffer tanılı olguların %66,6'sında, Crouzon tanılı olguların %50'sinde, Saethre-Chotzen tanılı olguların %57,1'inde ve Muenke tanılı olguların %50'sinde *FGFR2*, *FGFR3* ve *TWIST1* genlerindeki bilinen mutasyonlar gösterilmiştir (Karaman, 2015). Sendromik olmayan olgulardan sadece birinde p.His78His (c.234C>T) değişimi gösterilmiş ve değişimin sinonim olmakla birlikte, mutasyon analizi sonucunda "hastalıkla ilişkili" olarak tanımlandığı belirtilmiş ve ileri analizlere ihtiyaç duyulduğu ifade edilmiştir (Karaman, 2015).

Gerçekleştirmiş olduğumuz tez projesi, taranan hedef genler açısından ele alındığında, en kapsamlı moleküler genetik çalışma olmuştur. Bu bağlamda, ilk hedefimiz olan 16 genden 9 tanesi (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *RUNX2*, *TGF-β*, *EFNB1* ve *ALPL*), toplam 519 gen içeren (Ek Tablo 1) DDA paneli ile taranmış ve herhangi bir mutasyon saptanamamıştır. Diğer yedi gen, model organizmalar üzerinde kraniyosinostozu yol açabileceği düşünülen ama bugüne kadar insanda kraniyosinostoz etkeni olarak gösterilememiş aday genlerdir. Aday genler olmasından dolayı da panelde

yer almadığını düşünmekteyiz. Diğer yandan, kullanmış olduğumuz panelde yer alan dismorfoloji ve displazi ile ilişkilendirilmiş diğer 510 geni incelediğimizde olguların yaklaşık %20'sinde, kraniyosinostoz ile ilişkilendirilmiş üç gene ait (*AXIN2*, *TCF12* ve *ERF*) patolojik ve olası patolojik mutasyonlar tespit ettik. Miller ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen tüm ekzom ve tüm genom dizileme analizinin %37,5'lik oranıyla kıyaslandığında, elde ettiğimiz sonuçlar, kullandığımız panelin tanı yüzdesinin oldukça yüksek olduğunu ve rutin analizlerde uygulanmanın daha erken tanı verebileceğini düşündürmektedir.

YND analizine alınamayan dokuz olgu (NC22-NC30), 21 olguda belirlenen *AXIN2*, *ERF*, *FBNI*, *FREMI* ve *TCF12* genlerindeki varyasyonların bulunduğu ekzonlar için Sanger dizileme ile taranmıştır. NC22 kodlu olgunun DNA'sı ile sadece *AXIN2* ve *TCF12* genin 10. ekzonu çalışabilmiş diğer bölgeler, DNA'nın yetersizliğinden dolayı analiz edilememiştir. Analize alınan diğer sekiz olgudan birinde (NC30) *TCF12* geninin 10. intronunda splays bölge varyasyonu tespit edilmiştir. *In silico* analizler sonucunda evrimsel olarak korunmuş (PhyloP: 5,764) splays bölgesindeki c.825+5G>T varyasyonun, splays bölge değişimine yol açabileceği ve hastalık etkeni olabileceği öngülmüştür. Diğer yedi olgunun Sanger dizileme analizi sonucunda herhangi bir patojenik ya da olası patojenik varyasyon tespit edilememiştir. Sadece iki ekzonu (10 ve 13) dizilenebilen *TCF12*'nin ikinci çalışma grubundaki tanı yüzdesi böylelikle yaklaşık olarak %11 olarak belirlenmiş ve toplamda 30 olgunun üç tanesinde varyasyon tespit edilmesiyle, Türk kraniyosinostozlu olguların %10'unda etken mutasyon barındırabileceği belirlenmiştir. Diğer olgularda ise kraniyosinostoz fenotipine yol açabilecek patojenik bir mutasyon tespit edilememiştir.

Çalışmamız kapsamında DDA paneli kullanılarak 21 olgunun dördünde (~%20) ve Sanger dizileme ile de dokuz olgunun birinde (~%11) etken mutasyonların belirlenmesi mümkün olmuştur. Bununla birlikte, çalışma kapsamına alınan 30 olgunun 25'inde hastalıkla ilişkilendirilebilecek kesin tanıya ulaşılamamıştır. *FREMI* ve *FBNI* gen mutasyonu taşıyan olguların bu genlerden etkilendiklerine yönelik kesin tanıya ulaşabilmek için kapsamlı fonksiyonel analizler yapmak gerekliliğinin yanı sıra, bu genlerdeki varyasyonların toplumumuzdaki görülme sıklığının da bilinmesi, sonuç

açısından önem ihtiva etmektedir. Çalışmamız sonucunda tanı konulamayan olguların, daha ileri moleküler testler olan tüm ekzom dizileme ve/veya tüm genom dizileme analizlerine alınması, sadece olguların tanısına değil aynı zamanda hastalıkla ilişkili yeni aday genlerin ve yolakların tanımlanmasına da imkân sağlayacağını düşünmekteyiz.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gerçekleştirmiş olduğumuz tez projemiz kapsamında, sendromik olmayan kraniyosinostoz tanısı almış 30 olguda, hastalığa yol açan genlerin moleküler genetik taraması gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda 21 olgu, hastalığın etiopatogenezinde rol oynadığı çeşitli insan ve fare modeli çalışmalarıyla gösterilmiş genleri içeren DDA gen paneli kullanılarak hedefli YND analizine alınmıştır. 21 olgunun dördünde (~%20), kraniyosinostoz fenotipiyle uyumlu patolojik varyasyonlar tespit edilmiştir. Bu varyasyonlardan iki tanesi ilk defa çalışmamızda gösterilen patolojik varyasyonlardır. Olguların fenotipleri ile genotipleri birlikte ele alındığında, bilateral koronal sinostozu olan olgularda *TCF12* gen mutasyonları (p.M260fs\*5 ve p.P369fs\*26), sağ koronal kraniyosinostozu olan bir olguda ise *ERF* gen mutasyonu (p.G299fs\*9) olduğu görülmüştür. Sagittal sinostozu olan bir diğer olgumuzda ise *AXIN2* geninde patolojik, fonksiyon kaybettiren p.L349fs\*24 mutasyonu belirlenmiştir. *AXIN2* gen mutasyonunun insanda kraniyosinostoz fenotipine yol açabileceği ilk defa çalışmamız kapsamında gösterilmiştir.

DDA gen paneli kullanılarak yapılan ilk analizlerde patolojik varyasyon belirlenen ekzonlar, çalışma kapsamına alınan diğer dokuz olguda Sanger dizileme ile taranmıştır. Böylelikle hem olgularda mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir hem de olası hot-spot bölgeler araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda taranan dokuz olgunun birinde, *TCF12* geninde yeni bir c.825+5G>T splays bölge varyantı saptanmış ve yapılan *in silico* analizler sonucunda varyantın evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer aldığı ve hastalık yapıcı değişim olarak sınıflandırıldığı bulunmuştur. Böylelikle Türk popülasyonunda *TCF12* gen mutasyonlarının, olguların %10'unda görülebileceği belirlenmiştir.

Gerek genetik gerekse de fenotipik olarak oldukça heterojen bir hastalık olan kraniyosinostozun aydınlatılmasında kapsamlı genetik araştırmalar oldukça büyük önem ihtiva etmektedir. Çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz veriler ışığında, özellikle sendromik olmayan kraniyosinostoz tanısı konan olgularda, erken kapanan sütürün çeşidine göre moleküler genetik analizler yapılmasının tanı süresini hızlandıracağını

düşünmekteyiz. Özellikle de diğer sinostoz tiplerine kıyasla genetik etkenin daha sık belirlenebildiği koronal sinostozlu olgularda *TCF12* gen mutasyonlarının taranmasının, daha erken tanı ve aileye daha erken genetik danışma verilebilmesinin önünü açacaktır.

Yeni nesil dizileme teknolojisindeki gelişmeler sonucunda her geçen gün kraniyosinostozu yol açan yeni genler tanımlanmakta ve bu sayı 60'a yaklaşmaktadır. Kraniyosinostozlu olguların yüksek verimliliğe sahip yeni nesil dizileme platformlarında taranması fenotip-genotip korelasyonunun daha hızlı kurulabilmesinin önünü açmaktadır. Diğer taraftan, yapılan genetik analizler sonucunda mutasyon saptanmayan olguların, daha ileri analizler olan tüm ekzom ya da tüm genom dizileme analizleri ile araştırılması, yeni aday genlerin ve genomik bölgelerin tespit edilmesinin önünü açacaktır. Bununla birlikte, daha fazla olgu üzerinden yapılacak olan kapsamlı genetik analizler, Türk popülasyonundaki yaygın görülen kraniyosinostoz tiplerindeki etken genlerin/genotiplerin daha büyük doğrulukla belirlenmesini sağlayacaktır.

Sonuç olarak; genetik, sitogenetik, epigenetik ve çevresel etkenlerin sebep olduğu kraniyosinostozun tam olarak aydınlatılabildiği takdirde, embriyonik gelişimin kraniyofasiyal sürecinde rol oynayan yolların daha iyi anlaşılmasına ve kraniyofasiyal hastalıkların gerek tanısına gerek de tedavisine yönelik yeni ufukların açılmasına olanak sağlayacaktır.



## KAYNAKLAR

- Alderman BW, Bradley CM, Greene C, Fembach SK, Baron AE. Increased risk of craniosynostosis with maternal cigarette smoking during pregnancy. *Teratology*. 1994;50: 13-8.
- Aleck KA, Bartley, DL. Multiple malformation syndrome following fluconazole use in pregnancy: report of an additional patient. *Am. J. Med. Genet.* 1997;72: 253–256.
- Alfi O, Donnell GN, Crandall BF, Derencsenyi A, Menon R. Deletion of the short arm of chromosome no.9 (46,9p-): a new deletion syndrome. *Ann Genet.* 1973;16: 17–22.
- Alok A, Lei Z, Jagannathan NS, Kaur S, Harmston N, Rozen SG, Tucker-Kellogg L, Virshup DM. Wnt proteins synergize to activate  $\beta$ -catenin signaling. *J Cell Sci.* 2017;130(9): 1532-1544.
- Al-Rekabi Z, Cunningham ML, Sniadecki NJ. Cell Mechanics of Craniosynostosis. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017;3(11): 2733–2743.
- Arvanitis DN, Davy A. Regulation and misregulation of Eph/ephrin expression. *Cell Adh Migr.* 2012;6 (2): 131–137.
- Barik M, Bajpai M, Das RR, Panda SS. Study of environmental and genetic factors in children with craniosynostosis: A case-control study. *J Pediatr Neurosci.* 2013;8: 89–92.
- Barreto S, González-Vázquez A, Cameron AR, O'Brien FJ, Murray DJ. Identification of stiffness-induced signalling mechanisms in cells from patent and fused sutures associated with craniosynostosis. *Scientific Reports.* 2017;7: 11494.
- Beederman M, Lamplot JD, Nan G, Wang J, Liu X, Yin L, Li R, Shui W, Zhang H, Kim SH, Zhang W, Zhang J, Kong Y, Denduluri S, Rogers MR, Pratt A, Haydon RC, Luu HH, Angeles J, Shi LL, He TC. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J Biomed Sci Eng.* 2013;6(8A): 32-52.
- Beederman M, Farina EM, Reida RR. Molecular basis of cranial suture biology and disease: Osteoblastic and osteoclastic perspectives. *Genes Dis.* 2014;1(1): 120-125.
- Behr B, Longaker MT, Quarto N. Differential activation of canonical Wnt signaling determines cranial sutures fate: a novel mechanism for sagittal suture craniosynostosis. *Dev Biol.* 2010;344(2): 922-40.
- Bernardini L, Castori M, Capalbo A, Mokini V, Mingarelli R, Simi P, Bertuccelli A, Novelli A, Dallapiccola B. Syndromic craniosynostosis due to complex chromosome 5

rearrangement and MSX2 gene triplication. *Am J Med Genet Part A*. 2007;143A(24): 2937–43.

Bijlsma MF, Spek CA, Peppelenbosch MP. Hedgehog: an unusual signal transducer. *Bioessays*. 2004;26(4): 387-94.

Bochukova EG, Soneji S, Wall SA, Wilkie AO. Scalp fibroblasts have a shared expression profile in monogenic craniosynostosis. *J Med Genet*. 2010;47(12): 803-8.

Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L. Classical twin studies and beyond. *Nature Rev Genet*, 2002;3(11): 872-882.

Borke JL, Yu JC, Isales CM, Wagle N, Do NN, Chen JR, Bollag RJ. Tension-induced reduction in connexin 43 expression in cranial sutures is linked to transcriptional regulation by TBX2. *Ann Plast Surg*. 2003;51: 499–504.

Boulet SL, Rasmussen SA, Honein MA. A population-based study of craniosynostosis in metropolitan Atlanta, 1989–2003. *Am J Med Genet*. 2008;146A: 984–991.

Britto JA, Evans RD, Hayward RD, Jones BM. From genotype to phenotype: the differential expression of FGF, FGFR, and TGFbeta genes characterizes human cranioskeletal development and reflects clinical presentation in FGFR syndromes. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108(7): 2026-39.

Byron CD. Role of the osteoclast in cranial suture waveform patterning. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288(5): 552-63.

Carmichael SL, Ma C, Rasmussen SA, Honein MA, Lammer EJ, Shaw GM. Craniosynostosis and maternal smoking. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008;82: 78–85.

Chen G, Deng C, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 2012;8(2): 272-88.

Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T, Ogata N, Shimoaka T, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H. Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J Bone Miner Res*. 2001;16: 2074e2081.

Clarke CM, Fok VT, Gustafson JA, Smyth MD, Timms AE, Frazar CD, Smith JD, Birgfeld CB, Lee A, Ellenbogen RG, Gruss JS, Hopper RA, Cunningham ML. Single suture craniosynostosis: Identification of rare variants in genes associated with syndromic forms. *Am J Med Genet A*. 2018;176(2): 290-300.

Cohen SR, Persing JA. Intracranial pressure in single-suture craniosynostosis. *Cleft Palate Craniofac J*. 1998;35(3): 194-6.

Cohen MM, Jr. Editorial: perspectives on craniosynostosis. *Am J Med Genet A*, 2005; 136A(4), 313-326.

Connerney J, Andreeva V, Leshem Y, Muentener C, Mercado MA, Spicer DB. Twist1 dimer selection regulates cranial suture patterning and fusion. *Developmental Dynamics*. 2006; 235(5): 1345–1357.

Cox TC, Horst JA, Hing A V, Cunningham ML. Molecular Genetics and Biology of Craniofacial Craniosynostoses. *Stem Cell Biol Tissue Eng Dent Sci*.2015;5: 499-520.

Cunningham ML, Horst JA, Rieder MJ, Hing AV, Stanaway IB, Park SS, Samudrala R, Speltz ML. IGF1R variants associated with isolated single suture craniosynostosis. *Am J Med Genet A*. 2011;155A: 91–7.

Çakmak B, Hısım Y, Aysal T, Özsoy Z, Demirtürk F. Major konjenital anomaliler: Gaziosmanpafla Üniversitesi üç yıllık deneyim. *Gaziosmanpafla Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2012;4: 24-8.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958): 577–84.

Di Rocco F, Baujat G, Arnaud E, Rénier D, Laplanche JL, Daire VC, Collet C. Clinical spectrum and outcomes in families with coronal synostosis and TCF12 mutations. *Eur J Hum Genet*.. 2014;22(12): 1413–1416.

Ding HL, Hooper JE, Batzel P, Eames BF, Postlethwait JH, Artinger KB, Clouthier DE. MicroRNA profiling during craniofacial development: potential roles for Mir23b and Mir133b. *Front. Physiol*. 2016;7: 281.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(2): 139-49.

Fiedler M, Mendoza-Topaz C, Rutherford TJ, Mieszczanek J, Bienz M. Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating  $\beta$ -catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(5): 1937-42.

Fonteles CSR, Finnell RH, George TM, Harshbarger RJ. Craniosynostosis: current conceptions and misconceptions. *AIMS Genetics*. 2016;3(1): 99-129.

Francis-West PH, Tatla T, Brickell PM. Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes Bmp-4 and Bmp-2 in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia. *Developmental Dynamics*. 1994;201: 168–178.

Fraser S, Child A, Hunt I. Pectus updates and special considerations in Marfan syndrome. *Pediatr Rep*. 2017;9(4): 7277.

Francine R, Pascale S, Aline H. Congenital Anomalies: Prevalence and Risk Factors. *Universal Journal of Public Health*. 2014; 2(2): 58 – 63.

French LR, Jackson IT, Melton LJ. A population-based study of craniosynostosis. *J Clin Epidemiol*. 1990;43: 69-73.

Garza RM, Khosla RK. Nonsyndromic craniosynostosis. *Semin Plast Surg*. 2012;26(2): 53-63.

Goos JAC, Fenwick AL, Swagemakers SMA, McGowan SJ4, Knight SJ5, Twigg SR2, Hoogeboom AJ6, van Dooren MF, Magielsen FJ, Wall SA, Mathijssen IM, Wilkie AO, van der Spek PJ, van den Ouweland AM. Identification of Intragenic Exon Deletions and Duplication of TCF12 by Whole Genome or Targeted Sequencing as a Cause of TCF12-Related Craniosynostosis. *Hum Mutat*. 2016;37(8): 732–736.

Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*. 2006;281(32): 22429-33.

Goriely A, Wilki AO. Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. *Am. J. Hum. Genet*. 2012;90: 175–200.

Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. *Syndromes of the head and neck*. Oxford, UK: Oxford University Press; 1990.

Governale, L.S. Craniosynostosis. *Pediatr Neurol*. 2015;53(5): 394-401.

Göynüner FG, Kepkep K, Yetim G, Tuncay Y, Koç A, Tural E. Doğumlarda majör konjenital anomalilerin retrospektif analizi. *Perinataloji Dergisi*. 2005;13: 31-4.

Green DD, Hembry RM, Atkinson SJ, Reynolds JJ, Meikle MC. Immunolocalization of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in mechanically deformed fibrous joints. *Am J Orthodont Dentofac Orthop*. 1990; 97: 281–288.

Greenwood J, Flodman P, Osann K, Boyadjiev SA, Kimonis V. Familial incidence and associated symptoms in a population of individuals with nonsyndromic craniosynostosis. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2014;16, 302–310.

Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* 2009;19(1): 71-88.

Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003;8(2): 145-58.

Hawkins JD. A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(21): 9893-908.

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 2004;131(8): 1663-77.

Heino TJ, Hentunen TA. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3(2): 131-45.

Heuzé Y, Holmes G, Peter I, Richtsmeier JT, Jabs EW. Closing the gap: genetic and genomic continuum from syndromic to nonsyndromic craniosynostoses. *Curr Genet Med Rep.* 2014;2(3): 135–145.

Himmetoglu O, Tiras MB, Gursoy R, Karabacak O, Sahin I, Onan A. The incidence of congenital malformations in the Turkish population. *Int J Gynaecol Obstet.* 1996;55: 17-21.

Hirst M, Marra MA. Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1): 136-46.

Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development.* 1999;126(24): 5611-20.

Jabs EW, Müller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB, Snead ML, Maxsone R. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell.* 1993;75(3): 443-50.

Jacob S, Wu C, Freeman TA, Koyama E, Kirschner RE. Expression of Indian Hedgehog, BMP-4 and Noggin in craniosynostosis induced by fetal constraint. *Ann Plast Surg.* 2007;58(2): 215-21.

Janssen A, Hosen MJ, Jeannin P, Coucke PJ, De Paepe A, Vanakker OM. Second family with the Boston-type craniosynostosis syndrome: novel mutation and expansion of the clinical spectrum. *Am J Med Genet A.* 2013;161: 2352–7.

Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes and Development*. 2004;18, 937–951.

Jia J, Tian Q, Ling S, Liu Y, Yang S, Shao Z. MiR-145 suppresses osteogenic differentiation by targeting Sp7. *FEBS Lett*. 2013;587: 3027–3031.

Jin SW, Sim KB, Kim SD. Development and growth of the normal cranial vault: an embryologic review. *J Korean Neurosurg Soc*. 2016;59: 192–196.

Johnson D, Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Expression patterns of Twist and Fgfr1, -2 and -3 in the developing mouse coronal suture suggest a key role for twist in suture initiation and biogenesis. *Mech Dev*. 2000;91: 341–345.

Justice CM, Yagnik G, Kim Y, Peter I, Jabs EW, Erazo M, Ye X, Ainehsazan E, Shi L, Cunningham ML, Kimonis V, Roscioli T, Wall SA, Wilkie AO, Stoler J, Richtsmeier JT, Heuzév Y, Sanchez-Lara PA, Buckley MF, Druschel CM, Mills JL, Caggana M, Romitti PA, Kay DM, Senders C, Taub PJ, Klein OD, Boggan J, Zwienerberg-Lee M, Naydenov C, Kim J, Wilson AF, Boyadjiev SA. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for nonsyndromic sagittal craniosynostosis near BMP2 and within BBS9. *Nat. Genet*. 2012;44: 1360–1364.

Kalter H, Warkany J. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention (first of two parts). *N Engl J Med*. 1983;308(8): 424-31.

Karaman V. Sendromik ve Non-sendromik Kraniosinostoz olgularında *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREMI* ve *RAB23* Genlerinde Moleküler analizler. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. ZO Uyguner).

Kariminejad A, Kariminejad R, Tzschach A, Ullmann R, Ahmed A, Asghari-Roodsari A, et al. Craniosynostosis in a patient with 2q37.3 deletion 5q34 duplication: Association of extra copy of MSX2 with craniosynostosis. *Am J Med Genet*. 2009;149A(7): 1544–9.

Katsianou MA, Adamopoulos C, Vastardis H, Basdraa EK. Signaling mechanisms implicated in cranial sutures pathophysiology: Craniosynostosis. *BBA Clin*. 2016;6: 165–176.

Katz LH, Li Y, Chen JS, Munoz NM, Majumdar A, Chen J, Mishra L. Targeting the TGF- $\beta$  signaling in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013;17(7): 743–760.

Khanna PC, Thapa MM, Iyer RS, Prasad SS. Pictorial essay: The many faces of craniosynostosis. *Indian J Radiol Imaging*. 2011;21(1): 49-56.

Kim HJ, Roh HG, Lee IW. Craniosynostosis: Updates in Radiologic Diagnosis. *J Korean Neurosurg Soc*. 2016;59(3): 219-26.

Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA. Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol*. 2007;14: 150-161.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*. 2000;351 Pt 2:289-305.

Komatsu Y, Mishina Y. Craniosynostosis: An epistatic explanation. *Elife*. 2016; 5:e21162

Komatsu Y, Yu PB, Kamiya N, Pan H, Fukuda T, Scott GJ, Ray MK, Yamamura K, Mishina Y. Augmentation of Smad-dependent BMP signaling in neural crest cells causes craniosynostosis in mice. *J Bone Miner Res*. 2013;28(6): 1422-33.

Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2): 68-75.

Kurdođlu M, Kurođlu Z, Kūçukaydın Z, Kolusarı A, Adalı E, Yıldızhan R, Şahin HG, Kamacı M. Van yöresinde konjenital malformasyonların görölme sıklığı ve dağılımı. *Van Tıp Dergisi*. 2009;16: 95-8.

Lajeunie E, Crimmins DW, Arnaud E, Renier D. Genetic considerations in nonsyndromic midline craniosynostoses: a study of twins and their families. *J Neurosurg*. 2005;103:353-6.

Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff, PM, Grix AW Jr, Lott IT. Retinoic acid embryopathy. *New Engl. J. Med*. 1985;313, 837-841.

Lattanzi W, Barba M, Di Pietro L, Boyadjiev SA. Genetic advances in craniosynostosis. *American Journal of Medical Sciences*. 2017 173A: 1406-1429.

Lattanzi W, Bukvic N, Barba M, Tamburrini G, Bernardini C, Michetti F, Di Rocco C. Genetic basis of single-suture synostoses: genes, chromosomes and clinical implications. *Childs Nerv Syst*. 2012;28: 1301-1310.

Lee E, Le T, Zhu Y, Elakis G, Turner A, Lo W, Venselaar H, Verrenkamp CA, Snow N, Mowat D, Kirk EP, Sachdev R, Smith J, Brown NJ, Wallis M, Barnett C, McKenzie F, Freckmann ML, Collins F, Chopra M, Gregersen N, Hayes I, Rajagopalan S, Tan TY, Stark Z, Savarirayan R, Yeung A, Adès L, Gattas M, Gibson K, Gabbett M, Amor DJ,

Lattanzi W, Boyd S, Haan E, Gianoutsos M, Cox TC, Buckley MF, Roscioli T. A craniosynostosis massively parallel sequencing panel study in 309 Australian and New Zealand patients: findings and recommendations. *Genet Med.* 2017; 214.

Lee JC, Spiguel L, Shenaq DS, Zhong M, Wietholt C, He TC, Reid RR. Role of RANK-RANKL-OPG axis in cranial suture homeostasis. *J Craniofac Surg.* 2011;22(2): 699-705.

Lee HQ, Hutson JM, Wray AC, Lo PA, Chong DK, Holmes AD, Greensmith AL. Changing epidemiology of nonsyndromic craniosynostosis and revisiting the risk factors. *J Craniofac Surg.* 2012;23: 1245-1251.

Lenton K, James AW, Manu A, Brugmann SA, Birker D, Nelson ER, Leucht P, Helms JA, Longaker MT. Indian hedgehog positively regulates calvarial ossification and modulates bone morphogenetic protein signaling. *Genesis,* 2011;49, 784–796.

Levi B, Wan DC, Wong VW, Nelson E, Hyun J, Longaker MT. Cranial suture biology: from pathways to patient care. *J Craniofac Surg.* 2012;23: 13–19.

Levine JP, Bradley JP, Roth DA, McCarthy JG, Longaker MT. Studies in cranial suture biology: Regional dura mater determines overlying suture biology. 1998;101(6): 1441-7.

Ma L, Golden S, Wu L, Maxson R. The Molecular Basis of Boston-Type Craniosynostosis: The Pro148→His Mutation in the N-Terminal Arm of the MSX2 Homeodomain Stabilizes DNA Binding without Altering Nucleotide Sequence Preferences. *Hum Mol Genet.* 1996;5(12): 1915-20.

Liu H, Sun Q, Wan C, Li L, Zhang L, Chen Z. MicroRNA-338-3p regulates osteogenic differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells by targeting Runx2 and Fgfr2. *J Cell Physiol.* 2014;229: 1494–1502.

Liu, B., Yu, H.M., Hsu, W. Craniosynostosis caused by Axin2 deficiency is mediated through distinct functions of beta-catenin in proliferation and differentiation. *Developmental Biology.* 2007;301(1): 298–308.

Loane M, Dolk H, Kelly A, Teljeur C, Greenlees R, Densem J, EUROCAT Working Group. Paper 4: EUROCAT statistical monitoring: Identification and investigation of ten year trends of congenital anomalies in Europe. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2011; 91(Suppl 1), S31–S43.

Lupski JR. Digenic inheritance and Mendelian disease. *Nat. Genet.* 2012;44: 1291–1292.



Lyon SM, Waggoner D, Halbach S, Thorland EC, Khorasani L, Reid RR. Syndromic craniosynostosis associated with microdeletion of chromosome 19p13.12–19p13.2. *Genes & Diseases*. 2015;2(4): 347-352.

Magge SN, Snyder K, Sajja A, DeFreitas TA, Hofherr, SE, Broth RE, Keating RF, Rogers GF. Identical Twins Discordant for Metopic Craniosynostosis: Evidence of Epigenetic Influences. *J. Craniofac. Surg*. 2017;28: 14-16.

Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell*. 2001;7(4): 801-9.

Maruyama T, Jeong J, Sheu TJ, Hsu W. Stem cells of the suture mesenchyme in craniofacial bone development, repair and regeneration. *Nat Commun*. 2016;7: 10526.

Maruyama T, Mirando AJ, Deng CX, Hsu W. The balance of WNT and FGF signaling influences mesenchymal stem cell fate during skeletal development. *Sci Signal*. 2010;3(123): ra40.

Mathijssen IMJ. Guideline for Care of Patients With the Diagnoses of Craniosynostosis: Working Group on Craniosynostosis. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 2015;26(6): 1735-1807.

Mattina T, Perrotta CS, Grossfeld P: Jacobsen syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:9.

McCarthy JG, Reid CA. Craniofacial synostosis in association with vitamin D resistant rickets. *Ann Plast Surg*. 1980;4: 149–153.

McDonald-McGinn DM, Feret H, Nah HD, Bartlett SP, Whitaker LA, Zackai EH. Metopic craniosynostosis due to mutations in *GLI3*: A novel association. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(7): 1654-60.

Mefford HC, Shafer N, Antonacci F, Tsai JM, Park SS, Hing AV, Rieder MJ, Smyth MD, Speltz ML, Eichler EE, Cunningham ML. Copy number variation analysis in single-suture craniosynostosis: Multiple rare variants including *RUNX2* duplication in two cousins with metopic craniosynostosis. *Am J Med Genet*. 2010;152A: 2203-2210.

Mehrara BJ, Mackool RJ, McCarthy JG, Gittes GK, Longaker MT. Immunolocalization of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 and receptor-2 in rat cranial sutures. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1998;102(6):1805-17.

Menking M, Wiebel J, Schmidt, W. T., Ebel, K. D., and Ritter, R. Premature craniosynostosis associated with hyperthyroidism in 4 children with reference to 5 further cases in the literature. *Monatsschr. Kinderheilkd*. 1972;120: 106–110.

- Merrill AE, Bochukova EG, Brugger SM, Ishii M, Pilz DT, Wall SA, Lyons KM, Wilkie AO, Maxson RE Jr. Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin-Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis. *Hum Mol Genet.* 2006;15(8): 1319-28.
- Mishina Y, Snider TN. Neural crest cell signaling pathways critical to cranial bone development and pathology. *Exp Cell Res.* 2014;325(2): 138-47.
- Moodie SA, Wolfman A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* 1994;10(2): 44-8.
- Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res.* 2003;18: 1706–1715.
- Muenke M, Schell U: Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet.* 1995;11: 303–313.
- Nagaraja S, Anslow P, Winter B. Craniosynostosis. *Clin Radiol.* 2013;68: 284-92.
- Neben CL, Merrill AE. Signaling Pathways in Craniofacial Development: Insights from Rare Skeletal Disorders. *Curr Top Dev Biol.* 2015;115: 493-542.
- Nie X, Luukko K, Kettunen P. FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders. *Oral Dis.* 2006;12(2): 102-11.
- Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(7): 5330-8.
- Nur BG, Pehlivanoglu S, Mıhçı E, Çalışkan M, Demir D, Alper OM, Kayserili H, Lüleci G. Clinicogenetic study of Turkish patients with syndromic craniosynostosis and literature review. *Pediatr Neurol.* 2014;50: 482-490.
- Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 2017;169(6): 985-999.
- Oppenheimer AJ, Rhee ST, Goldstein SA, Buchman SR. Force-induced craniosynostosis via paracrine signaling in the murine sagittal suture. *J Craniofac Surg.* 2012;23:573–577.
- Opperman LA, Passarelli RW, Morgan EP, Reintjes M, Ogle RC. Cranial sutures require tissue interactions with dura mater to resist osseous obliteration in vitro. *J Bone Miner Res.* 1995; 10:1978 – 1987.

Opperman LA, Rawlins JT. The extracellular matrix environment in suture morphogenesis and growth. *Cells Tissues Organs*. 2005;181(3-4):127-35.

Opperman LA, Sweeney TM, Redmon J, Persing JA, Ogle RC. Tissue interactions with underlying dura mater inhibit osseous obliteration of developing cranial sutures. *Dev Dyn*. 1993; 198:312–322.

Opperman LA. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev. Dyn*. 2000;219: 472–485.

Ornitz D.M., and Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001;2(3): reviews 3005.1–reviews3005.12.

Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(3): 215-66.

Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Development*. 2015;29: 1463–1486.

Otto A. *Lehrbuch der pathologischen Anatomie*. Berlin. Germany: Rucher, 1830.

Oztarhan K, Gedikbasi A, Yildirim D, Arslan O, Adal E, Kavuncuoglu S, Ozbek S, Ceylan Y. Prevalence and distribution of congenital abnormalities in Turkey: differences between the prenatal and postnatal periods. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2010;50(4): 221-5.

Özler A, Baflaranoğlu S, Karaçor T, Tunç SY, Yaman Tunç N, Palancı Y, Evsen MS, Yalınkaya A. Tersiyer bir merkezde konjenital anomalili doğumların retrospektif analizi. *Perinatoloji Dergisi*. 2014;22(1): 13-17.

Pan H, Zhang H, Abraham P, Komatsu Y, Lyons K, Kaartinen V, Mishina Y. BmpR1A is a major type 1 BMP receptor for BMP-Smad signaling during skull development. *Dev Biol*. 2017;429(1): 260-270.

Panigrahi, I. Craniosynostosis genetics: The mystery unfolds. *Indian J Hum Genet*. 2011; 17:48–53.

Passos-Bueno MR, Serti Eacute AE, Jehee FS, Fanganiello R, Yeh E. Genetics of craniosynostosis: genes, syndromes, mutations and genotype-phenotype correlations. *Front Oral Biol*. 2008;12: 107-43.

Passos-Bueno MR, Fanganiello RD, Jehee FS. Craniosynostosis and chromosomal alterations. Muenke, M., Kress, W., Collmann,H., Solomon,B. (Eds.), *Craniosynostoses: Molecular Genetics, Principles of Diagnosis and Treatment*, Karger, Basel, 2011; 152-164.

Paumard-Hernández B, Berges-Soria J, Barroso E, et al. Expanding the mutation spectrum in 182 Spanish probands with craniosynostosis: identification and characterization of novel TCF12 variants. *Eur J Hum Genet.* 2015;23:907-914.

Penny LA, Dell'Aquila M, Jones MC, Bergoffen J, Cunnif C, Fryns JP, Grace E, Graham JM, Kouseff B, Mattina T, Syme J, Voullaire L, Zelante L, Zenger-Hain J, Jones OW, Evans GA: Clinical and molecular characterization of patients with distal 11q deletion. *Am J Hum Genet.* 1995;56: 676-683.

Percival C, Richtsmeier JT. The epigenetics of dysmorphology: craniosynostosis as an example. In: Hallgrímsson B, Hall BK, editors. *Epigenetics: Linking Genotype and Phenotype in Development and Evolution.* San Francisco: University of California Press, 2011; 377–397.

Plomin R, DeFries JC, Knopik VS, Neiderhiser JM. *Behavioral genetics.* 6<sup>th</sup> edition. New York: Worth Publishers. 2013.

Potter A, Rhodes J. Differential MicroRNA Expression in Patent and Synostotic Human Infant Calvarial Suture. *Plastic and Reconstructive Surgery,* 2011;128(4S):99.

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2000;7: 165–97.

Hill R, Jones P, Rees A, Sime C, Justice M, Copeland N, Jenkins N, Graham E, Davidson D. A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1 *Genes Dev.* 1989; 3: 26-37.

Regard JB, Zhong Z, Williams BO, Yang Y. Wnt signaling in bone development and disease: making stronger bone with Wnts. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12).

Røysamb E, Tambs K. The beauty, logic and limitations of twin studies. *Norsk Epidemiologi.* 2016;26: 35-46.

Sahar DE, Longaker MT, Quarto N. Sox9 neural crest determinant gene controls patterning and closure of the posterior frontal cranial suture. *Dev. Biol.* 2005; 280: 344–361

Sanchez-Lara PA, Carmichael SL, Graham Jr. JM, Lammer EJ, Shaw GM, Ma C, Rasmussen SA. Fetal constraint as a potential risk factor for craniosynostosis. *Am. J. Med. Genet. A.* 2010;152A: 394-400.

Schaefer L, Mihalik D, Babelova A, Krzyzankova M, Grone HJ, Iozzo RV, Young MF, Seidler DG, Lin G, Reinhardt DP, Schaefer RM. Regulation of fibronectin-1 by biglycan

and decorin is important for tissue preservation in the kidney during pressure-induced injury. *Am J Pathol.* 2004;165: 383–396.

Senarath-Yapa K, Chung MT, McArdle A, Wong VW, Quarto N, Longaker MT, Wan DC. Craniosynostosis: molecular pathways and future pharmacologic therapy. *Organogenesis.* 2012;8(4): 103-13.

Shahinian HK, Jaekle R, Suh RH, Jarrahy R, Aguilar VC, Soojian M. Obstetrical factors governing the etiopathogenesis of lambdoid synostosis. *Am J Perinatol.* 1998;15(5): 281-6.

Sharma VP, Fenwick AL, Brockop MS, McGowan SJ, Goos JA, Hooeboom AJ, Brady AF, Jeelani NO, Lynch SA, Mulliken JB, Murray DJ, Phipps JM, Sweeney E, Tomkins SE, Wilson LC, Bennett S, Cornall RJ, Broxholme J, Kanapin A; 500 Whole-Genome Sequences (WGS500) Consortium, Johnson D, Wall SA, van der Spek PJ, Mathijssen IM, Maxson RE, Twigg SR, Wilkie AO. Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat Genet.* 2013;45: 304–307.

Shashi V, Hart TC. Environmental Etiologies of Orofacial Clefting and Craniosynostosis, in *Understanding Craniofacial Anomalies* (eds M. P. Mooney and M. I. Siegel), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 2002.

Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6): 685–700.

Shiihara T, Kato M, Kimura T, Hayasaka K, Yamamori S, Ogata T. Craniosynostosis with extra copy of MSX2 in a patient with partial 5q-trisomy. *Am J Med Genet.* 2004;128A(2): 214–6.

Sood S, Eldadah ZA, Krause WL, McIntosh I, Dietz HC. Mutation in fibrillin-1 and the Marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. *Nat Genet.* 1996;12(2): 209-11.

Stamper BD, Park SS, Beyer RP, Bammler TK, Farin FM, Mecham B, Cunningham ML. Differential expression of extracellular matrix-mediated pathways in single-suture craniosynostosis. *PLoS One.* 2011;6(10): e26557.

Su N, Jin M, Chen L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Res.* 2014;2: 14003.

Swinkels ME, Simons A, Smeets DF, Vissers LE, Veltman JA, Pfundt R, de Vries BB, Faas BH, Schrandt-Stumpel CT, McCann E, Sweeney E, May P, Draaisma JM, Knoers NV, van Kessel AG, van Ravenswaaij-Arts CM. Clinical and cytogenetic

characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype. *Am J Med Genet A*. 2008;146A: 1430–1438.

Takahashi I, Onodera K, Sasano Y, Mizoguchi I, Bae JW, Mitani H, Kagayama M. Effect of stretching on gene expression of beta1 integrin and focal adhesion kinase and on chondrogenesis through cell-extracellular matrix interactions. *Eur J Cell Biol*. 2003;82: 182–192.

Temtamy S, Abdel Meguid N, Mazen I, Ismail SR, Kassem NS, Bassionui R. A genetic epidemiological study of malformations at birth in Egypt. *Eastern Mediterranean. Health Journal*. 1998;4: 252-9.

Teven CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis*. 2014;1(2):199-213.

Timberlake AT, Choi J, Zaidi S, Lu, Q., Nelson-Williams, C., Brooks, E.D., Bilguvar, K., Tikhonova, I., Mane, S., Yang, J.F., Sawh-Martinez, R., Persing, S., Zellner, E.G., Loring, E., Chuang, C., Galm, A., Hashim, P.W., Steinbacher, D.M., DiLuna, M.L., Duncan, C.C., Pelphrey, K. A., Zhao, H., Persing, J. A., Lifton, R.P. Two locus inheritance of non-syndromic midline craniosynostosis via rare SMAD6 and common BMP2 alleles. *Elife*, 2016;5: e20125.

Timberlake AT, Furey CG, Choi J, Nelson-Williams C; Yale Center for Genome Analysis, Loring E, Galm A, Kahle KT, Steinbacher DM, Larysz D, Persing JA, Lifton RP. De novo mutations in inhibitors of Wnt, BMP, and Ras/ERK signaling pathways in non-syndromic midline craniosynostosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(35): E7341-E7347.

Timberlake AT, Persing JA. Genetics of non-syndromic craniosynostosis. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2018;141(6): 1508–1516.

Ting MC, Wu NL, Roybal PG, Sun J, Liu L, Yen Y, Maxson RE Jr. EphA4 as an effector of Twist1 in the guidance of osteogenic precursor cells during calvarial bone growth and in craniosynostosis. *Development*. 2009;136(5): 855-64.

Tomatır AG, Demirhan H, Sorkun HC, Köksal A, Ozerdem F, Cilengir N. Major congenital anomalies: a five-year retrospective regional study in Turkey. *Genet Mol Res* 2009;8: 19-27.

Tubbs RS, Bosmia AN, Cohen-Gadol AA. The human calvaria: a review of embryology, anatomy, pathology, and molecular development. *Childs Nerv Syst*. 2012;28(1): 23-31.

Twigg SR, Vorgia E, McGowan SJ, Peraki I, Fenwick AL, Sharma VP, Allegra M, Zaragkoulias A, Sadighi Akha E, Knight SJ, Lord H, Lester T, Izatt L, Lampe AK,

Mohammed SN, Stewart FJ, Verloes A, Wilson LC, Healy C, Sharpe PT, Hammond P, Hughes J, Taylor S, Johnson D, Wall SA, Mavrothalassitis G, Wilkie AO. Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis. *Nat Genet.* 2013; 45:308–313.

Twigg SRF, Wilkie AOM. A genetic-pathophysiological framework for craniosynostosis. *Am J Hum Genet.* 2015;97: 359–377.

van der Meulen J. Metopic synostosis. *Childs Nerv Syst.* 2012; 28(9): 1359–1367.

Virchow R: Über den Cretinismus, namentlich in Franken, und über pathologische Schädelformen. *Verhandl Phys Med Ges Würzburg* 1851;2:230–270.

von Kriegsheim A, Baiocchi D, Birtwistle M, Sumpton D, Bienvenut W, Morrice N, Yamada K, Lamond A, Kalna G, Orton R, Gilbert D, Kolch W. Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(12):1458–64.

Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(3): 651–7.

Wang JC, Nagy L, Demke JC. Syndromic Craniosynostosis. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2016;24(4): 531–543.

Wang JC, Steinraths M, Dang L, Lomax B, Eydoux P, Stockley T, Yong SL, Van Allen MI. Craniosynostosis associated with distal 5q-trisomy: Further evidence that extra copy of MSX2 gene leads to craniosynostosis. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(24):2931–6.

Wang T, Xu Z. MiR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 402: 186–189.

Warren SM, Brunet LJ, Harland RM, Economides AN, Longaker MT. The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion. *Nature.* 2003;422(6932): 625–9.

Wilkie AO, Bochukova EG, Hansen RM, Taylor IB, Rannan-Eliya SV, Byren JC, Wall SA, Ramos L, Venâncio M, Hurst JA, O'rourke AW, Williams LJ, Seller A, Lester T. Clinical dividends from the molecular genetic diagnosis of craniosynostosis. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(16): 1941–9.

Wilkie AO, Tang Z, Elanko N, Walsh S, Twigg SR, Hurst JA, Wall SA, Chrzanowska KH, Maxson RE Jr. Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene MSX2 causes defects in skull ossification. *Nat Genet.* 2000;24(4): 387–90.

Wilkie AO. Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet.* 1997;6(10): 1647–56.

Wilkie AO, Byren JC, Hurst JA, Jayamohan J, Johnson D, Knight SJ, Lester T, Richards PG, Twigg SR, Wall SA. Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics*. 2010;126: 391 – 400.

Winograd JM, Im MJ, Vander Kolk CA. Osteoblastic and osteoclastic activation in coronal sutures undergoing fusion ex vivo. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100: 1103–1112.

Yen EH, Pollit DJ, Whyte WA, Suga DM. Continuous stressing of mouse interparietal suture fibroblasts in vitro. *J Dent Res*. 1990;69: 26–30.

Yilmaz E, Mihci E, Guzel Nur B, Alper OM. A novel AXIN2 gene mutation in sagittal synostosis. *Am J Med Genet Part A*. 2018;1–5.

Yu HM, Jerchow B, Sheu TJ, Liu B, Costantini F, Puzas JE, Birchmeier W, Hsu W. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development*. 2005;132(8): 1995–2005.

Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh JC, He X. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*. 2008;135(2): 367-75.

Zhao H, Feng J, Ho TV, Grimes W, Urata M, Chai Y. The suture provides a niche for mesenchymal stem cells of craniofacial bones. *Nat Cell Biol*. 2015;17(4): 386-96.

Zwijssen A, Verschueren K, Huylebroeck D. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett*. 2003;546(1): 133-9.



Tablo 1. Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
ACAN	15q26.1	7593	1386	81,7	42
ACP5	19p13.2	978	0	100	9
ACTB	7p22.1	1128	0	100	10
ACVR1	2q24.1	1530	0	100	13
ADAMTS10	19p13.2	3312	5	99,8	33
ADAMTS17	15q26.3	3288	35	98,9	28
ADAMTSL2	9q34.2	2856	0	100	31
AGA	4q34.3	1195	0	100	12
AGPS	2q31.2	1977	12	99,4	25
AHI1	6q23.3	3644	0	100	40
AKT1	14q32.33	1443	0	100	20
ALMS1	2p13.1	12504	0	100	82
ALPL	1p36.12	1663	0	100	16
ALX1	12q21.31	981	0	100	8
ALX3	1p13.3	1032	7	99,3	8
ALX4	11p11.2	1236	48	96,1	9
AMELX	Xp22.2	618	0	100	8
AMER1	Xq11.2	3408	0	100	19
AMPD2	1p13.3	2677	0	100	27
ANKH	5p15.2	1479	0	100	13
ANKRD11	16q24.3	7992	0	100	51
ANO5	11p14.3	2790	0	100	27
ANTXR1	2p13.3	1764	17	99	22
ANTXR2	4q21.21	1590	0	100	18
APC	5q22.2	8697	0	100	62
ARL13B	3q11.1-q11.2	1287	0	100	15
ARL6	3q11.2	561	0	100	8
ARSB	5q14.1	1631	0	100	15
ARSE	Xp22.33	1770	0	100	13
ASPH	8q12.3	2989	0	100	39
ATRX	Xq21.1	7485	6	99,9	65
ATXN10	22q13.31	1428	0	100	17
AXIN1	16p13.3	2589	0	100	19
AXIN2	17q24.1	2532	0	100	21
B3GALT6	1p36.33	990	185	81,3	4
B3GAT3	11q12.3	1008	0	100	8
B9D1	17p11.2	1025	0	100	10
BBS1	11q13.2	1782	0	100	22
BBS10	12q21.2	2172	0	100	12
BBS12	4q27	2133	0	100	12
BBS2	16q13	2166	0	100	18
BBS4	15q24.1	1560	0	100	18
BBS7	4q27	2153	0	100	29
BBS9	7p14.3	2664	0	100	32
BCOR	Xp11.4	5511	0	100	37
BLM	15q26.1	4254	0	100	37
BMP1	8p21.3	3047	86	97,2	29
BMP2	20p12.3	1191	0	100	7
BMPER	7p14.3	2058	0	100	19
BMPR1B	4q22.3	1742	73	95,8	13
BRAF	7q34	2301	5	99,8	25
BRCA2	13q13.1	10257	0	100	76
BRCC3	Xq28	954	0	100	11
BUB1B	15q15.1	3153	0	100	31
C21orf2	21q22.3	1131	8	99,3	12
C4orf26	4q21.1	1048	0	100	5
C5orf42	5p13.2	9594	1	100	94

**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
CA1	8q21.2	786	0	100	10
CA2	8q21.2	783	0	100	10
CANT1	17q25.3	1206	0	100	10
CASR	3q13.33-q21.1	3397	0	100	20
CBL	11q23.3	2721	0	100	23
CC2D2A	4p15.32	5058	72	98,6	49
CCBE1	18q21.32	1221	0	100	15
CCDC8	19q13.32	1617	0	100	9
CDC6	17q21.2	1683	0	100	15
CDH3	16q22.1	2490	0	100	22
CDT1	16q24.3	1641	0	100	17
CENPE	4q24	8109	0	100	79
CEP120	5q23.2	2961	25	99,2	31
CEP290	12q21.32	7452	202	97,3	82
CEP41	7q32.2	1190	0	100	13
CEP57	11q21	1521	0	100	16
CHRNA	2q37.1	1554	0	100	18
CHST14	15q15.1	1131	0	100	7
CHST3	10q22.1	1440	0	100	9
CHSY1	15q26.3	2409	236	90,2	13
CHUK	10q24.31	2238	0	100	24
CLCN5	Xp11.23	2735	0	100	19
CLCN7	16p13.3	2418	91	96,2	35
COG1	17q25.1	2943	0	100	22
COL10A1	6q22.1	2043	0	100	12
COL11A1	1p21.1	5580	0	100	93
COL11A2	6p21.32	5478	0	100	70
COL1A1	17q21.33	4395	11	99,7	56
COL1A2	7q21.3	4107	12	99,7	56
COL2A1	12q13.11	4470	6	99,9	60
COL9A1	6q13	2838	0	100	42
COL9A2	1p34.2	2070	6	99,7	34
COL9A3	20q13.33	2055	78	96,2	32
COLEC11	2p25.3	1161	0	100	12
COMP	19p13.11	2274	15	99,3	27
CREB3L1	11p11.2	1560	0	100	16
CREBBP	16p13.3	7335	131	98,2	58
CRIP1	2p21	306	0	100	6
CRTAP	3p22.3	1212	6	99,5	11
CSPP1	8q13.1-q13.2	3666	16	99,6	39
CTDP1	18q23	2953	122	95,9	25
CTSA	20q13.12	1497	0	100	17
CTSK	1q21.3	990	0	100	8
CUL7	6p21.1	5935	0	100	42
CYP26B1	2p13.2	1539	18	98,8	13
DDR2	1q23.3	2568	0	100	22
DDX11	12p11.21	2918	0	100	33
DDX59	1q32.1	1860	0	100	14
DHCR24	1p32.3	1551	0	100	12
DHCR7	11q13.4	1428	0	100	12
DHODH	19q22.2	1188	0	100	13
DIS3L2	2q37.1	3194	0	100	29
DLL3	19q13.2	1948	18	99,1	19
DLX3	17q21.33	864	0	100	7
DLX5	7q21.3	870	0	100	6
DMP1	4q22.1	1542	0	100	13
DNA2	10q21.3	3183	6	99,8	29

**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
DNAAF1	16q24.1	2178	0	100	18
DNAAF2	14q21.3	2514	0	100	15
DNAH11	7p15.3	13551	7	99,9	123
DNAH5	5p15.2	13875	0	100	125
DNAI1	9p13.3	2112	0	100	21
DNAI2	17q25.1	1818	0	100	18
DSPP	4q22.1	3906	1707	56,3	14
DYM	18q21.1	2010	0	100	22
DYNC2H1	11q22.3	12945	3	100	152
EBP	Xp11.23	693	0	100	6
ECEL1	2q37.1	2328	0	100	27
EDA	Xq13.1	1239	2	99,8	13
EFNB1	Xq13.1	1041	0	100	9
EFTUD2	17q21.31	2955	0	100	29
EIF2AK3	2p11.2	3351	96	97,1	29
EMG1	12p13.31	733	0	100	6
ENAM	4q13.3	3429	0	100	23
ENPP1	6q23.2	2778	157	94,3	31
EP300	22q13.2	7245	0	100	57
ERCC1	19q13.32	1092	0	100	11
ERCC5	13q33.1	3561	0	100	30
ERCC6	10q11.23	4482	0	100	35
ERCC8	5q12.1	1197	0	100	18
ERF	19q13.2	1647	0	100	12
ESCO2	8p21.1	1812	0	100	19
EVC	4p16.2	2985	140	95,3	29
EVC2	4p16.2	3970	67	98,3	33
EXOC4	7q33	2930	0	100	26
EXOC8	1q42.2	2178	0	100	13
EXT1	8q24.11	2241	0	100	17
EXT2	11p11.2	2954	0	100	20
EYA1	8q13.3	1933	0	100	21
EZH2	7q36.1	2522	0	100	22
FAM20A	17q24.2	1801	9	99,5	14
FAM20C	7p22.3	1755	39	97,8	18
FAM58A	Xq28	775	0	100	6
FAM83H	8q24.3	3540	117	96,7	23
FBLN1	22q13.31	2580	83	96,8	23
FBN1	15q21.1	8622	0	100	86
FBN2	5q23.3	8739	0	100	86
FBXW4	10q24.32	1239	12	99	11
FERMT3	11q13.1	2129	103	95,2	21
FGD1	Xp11.22	2886	0	100	26
FGF10	5p12	627	0	100	6
FGF23	12p13.32	756	0	100	7
FGF8	10q24.32	908	32	96,5	7
FGF9	13q12.11	627	0	100	6
FGFR1	8p11.23	3007	0	100	24
FGFR2	10q26.13	2907	0	100	24
FGFR3	4p16.3	2572	84	96,7	28
FKBP10	17q21.2	1749	0	100	15
FLNA	Xq28	7944	27	99,7	71
FLNB	3p14.3	7941	188	97,6	63
FMN1	15q13.3	5756	23	99,6	44
FOXP1	14q12	1470	272	81,5	8
FRAS1	4q21.21	12114	0	100	94
FREM1	9p22.3	7005	0	100	59

**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
FREM2	13q13.3	9510	0	100	68
FUCA1	1p36.11	1401	0	100	12
GALNS	16q24.3	1569	120	92,4	14
GALNT3	2q24.3	1902	0	100	19
GDF5	20q11.22	1506	0	100	10
GDF6	8q22.1	1368	0	100	9
GHR	5p13.1-p1	1938	0	100	16
GJA1	6q22.31	1149	0	100	6
GLB1	3p22.3	2189	4	99,8	18
GLE1	9q34.11	2202	17	99,2	21
GLI3	7p14.1	4743	29	99,4	31
GLIS2	16p13.3	1575	0	100	12
GNAI3	1p13.3	1065	0	100	9
GNAS	20q13.32	5930	139	97,7	30
GNPAT	1q42.2	2043	0	100	21
GNPTAB	12q23.2	3771	5	99,9	33
GNPTG	16p13.3	924	15	98,4	10
GNS	12q14.3	1659	0	100	17
GORAB	1q24.2	1330	0	100	10
GPC6	13q31.3-q32.1	1668	0	100	15
GREM1	15q13.3	1014	0	100	4
GRHL3	1p36.11	2028	0	100	23
GRIP1	12q14.3	3231	0	100	28
GUSB	7q11.21	1956	0	100	17
HDAC4	2q37.3	3255	0	100	32
HDAC6	Xp11.23	3648	0	100	34
HDAC8	Xq13.1	1354	0	100	14
HES7	17p13.1	1145	108	90,6	8
HGSNAT	8p11.21-p11.1	1908	118	93,8	19
HOXA11	7p15.2	942	0	100	7
HOXA13	7p15.2	1167	24	97,9	7
HOXD13	2q31.1	1032	67	93,5	7
HPGD	4q34.1	909	0	100	10
HRAS	11p15.5	633	0	100	7
HSPG2	1p36.12	13182	550	95,8	131
ICK	6p12.1	1899	0	100	18
IDH1	2q34	1245	0	100	10
IDH2	15q26.1	1359	15	98,9	16
IDS	Xq28	1839	0	100	17
IDUA	4p16.3	1968	239	87,9	22
IFITM5	11p15.5	399	0	100	4
IFT122	3q21.3-q22.1	3977	0	100	36
IFT140	16p13.3	4389	0	100	37
IFT172	2p23.3	5250	0	100	58
IFT43	14q24.3	849	0	100	10
IFT80	3q25.33	2362	0	100	31
IGF1	12q23.2	663	0	100	7
IHH	2q35	1236	45	96,4	8
IKBKG	Xq28	1651	890	46,1	5
IL11RA	9p13.3	1269	0	100	13
IL1RN	2q14.1	673	0	100	8
INPPE	9q34.3	1935	0	100	17
INPPL1	11q13.4	3777	137	96,4	37
INTU	4q28.1	2829	0	100	28
INVS	9q31.1	3198	0	100	31
IQCB1	3q13.33; 3q21.1	1797	0	100	19
IRF6	1q32.2	1522	0	100	12

**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
IRX5	16q12.2	2246	34	98,5	10
JAG1	20p12.2	3657	0	100	36
KAT6B	10q22.2	6661	0	100	41
KCNJ2	17q24.3	1284	0	100	7
KCNK9	8q24.3	1125	0	100	7
KCNQ1OT1	11p15.5	91671	46025	49,8	255
KDM6A	Xp11.3	4206	0	100	44
KIAA1279	10q22.1	1866	22	98,8	15
KIF14	1q32.1	4947	0	100	45
KIF22	16p11.2	2060	0	100	16
KIF3A	5q31.1	2100	0	100	23
KIF7	15q26.1	4032	29	99,3	33
KLK4	19q13.41	765	0	100	7
KRAS	12p12.1	687	0	100	7
LARP7	4q25	1972	19	99	18
LBR	1q42.12	1848	31	98,3	19
LEMD3	12q14.3	2771	17	99,4	25
LEPRE1	1p34.2	2892	0	100	24
LFNG	7p22.3	1417	213	85	15
LIFR	5p13.1	3294	0	100	33
LMBR1	7q36.3	1473	0	100	19
LMNA	1q22	2219	90	95,9	19
LMX1B	9q33.3	1453	52	96,4	14
LPIN2	18p11.31	2691	0	100	24
LRIG2	1p13.2	3198	126	96,1	28
LRP2	2q31.1	13968	18	99,9	116
LRP4	11p11.2	5718	14	99,8	48
LRP5	11q13.2	4848	103	97,9	44
LTBP3	11q13.1	4222	84	98	36
MAFB	20q12	972	0	100	6
MAN2B1	19p13.13	3116	0	100	28
MAN2C1	15q24.2	3447	0	100	34
MAP2K1	15q22.31	1182	0	100	13
MAP2K2	19p13.3	1203	3	99,8	14
MASPI	3q27.3	3037	0	100	26
MATN3	2p24.1	1461	45	96,9	11
MBD5	2q23.1	4485	0	100	28
MED12	Xq13.1	6534	0	100	63
MED17	11q21	1956	0	100	19
MEGF8	19q13.2	8538	293	96,6	69
MEOX1	17q21.31	975	0	100	7
MESP2	15q26.1	1194	148	87,6	7
MGAT2	14q21.3	1344	0	100	7
MGP	12p12.3	387	0	100	5
MID1	Xp22.2	3077	19	99,4	17
MIR17HG	13q31.3	5805	479	91,7	26
MKKS	20p12.2	1713	0	100	11
MKS1	17q22	1730	0	100	19
MLL	11q23.3	12033	260	97,8	80
MLL2	12q13.12	16614	0	100	122
MMP13	11q22.2	1416	121	91,5	13
MMP2	16q12.2	1986	6	99,7	19
MMP20	11q22.2	1452	12	99,2	13
MMP9	20q13.12	2124	0	100	18
MNX1	7q36.3	1261	415	67,1	7
MRE11A	11q21	2127	0	100	26
MSMO1	4q32.3	882	0	100	7

**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
MSX1	4p16.2	912	5	99,5	7
MSX2	5q35.2	804	0	100	6
MYBPC1	12q23.2	3671	0	100	40
MYCN	2p24.3	1395	16	98,9	10
MYH3	17p13.1	5823	0	100	51
MYH8	17p13.1	5814	0	100	54
MYO18B	22q12.1	7704	0	100	59
NAGLU	17q21.2	2232	155	93,1	15
NBN	8q21.3	2265	0	100	23
NDEL1	17p13.1	1073	0	100	10
NEK1	4q33	3861	0	100	44
NEU1	6p21.33	1248	0	100	10
NF1	17q11.2	8709	40	99,5	99
NFIX	19p13.13	1635	27	98,3	16
NHS	Xp22.2-p22.13	4990	0	100	30
NIPBL	5p13.2	8655	20	99,8	80
NKX3-2	4p15.33	1002	0	100	8
NLRP3	1q44	3388	0	100	20
NME8	7p14.1	1767	0	100	22
NOG	17q22	699	0	100	4
NOTCH2	1p12	7602	7	99,9	54
NPHP1	2q13	2202	0	100	25
NPHP3	3q22.1	3993	0	100	40
NPHP4	1p36.31	4281	0	100	36
NPR2	9p13.3	3144	0	100	31
NRAS	1p13.2	570	0	100	5
NRXN1	2p16.3	4927	0	100	45
NSD1	5q35.3	8211	0	100	55
NSDHL	Xq28	1122	0	100	8
NT5E	6q14.3	1725	0	100	15
OBSL1	2q35	6112	233	96,2	44
OFD1	Xp22.2	3045	11	99,6	35
OPHN1	Xq12	2409	0	100	25
ORC1	1p32.3	2586	0	100	20
ORC4	2q23.1	1311	0	100	17
ORC6	16q11.2	759	0	100	9
OSTM1	6q21	1005	43	95,7	9
PAPSS2	10q23.2-q23.31	1860	23	98,8	16
PAX1	20p11.22	1615	0	100	12
PAX3	2q36.1	2238	0	100	18
PAX6	11p13	1311	26	98	13
PAX9	14q13.3	1032	0	100	9
PCNT	21q22.3	10011	125	98,8	92
PDE4D	5q11.2-q12.1	3478	28	99,2	35
PEX1	7q21.2	3852	0	100	38
PEX10	1p36.32	1217	0	100	10
PEX11B	1q21.1	794	0	100	8
PEX12	17q12	1080	0	100	8
PEX13	2p15	1212	0	100	9
PEX14	1p36.22	1134	0	100	13
PEX16	11p11.2	1100	0	100	15
PEX19	1q23.2	924	0	100	10
PEX2	8q21.13	918	0	100	6
PEX26	22q11.21	918	0	100	8
PEX3	6q24.2	1122	0	100	14
PEX5	12p13.31	2208	0	100	18
PEX6	6p21.1	2943	98	96,7	24

**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
PEX7	6q23.3	972	0	100	13
PGAP2	11p15.4	2065	1	100	12
PGAP3	17q12	963	0	100	10
PHEX	Xp22.11	2262	0	100	26
PHF6	Xq26.2	1475	0	100	13
PHGDH	1p12	1602	0	100	13
PIEZO2	18p11.22-p11.21	8259	0	100	73
PIGL	17p11.2	759	0	100	8
PIGO	9p13.3	3270	0	100	25
PIGV	1p36.11	1482	0	100	9
PITX1	5q31.1	945	0	100	8
PKD1	16p13.3	12912	820	93,6	93
PKD2	4q22.1	2907	0	100	23
PKHD1	6p12.3-p12.2	12260	0	100	102
PLCB4	20p12.3-p12.2	3690	17	99,5	41
PLEKHM1	17q21.31	3171	128	96	26
PLIN1	15q26.1	1569	0	100	15
PLK4	4q28.1	2913	0	100	27
PLOD2	3q24	2277	0	100	29
POC1A	3p21.2	1385	0	100	12
POLD1	19q13.33	3324	0	100	34
POLE	12q24.33	6861	0	100	64
POLR1C	6p21.1	1041	0	100	11
POLR1D	13q12.2	762	0	100	9
POR	7q11.23	2043	0	100	23
PPIB	15q22.31	651	6	99,1	7
PPP1R3B	8p23.1	858	0	100	5
PQBP1	Xp11.23	1045	0	100	9
PRG4	1q31.1	4215	46	98,9	30
PRKAR1A	17q24.2	1193	41	96,6	13
PRRX1	1q24.2	793	0	100	6
PTDSS1	8q22.1	1422	0	100	14
PTH1R	3p21.31	1782	12	99,3	19
PTHLH	12p11.22	961	0	100	6
PTPN11	12q24.13	1941	14	99,3	17
PVRL1	11q23.3	1984	0	100	17
PYCR1	17q25.3	1114	0	100	11
RAB23	6p12.1-p11.2	714	0	100	9
RAB33B	4q31.1	690	0	100	5
RAB3GAP2	1q41	4182	0	100	48
RAD21	8q24.11	1896	12	99,4	20
RAF1	3p25.2	1947	0	100	18
RAI1	17p11.2	5721	112	98	37
RASGRP2	11q13.1	1830	0	100	23
RBBP8	18q11.2	2701	0	100	30
RECQL4	8q24.3	3627	159	95,6	32
RIPK4	21q22.3	2355	0	100	18
RMRP	9p13.3	268	0	100	2
RNF135	17q11.2	1391	14	99	11
RNF168	3q29	1716	0	100	13
ROR2	9q22.31	2832	0	100	20
RPGRIP1L	16q12.2	3948	138	96,5	41
RPS6KA3	RPS6KA3	2223	0	100	24
RSPH4A	6q22.1	2151	0	100	15
RSPH9	6p21.1	966	0	100	8
RUNX2	6p21.1	1947	24	98,8	13
SALL1	16q12.1	7222	0	100	23

**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
SALL4	20q13.2	3162	0	100	19
SATB2	2q33.1	2202	0	100	17
SBDS	7q11.21	753	0	100	9
SCARF2	22q11.21	2729	194	92,9	21
SCLT1	4q28.2	2067	0	100	29
SDCCAG8	1q43-q44	2142	0	100	25
SEC23A	14q21.1	2298	0	100	28
SERPINF1	17p13.3	1257	0	100	11
SERPINH1	11q13.5	1257	0	100	9
SETBP1	18q12.3	4980	18	99,6	31
SF3B4	1q21.2	1275	0	100	11
SGSH	17q25.3	1509	0	100	16
SH3BP2	4p16.3	2073	167	91,9	19
SH3PXD2B	5q35.1	2736	75	97,3	21
SHFM1	7q21.3	213	0	100	4
SHH	7q36.3	1389	48	96,5	10
SHOC2	10q25.2	1749	0	100	15
SHOX	Xp22.33; Yp11.2	1848	90	95,1	22
SIX1	14q23.1	855	0	100	6
SLC16A2	Xq13.2	1620	0	100	12
SLC17A5	6q13	1488	0	100	18
SLC24A4	14q32.12	2004	13	99,4	18
SLC26A2	5q32	2220	0	100	13
SLC34A3	9q34.3	1800	4	99,8	17
SLC35D1	1p31.3	1068	0	100	17
SLC39A13	11p11.2	1216	0	100	11
SLC3A1	2p21	2058	0	100	16
SLCO2A1	3q22.1-q22.2	1932	7	99,6	18
SLCO5A1	8q13.3	2587	0	100	19
SMARCAL1	2q35	2865	0	100	24
SMC1A	Xp11.22	3702	0	100	32
SMC3	10q25.2	3654	13	99,6	41
SMOC2	6q27	1425	84	94,1	14
SNAP29	22q11.21	777	0	100	7
SNX10	7p15.2	621	0	100	7
SOS1	2p22.1	4002	5	99,9	38
SOST	17q21.31	642	17	97,4	5
SOX9	17q24.3	1530	28	98,2	10
SP7	12q13.13	1296	0	100	10
SPECC1L	22q11.23	3379	0	100	30
SQSTM1	5q35.3	1372	0	100	11
STAT3	17q21.2	2548	84	96,7	26
SULF1	8q13.2-q13.3	2616	0	100	26
SUMF1	3p26.1	1125	34	97	10
SUMO1	2q33.1	306	0	100	6
TBC1D32	6q22.31	3774	0	100	43
TBCE	1q42.3	1584	0	100	18
TBX15	1p12	1491	0	100	11
TBX2	17q23.2	2139	2	99,9	18
TBX22	Xq21.1	1661	0	100	14
TBX3	12q24.21	2232	29	98,7	17
TBX4	17q23.2	1638	0	100	13
TBX5	12q24.21	1649	0	100	13
TBX6	16p11.2	1311	0	100	14
TBXAS1	7q34	1794	0	100	17
TCF12	15q21.3	2190	0	100	27
TCF4	18q21.2	3296	61	98,1	27



**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
TCIRG1	11q13.2	2558	0	100	25
TCOF1	5q32-q33.1	4571	0	100	39
TCTEX1D2	3q29	429	0	100	5
TCTN1	12q24.11	1939	0	100	20
TCTN2	12q24.31	2094	0	100	22
TCTN3	10q24.1	1824	0	100	17
TFAP2A	6p24.3	1374	0	100	13
TFAP2B	6p12.3	1383	0	100	13
TGFB1	19q13.2	1173	0	100	11
TGFBR1	9q22.33	1512	97	93,6	15
TGFBR2	3p24.1	1779	48	97,3	13
THPO	3q27.1	2280	0	100	8
TMCO1	1q24.1	953	0	100	10
TMEM138	11q12.2	489	0	100	5
TMEM216	11q12.2	447	0	100	5
TMEM231	16q23.1	1110	0	100	9
TMEM237	2q33.1	1245	0	100	18
TMEM38B	9q31.2	876	0	100	9
TMEM67	8q22.1	3151	50	98,4	38
TNFRSF11A	18q21.33	1860	75	96	15
TNFRSF11B	8q24.12	1206	0	100	9
TNFSF11	13q14.11	954	2	99,8	8
TNNI2	11p15.5	564	0	100	7
TNNT3	11p15.5	851	0	100	19
TP63	3q28	2216	0	100	21
TPM2	9p13.3	1014	0	100	13
TRAPPC2	Xp22.2	618	0	100	6
TREM2	6p21.1	871	0	100	8
TRIM32	9q33.1	1962	0	100	11
TRIP11	14q32.12	5940	20	99,7	50
TRPS1	8q23.3	3885	0	100	23
TRPV4	12q24.11	2900	0	100	22
TTC21A	3p22.2	3966	0	100	34
TTC21B	2q24.3	3951	24	99,4	44
TTC8	14q31.3	1656	0	100	20
TUBGCP6	22q13.33	5460	0	100	45
TWIST1	7p21.1	609	28	95,4	3
TYROBP	19q13.12	386	0	100	5
UBE2A	Xq24	475	0	100	7
UBE3B	12q24.11	3312	121	96,3	29
UBR1	15q15.2	5250	58	98,9	55
VIPAS39	14q24.3	1482	0	100	21
WDPCP	2p15	2241	0	100	25
WDR19	4p14	4029	24	99,4	42
WDR34	9q34.11	1611	0	100	15
WDR35	2p24.1	3546	13	99,6	36
WDR72	15q21.3	3415	106	96,9	34
WISP3	6q21	1173	6	99,5	9
WNT1	12q13.12	1113	0	100	11
WNT10B	12q13.12	1170	0	100	10
WNT3	17q21.31-q21.32	1068	0	100	10
WNT5A	3p14.3	1238	0	100	9
WNT7A	3p25.1	1050	2	99,8	8
WRN	8p12	4299	0	100	49
XPBPEP3	22q13.2	1628	9	99,4	13
XRCC4	5q14.2	1011	0	100	10
ZBTB16	11q23.2	2022	0	100	14

**Tablo 1.** Dismorfoloji ve Displazi Araştırma Gen Paneli (devamı)

Gen Adı	Kromozomal Lokasyon	Hedef bölge (bp)	Kaçan Bölge (bp)	Kapsadığı (%)	Amplikon sayısı
ZBTB20	3q13.31	2226	0	100	14
ZBTB24	6q21	3096	0	100	14
ZBTB42	14q32.33	1269	0	100	7
ZMPSTE24	1p34.2	1428	0	100	12
ZNF423	16q12.1	3855	0	100	26
ZSWIM6	5q12.1	3648	225	93,8	27



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	ELANUR	<b>Uyruğu</b>	T.C.
<b>Soyadı</b>	YILMAZ	<b>Tel no</b>	05379302315
<b>Doğum tarihi</b>	26.10.1985	<b>e-posta</b>	elanuryilmaz@yahoo.com

### Eğitim Bilgileri

	<b>Mezun olduğu kurum</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Lise</b>	Ankara Atatürk Lisesi	2004
<b>Lisans</b>	Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2009
<b>Yüksek Lisans</b>	Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2012
<b>Doktora</b>	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik	2018

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (yıl-yıl)</b>
<b>Araştırma Görevlisi</b>	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD	2013-2018

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Sınav türü</b>	<b>Puanı</b>
<b>İngilizce</b>	YDS	78,75
<b>İngilizce</b>	YÖKDİL	97,50

### Proje Deneyimi

<b>Proje Adı</b>	<b>Destekleyen kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
Primer Siliyer Diskinezili Türk Olgularda Hastalıkla İlişkili Genetik Profilin Belirlenmesi ve Fenotiple İlişkisinin Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu	2018- devam ediyor
Genetic Studies of Deafness	University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL, USA	2017-devam ediyor
Mülleryan A plazili Türk Olgularda Aday Gen Haritalama Çalışmaları.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu	2011-2015

### Burslar-Ödüller:

Ekim 2015 – Mart 2016: Erasmus+ Programı Staj Hareketliliği

## **Uluslararası Yayınlar:**

**Yilmaz, E.**, Mihci, E., Nur, B., Alper, O.M. 2018. A Novel AXIN2 Gene Mutation in Sagittal Synostosis. *Am J Med Genet Part A*. 2018; 176(9):1976-1980.

Bademci, G., Abad, C., Incesulu, A., Rad, A., Alper, O., Kolb, S.M., Cengiz, F.B., Diaz-Horta, O., Silan, F., Mihci, E., Ocak, E., Najafi, M., Maroofian, R., **Yilmaz, E.**, Guzel Nur, B., Duman, D., Guo, S., Sant, D.W., Wang, G., Monje, P.V., Haaf, T., Blanton, S.H., Vona, B., Walz, K., Tekin, M. MPZL2 is a novel gene associated with autosomal recessive nonsyndromic moderate hearing loss. *Hum Genet*. 2018; 137(6-7):479-486.

Demir Eksi, D., Shen, Y., Erman, M., Chorich, L., Sullivan, M., Bilekdemir, A.M., **Yilmaz, E.**, Luleci, G., Kim, H-G., Alper, O., Layman, L.C. 2018. Copy number variation and regions of homozygosity analysis in patients with Mullerian aplasia. *Molecular Cytogenetics*; 2018; 11:13.

**Yilmaz, E.**, Mihci, E., Nur, B., Alper, O.M., Tacoy, S. 2018. Recent advances in Craniosynostosis (under review)

**Yilmaz, E.**, Nur, B., Mihci, E., Alper, O.M. 2018. TCF12 Gene Mutations in Turkish Patients with Coronal Suture Craniosynostosis (under review).

Toru, H.S., Guzel Nur, B., Sanhal, C.Y., Mihci, E., Mendilcioglu, I, **Yilmaz, E.**, Tasova Yilmaz, G., Ozbudak, I.H., Karaali, K., Alper, O.M., Karaveli, F.S. 2015. Perinatal Diagnostic Approach To Fetal Skeletal Dysplasias: Six Years Experience Of A Tertiary Centre. *Fetal & Pediatric Pathology*; 2015;34(5):287-306.

Beköz, A.B., Beköz, S., **Yilmaz, E.**, Tüzün, S., Beköz, U. 2013. Consequences of the increasing prevalence of the poisonous Lagocephalus sceleratus in Southern Turkey. *Emerg. Med. J.*; 30(11):954-5.

## **Bildiriler:**

Demir Ekşi, D., **Yilmaz, E.**, Akin, Y., Usta, M.F., Başar, M.M., Kahraman, S., Erman Akar, M., Alper, O. M. “CNV Analysis of Turkish Patients with Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens: Detection of a Potential Candidate Gene” The European Human Genetics Conference, Copenhagen, Denmark. 2017. (Poster)

**Yilmaz, E.**, Basaran, E., Ertosun, M. G., Bingol, A., Karadag, B., Mihci, E., Alper, O. M. “Disease-targeted sequencing: CFTR gene targeted exome sequencing in Turkish cystic fibrosis patients with a novel mutation” The European Human Genetics Conference, Copenhagen, Denmark. 2017. (Poster)

**Yılmaz, E.**, Nur, B., Mıhçı, E., Alper.O.M. “Nadir bir olgu olarak Pfeiffer Sendromu” XII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İzmir, Türkiye. 2016. (Poster)

Arts,P., Simons, A., **Yılmaz, E.**, Al-Zharani, M., Mensenkamp, A., van Zelst-Stams, W., Van Deuren, M., Simon, A., Gilissen , C., Veltman, J.A., van de Veerdonk, F., Faqeih, E.A., Netea, M.G. , Hoischen, A. “Exome sequencing of 205 patients with primary immunodeficiencies: translational genomics with direct clinical implications”. The 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2016), Barcelona, Spain. 2016. (Poster)

Arts, P., Simons, A., **Yılmaz, E.**, Mensenkamp, A., van Zelst-Stams, W., Veltman, J.A., van de Veerdonk, F., Hoischen, A., Netea, M.G. “Exome sequencing of 175 patients with primary immunodeficiencies; translational genomics with direct clinical implications”. The European Human Genetics Conference (ESHGC). 2016. (Poster)

Bingol, A., Ertosun, M.G., Artan, R., Yilmaz, A., Mihci, E., Guzel, B.N., Erman Akar, M., Mendilcioglu, I., Simsek, M., Demir, D., Pehlivanoglu, S., **Yılmaz, E.**, Alper, O.M. “Cystic fibrosis transmembrane regulator mutations in Turkish patients with cystic fibrosis”. 37th European Cystic Fibrosis Conference. 2014. (Poster)

#### **Ulusal Yayınlar:**

Özbey,G., **Yılmaz, E.**, Dalaklıoğlu, S., Alper, O. 2017. Hipertansiyonda Vitamin D ile İlişkili Genetik Polimorfizmlerin Rolü. MN Kardiyoloji; 24(1):42-49.

**Yılmaz, E.** Gen Düzenlemenin Altın Çağı: CRISPR Sistemi. 2017. Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi, Nisan sayısı, s.60-65.

**Yılmaz, E.** Besin Savaşları. 2017. Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi, Şubat sayısı sayısı, s.66-74.

**Yılmaz E.** Laboratuvarların Yıldızı: Zebra Balıkları. 2015. Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi, Kasım sayısı, s.80-82.