

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

**KONJENİTAL KALP HASTALIKLARINDA MLPA
KULLANILARAK GEN KOPYA SAYISI VARYASYONLARININ
ANALİZ EDİLMESİ**

Dr. Esra Tuba MUTLU

**Genetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2016**

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

**KONJENİTAL KALP HASTALIKLARINDA MLPA
KULLANILARAK GEN KOPYA SAYISI VARYASYONLARININ
ANALİZ EDİLMESİ**

Dr. Esra Tuba MUTLU

**Genetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Osman Koray BODUROĞLU**

**ANKARA
2016**

Anabilim Dalı : **Pediyatrik Temel Bilimler Ana Bilim Dalı**
 Program : **Genetik Doktora Programı**
 Tez Başığı : **Konjenital Kalp Hastalıklarında MLPA Kullanılarak Gen Kopya Sayısı Varyasyonlarının Analiz Edilmesi**

Öğrenci Adı-Soyadı : **Dr.Esra Tuba MUTLU**
 Savunma Sınavı Tarihi : **08.06.2016**

Bu alışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve Tez Danışmanı : **Prof.Dr.Koray BODUROğLU**

Hacettepe Üniversitesi

(İmza)

Üye: **Prof.Dr.Fatih Süheyl EZGÜ**

Gazi Üniversitesi

(İmza)

Üye: **Prof.Dr.Zerrin Yılmaz ÇELİK**

Başkent Üniversitesi

(İmza)

Üye: **Prof.Dr.Gülen Eda UTİNE**

Hacettepe Üniversitesi

(İmza)

Üye: **Doç.Dr.Pelin Özlem şİMşEK**

KİPER

Hacettepe Üniversitesi

(İmza)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görölmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(İmza)

Prof.Dr. Diclehan ORHAN

Müdür

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Osman Koray BODUROĞLU başta olmak üzere, Genetik Bilim Dalı'nda desteklerini benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mehmet ALİKAŞİFOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Dilek AKTAŞ'a, Sayın Prof. Dr. Gülen Eda UTİNE'ye, Sayın Doç. Dr. Pelin Özlem ŞİMŞEK KİPER'e, Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı'nda bu doktora tezinin gerçekleştirilmesi sürecinde bana her konuda destek olan Sayın Prof. Dr. Tevfik KARAGÖZ'e, Sayın Uzm. Dr. Hakan AYKAN'a ve Tez İzleme Komitesi olarak çalışmamı yönlendiren Sayın Prof. Dr. Fatih Süheyl EZGÜ'ye, bu süreçte kaybettiğimiz Sayın Prof. Dr. Murat Derbent'e ve Genetik Laboratuvarında deneylerin yapılması ve sonuçların elde edilmesinde değerli katkıları olan Sayın Biyolog Serkan KABAÇAM'a, tüm Genetik Laboratuvarı çalışanlarına ve tüm Pediatrik Genetik Bilim Dalı çalışanlarına ve genetik bilimine olan sevgimi anlayan, her zaman destek olan çok sevgili aileme; bana gösterdikleri anlayış, inanç, sevgi ve destek için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Mutlu, E. Tuba, Konjenital kalp hastalıklarında MLPA kullanılarak gen kopya sayısı varyasyonlarının analiz edilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Doktora Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2016. Konjenital Kalp Hastalıkları (KKH); kalpte doğumda var olan yapısal veya fonksiyonel anomalilerdir. Enfeksiyöz etiyolojilerden sonra KKH'ı infant mortalitesine en çok sebep olan durumdur. Klinik önemine rağmen KKH'nın etyopatogenezi hakkında bilgimiz azdır. Embriyolojik dönemde kalp gelişimi sırasında moleküler ve hücresel düzeyde bir çok genetik faktör birbiriyle ilişki halinde bulunmaktadır. Bu faktörler arasında transkripsiyon düzenleyicileri, sinyalizasyon yolları ve kromatin yeniden düzenlenmesi örnek olarak verilebilir. Konjenital kalp hastaları arasında son yapılan çalışmalar, bu hastaların önemli bir kısmında reküren kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) bulunduğunu göstermiştir. Bu kopya sayısı değişiklikleri içerdikleri gen/genlere göre kalp dışında diğer önemli organları da etkileyebilmektedir. Bu tür hastalarda konjenital kalp hastalıkları sıklıkla ilk görülen bulgu olabildiği için, kardiyoloji kliniğine başvuran bu hastalarda; KKH'ları ile ilişkili gen/genleri içeren genomik bölgelerin kopya sayısı değişikliklerinin araştırılması ile erken tanı ve ekstrakardiyak semptomların tedavisi mümkün olmaktadır. Bu çalışmada kardiyak septal defekt saptanan, görünüşte non-sendromik olan 45 hastada, MLPA kiti kullanılarak GATA4, NKX2-5, TBX5, BMP4, CRELD1 genlerini içeren genomik bölgelerdeki kopya sayısı değişikliklerini araştırmak ve 22q11.2 kromozomal bölgesini analiz etmek hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda 45 hasta klinik olarak değerlendirilmiş ve genetik analiz sonrası üç kopya sayısı değişikliği tespit edilmiştir (n=3/45, %6.6). MLPA analizi ile üç hastada erken sendrom tanısı mümkün olmuştur. Çalışmamız; reküren CNV'lerin pediatrik kardiyoloji kliniklerinde MLPA ile araştırılmasının non-sendromik konjenital kalp hastalarında, erken sendrom tanı imkanı yaratabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: konjenital kalp hastalıkları, KKH; kardiyak septal defekt, ASD, VSD, AVSD; çoklu ligasyon-bağımlı prob amplifikasyonu, MLPA; kopya sayısı değişiklikleri, CNVler; 22q11 delesyon sendromu, 22q11DS.

Destekleyen Kurumlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP 6080 Proje ID: 1572).

ABSTRACT

Mutlu, E. Tuba, Analysis of gene copy number variations in patients with congenital heart diseases by using MLPA. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Genetics, Ankara, 2016. Congenital heart disease (CHD) refers to abnormalities in the heart's structure or function that arise before birth. Congenital heart defects are the leading non-infectious cause of mortality in newborns. Despite their clinical importance, little is known about the etiopathogenesis of CHD. Within embryogenesis the human heart undergoes several stages of development. At the molecular and cellular levels, heart development entails precise orchestration of genetic events such as the interplay of master transcriptional regulators, signaling pathways and chromatin remodeling. Recent studies among CHD patients have shown the importance of recurrent copy number variations (CNV) in a significant number of patients. Recurrent CNVs which span several genes may affect other important organs besides the heart. As CHD may be the first presenting symptom in such patients, analysis of recurrent CNVs in genomic regions with genes associated with CHD in patients referring to cardiology clinics, may lead to early diagnosis and treatment of extracardiac symptoms in such patients. In this study, we aimed to screen copy number variations of genomic regions including GATA4, NKX2-5, TBX5, BMP4, CRELD1 genes and to analyse 22q11.2 chromosomal region by using MLPA assay among apparently non-syndromic 45 patients with cardiac septal defects. For this purpose 45 patients were clinically evaluated and after genetic analysis 3 CNVs were identified (n=3/45, %6.6). MLPA assay led to early syndrome diagnosis in three patients. Our study confirms that analysis of recurrent CNVs by using MLPA assay within pediatric cardiology clinics can lead to early syndrome diagnosis in non-syndromic CHD patients.

Key words: congenital heart disease, CHD; cardiac septal defect, ASD, VSD, AVSD; multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA; copy number variants, CNVs; 22q11 deletion syndrome, 22q11DS.

Supported by Hacettepe University Research Projects Management System (BAP 6080 Project ID: 1572).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kardiyak Morfogenez	4
2.2. Konjenital Kalp Hastalıklarında Etyopatogenez	9
2.2.1. Kardiyak Transkripsiyon Faktörlerini Kodlayan Genler	18
2.2.2. Sinyal Yolaklarını Kodlayan Genler	19
2.2.3. Kardiyak Yapısal Proteinlerini Kodlayan Genler	20
2.2.4. Epigenetik Regülatörleri Kodlayan Genler	20
2.2.5. Mikrodelesyon ve Mikroduplikasyon Sendromlarında Tanımlanan KKH Aday Genleri	22
2.3. Kardiyak Septal Defektler	25
2.3.1. Ventriküler Septal Defektler	25
2.3.2. Atrial Septal Defektler	26
2.3.3. Atrioventriküler Septal Defektler	27
2.4. Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Genetik Etiyoloji	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
3.1. Çalışma Planı ve Hasta Seçimi	30
3.2. Çalışmanın Yürütülmesi ve Yöntem	30
3.3. Klinik Değerlendirme	31
3.4. Moleküler Çalışmalar	31
3.4.1. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu ve DNA Kalite Analizi	31
3.4.2. Multipleks Ligasyon-Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)	32

4. BULGULAR	34
4.1. Demografik Özellikler	34
4.2. Hastaların Klinik Bulguları	34
4.3. Hastaların MLPA Analiz Sonuçları	36
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
7. KAYNAKLAR	60
EKLER	85
EK-1: Etik Kurul Onayı	
EK-2: Hasta Değerlendirme Formu	
EK-3: MLPA P311-A2 Konjenital Kalp Hastalıkları Kiti	
EK-4: Çocuk ve Ebeveyn Onam Formları	

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Atrium
AD	: Otozomal Dominant
Ao	: Aorta
AR	: Otozomal Resesif
AS	: Aort Stenozu
AS	: Aort Kesesi
ASD	: Atrial Septal Defekt
AV	: Kanal Atrioventriküler Kanal
AVSD	: Atrioventriküler Septal Defekt
BAV	: Biküspit Aort Kapak
CFC	: Kardiyofasiyokutanöz
CGH	: Komparatif Genomik Hibridizasyon
CNC	: Kardiyak Nöral Krest
CNV	: Kopya Sayısı Varyasyonu
CNP	: Kopya Sayısı Polimorfizmi
CoA	: Aort Koarktasyonu
Co TFs	: Transkripsiyon Kofaktörleri
CT	: Kono Trunkus
DA	: Duktus Arteriozus
DGV	: <i>Database of Genomic Variants</i>
DILV	: Çift Girişli Sol Ventrikül
DORV	: Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül
E	: Efektör
ECs	: Endokardiyal Yastıkçıklar

EKO	: Ekokardiyografi
EMT	: Endotelyal Mezenkimal Transformasyon
FHF	: Primer (İlk) Kalp Alanı
HCM	: Hipertrofik Kardiyomiyopati
HLHS	: Hipoplastik Sol Kalp Sendromu
HM	: Histon Modifikasyonu
HOS	: Holt-Oram Sendromu
IAA	: Kesintili Aortik Arkus
IVS	: İnterventriküler Septum
KKH	: Konjenital Kalp Hastalıkları
L	: Ligand
LA	: Sol Atrium
LCA	: Sol Karotid Arter
LCRs	: Düşük Kopya Tekrarları
LR	: Sol Sağ
LSCA	: Sol Subklavyen Arter
LV	: Sol Ventrikül
MAPK	: Mitojen Aktiveli Protein Kinaz
Mb	: Megabaz
MLPA	: <i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>
MS	: Mitral Stenoz
NAHR	: Non Allelik Homolog Rekombinasyon
NVM	: Ventriküler Miyokardiyumun Non Kompaksiyonu
OFT	: Çıkış Yolu
OMIM	: <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PA	: Pulmoner Arter

PAPVR	: Parsiyel Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi
PAS	: Pulmoner Arter Stenozu
PDA	: Patent Duktus Arteriozus
PHTN	: Pulmoner Hipertansiyon
PFO	: Potent Foramen Ovale
PPS	: Periferel Pulmoner Stenoz
PS	: Pulmoner Valv Stenozu
PTA	: Persistan Trunkus Arteriozus
R	: Reseptor
RA	: Sağ Atrium
RA	: Retinoik Asit
RCA	: Sağ Karotid Arter
RSCA	: Sağ Subklavyen Karotid Arter
RV	: Sağ Ventrilül
SHF	: İkinci Kalp Alanı
SVAS	: Supravalvuler Aort Stenozu
TA	: Triküs pit Atrezisi
TAPVR	: Total Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi
TDR	: Tipik Delesyon Bölgesi
TFs	: Transkripsiyon Faktörleri
TOF	: Fallot Tetralojisi
TGA	: Büyük Arterlerin Transpozisyonu
V	: Ventrikül
VSD	: Ventriküler Septal Defekt

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
4.1. 22q11.2 delesyonu tespit edilen CHD 21, CHD 29 ve CHD 50 nolu hastaların yüz bulguları.	42
4.2. 22q11.2 Delesyonu Tespit Edilen Hastaların MLPA Analiz Sonuçları	43
4.3. CTSB-9 Geninde Delesyon Tespit Edilen Hastaların MLPA Analiz Sonuçları	45
5.1. 22q11 bölgesindeki düşük kopya tekrarlarının şematik prezentasyonu	49
5.2. Tipik delesyon bölgesindeki genlerin şematik prezentasyonu	50



TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. KKH'larının Görüldüğü Anöploidi ve Mikrodelesyon Sonucu Oluşan Sendromlar	13
2.2. KKH'larının Görüldüğü Tek Gen Defektlerinin Neden Olduğu Sendromlar	14
2.3. Tek Gen Defektlerinin Neden Olduğu Non-Sendromik KKH	15
2.3.1. Transkripsiyon Faktörleri ve Kofaktörler	15
2.3.2. Reseptörler, Ligandlar, Sinyal Yolakları	16
2.3.3. Yapısal Proteinler	17
2.4. Epigenetik regülatörleri kodlayan genler	17
2.5. Non-Sendromik Septal Defektlere Neden Olan Genler ve Kromozomal Lokuslar	17
2.6. Kardiyak Morfogenezde Etkili Transkripsiyon Faktörleri	29
4.1. Kardiyak Septal Defekt Tanısı Alan 45 Hastanın Klinik Bulguları	40
4.2. Kardiyak Septal Defekti Olan 45 Hastanın Klinik Özellikleri ve Sıklıkları	41
4.3. Kardiyak Septal Defekti Olan 45 Hastanın MLPA Analizi İle Saptanan Kopya Sayısı Varyantları ve Kopya Sayısı Polimorfizmleri	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital Kalp Hastalıkları (KKH); doğumsal defektler arasında yüksek mortalite ve morbidite nedenlerindedir, insidansı yaklaşık %2-3 olarak bildirilmektedir. Klinik önemine rağmen KKH'nın etyopatogenezi hakkında bilginiz azdır. KKH'ı kromozomal ve mendelyan malformasyon sendromlarının bir komponenti olarak görülebilmektedir ancak vakaların %80'inde yüksek kalıtım gösteren sporadik bir durum söz konusudur.

Embriyolojik dönemde kalp gelişimi sırasında moleküler ve hücresele düzeyde bir çok genetik faktör birbiriyle ilişki halinde bulunmaktadır. Bu faktörler arasında transkripsiyon düzenleyicileri, sinyalizasyon yolakları ve kromatin yeniden düzenlemesi örnek olarak verilebilir. Özellikle transkripsiyon faktörlerinin kalp gelişiminde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. KKH ile asosiyel bulunan transkripsiyon faktör genleri arasında NKX2-5, GATA4 ve TBX5 kalp gelişimi için kritik öneme sahiptir. Bu üç kardiyak transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar daha çok atrial septal defekt (ASD), ventriküler septal defekt (VSD) ve atriyoventriküler septal defekt (AVSD)'li hastalarda tespit edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra CRELD1 geni, AVSD ile direkt asosiyasyonu olduğu gösterilen ilk insan genidir. BMP4 geni atriyoventriküler septasyon için kritik olan bölgelerde ekspresyon olur. BMP4 geninin interventriküler septumun membran kısmının formasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir.

22q11.2 mikrodelesyon sendromunda (DiGeorge Sendromu) ASD ve VSD ile birlikte farklı kardiyak malformasyonlar da görülürken; 22q11.2 mikrodüplikasyonları ile ilişkili KKH'ları arasında VSD de bulunmaktadır. Konjenital kalp hastaları arasında son yapılan çalışmalar, bu hastaların bir kısmında rekürren kopya sayısı değişikliklerinin bulunduğunu göstermiştir. Bu kopya sayısı değişiklikleri içerdikleri gen/genlere göre kalp dışında diğer önemli organları da etkileyebilmektedir. 22q11.2 delesyonu veya duplikasyonu olan hastalarda sıklıkla görülen kognitif disfonksiyon bu duruma örnek olarak verilebilir.

Bu çalışmanın amacı; Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Kardiyoloji Bölümü'nde ASD, VSD veya AVSD saptanan, öncesinde genetik tanı almamış olan ve görünüşte non-sendromik olan 45 hastada, MLPA P311-A2 Konjenital Kalp Hastalıkları kiti kullanılarak GATA4, NKX2-5, TBX5, BMP4, CRELD1 genlerini içeren genomik bölgelerdeki kopya sayısı değişikliklerini araştırmak ve 22q11.2 kromozomal bölgesini analiz etmektir.

Bu tür hastalarda konjenital kalp hastalıkları sıklıkla ilk görülen bulgu olabildiği için, kardiyoloji kliniğine başvuran bu hastalarda; KKH'ları ile ilişkili gen/genleri içeren genomik bölgelerin kopya sayısı değişiklikleri araştırılacak, analiz sonrasında tanı alan hastalarda varsa diğer ekstrakardiyak semptomların tespiti ve tedavisi mümkün olabilecektir. Aynı zamanda bu hastaların ailelerine genetik danışma verilecek ve sonraki gebelikler için prenatal tanı imkanı söz konusu olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Konjenital Kalp Hastalıkları (KKH); kalpte doğumda var olan yapısal veya fonksiyonel anomalilerdir [1,2]. Enfeksiyöz etiyojilerden sonra KKH'ı infant mortalitesine en çok sebep olan durumdur. Konjenital Kalp Hastalıkları; her 1000 canlı doğumun 19-75'inde görülmektedir [3] ve terme ulaşmayan fetüsler eklendiğinde insidans daha da yükselmektedir [1,2]. KKH'nın %40'ı yaşamın ilk yılında tanı almaktadır[4]. Kardiyomyopatiler, ileti-sistem hastalıkları ve lateralite defektleri; kalıtsal olmalarına ve doğumda var olmalarına rağmen, farklı klinik presentasyonları sebebiyle bu insidansa dahil edilmemiştir [5].

Konjenital Kalp Hastalıkları üç ana kategoride incelenebilir; siyanotik kalp hastalıkları, sol taraflı obstrüksiyon defektleri ve septal defektler. Siyanotik kalp hastalıkları içinde Büyük Arterlerin Transpozisyonu (TGA), Fallot Tetralojisi (TOF), triküspid atrezisi, pulmoner atrezi,Çift çıkımlı sağ ventrikül (DORV), Persistan Trunkus Arteriozus (PTA) bulunmaktadır. Sol-taraflı obstrüksiyon defektleri arasında, hipoplastik sol kalp sendromu (HLHS), mitral stenoz(MS), aort stenozu (AS), aort koarktasyonu (CoA), kesintili aortik arkus (IAA) bulunur. Septal defektler içinde de, atriyal septal defektler (ASD), ventriküler septal defektler (VSD), atriyoventriküler septal defektler (AVSD) bulunmaktadır. Bu üç ana kategoriye girmeyen diğer konjenital kalp defektleri arasında biküspid aort kapak (BAV) ve patent duktus arteriozus (PDA) bulunur.En çok görülen konjenital kalp hastalığı biküspid aort kapak hastalığıdır, ikinci en çok görülen konjenital kalp hastalığı ise septal defektlerdir [5].

Kardiyak septal defektler tüm KKH'larının %50'ini içerirler; ventriküler septal defekt en sık görülen gelişimsel kardiyak defekt olup, tüm konjenital kalp hastalıklarının yaklaşık %20'ini oluşturur [14,15]. Atriyoventriküler septal defekt ise tüm KKH'nın yaklaşık %7'inden sorumludur [16,31]. Mutasyon taşıyıcıları arasında en sıklıkla görülen kardiyak fenotiplerden biri ise atriyal septal defektir [18]. Septal defektler bazı Mendelyan sendromlarla güçlü asosiyasyon gösterirler; aynı zamanda izole KKH'nın da büyük bölümünü oluştururlar [14].

2.1. Kardiyak Morfogenez

Kalp embriyo gelişimi sırasında fonksiyon gösteren ilk organdır ve fetal yaşamın devamı için fonksiyonu gereklidir [35]. Kalbi oluşturan hücreler; santral aksın iki yanına yerleşmiş, mezodermden köken alan hücrelerdir. Aynı kökenden gelen iki farklı mezodermal kalp alanları, kalbi oluşturan hücreleri temin ederler [40,25].

Primer veya ilk kalp alanı (FHF), anterior lateral mezodermdaki hücrelerden köken alır ve insan gestasyonun onbeşinci gününde, ikinci kalp alanı (SHF) ile birlikte hilal şeklinde bir yapı oluşturur [40,36]. Yaklaşık üçüncü haftada, ventral orta hatta bu hücreler birleşerek primitif kalp tüpünü oluştururlar. Bu birleşme esnasında oluşan defekt; cardia bifidaya neden olur ki bu durumda normal bir kalp gelişimi mümkün olmaz; kalp gelişimi iki farklı alanda bağımsız olarak devam eder. Bazen bu çift odaklar primitif chamberları oluşturabilir [43]. Primitif kalp tüpünün oluşmasıyla sonuçlanan bilateral göç ve birleşme için gerekli hücresel mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsa da; çeşitli transkripsiyon regülatörlerinin bu işlem için önemli olduğu bilinmektedir. Mesp1 erken safhada, kardiyak öncü hücrelerin uygun lokasyonlara göç edebilmeleri için gereklidir [44]. GATA4 ise kardiyak füzyon için gereklidir [45,46]. Furin'in eksikliği de cardia bifida ile sonuçlanmaktadır [47,48]. Furin Nodal, Lefty ve BMP'i de içeren çeşitli TGF- β aile üyelerini aktive edebilir. Belki Furin'in fonksiyonu ile ilintili olarak; viseral endodermden salgılanan BMP2, kardiyak öncü hücrelerinin normal migrasyonunu da içeren, kalbin embriyonik şekil aldığı durumlarda gereklidir [49].

Primitif kalp tüpünün iç katmanı endokardiyal hücreleri, dış katmanı miyokardiyal hücreleri içerir. Bu iki katman arasında karşılıklı sinyalin olduğu kardiyak jel denilen jelatinöz ekstrasellüler matriks bulunur. Yeni oluşan bu primitif kalp tüpü içindeki hücreler, gelişen atriuma, atriyoventriküler kanala ve sol ventriküle katkıda bulunurlar [37,38]. Primitif kalp tüpünün genişlemesi ve uzaması ile kalbin kıvrılması (kardiyak looping) meydana gelir. Primitif kalp tüpünün arkasında yer alan ve kalp tüpünün anterior ve posterior uçlarına göç eden ikinci kalp alanı (SHF) hücreleri arterial kutupta; çıkış yolu (OFT), sağ ventrikül,

interventriküler septumu oluştururken; venöz kutupta bu hücreler gelişen atriuma ve atrial septuma katkı verirler [39,41].

Kalbin asenkronize kontraksiyonları primitif kalp tüpünün oluşmasıyla başlar. Kalbin kıvrılması ile de kalp kanı pompalamaya başlar. Kıvrılma esnasında, primitif kalp tüpü morfolojik olarak farklı yapılarda olan primitif atriuma, primitif ventriküle ve primitif OFT'e dönüşür. Bu esnada, ventriküler ve atrial bölümlerin (chamber) nasıl büyüdüğüne yönelik ilginç bir hipotez vardır. Gen ekspresyon ve hücre proliferasyon paternlerinin araştırılması sonucunda, kalbin bu bölümlerinin primitif kalp tüpünden balonlaşarak oluştuğu öne sürülmüştür [50,51]. Bu balon modeli cazip gelmiştir çünkü hücrelerin belirli bir yapıya nasıl olup da bölüştürüldüğüne yönelik; bu kompleks oluşum mekanizmalarına derli toplu, düzgün bir anlatım olanağı sunmuştur. Köken analizleri ile spesifik şekil ve hücre oryantasyon yapılarının morfogenezine yol açan büyüme modeli desteklenmiştir. İşaretlenmiş hücrelerin küçük klonları çalışılarak, organogenez sırasında hücrelerin takip ettiği hücre bölünme paternleri anlaşılabilmiştir [52,53,54]. Köken analizleri ile kalp bölümlerinin (chamber) düşünüldüğü şekilde oluştuğu görülmüştür fakat primitif kalp tüpünden kalp bölümlerini oluşturmak üzere hücrelerin nasıl bölüştürüldüğü daha komplikedir. Örneğin; Tbx-2'in eksprese edildiği hücreler ağırlıklı olarak AV kanal ile sınırlı iken; komşu sol ventrikülde de pek çok hücreye rastlanmıştır [55].

Büyüme prosesini regüle eden mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmekte olup; kalp bölümlerinin morfogenezine farklı oranlardaki proliferasyon yön veriyor olabilir [56,57,58]. Kardiyak bölümlerinin morfogenezinde trabekül oluşumu önemlidir. Trabekül kalbin ince duvarlı bir organdan, yüksek basınca karşı kan pompalayabilen şekilde büyüebilmesini sağlar. Trabekülasyonun sağlanması için; neuregulin/ErbB, Notch, Ephrin/Eph ve Bmp10'un da içlerinde bulunduğu, çok sayıda sinyal yolları harekete geçer. Bmp10 gelişen trabekül içinde eksprese edilir ve trabeküller miyokardiyumun proliferasyonu için gereklidir [59]. Endokardiyumdan köken alan Nrg1, miyokardiyumdaki ErbB reseptörlerine sinyal vererek; Bmp10'dan bağımsız bir yolak içinde trabekülasyonun oluşumuna olanak sağlar [60,61,62]. Trabekülasyon için EphrinB2 ve reseptörü EphB42ün de önemli rolleri vardır [63]. Trabeküleyle yakın olan endokardiyumdaki Notch sinyali de trabekülasyon için önemlidir. Notch pek çok sinyal yolları içinde yer alır. Notch sinyali Bmp10

ekspresyonunu muhafaza eder ve Nrg1 ve EphrinB2'nin endokardiyumdaki ekspresyonunu teşvik eder [62].

Kardiyak bölünme (septasyon); miyokardiyumun spesifik bölgelerinin büyümesiyle atrium ve ventrikülün sağ ve sol bölümlere ayrılmasını içerir. Ventriküllerin septasyonu daha basittir. Ventriküler septasyon defektleri; Konjenital Kalp Hastalıkları (KKH) arasında ikinci en sık görülen durumdur. Ancak, ventriküler septasyonu dikte ederek şekil veren durumlar ve peşisıra septal morfogenezi yöneten hücresel değişiklikler anlaşılamamıştır. Embriyolojik çalışmalar ile; sağ ve sol ventriküllerin küçük bir segmentinde birbirine komşu iki hücre popülasyonunun büyüyerek interventriküler septumu (IVS) oluşturduğu belirlenmiştir. Genetik köken analizleri ile; IVS'nin sağ ve sol komponentlerinin IVS'nin oluşumu sırasında birbirleriyle karışmadıkları bulunmuştur [37,64]. Transkripsiyon faktörlerinden; TBX5, GATA4, NKX2-5, SALL4 ve HAND ailesini de içeren pek çok gen; IVS'nin oluşumunda rol almaktadır. Bu genlerin hepsi IVS'nin oluşumunda önemli olsa da, bunların kaybı; pleiotropik etkilere yol açar. IVS oluşumunun tamamen yok olmasıyla sonuçlanmaz, septumda bir defekt ile sonuçlanır. Dolayısıyla; IVS'nin lokasyonuna şekil veren, oluşumunu teşvik eden moleküler belirleyiciler tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat en azından bir gen; IVS oluşumuna rehberlik eden miyokardiyumun şekil almasıyla direkt olarak ilişkili olabilir. TBX5; ventriküllerde, IVS'nin oluştuğu yerin hemen üst bölgesine uzanan dinamik bir patern içinde eksprese olur [65,66]. TBX5'in fare ve civcivlerdeki genetik manipülasyonu ile; ventriküllere oranla, IVS'nin pozisyonunun, TBX5'i eksprese eden veya etmeyen hücreler arasındaki sınırla belirlendiği öne sürülmüştür [67,66]. TBX5'in sağ ve sol ventriküllerin arasındaki sınır boyunca yanlış ekspresyonu IVS oluşumunu ortadan kaldırmaktadır [66].

Farelerde; ventriküler miyokardiyumda veya IVS'e katkı veren hücreleri içeren ventriküler miyokardiyumun segmentinde TBX5'in silinmesi sonucu normal kalp oluşur ancak IVS oluşumu başlayamaz [66]. Bu da; IVS'e katkı veren ventriküler miyokardiyumun spesifik bölgesindeki TBX5'in IVS oluşumunda kritik önem taşıdığını göstermektedir. IVS oluşumu için TBX5 ekspresyonu gereklidir fakat bu sınırın nasıl fonksiyon göstererek IVS'i oluşturduğu bilinmemektedir. TBX5, farklı hücre sinyal yolları ile etkileşime girerek atrial septasyonda da kritik

rol oynar. TBX5'in endokardiyumdaki fonksiyonu; septal oluşumu sağlayan sinyal yollarının tesisi için gereklidir [68]. Atrial septasyonun oluşumu için; ikinci kalp alanında (SHF), TBX5-Hedgehog moleküler ağının gerekli olduğu görülmüştür. TBX5'in ikinci kalp alanının Hedgehog sinyaline verdiği cevabı regüle ettiği tespit edilmiştir. Endokardiyumda veya miyokardiyumda TBX5'in bir kopyasının silinmesi, TBX5+/-farelerde görülen septasyon defektlerine yol açmaz fakat ikinci kalp alanının hedgehog sinyaline cevap veren hücrelerinde TBX5'in bir kopyasının silinmesi septasyon defektlerine yol açmaktadır. TBX5 direk olarak Hedgehog pathway genlerini regüle eder ve Osr1'in regülasyonunda Hh-pathway'ine paralel etki de gösterebilir [69].

Kardiyak septasyon sonrasında, atrium ve ventrikül arasındaki iletişim devam eder, kalp kapakları tek yönlü kan akışını sağlarlar. Kalp kapaklarının oluşumu miyokardiyum ile endokardiyum arasındaki kompleks, koordine sinyaller ile ortaya çıkar. Miyokardiyumdan gelen sinyaller lokal endotelial-mesenkimal transformasyonu (EMT) başlatır. EMT'nin lokasyonu; kalp segmentlerinin başlangıçtaki patternine ve Bmp2 gibi EMT'i indükleyen faktörlerin lokalize ekspresyonlarına bağlıdır [70]. Bmp2 Tbx2 ile birlikte; AV kanalın ve çıkış yolunun (outflow tract) şekil alması için ve transforme olmuş endokardiyal hücrelerin göç ettiği kardiyak jelin tesisinde gereken genlerin ekspresyonu için de gereklidir [71,70]. AV kanalın şekil almasında endokardiyumdaki Notch sinyali de yer alır, Notch sinyali Bmp2'yi baskılar [72]. Kardiyak jelin duvarlarının kalınlaşmasıyla AV kanalda ve OFT bölgelerinde endokardiyal yastıkçıklar (ECs) oluşur. Endokardiyal yastıkçıklar, primitif kalp kapakları olarak fonksiyon gösterirler ve tek yönlü pulsatil kan akışını sağlarlar [42]. Snail transkripsiyon faktörlerinden Snai1 ve Snai2'nin ekspresyonlarının başlaması için TGF β sinyali kritik rol oynar. Snail transcription faktörleri, EMT'i oluşturan hücrelere invazif özelliklerini verir [73]. Son olarak, miyokardiyal calcineurin/NFAT sinyallerini içeren dördüncü bir yolak; AV kanalda kalp kapaklarının oluşacağı bölgede VEGF ekspresyonunu baskılar [74]. ErbB3'ü de içeren EMT'i indükleyen faktörlerin aktivasyonu için endokardiyumda GATA4'ün ekspresyonu da gereklidir [75]. Notch ve BMP de endokardiyal EMT için gereklidir [76].

AV kapak oluşumu gibi kardiyak çıkış yolunun (outflow tract) septasyonu ve pulmoner, aort kapaklarının tesisinde benzer sinyal yolları rol alır, ancak kısmi farklılıklar da vardır. Örneğin; VEGF sinyali hem AV kanaldaki hem de OFT'deki EMT için gereklidir ancak; OFT'deki rolü AV kanaldaki endokardiyal yastıkçık oluşumundan daha önemlidir [77]. Karmaşık sinyal yollarının koordine edildiği ikinci kalp alanından çıkış yolu (outflow tract) oluşur. Oluşan çıkış yolu içinde kardiyak nöral krest hücreleri yer değiştirir ve distal çıkış yolunun yastıkçık hücreleri bu hücrelerden köken alır. OFT'nin proksimal yastıkçık hücreleri endotelden köken alır. İkinci kalp alanının mezoderminden başlayan, sınırdaki nöral krest ve endokardiyal hücreler ile etkileşen sinyal yolları bu oluşumların morfogenezinde gereklidir [78,79].

T-box transkripsiyon faktörü Tbx1'in kontrolü altındaki Fgf8 sinyalleri; komşu nöral krest ve endotel hücrelerine sinyal veren BMP'lerin de içinde bulunduğu diğer büyüme faktörlerini aktive eden otokrin sinyal döngüsü için gereklidir [80,79]. Tbx1'in sinyali başlatmadaki rolü ilginçtir çünkü insanlarda TBX1'in heterozigot kaybı 22q11 mikrodelsiyon sendromuna (Di-George sendromuna) yol açar [81,26]. Bu sendromun kardiyovasküler bulgularının nöral krest oluşumundaki bir defekten kaynaklandığı düşünülmüştür, fakat Tbx1 brankial arkta ve ikinci kalp alanı (SHF) mezoderminde de eksprese olur [83,84]. TBX1'in nöral krest hücreleri içindeki hücre-otonom fonksiyonundan ziyade, OFT gelişimini ve kardiyak morfogenezi etkileyen otokrin ve parakrin sinyalleri aktive ediyor olması önemlidir. OFT ve AV kanaldaki yastıkçık oluşumu başlatıldıktan sonra kapak oluşumu kapak dokusunun uzaması ve gelişmesi ile devam eder [85]. Benzer sinyal yolları harekete geçer. Örneğin; calcineurin/NFAT sinyali miyokardiyumdaki fonksiyonundan sonra endokardiyumda fonksiyon gösterir [74]. Valvulogenezin ilk evrelerinden daha az anlaşılmış olsa da; kapakların gelişimi, Twist1 ve TBX20'nin kayıplarıyla, Sox9 ve Scleraxis'in ekspresyonuyla birlikte tendon benzeri bir fenotip oluşumuyla, gen ekspresyonunda ve hücre kimlikte belirgin değişiklikleri içerir [86,87].

Kalp oluşumu sırasında pek çok hücre tipi özelleşir, ayrışır. Miyokardiyal hücreler atrial, ventriküler, pacemaker, AV nod ve His-Purkinje hücrelerine özelleşir. Atrial ve ventriküler hücreler dışındaki bu üç hücre tipi kardiyak ileti sistemini

oluştururlar. Sol ve sağ bölümlere tekabül eden; atrial ve ventriküler hücrelerin tesisine neden olan faktörler açık değildir. Atrial ve ventriküler kimliği belirleyen faktörler de net değildir [88]. Sağ ve sol ventriküler miyositlere farklılaşma; kalp tüpünün antero-posterior şekil almasına ve TBX5 ve HAND1 gibi transkripsiyon faktörlerinin spesifik ekspresyonuna bağlı gibi gözükmetedir [65,89]. Sağ ve sol atrium; embriyonik vücut planının tesisini başlatan sağ-sol sinyal kaskadlarına bağlı olarak şekil alır [90,91]. Sol-tarafta eksprese olan Pitx2 transkripsiyon faktörü; kalp atımının başlaması ve iletimi için kritik olan pacemaker doku farklılaşmasının başlamasını sol atriumda baskılayarak, sağ ve sol atrial kimliği tesis eder [92,93]. Atrial ve ventriküler dokular içinde, hücre-tipi özelleşme ile her kalp atımı için koordine bir şekilde atımları ileten fiberler oluşur. Sinoatrial node pacemaker hücrelerinin önemli bir özelliği olan spontan depolarizasyon için gerekli iyon kanallarının ekspresyonunu desteklerken, çalışan miyokardiyum fenotipini kısmen baskılayan Tbx3'ün lokalize ekspresyonu atımların başladığı sinoatrial nodun şekil almasını belirler [94,95].

Atrial ve ventriküler kontraksiyon arasındaki koordinasyonu emin kılmak için atımların yavaşladığı atrioventriküler nodu da içine alan atrioventriküler ileti sisteminin oluşması için de Tbx3 önemlidir. Tbx3 ekspresyonu, atrioventriküler ileti sistemini ana hatlarıyla belirler [96]. Tbx3 atrioventriküler nodun oluşması için de önemlidir [95] fakat Tbx2; atımların atriumdan ventriküle sadece atrioventriküler nodun üzerinden geçmesini emin kılan yalıtın dokuları özelleştirir [58]. Bu önemli elektrik yalıtımı olmazsa, letal aritmilere neden olan yardımcı yolaklar gelişir. Distal ileti sisteminin gelişimi için Tbx5, Nkx2-5 ve Id2'nin doz-sensitif fonksiyonları gereklidir [97,98]. Irx3 transkripsiyon faktörü de kardiyak his-purkinje sistemindeki hızlı iletinin sağlanması için gereklidir [99]. Son olarak da, Irx5 transkripsiyon faktörü; kardiyak ventriküler repolarizasyonu sağlayarak, akımın yeniden başlamasını koordine eder ve kalp atımının devamını sağlar [100].

2.2. Konjenital Kalp Hastalıklarında Etyopatogenez

Konjenital Kalp Hastalıklarının major sebebi, embriyogenez sırasında kalp gelişiminde rol alan regülatörlerde oluşan mutasyonlar olarak düşünülse de [4],

epidemiyolojik veriler çevresel etkilere de dikkat çekmektedir [6]. Prenatal dönemde; terapötik amaçla kullanılan; thalidomide, isotretinoin, trimethoprim-sulfonamide, sulfasalazine, ibuprofen, antikonvülzan kullanımının konjenital kalp hastalığı riskinde artışa sebep olduğu bildirilmiştir [6]. Ancak bu epidemiyolojik çalışmalar hastalık riskine dikkat çekerken, sebep olan hastalık mekanizmaları belirtilmemiştir [5]. Maternal alkol, marihuana kullanımı ile maternal dönemde maruz kalınan organik çözücüler ve pestisitler de konjenital kalp hastalığı riskinde artışa neden olmaktadır. Tedavi edilmemiş maternal fenilketonüri, pregestasyonel diyabet, maternal rubella, yüksek ateşle seyreden hastalıklar ve influenza da konjenital kalp hastalığı riskinde artışa sebep olmaktadır [6].

Konjenital Kalp Hastalıklarının etyopatogenezi henüz tam olarak anlaşılammıştır. Tek gen hastalıklarının ve kromozomal defektlerin multisistem bir hastalık yapısında konjenital kalp hastalıklarına neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Anöploidinin çok bilinen örnekleri Trizomi 21 ve Turner Sendromudur (45,X). Trizomi 21’de yaklaşık %50 oranında hastada, atriyoventriküler septal defektler ve/veya Fallot Tetralojisi görülürken; Turner sendromunda aort koarktasyonu (CoA) çok sıklıkla görülür (Tablo2.1.).

En sıklıkla görülen segmental anöploidi ise 22q11mikrodelesyonudur. 22q11 mikrodelesyonu genellikle de novo oluşur. Mendelyan malformasyon sendromlarına örnek olarak, otozomal dominant kalıtım gösteren, konjenital kalp hastalıklarının ve ekstrakardiyak anomalilerin görüldüğü Noonan ve Holt Oram Sendromları bulunmaktadır (Tablo2.2.). GATA4 ve NKX2.5 mutasyonlarının neden olduğu nadir otozomal dominant kalıtım gösteren izole konjenital kalp hastalıkları da vardır. Non-sendromik kardiyak malformasyonlara yol açan tek gen defektleri arasında; MYH6, atrial septal defektlere neden olurken; CRELD1, ALK2, BMPR2’nin atrioventriküler septal defektlerin genetik etiolojisinde rol aldıkları gösterilmiştir. Non-sendromik septal defektlerin etyopatogenezi çoğu vakada bilinmiyor olsa da; otozomal dominant kalıtımın görüldüğü pedigriler; genlerin veya kromozomal lokusların tanımlanmasında faydalı olmuşlardır (Tablo2.5.) [34]. NOTCH1 mutasyonları ise, aort kapağı malformasyonlarına, aort valv kalsifikasyonlarına neden olmaktadır (Tablo2.3.).

Konjenital Kalp Hastalıkları kromozomal ve mendelyan malformasyon sendromlarının bir komponenti olarak görülebilmektedir ancak bu bilinen genetik sebepler hastalığın %20'sinden azına tekabül etmektedir [7,30,31]. KKH'nın büyük bir kısmında yüksek kalıtım gösteren sendromik olmayan bir durum söz konusudur fakat hastaların %25-%40'ında ekstrakardiyak anomaliler de bulunmaktadır [8]. KKH'nın büyük çoğunluğu sporadik veya ailesel olsun sendromik değildir ve konjenital kalp hastalarının %80'inde genetik etyopatoloji bilinmemektedir. Sporadik olarak görünen vakalarda dahi epidemiyolojik çalışmalarda, KKH için, kardeş ve çocuklarda %2-5 olarak saptanan artmış rekürens risk; paylaşılan genlerin ve/veya çevrenin potansiyel rolünü göstermiştir [9].

Populasyon bazlı çalışmalarda; birinci derece akrabalarda, herhangi bir formdaki KKH'ı için relatif risk 3.2 olarak saptanırken; birinci derece akrabalarda; rekürens risk oranı; heterotaksi için 79.1; konotrunkal defektler için 11.7; atriyoventriküler septal defektler için 24.3; izole atriyal septal defektler için 7.1; izole ventriküler septal defektler için 3.4 olarak tespit edilmiştir. Aynı defekt için rekürens risk oranı 8.15 iken farklı kalp defektleri için bu oran 2.68 olarak bulunmuştur. Birinci derece akrabalarında KKH aile hikayesi olanlar; popülasyondaki kalp defektlerinin sadece %2.2'ini oluşturmaktadırlar. Kromozomal defektler çıkarıldığında bu oran %4.2 olmaktadır [10]. Parental akrabalık durumunda ise, çocuklarda KKH riski 2-3 kat artmaktadır [11].

Sendromik hastalarda, KKH'nın insidansı çok yüksektir, özellikle trizomi 13,18 ve 21 de hastaların %80-%90'ında KKH görülebilmektedir [12,13]. Aile bazlı çalışmalar KKH ile bağlantılı genleri bulmada yararlı olmuşlarsa da; popülasyon bazlı çalışmalarda, akraba olmayan hastalarda, mutasyonlar kolay saptanamamıştır. Bu durum KKH'nın multifaktöriyel nedenlerine işaret etmektedir. Bunun ötesinde mutasyonlar değişken ekspresyon gösterirler, öyle ki aynı mutasyon farklı kardiyak malformasyonlara neden olurken; farklı mutasyonlarda aynı kardiyak malformasyon görülebilmektedir. Penetrans değişiklikleri de KKH'da pedigrilerde sıklıkla rastlanılan bir durumdur. Azalmış penetrans taşıyıcılardaki tespit edilmemiş asemptomatik kalp defektlerine bağlı olabileceği gibi epistaz sebebiyle de olabilir. Bu durum da modifiye edici bir takım faktörlerin ve epigenetik mekanizmaların varlığını gösterir [17].

Kalp gelişimi; zamansal ve mekansal olarak çok sıkı regüle edilen, kompleks bir yapı içerisinde birbiriyle etkileşime giren, çok sayıdaki sinyal yolları tarafından kontrol edilmektedir. Bu güne kadar tanımlanmış KKH genleri, gelişim basamaklarındaki tüm sinyal yollarının, insan KKH'ında rolü olabileceğini göstermektedir. Bunlar arasında; ligandlar(ör; JAG1), reseptörler (ör; NOTCH, PDGFRA), down-stream sinyal efektörler (ör; PTPN11, SMAD6), transkripsiyon faktörleri (ör; GATA4, NKX2-5) ve hedef genler (ör; ACTC1, MYH6) bulunmaktadır (Tablo2.3.). Bunların ötesinde; histon-modifiye eden proteinleri kodlayan hastalık genlerinin tespit edilmesi ile ortaya çıkan hedef genlerin epigenetik regülasyonu; kalp gelişimindeki kompleks yapıya başka bir regülasyon basamağı daha eklemiştir (Tablo2.4.) [32].

Bu bulgular; genetik ve çevresel risk faktörlerinin; kalp gelişiminde rol alan protein ağları içinde birbirleriyle etkileşime girerek KKH'a sebep olabileceğini göstermektedir [33].

Tablo 2.1. KKH'larının Görüldüğü Anöploidi ve Mikrodelesyon Sonucu Oluşan Sendromlar

Sendrom	Kardiyak Anomali	KKH %	Klinik Özellikler	Neden Olan Genler	Kalıtım	OMIM
Trizomi 13 (Patau Sendromu)	ASD, VSD, PDA, HLHS	%80	Mikrosefali,ağır mental retardasyon, polidaktili,yarık damak/dudak, genitoüriner anomaliler, omfalosel, mikroftalmi	Bilinmiyor	Mayozda hata	
Trizomi 18 (Edwards Sendromu)	ASD, VSD, PDA, TOF, DORV, CoA, BAV	%90- %100	Polihidramniöz, bilier atrezi, ağır mental retardasyon, diyafram hernisi, omfalosel	Bilinmiyor	Mayozda hata	
Trizomi 21 (Down Sendromu)	ASD, VSD, AVSD, TOF	%40- %50	Hipotoni, gelişim geriliği,simian çizgisi, epikantus katlantısı	Bilinmiyor	Mayozda hata	190685
Monozomi X (Turner Sendromu)	CoA, BAV, AS, HLHS	%25- %35	Kısa boy, göğüs kafesinin geniş olması, meme başlarının birbirine uzak olması, yele şeklinde kalın ve kısa boyun, primer amenore	Bilinmiyor	Mayozda hata	
47,XXY (Klinefelter Sendromu)	PDA, ASD, mitral valv prolapsusu	%50	Uzunboy, hipoplastik testisler,gecikmiş puberte	Bilinmiyor	Mayozda hata	
22q11 delesyon (DiGeorge Sendromu)	IAA Tip B, aortik ark anomalileri, trunkus arteriosus, TOF	%75	Timus ve paratiroid hipoplazisi, immünyetmezlik, düşük kulak,hipokalsemi, konuşma / öğrenme bozuklukları, renal anomaliler	TBX1	De Novo AD (%6- %28 vakada)	188400
7q11.23 delesyon (Williams-Beuren Sendromu)	Supravalvar AS, PPS	%50- %85	Infantil hiperkalsemi, elf yüz, sosyal kişilik, gelişim geriliği, işitme kaybı	ELN	De Novo AD (az vakada)	194050

Tablo 2.2. KKH'larının Görüldüğü Tek Gen Defektlerinin Neden Olduğu Sendromlar

Sendrom	Kardiyak Anomaliler	Klinik Özellikler	Neden Olan Genler	Lokus	Kalıtım	KKH%	OMIM
Noonan Sendromu	PS ve displastik pulmoner kapak, AVSD, HCM, CoA	Kısa boy, yele boyun, göğüsduvarı deformiteleri, gelişim geriliği, kriptorşidizm, anormal yüz görünümü	PTPN11, KRAS, RAF1, SOS1	12q24 12p1.21 2p21 3p25.2 7q34 15q22.31 11p15.5 1p13.2 10q25.2 11q23.3 17q11.2	AD AR	%80	163950
Costello Sendromu	PS, HCM, kardiyak ileti anomalileri	Kısa boy, gelişim geriliği, kaba yüz, solid organ karsinomasında artmış risk	HRAS	11p15.5	De Novo AD	%63	218040
Ellis-van Creveld Sendromu	ASD, tek atrium	İskelet displazisi(kısa uzuvlar, displastik tırnaklar, dişler)	EVC, EVC2	4p16	AR	%60	225500
Alagille Sendromu	PS, TOF, ASD, PAS	İntrahepatik safra kanalı azlığı, kolestaz, tipik yüz görünümü, iskelet sistemi anomalileri, oküler anomaliler, büyüme geriliği, işitme kaybı, atnalı böbrek	JAG1, NOTCH2	20p12 1p12	AD	%90	118450
Okihiro Sendromu	VSD, PFO, TOF	Önkol malformasyonları, renal oküler malformasyonlar	SALL4	20q13.2	AD		607343
Holt-Oram Sendromu	ASD, VSD, AVSD, ilerleyici AV ileti sistem hastalıkları	Başparmak anormallikleri, radial displazi	TBX5	12q24	AD	%85	142900
Kabuki Sendromu	VSD, ASD, TOF, CoA, PDA, TGA	Mental retardasyon, postnatal büyüme geriliği, yarık damak, iskelet anomalileri	MLL2	12q13.12	De Novo	%31- %55	147920
Char Sendromu	PDA	Dismorfik yüz, parmak anomalileri	TFAP2b	6p12	AD	%100	169100
CHARGE Sendromu	ASD, VSD, valv defektleri	Kolobom, koanal atrezi, gelişim geriliği, genital-üriner anomaliler	CHD7, SEMA3E	8p12 7q21.11	AD	%85	214800

Tablo 2.3. Tek Gen Defektlerinin Neden Olduğu Non-Sendromik KKH**Tablo 2.3.1.** Transkripsiyon Faktörleri ve Kofaktörler

Gen	Protein	Fenotip	OMIM
ANKRD1	Ankyrin Repeat Domain	TAPVR	609599
CITED2	c-AMP Responsive Element-Binding Protein	ASD, VSD	602937
FOG2/ZFPM2	Friend of GATA	TOF, DORV	603693
GATA4	GATA4 Transcription Factor	ASD, PS, VSD, TOF, AVSD, PAPVR	600576
GATA6	GATA6 Transcription Factor	ASD, TOF, PS, AVSD, PDA, OFT defects, VSD	601656
HAND2	Helix-Loop-Helix Transcription Factor	TOF	602407
IRX4	Iroquois Homeobox 4	VSD	606199
MED13L	Mediator Complex Subunit 13-like	TGA	608771
NKX2-5	Homeobox Containing Transcription Factor	ASD, VSD, TOF, HLH, CoA, TGA, DORV, IAA, OFT defects	600584
NKX2-6	Homeobox Containing Transcription Factor	PTA	
TBX1	T-Box 1 Transcription Factor	TOF, (22q11 deletion syndromes)	602054
TBX5	T-Box 5 Transcription Factor	AVSD, ASD, VSD, (Holt Oram Syndrome)	601620
TBX20	T-Box 20 Transcription Factor	ASD, MS, VSD	606061
TFAP2B	Transcription Factor AP-2 Beta	PDA, (Char syndrome)	601601
ZIC3	Zinc Finger Transcription Factor	TGA, PS, DORV, TAPVR, ASD, HLH, VSD, Dextrocardia, L-R axis defects	300265

Tablo 2.3.2. Reseptörler, Ligandlar, Sinyal Yolakları

Gen	Protein	Fenotipler	OMIM
ACVR1/ALK2	BMP Receptor	AVSD	102576
ACVR2B	Activin Receptor	PS, DORV, TGA, Dextrocardia	602730
ALDH1A2	Retinaldehyde Dehydrogenase	TOF	603687
CFC1/CRYPTIC	Cryptic Protein	TOF, TGA, AVSD, ASD, VSD, IAA, DORV	605194
CRELD1	Epidermal Growth Factor- Related Proteins	ASD, AVSD	607170
FOXH1	Forkhead Activin Signal Transducer	TOF, TGA	603621
GDF1	Growth Differentiation Factor-1	Heterotaxy, TOF, TGA, DORV	602880
GJA1	Connexin 43	ASD, HLH, TAPVR, (Oculodentodigital dysplasia)	121014
JAG1	Jagged-1 Ligand	PAS, TOF, (Alagille syndrome)	601920
LEFTY2	Left-Right Determination Factor	TGA, AVSD, IAA, CoA, L-R axis defects	
NODAL	Nodal homolog (TGF-beta superfamily)	TGA, PA, TOF, DORV, Dextrocardia, TAPVR, AVSD	601265
NOTCH1	NOTCH1 (Ligand of JAG1)	BAV, AS, CoA, HLH	190198
PDGFRA	Platelet-Derived GrowthFactor Receptor Alpha	TAPVR	173490
SMAD6	MAD-related protein	BAV, CoA, AS	602931
TAB2	TGF-beta Activated Kinase	OFT defects	605101
TDGF1	Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1	TOF, VSD	187395
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	CoA, OFT defects	192240

Parentez içindeki fenotipler; gen mutasyonlarıyla ilgili sendromları ve/veya ekstrakardiyak bulguları içerir. OFT, çıkış yolu defektleri.

Tablo 2.3.3. Yapısal Proteinler

Gen	Protein	Fenotipler	OMIM
ACTC1	Alpha Cardiac Actin	ASD	102540
ELN	Elastin	SVAS, PAS, PS, AS,(Williams-Beuren syndrome)	130160
MYH11	Myosin Heavy Chain 11	PDA, Aortic Aneurysm	160745
MYH6	Alpha Myosin Heavy Chain	ASD, AS, PFO, TGA	160710
MYH7	Beta Myosin Heavy Chain	Ebstein Anomaly, ASD, NVM	160760

Parentez içindeki fenotipler; gen mutasyonlarıyla ilgili sendromları ve/veya ekstrakardiyak bulguları içerir. PAS, pulmoner arter stenozu; SVAS, supralvalv aort stenozu; NVM, Ventriküler myocardiumun non-kompaksiyonu.

Tablo 2.4. Epigenetik regülatörleri kodlayan genler

Gen	Protein	Fenotipler
CHD7	Binding to H3K4Me3	CHARGE syndrome
KMT2D (MLL2)	H3K4 methyltransferase	Kabuki syndrome
EP300	Histone acetyltransferase	Rubinstein-Taybi syndrome
CREBBP	Histone acetyltransferase	Rubinstein-Taybi syndrome
EHMT1	H3K9 methyltransferase	Kleefstra syndrome

Tablo 2.5. Non-Sendromik Septal Defektlere Neden Olan Genler ve Kromozomal Lokuslar

Fenotip	Kromozom Lokusları	Gen
Atrial septal defekt 1	5p	bilinmiyor
Atrial septal defekt 2	8p23.1	GATA4
Atrial septal defekt 3	14q11.2	MYH6
Atrial septal defekt 4	7p14.2	TBX20
Atrial septal defekt 5	15q14	ACTC1
Atrial septal defekt 6	4q32.3	TLL1
Atrial septal defekt 7	5q35.1	NKX2-5
Atrial septal defekt 8	6q24.1	CITED2
Ventriküler septal defekt 1	8p23.1	GATA4
Ventriküler septal defekt 2	6q24.1	CITED2
Ventriküler septal defekt 3	5q35.1	NKX2-5
Atrioventriküler septal defektleri 1	1p31-21	bilinmiyor
Atrioventriküler septal defekt 2	3p25.1	CRELD1
Atrioventriküler septal defekt 3	6q22.31	GJA1
Atrioventriküler septal defekt 4	8p23.1	GATA4

2.2.1. Kardiyak Transkripsiyon Faktörlerini Kodlayan Genler

Genetik çalışmalar sonucunda; kalıtsal ve sporadik konjenital kalp hastalıklarına neden olan pek çok gen tespit edilmiştir. Bulunan genlerin büyük çoğunluğu transkripsiyon faktörlerini kodlarlar. Transkripsiyon faktörleri, kalp gelişimi sırasında, ventriküler septasyon veya çıkış yolu morfogenezi gibi spesifik durumları regüle ederler.

İlk bulunan konjenital kalp hastalığına neden olan tek gen mutasyonu; T-box transkripsiyon faktör genlerinden; Holt-Oram sendromuna (HOS) neden olan TBX5 genidir [19]. Holt-Oram sendromunda çoğunlukla ASD, VSD ve ileti sistemi defektleri görülür. TBX5'ten sonra, kalıtsal ASD ve atriyoventriküler blok görülen ailelerde, NKX2-5 mutasyonları bulunmuştur. NKX2-5 mutasyonları; VSD, Ebstein anomali ve TOF gibi farklı konjenital kalp hastalıkları olan ailelerde de görülmüştür [20]. Farelerle yapılan çalışmalarda, transkripsiyon faktörlerinin dozlarının önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır. TBX5'in bir alleli silinen farelerde; heterozigot TBX5 mutasyonuna sahip HOS'lu hastalardaki kalp defektlerine birebir benzer defektler görülürken; KKH ile ilgili bazı gen mutasyonlarında; gen dozunun fenotipe etkisinde farklılıklar olduğu bulunmuştur. Farelerde NKX2-5'in bir allelinin silinmesi; insanlarda, NKX2-5 eksikliğine bağlı oluşan kardiyak defektlerin birebir benzerini göstermemiştir. Yine TBX20 eksikliği; farelerde doz %50'inin altında olursa ancak bir kalp defekti oluştururken; insanlarda, fonksiyonda %50 kayıpla seyreden TBX20 mutasyonları çok farklı yapısal defektlere neden olmaktadır. Bu çalışmalarda ayrıca TBX5 ve NKX2-5'in fiziksel olarak etkileşime girdiği ve sinerjistik bir hedef aktivasyonu gösterdikleri bulunmuştur [21,22,23].

Birbirleriyle etkileşime giren transkripsiyon faktörlerinin önemi; GATA4 mutasyonlarının kalıtsal septal defektlere neden olduğunu gösteren çalışmalarla tekrar vurgulanmıştır. GATA4'ün NKX2-5 ile etkileşime girdiği görülmüştür [24,25]. GATA4 ile NKX2-5 arasındaki ve GATA4 ile TBX5 arasındaki defektif etkileşimler, GATA4 mutasyonlarının neden olduğu KKH'nın altta yatan sebepleri arasındadır. Bu üç birbiriyle etkileşen kardiyak transkripsiyon faktörlerinin kalp oluşumunda doz sensitif regülatörler oldukları belirlenmiştir.

Farelerle yapılan çalışmalarda, başka bir transkripsiyon faktör geni olan TBX1'in 22q11 mikrodelesyon sendromlarındaki KKH'ndan sorumlu olduğu belirtilmiştir [26]. 22q11 bölgesindeki başka genlerin de muhtemelen bu sendromdan sorumlu olduğu; örneğin CRKL'nin eksikliğinin, fare modellerinde benzer defektlere neden olduğu ve TBX1'in delesyonun yarattığı durumu şiddetlendirdiği belirtilmiştir [27,28]. SALL 4 ve TBX20 mutasyonlarının tanımlanması ile, etkileşime giren transkripsiyon faktörlerinin sayıları da artmıştır. TBX5 ve SALL4'ün birlikte fonksiyonu, hedef gene bağlı olarak; gen ekspresyonunu baskılayabilir veya aktive edebilirken; TBX5, GATA4 ve NKX2-5 birlikte çalışarak sadece gen aktivasyonuna sebep olmaktadır [29]. Tüm bu çalışmalar, transkripsiyon faktörlerinin kompleks etkileşimlerinin; kardiyak gen ekspresyon regülasyonunun ve konjenital kalp hastalıklarının etiyolojisinin anlaşılmasında önemli rolleri olduğunu ortaya çıkarmıştır.

2.2.2. Sinyal Yolaklarını Kodlayan Genler

Sendromik ve izole Konjenital Kalp Hastalıklarında (KKH) hastalık genlerinin tanımlanması ile kalp gelişiminde bir kısım sinyal yolaklarının varlığı da doğrulanmıştır. NOTCH sinyal yolağı hücre kaderini belirleyen bir regülatör olarak ve pek çok gelişimsel işlemlerde şekil veren bir sinyal efektörü olarak rol oynar. Alagille sendromunda Notch sinyal ligandını kodlayan JAG1 genindeki mutasyonların belirlenmesi NOTCH sinyali ile insan KKH arasında ilk tespit edilen bağ olmuştur [137,138]. Alagille sendromu (AGS) multisistem bir bozukluktur. Bu sendromda karaciğer, kalp, gözler, yüz ve iskelet sistemi etkilenir [139]. En sık pulmoner arter stenozu, valvuler pulmoner stenoz (PS), Fallot Tetralojisi olmak üzere hastaların %90'unda kardiyovasküler anomaliler görülür [216]. AGS; %90 hastada JAG1 mutasyonları sonucu oluşurken, < %1 hastada NOTCH2 mutasyonları bu sendroma neden olmaktadır [140,141].

NOTCH1 mutasyonları izole KKH'da tanımlanmıştır [142,217]. Notch1 sinyali kardiyak valv formasyonunda yer alan endotel-mesenkimal transformasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Notch1 mutant farelerde EMT'nin bozulmasından dolayı hipoplastik endokardiyal yastıklar oluşmaktadır [76]. NOTCH1, WNT4, BMP2

simyalinin endokardiyum ve miyokardiyum arasındaki ilişkilerinin valv morfogenezinde önemli olduğu gösterilmiştir [76,72].

RAS-mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağındaki sinyal transdüksiyonu hücre proliferasyonunu ve differensiyasyonunu stimule eder. RASopatiler [143] olarak bilinen Noonan, Costello, LEOPARD, Kardiyofasyokutanöz (CFC) sendromlarındaki hastalık genlerinin tanımlanması RAS-MAPK sinyal transdüksiyon yolağı ile insan KKH arasında bir bağ olduğunu göstermiştir. Noonan sendromunda hastaların %85'inde kardiyak defekt görülür, çoğunlukla görülen kardiyak defektler arasında pulmoner valv stenozu, ASD ve hipertrofik kardiyomiopati bulunmaktadır [144,145].

Noonan sendromunun yaklaşık %50'nden PTPN11 gen mutasyonları sorumlu görülmektedir [148]. KRAS [146,147], SOS1 [149,150], RAF1 [151,152], NRAS [153], HRAS [154], BRAF [146,155], SHOC2 [156], MAP2K1 (MEK1) ve MAP2K2 (MEK2)[155], CBL [157], NF1 [158] mutasyonları KKH'larının görüldüğü RASopatiler ile ilişkilendirilmiştir.

2.2.3. Kardiyak Yapısal Proteinlerini Kodlayan Genler

KKH'larında kardiyak yapısal proteinlerini kodlayan gen mutasyonları da görülmektedir. Kardiyak sarkomerik protein MYH6 (myosin heavy chain 6) mutasyonları ASD ile ilişkilendirilmiştir [159,111]. MYH6 ekspresyonunun moleküler regülasyonunda GATA4 [160], TBX5, MEFC2 [161] transkripsiyon faktörleri rol almaktadır. Myosin heavy chain 7'i kodlayan MYH7 mutasyonlarının Ebstein anomalisine ve septal defektlere neden olduğu görülmüştür [162]. ACTC1 mutasyonları ASD'ye neden olurken [112]; MYH11 mutasyonları torasik aortik anevrizmaya ve/veya aortik diseksiyona ve PDA'ya neden olmaktadır [163].

2.2.4. Epigenetik Regülatörleri Kodlayan Genler

Model organizmaların analizleri, kalp gelişimi için kromatin yapısının dinamik modifikasyonunun gen ekspresyonunda önemli bir regülatör olduğunu göstermiştir [218]. Kromatin-modifiye eden enzimler iki gruba ayrılırlar. İlki ATP

bağımlı nükleozom değiştirici enzimlerdir; diğeri ise Histon-modifiye eden enzimlerdir [164,165].

Histon modifiye eden enzimler çeşitli bölgelerde histonların amino asidlerine spesifik kimyasal grupların eklenmesini veya çıkarılmasını sağlarlar. Histon modifikasyonunun asetilasyon, deasetilasyon, metilasyon, demetilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon gibi çeşitli şekilleri vardır. ATP bağımlı nükleozom değiştirici enzimler; ISWI, SWI/SNF, CHD, INO80 şeklinde dört subgruba ayrılabilir. Bu kompleksler transkripsiyona izin vermek veya önlemek için koaktivatörler ve korepresrlerle birlikte nükleozomların repozisyonunu yönetirler [166,167,168]. Vertebralardaki SWI/SNF kompleksleri Brg1/ Brahma-asosiye faktör (BAF) kompleksleri olarak bilinir [169,170]. Brg1 SWI/SNF komplekslerinde ATPase subunit olarak fonksiyon gösterir. Brg1 yokluğunda fare embriyolarının kardiyomiyositlerin ekspansiyonunun ve matürasyonunun başladığı postkonsepsiyon 11.5 günde öldükleri gözlemlenmiştir [164]. Bunun tesinde Gata4 ve Tbx5'in Baf60c ile kombinasyonu; non-kardiyogenik fare mezoderminden diferansiye kardiyomiyositlere dönüşüm için yeterli olmuştur [171]. Baf 180'nin null mutasyonlarında ise fareler postkonsepsiyon 15 günde ölmüşlerdir ve bu farelerde hipoplastik ventrikül ve VSD görülmüştür [172]. Bu bulgular; BAF kompleksinin kardiyogenez için anahtar bir rol oynadığını göstermektedir. Histonlara bağlanan veya histonları modifiye eden proteinleri kodlayan genler kalp defektlerine neden olan sendromlarda hastalık genleri olarak tespit edilmişlerdir.

Kabuki sendromu, intellektüel disabilite, kraniyofasiyel anomali, iskelet ve el malformasyonları ile karakterizedir. Anormal organ gelişiminin görüldüğü sendromda %50 vakada sıklıkla septal defektler ve aort koarktasyonu olmak üzere, KKH da görülmektedir [173,174]. KMT2D (MLL2) gen mutasyonu Kabuki sendromunun major sebebidir. KMT2D histon H3'n Lys-4 pozisyonunun di ve tri metilasyonunda görevli histon metiltransferazı kodlar [175].

CHARGE sendromunda (OMIM # 214800) büyüme geriliği, göz, kulak, genital malformasyonlar ve kalp defektleri görülmektedir [176,177]. Vakaların yaklaşık 2/3' CHD7 mutasyonları sebebiyle oluşur [176,178]. In vitro çalışmalarda CHD7'nin H3K4 metilasyon bölgelerine yakın DNA bölgelerine bağlandığı

gösterilmiştir [179]. CHD7'nin nöral krest hücre migrasyonu için gerekli olduğu tespit edilmiştir [180]. CHARGE sendromunda yüksek oranda görülen outflow tract defektleri CHD7'nin bu fonksiyonu ile açıklık kazanmıştır; bilindiği gibi nöral krest hücreleri kardiyak çıkış yolunun (OFT) septasyonunda önemli rol oynamaktadırlar [181].

2.2.5. Mikrodelesyon ve Mikroduplikasyon Sendromlarında Tanımlanan KKH Aday Genleri

Mikrodelesyon ve mikroduplikasyon sendromlarında genotip-fenotip karşılaştırılması ile KKH aday genleri tespit edilmiştir. DiGeorge sendromunun (DGS, OMIM # 188400, 22q11 delesyon sendromu (DS) ve velokardiyofasiyal sendromu olarak da bilinir)) büyük çoğunluğu 22q11.2 de bulunan 3Mb'lık bir delesyon sebebiyle oluşur [182].

22Q11.2 duplikasyon sendromu (OMIM # 608363) 22q11.2 deki genomik materyalin duplikasyonu sonucu oluşmaktadır. 22Q11.2 duplikasyonlarının büyük çoğunluğu DGS'deki 3Mb'lık delesyonun resiprokali olarak görülmüştür [183]. 3Mb'lık delesyonda 50'den fazla gen etkilenmektedir. Bu genler arasında T-box transkripsiyon faktörü TBX1 de bulunmaktadır. TBX1-/- farelerde 22q11.2 DS olan bireylerdeki benzer kardiyak fenotip gözlemlenmiştir [184,26].

TBX1 kardiyak çıkış yolunun (OFT) gelişimine katkı veren hücre popülasyonlarını içeren SHF'deki kardiyak progenitörlerin proliferasyonu için gereklidir [84]. TBX1 nokta mutasyonları 22q11.2 delesyonu olmayan ancak DGS'ye benzer bir klinik prezentasyon gösteren bireylerde de görülmüştür [185,186]. Tbx1'i fazla eksprese eden transgenik fareler, 22q11 duplikasyon hastalarına, kardiyak çıkış yolu defektlerini de içeren fenotipik benzerlikler göstermişlerdir. Bu durum TBX1'in gen dozajının normal kardiyak gelişim için önemli olduğunu göstermektedir [183,188,187]. Buna karşın; 3 Mb bölgesinde olup, TBX1 distalinde küçük (1.5 Mb) delesyon taşıyan vakalar rapor edilmiştir [189,82]. Bu durum da; TBX1'den başka genlerin DGS hastalarındaki kardiyak fenotipe sebep olabileceğini göstermektedir.

Bu bölgede bulunan bir aday gen de CRKL'dir. CRKL delesyonu olan farelerde defektif OFT gelişimi ve VSD görülmektedir [189,190]. Tbx1+/- Crkl+/-

olan çift mutant farelerde kardiyak fenotiplerin daha ağır seyrettiği görülmüştür [27]. CRKL ile Fgf8 arasında da bir genetik ilişki olduğu gösterilmiştir [28]. Bu da; DGS'nin patogenezinde FGF8, TBX1 ve CRKL1 arasında bir bağ olduğunu desteklemektedir.

Fenotipik çeşitlilik DGS'nun ve 22q11.2 duplikasyon sendromunun karakteristik bir özelliğidir. Bu varyasyonlar 22q11.2 bölgesindeki gen varyasyonlarından kaynaklanabileceği gibi epistazdan da kaynaklanıyor olabilir. Tbx1'in çeşitli protein ve sinyal yolları ile etkileşime girdiği ve regüle ettiği gösterilmiştir. Tbx1 delesyonunun olduğu dokuların gen ekspresyon profili ile pek çok Tbx1 hedef geni tespit edilmiştir; bunların arasında retinoik asidin (RA) homeostazında yer alan genler de bulunmaktadır [191,192]. RA Tbx1 ekspresyonunu regüle eder [193]. Tbx1 ile RA sinyali arasında dual bir ilişki var gibi gözükmektedir. Faringeal ark gelişiminde faringeal endoderimde Tbx1 ekspresyonu Hedgehog sinyal yolağı ile regüle edilir [194,195]. Tbx1 ise SHF'de ve faringeal endoderimde FGF8'in ekspresyonunu regüle eder [83,196]. Tbx1 aynı zamanda SMAD1'e bağlanarak BMP sinyali üzerinde negatif bir modülatör olarak rol oynar [197].

William-Beuren sendromu (WBS, OMIM # 194050) 7q11.23 genomik bölgesinde delesyon sonucu oluşur. WBS hastalarının büyük çoğunluğunda 28 geni içeren 1.5-1.8 Mb'lık bir delesyon bulunur [198,199]. Özellikle supralvalvular aortik stenoz (SVAS) ve pulmoner arter stenozu (PAS) olmak üzere %75 hastada kardiyovasküler anomaliler görülmektedir[200]. %6-10 vakada aortik veya mitral valv defektleri görülürken ASD, VSD, TOF şeklinde WBS için atipik olan kardiyak defektler de önemli oranda görülmektedir [200,201]. ELN geni elastini kodlar ve WBS hastalarında görülen SVAS'a neden olduğu bildirilmiştir. Sadece ELN ve LIMK1 genlerinde atipik delesyonları olan SVAS hastaları bildirilmiştir [202,203]. ELN nokta mutasyonları ailesel ve sporadik SVAS ile ilişkilendirilmiştir [204,130]. Ancak ELN delesyonu WBS hastalarının bir kısmında görülen atipik kalp defektlerini açıklamamaktadır. Baz1b geni WBS'de sıklıkla görülen delesyon bölgesinde bulunur. Homozigot Baz1b-/- farelerde ASD, VSD, trabekülasyon defektleri, aort koarktasyonu gibi atipik kardiyak defektler görülmüştür [205]. BAZ1B (aynı zamanda WSTF olarak bilinir) üç ATP bağımlı kromatin değiştirici kompleksinde (1-WSTF içeren nukleozom assembly kompleksi / WINAC; 2-WICH

kompleksi / WSTF-ISWI kromatin değiştirici kompleks ve 3-B-WICH kompleksi) subunit olarak görev yapar [206,207,208]. Bu kompleksler, gen regülasyonu, DNA replikasyonu ve DNA onarımı için önemlidir [207,209]. BAZ1B knock-out farelerin kardiyak fenotipleri ve BAZ1B'nin kromatin değiştirici fonksiyonu WBS'deki bazı fenotiplerin örneğin atipik kalp defektlerinin epigenetik etkiler sebebiyle oluşabildiği izlenimini vermektedir.

Wolf-Hirschorn sendromu (WHS, OMIM # 194190) 4p16.3deki mikrodelesyonlar nedeniyle oluşmaktadır. Hastalardaki genotip-fenotip karşılaştırması histon lizin metil transferaz WHSC1'i (aynı zamanda NSD2 olarak bilinir) kodlayan genin haployetersiz olması durumunda WHS fenotipinin ortaya çıktığını göstermektedir [210]. WHSC1-/- mutant farelerde ASD ve VSD görülmekte olup, yapılan araştırmalarda Whsc1'in kardiyak transkripsiyon faktörü NKX2-5 ile etkileşime girdiği görülmüştür [211]. Dahası, chip-assay ile hedef genlerin transkripsiyonel regülasyonunda Whsc1'in Nkx2-5 ile birlikte çalıştığı gösterilmiştir. Whsc1-/+ ve Nkx2.5-/+ farelerde yapılan araştırmalar iki genin kardiyak septal formasyon sırasında etkileştiğini göstermiştir. WHS'de görülen kalp defektlerine sebep olan bir başka aday gen FGFR1 genidir. FGFR1 geni fibroblast büyüme faktörü reseptör ailesinden bir üyeyi kodlamaktadır. Fare gelişiminde Fgfr1'in beyinde, faringeal arkta ve kalpte eksprese olduğu görülmüştür [212]. Farelerde Fgfr1'in delesyonu VSD, atrioventriküler valv deformasyonu şeklinde kalp defektlerine neden olmaktadır. 8p23.1'in interstitial delesyonlarında %94 vakada kardiyak defektler görülmüştür [213]. Bu defektler izole septal defektlerden kompleks kalp defektlerine (Fallot Tetralojisi, hipoplastik sol kalp sendromu) çeşitlilik göstermektedir. Hastaların bir kısmında yaklaşık 3.7Mb rekürren delesyonlar görülürken bazı hastalarda 8p telomere uzanan daha geniş delesyonlar görülmektedir.

Rekürren delesyonların görüldüğü bölgede GATA4 geni bulunmaktadır. GATA4 gen mutasyonları sıklıkla septal defektler olmak üzere çeşitli KKH'a neden olmaktadır [214]. GATA4; NKX2-5, TBX5, ZFPM2 (FOG2), SMAD4 ve HAND2 gibi çeşitli diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer [215,109,126,160]. Bu nedenle; 8p23 delesyonlarının bir kısmında görülen kompleks kardiyak fenotipler; GATA4'ün bağlandığı faktörleri kodlayan genlerin epistatik etkilerinden kaynaklanıyor olabilir.

2.3. Kardiyak Septal Defektler

2.3.1. Ventriküler Septal Defektler

Ventriküler septal defektler, tüm konjenital kalp hastalıkları arasında en sık görülen kalp malformasyonlarından ve anatomik olarak heterojendir. Bu heterojen yapı konusunda insan genetik çalışmaları malesef kardiyoloji literatürünün aksine önemli ayrımlar yapmakta başarılı olamamıştır. Perimembranöz VSD'ler; daha sık görülen muskuler VSD'lerin aksine, membranöz septumun içinde veya sınırında oluşur (membranöz septum; muskuler septumun üst kısmıyla endokardiyal yastıkçıkların füzyonu sonucu oluşur). Perimembranöz VSD'ler, outlet, inlet ve trabeküler olmak üzere üç tipe ayrılırlar. Outlet septumdaki defektlerin conus septumun füzyonunun başarılı olmamasına bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Inlet defektlerin ise sağ üst endokardiyal yastıkçık ile muskuler septum arasında komplet bir füzyon gerçekleşmemesi sonucu olabileceği düşünülmektedir. Trabeküler septumdaki muskuler defektler ise muhtemelen medial duvarların yetersiz birleşmesi sonucu olabilir, denmektedir. VSD'ler tamamen farklı kardiyak elementlerden oluşabileceği için, bu defektlerin moleküler yorumu risklidir. VSD'ler kalp gelişimini etkileyen hemen hemen tüm genetik bozukluklarda görülebilmektedir, bu yüzden genetik sebeplerin araştırıldığı çalışmalar spesifik olamamıştır. Bazıları, Velokardiyofasiyal sendromda olduğu gibi; ortak çıkış yolu (common outflow defect) defektlerinin devamı şeklinde görülür. Bazıları; Down sendromunda olduğu gibi AV kanal defektlerinin devamı şeklinde görülür. Muskuler VSD'ler; Holt-Oram Sendromunda (TBX5 mutasyonu) ve GATA4 mutasyonlarında olduğu gibi büyük ihtimalle kardiyomiyosit gelişimindeki defektlere bağlı olarak görülmektedir [102,103] veya konjenital kardiomyopatide (örneğin; sol ventriküler non kompaksiyon) görüldüğü gibi kardiyomiyositlerin varlıklarını sürdürmelerinde veya yeniden şekil almalarında meydana gelen defektler neticesinde oluşabilir [104]. VSD'ler sık olarak diğer başka defektlerle birlikte görülebilir. Bu defektler daha kompleks, birden fazla olabilir yada aort koarktasyonu gibi tek olabilir. Bu birlikteliklerin spesifik bir moleküler alt tip mi yoksa normal olmayan intrakardiyak kan akımı sonucu gelişebilen sekonder defektler mi olduğu bilinmemektedir. VSD'ler; Rubinstein-Taybi sendromu (CREBBP haploinsufficiency) gibi multisistem sendromlarında da sıklıkla görülür.

2.3.2. Atrial Septal Defektler

Tek atrium; septum primum ve septum sekundumun gelişmesinde yaşanan başarısızlık sonucu atrial septasyonda erken ve ağır bir defekt olarak ortaya çıkar. Bu anomali EVC veya EVC2 mutasyonlarına bağlı olarak oluşan Ellis Van Creveld Sendromunun karakteristik bir bulgusudur [105]. Atrioventriküler kanal defektleri ve tek atriumun kombinasyonu, defektif kolesterol biyosentezi sonucu oluşan Smith-Lemli-Opitz Sendromunda görülebilmektedir. Bu kompleks gelişim defektleri sadece defektif kolesterol modifikasyonundan değil aynı zamanda hedgehog sinyalinin negatif regülasyonu sonucu oluşabilir [106]. Septum sekundumdaki defektler (sekundum ASD/ ASD2) ASD'lerin en sık görülen formudur ancak trikuspid ve mitral kapakların düzeyinde, atrial septumda oluşan primum ASD (ASD1) de önemlidir. Primum ASD'de atrioventriküler kapak anomalileri de görülür. Septal defektlere neden olan genetik hastalıklarının prototipi Holt-Oram Sendromudur. Bu durum TBX5 mutasyonları sonucu oluşur ve hemen hemen her zaman başparmak, el ve radial malformasyonlar septal defektlere eşlik eder [102,107]. Önemli bir başka transkripsiyon faktörü olan NKX2-5'teki mutasyonlar sonucu oluştuğu tespit edilen ailesel ASD'ler de vardır [108]. Bu hastalarda sıklıkla kardiyak ileti bozukluklarına da rastlanır. Önemli bir diğer transkripsiyon faktörü olan GATA4 ve TBX20'deki mutasyonlar da izole ASD'nin görüldüğü ailelerde bulunmuştur [109,110]. Bu ailelerin bazı bireylerinde kardiyomiyopati de saptanmıştır bu durum da transkripsiyon faktörlerine normal kardiyomiyosit oluşumu için devam eden bir ihtiyacın varlığına işaret etmektedir. Tüm bu transkripsiyon faktörleri, kardiyak gen ekspresyonunu regüle eden bir kompleksin parçalarıdır. Ailesel ASD'lerde MYH6 gen mutasyonları da görülmüştür [111]. MYH6 geni TBX5'e hedef olan kontraktıl bir protein kodlar, dolayısıyla MYH6 ile TBX5 arasında potansiyel fonksiyonel bir bağ vardır. Bu ailelerden elde edilen bu veriler, transkripsiyon faktörü TBX5, kontraktıl protein MYH6 ve atrial septal defekt arasındaki fonksiyonel bağa işaret etmektedir. Alfa kardiyak aktin (ACTC1) gen mutasyonlarının ailesel ASD'lerde görülmesi kontraktıl protein bozuklukları ile septal defektler arasındaki bağ kuvvetlendirmiştir [112]. ASD'ler pek çok Mendelyan bozukluklarda sıklıkla görülür, bu da çeşitli ve farklı yolakların atrial septasyonda rol aldığını göstermektedir veya ASD'nin kardiyak gelişiminin erken dönemdeki bozukluklarının

non-spesifik bir sonucu olarak oluştuğunu öne sürmektedir. ASD'lerin; BCOR'daki mutasyon sonucu oluşan MCOPS3 (Microftalmia syndromic3) gibi sendromik göz bozukluklarında [113] ve RBM10 mutasyonları ile oluşan TARP sendromunda [114] görülmeleri; atrial septasyonun pek çok bilinmeyen, beklenmedik faktörlere karşı hassasiyetini göstermektedir. Nodal sinyal yolağında ve embriyonik sol sağ (LR) paterninde yer alan bir gen ürünü olan CITED2 mutasyonlu bireylerde ASD'nin görülmeleri erken embriyonik anomalilerin, anatomik sonuçlarının çeşitliliğinin bir göstergesi olmaktadır [115].

2.3.3. Atrioventriküler Septal Defektler

Atrioventriküler septal defektler; inferior atrial septumu ve superior ventriküler septumu içine alan pek çok malformasyonu kapsar. Bu malformasyonlara aynı zamanda endokardiyal yastıkçık ve AV kanal defektleri de denir. AVSD'li hastaların yaklaşık 2/3'ünde sitogenetik bir anomali olduğu yapılan çalışmalarla tahmin edilmektedir. AVSD'nin en sık birlikte görüldüğu anomali ise Trizomi 21'dir [116]. Kalp gelişiminde önemli rolleri olan GATA4 ve SOX7 transkripsiyon faktörlerini de içine alan 8p23 delesyonu olan hastalarda da tipik olarak AV kanal defektlerine rastlanır [117]. GATA4'ün missense mutasyonlarının AVSD'e neden olduğu gösterilmiştir [109]. Ek olarak, 3p25-26 delesyon sendromunda da AVSD en sık görülen kardiyak defektir [118]. Bu bölgede bulunan CRELD1 geni AVSD ile ilişkilendirilmiştir ve bazı çalışmalarda nokta mutasyonları tanımlanmıştır [119,16]. BMPR2 mutasyonları da primer pulmoner hipertansiyon ve konjenital kalp hastalıklarının birlikte görüldüğu çeşitli hastalarda saptanmıştır [120]. BMP/TGF- β reseptörü olan ALK2'de görülen mutasyonlar da AVSD ile ilişkilendirilmiştir [121]. Otozomal dominant geçişli ailesel AVSD için kromozom 1p31-p21 lokusu saptanmıştır ancak spesifik gen henüz tanımlanamamıştır [122].

2.4. Non-sendromik Konjenital Kalp Hastalıklarında Genetik Etiyoloji

Non-sendromik, izole KKH'a neden olan gen nokta mutasyonlarının sayısı hızla artmaktadır [123,31] (Tablo2.6.). Transkripsiyon faktörlerinin kalp gelişiminde çok önemli rolleri olduğu bulunmuştur [124,24]. Kardiyovasküler yapısal gelişim;

kardiyomiyositler, ileti sistemi, düz kas hücreleri, valvular ve endotel hücreleri gibi farklı hücre tiplerinin koordinasyonlu üretimi sonucu sağlanır. Transkripsiyon faktörlerinin kendi aralarında, hedef genler ve sinyal pathwayleri ile olan bağlantıları ile kardiyak hücrelerin kaderini ve kardiyak morfogenezi kontrol eden genlerin aktivasyonu gerçekleşir [4]. İnsanlarda, transkripsiyon faktörlerinin mutasyonu sonucu oluşan malformasyonların klinik spektrumu çok geniştir; genotip-fenotip bağlantısı komplekstir; bir yapısal defekt birden fazla gen mutasyonu sonucu oluşabilir aynı zamanda aynı gen mutasyonları farklı yapısal defektlere neden olabilir. GATA4 gen mutasyonları sadece kalıtsal septal defektlere neden olmaz aynı zamanda atrioventriküler kanal defektlere de sebep olur [125,126]. NKX2-5 gen mutasyonları da benzer şekilde; atrial septal defekt, ventriküler septal defekt, aort koarktasyonu, ileti-sistem bozuklukları gibi pek çok farklı KKH'a neden olur [108]. Fakat sporadik, non-sendromik KKH'larında transkripsiyon faktör gen mutasyonlarının frekansı %0-3'tür [127,128]. Dolayısıyla, başka genlerin ve moleküler mekanizmaların etkili olduğu öne sürülmüştür. Sinyal yollarında yer alan molekülleri kodlayan genlerdeki mutasyonların değişik formlardaki sporadik konjenital kardiyak defektlere neden olduğu gösterilmiştir. Notch sinyal yolağının kardiyak morfogenezde önemli rolleri vardır. NOTCH1 mutasyonu da dominant kalıtılan BAV ile ilişkili bulunmuştur [217,129]. Kardiyak yapısal proteinlerden elastin (ELN) gen mutasyonları da sporadik supravavular aort stenozlu hastalarda saptanmıştır [130]. Benzer olarak, MYH6 gen (kardiyak kas proteini kodlayan gen) mutasyonlarının sporadik atrial septal defektlere neden olduğu görülmüştür [112,131].

Nadir (popülasyon frekansı \leq %1) kopya sayısı varyantları (CNV) sporadik, non-sendromik KKH'larının %5-10'undan sorumlu görülmektedir [8]. Geniş de novo CNV'ler (probandlarda görülüp, ebeveynlerde görülmeyen); Fallot Tetralojisinde ve diğer izole KKH vakalarında tespit edilmiştir [132,133,134]. Bazı CNV'ler daha önce klasifiye edilmiş KKH genlerini içerirler. KKH'larında GATA4 geninde reküren CNV'ler saptanmıştır [135]. Kromozom 20p12.2 ve 9q34.3'te Notch sinyal yolağından JAG1 ve NOTCH1 genlerini içeren CNV'ler bulunmuştur [136].

Tablo 2.6. Kardiyak Morfogenezde Etkili Transkripsiyon Faktörleri

Gen	Kardiyak Fenotip	OMIM
ANKRD1	Total Pulmoner Venöz Dönüş Anomalisi	609599
CITED2	Ventriküler Septal Defekt Atrial Septal Defekt	602937
GATA4	Atrial Septal Defekt AtrioventrikülerSeptal Defekt	600576
GATA6	PersistanTrunkus Arteriozus Pulmoner Valv Stenozu	601656
HAND2	Fallot Tetralojisi	602407
HEY2	Trikuspid Atrezi	604674
IRX4	VentrikülerSeptal Defekt	606199
NKX2-5	Atrial Septal Defekt Fallot Tetralojisi Hipoplastik Sol Kalp Kesintili Arkus Aorta Heterotaksi BüyükArterlerin Transpozisyonu Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül VentrikülerSeptal Defekt	600584
NKX2-6	PersistanTrunkus Arteriozus	611770
TBX1	VentrikülerSeptal Defekt Kesintili Arkus Aorta	602054
TBX5	Atrial Septal Defekt VentrikülerSeptal Defekt Atrioventriküler Septal Defekt	601620
TBX20	Atrial Septal Defekt VentrikülerSeptal Defekt Patent Duktus Arteriozus Hipoplastik Sol Kalp Atrial Septal Defekt	606061
TFAP2B	Patent Duktus Arteriozus	601601
ZFPM2	Fallot Tetralojisi Çift Çıkımlı Sağ Ventrikül	603693
ZIC3	Heterotaksi BüyükArterlerin Transpozisyonu Atrial Septal Defekt	300265

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma Planı ve Hasta Seçimi

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Genetik Bilim Dalı'nda 2014-2015 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından etik açıdan uygun bulunmuştur ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP6080 Hızlı Destek Projesi ile desteklenmiştir (GO 13/568-18) (Proje ID: 1572).

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Çocuk Kardiyolojisi Bilim Dalı polikliniğinde atrial septal defekt (ASD), ventriküler septal defekt (VSD), atrioventriküler septal defekt (AVSD) tanısı alan ve çalışmamız öncesi genetik tanı almamış, görünüşte non-sendromik 27 kız, 18 erkek olmak üzere toplam 45 hasta dahil edilmiştir. 21 hasta ASD, 14 hasta VSD, 8 hasta VSD+ASD, 2 hasta AVSD tanısı almıştır. Ekstrakardiyak malformasyonu olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir, ancak çalışma öncesi genetik tanı almış sendromik hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2. Çalışmanın Yürütülmesi ve Yöntem

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyolojisi Bilim Dalı polikliniğinde transtorasik ekokardiyografi (EKO) ile kardiyak septal defekt saptanan hastalar, Çocuk Genetik Bilim Dalı'nda klinik olarak değerlendirilmiş ve Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak hasta ve hasta ebeveynlerine çalışma konusunda bilgilendirici formlar verilmiş, gerekli onamlar alındıktan sonra çalışmaya dahil edilmişlerdir. Moleküler çalışmalar Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Genetik Tanı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Klinik Değerlendirme

Hastaların başvuru sırasındaki antropometrik ölçümleri, dismorfik yüz bulguları, diğer sistemik muayene bulguları, annenin gebeliği esnasında geçirilmiş hastalık öyküsü, ilaç kullanımı ve hastaların aile hikayesi, üç nesil pedigri araştırılması Hasta Değerlendirme Formu kullanılarak kaydedilmiştir. Hasta Değerlendirme Formu EK 1'de gösterilmiştir. Hastalarda büyümenin değerlendirilmesi sırasında; boy, vücut ağırlığı ve baş çevresi ölçümleri dikkate alınmıştır.

3.4. Moleküler Çalışmalar

Klinik değerlendirmenin ardından çalışma için uygun bulunan hastalar moleküler çalışmaya alınmışlardır. Çalışmada MLPA analizi; SALSA MLPA P 311-A2 Konjenital Kalp Hastalıkları kiti (MRC- Holland, Amsterdam, Hollanda) kullanılarak geręekleřtirilmiřtir.

3.4.1. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu ve DNA Kalite Analizi

Hastalardan DNA elde etmek amacıyla, kan örnekleri 10 ml olacak şekilde EDTA'lı tüplerin içine ön kol median kubital venden alınmıştır. Periferik kan örnekleme, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Bilim Dalı'nda poliklinik hemşiresi tarafından yapılmıştır ve genetik analiz için alınan kan örnekleri Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Genetik Laboratuvarı'na yönlendirilmiştir. DNA izolasyonu tuzda çöktürme yöntemi (amonyum asetat) ile yapılmıştır.

Genomik DNA konsantrasyonu ve saflığının ölçümü için NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. DNA'nın miktar ve saflığı spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerden belirlenmektedir. DNA'nın kalitesi için A260/280 ve A260/230 değerlerine bekılmaktadır. Temiz bir DNA'da A260/280 oranı 1,8 ile 2,0 arasında ve A260/230 oranı 2'den büyük olmalıdır. Bu ölçümle 1,8'in altında elde edilen A260/280 değeri protein kontaminasyonunu, 2'nin üzerinde elde edilen A260/280 değeri RNA

kontaminasyonunu işaret etmektedir. Hasta DNA'larının temiz oldukları ve kontamine olmadıkları doğrulandıktan sonra deneylere devam edilmiştir.

3.4.2. Multipleks Ligasyon-Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)

Genomik DNA kullanılarak GATA4, NKX2-5, TBX5, BMP4, CRELD1 genlerini içeren kopya sayısı varyantlarının ve 22q11 kromozom bölgesinin analizi için SALSA P-311-A2 MLPA kiti (MRC-Holland, Amsterdam, Hollanda) kullanılmıştır.

Multipleks Ligasyon- bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) Yöntemi:

1- DNA'nın Denatürasyonu ve SALSA Probları ile Hibridizasyonu:

Uygun konsantrasyondaki (50-100 ng/ μ L) DNA örneği 98 °C'de denatüre edilir. Sonrasında 25°C'ye soğutulurak 1,5 μ L SALSA prob karışımı ve 1,5 μ L MLPA tamponu ile karıştırılarak 95°C'de bir dakika boyunca birlikte denatüre edilir. Sonrasında 60 °C'de 16 ile 20 saat arası hibridizasyona bırakılır.

2- Ligasyon Reaksiyonu:

Hibridizasyon süresinin sonunda 54 °C'de bir dakika inkübasyon sonrası 54 °C'deki örneklerin üzerine 32 μ L Ligaz karışımı (25 μ L dH₂O + 3 μ L Ligaz tampon A + 3 μ L Ligaz tampon B + 1 μ L Ligaz-65 enzimi) eklenir. Onbeş dakika boyunca 54 °C'de inkübe edildikten sonra 5 dakika boyunca 98 °C'de tutulur ve sıcaklığı 20 °C'ye düşürülen örnekler PCR basamağına alınır.

3- PCR:

Ligasyon reaksiyonu basamağında elde edilen karışımların üzerine oda sıcaklığında 10 μ L polimeraz karışımı (7,5 μ L dH₂O, 2 μ L SALSA PCR primer karışımı ve 0,5 μ L SALSA polimeraz) eklenir ve PCR yapılır. Sonrasında PCR 95 °C'de denatürasyon (30 sn), 60 °C'de hibridizasyon (30 sn) ve 72 °C'de elongasyon (60 sn) basamaklarından oluşan 35 döngü

sonrasında 72 °C’de 20 dakika inkübasyon ve örnek sıcaklıklarının 15 °C’ye düşürülmesi ile son bulur.

4- Amplifikasyon Ürünlerinin Kapiller Elektroforezle Ayrılması ve Miktarlarının Belirlenmesi:

Bu aşamada 0,7 µL PCR ürününe 0,3 µL ROX-500 ve 9 µL deiyonize formamide eklenir. ABI-3130 dizi analizi cihazında 36 cm kapillerlerde yürütülür ve uygun yazılım (Coffalyser.Net, MRC-Holland) kullanılarak veri analizi yapılır.

MLPA analizi firmanın önerdiği protokole uyularak yapılmıştır (*MLPA®DNADetection/Quantification Protocol, MRC-Holland*).

MLPA ürünleri ABIPRISM®3130Genetic Analyzer (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) kullanılarak analiz edilmiştir. Veri analizi üretici firmanın önerisi doğrultusunda Coffalyser. Net®programı kullanılarak yapılmıştır.

SALSA P311-A2 MLPA Konjenital Kalp Hastalıkları kitinde GATA4 geninin 7 ekzonu için 7 prob ve genin upstream ve downstreami için 2 prob; NKX2-5 geninin 2 ekzonu için 2’şer prob; TBX5 geninin 8 ekzonu için 8 prob, 9. ve 10. Ekzon için 2’şer prob; BMP4 geninin 5 ekzonu için 4 prob; CRELD1 geninin 11 ekzonundan ekzon 3 ve ekzon 10 için birer prob ve 22q11 kromozom bölgesi için 3 prob, bunlara ek olarak 10 referans prob bulunmaktadır.

Kullanılan SALSA P311-A2 MLPA Konjenital Kalp Hastalıkları kitinin özellikleri ekte sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Özellikler

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı Polikliniğinde kardiyak septal defekt tanısı alan görünüşte non-sendromik 45 hasta dahil edilmiştir. Bu hastalardan 27'si (n= 27/45, %60) kız, 18'i (n= 18/45, %40) erkektir. Hastaların (n=45) başvuru yaşı 3 ay ile 235 ay arasında değişkenlik göstermiştir (ortalama başvuru yaşı 63,37 ay). Hastaların 9'unun (n= 9/45, %20) aile öyküsünde akrabalık olduğu saptanmıştır. Bu dokuz hastanın 7'inin anne ve babası arasında 1. derece kuzen evliliği olduğu, 2'inin anne ve babası arasında uzak akrabalık olduğu tespit edilmiştir. Hasta CHD42 ve hasta CHD43 kardeşlerdir. Hastaların 4'ünde (n=4/45, %8,8) konjenital kalp hastalığı aile öyküsü olduğu saptanmıştır. Bir hastamızın ikiz kız kardeşinde atrial septal defekt olduğu, iki erkek kardeş olan hastalarımızın annelerinin önceki üç çocuğunu ve bir kız bir de erkek kardeşini dilate kardiyomiyopati nedeniyle kaybettiği, bir hastamızın da babasında atrial septal defekt olduğu saptanmıştır.

4.2. Hastaların Klinik Bulguları

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı Polikliniğinde kardiyak septal defekt tanısı alan 45 hastadan 21 hasta atrial septal defekt (ASD) (n= 21/45, %46,6) , 14 hasta ventriküler septal defekt (VSD) (n= 14/45, %31,11), 8 hasta VSD+ASD (n= 8/45, %17,77), 2 hasta atrioventriküler septal defekt (AVSD) (n= 2/45, %4,44) tanısı almıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların 9'unda (n= 9/45, %20) büyüme geriliği saptanmıştır. Bu dokuz hastanın 8'inde boy ve ağırlık 3 persentilin altında saptanırken, bir hastada boy 10.persentil, ağırlık 3 persentilin altında tespit edilmiştir. Bu hastaların üçü 22q11.2 delesyonu saptanan hastalardır. Hastaların 4'ünde (n=4/45, %8,8) gelişme geriliği tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). Bu hastalardan birinde 22q11.2 delesyonu bulunmuştur. 22q11.2 delesyonu olan hastanın ailesi, doğuştan beri anlama güçlüğü olduğu ve halen sınıfını geçmekte zorlandığını bildirmiştir. Diğer üç hastanın biri, 2 yaşında yürümüş ancak 7,5 yaşında sadece anne-baba diyebiliyorken, cümle

kuramamaktadır. Bir diğ er hasta 3 yaş ında sadece anne-baba diyebilirken; diğ eri de 7 aylıkken baş ını dik tutabilmiş , 15 aylık oldu ğ u halde desteksiz oturamamaktadır.

Ekstrakardiyak konjenital anomalisi olan 2 hasta (n= 2/45, %4,4) ç alışmaya dahil edilmiştir . Bu hastalardan birinde koanal atrezi, diğ erinde konjenital adrenal hiperplazi (KAH) tespit edilmiş olup KAH saptanan hastada ambiguous genitelya da saptanmıştır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Ç alışmaya dahil edilen hastaların yüz özelliklerine bakıld ığında iki hastada (n=2/45, %4,44) burun kökü belirgin görülmüş olup bu iki hasta da 22q11.2 delesyonu tespit edilen hastalardır. Üç hastada (n=3/45, %6,66) antevort kulak tespit edilmiş olup bu hastaların da ikisi 22q11.2 delesyonu saptanan hastalardır. Bir hastada (n=1/45, %2,22) epikantus, bir hastada (n=1/45, %2,22) da palpebral aralık uzun olarak tespit edilmiştir . Palpebral aralık uzun olarak saptanan hastada 22q11.2 delesyonu tespit edilmiştir . Bir hastada (n=1/45, %2,22) yarı k damak ve dudak saptanırken, koanal atrezisi olan bir hastada da (n=1/45, %2,22) mikrognati saptanmıştır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Baş ve santral sinir sistemi bulgularına bakıld ığında bir hastada (n=1/45, %2,22) hidrosefali ve trigonosefali saptanırken, bir baş ka hastada (n=1/45, %2,22) intrakranial kist tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Endokrin sistem bulgularına bakıld ığında iki hastada (n= 2/45, %4,44) hipotiroidi saptanmıştır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Gastrointestinal sistem bulgularına bakıld ığında iki hastada (n=2/45, %4,44) inguinal herni, bir hastada (n= 1/45, %2,22) özafagus atrezisi tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Genitoüriner sistem bulguları incelendiğ inde, bir hastada (n=1/45, %2,22) ambigiüs genitelya, bir hastada (n=1/45, %2,22) böbrek kisti tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Kas ve iskelet sistem bulgularına bakıld ığında iki hastada (n= 2/45, %4,44) skolyoz tespit edilmiştir . Bu hastalardan birisinde 22q11.2 delesyonu tespit edilmiştir . Bir hastada (n=1/45, %2,22) parmaklarda overriding tespit edilmiştir ve

bu hasta da MLPA analizinde 22q11.2 delesyonu tespit edilen bir diğerk hastadır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Nöroloji sistem bulguları sorgulandığında bir hastanın (n= 1/45, %2,22) epilepsi hastası olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Nöropsikiyatrik sistem bulguları araştırıldığında bir hastada (n=1/45, %2,22) dikkat eksikliği tespit edilmiştir ve bu hasta 22q11.2 delesyonu tespit edilen üç hastadan biridir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

Dermatoloji sistem bulgularına bakıldığında bir hastada (n=1/45, %2,22) alnında ve bacağında hipopigmente alanlar tespit edilmiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2).

İşitme ve konuşma özelliklerine bakıldığında bir hastada (n=1/45, %2,22) işitme azlığı olduğu, bir hastada kekemelik (n=1/45, %2,22) olduğu saptanmıştır.

Hastaların aile hikayesinde akrabalık sorgulanmıştır. Çalışmaya dahil olan 45 hastanın 9'unda (n=9/45, %20) akrabalık olduğu saptanmıştır. Dokuz hastanın yedisinde (n=7/45, %15,55) anne ve baba arasında 1.derece kuzen evliliği olduğu tespit edilirken, iki hastanın (n=2/45, %4,44) anne ve babası arasında uzak akrabalık olduğu bildirilmiştir.

Hastaların aile öyküsünde konjenital kalp hastalığı araştırılmıştır. Hastaların 4'ünde (n=4/45, %8,8) konjenital kalp hastalığı aile öyküsü olduğu saptanmıştır. Bir hastamızın ikiz kız kardeşinde atrial septal defekt olduğu, iki erkek kardeş olan hastalarımızın annelerinin önceki üç çocuğunu ve bir kız bir de erkek kardeşini dilate kardiyomiyopati nedeniyle kaybettiği, bir hastamızın da babasında atrial septal defekt olduğu saptanmıştır.

4.3. Hastaların MLPA Analiz Sonuçları

MLPA analizi sonucu MLPA sinyalleri beş hasta hariç tüm çalışma grubunda tüm ekzonlarda normal aralıkta (0.7-1.3 arasında) bulunmuştur. 45 hastalık çalışma grubunun üçünde 22q11.2 kromozom bölgesinde delesyon tespit edilmiştir (n=3/45, %6.6). Hasta CHD21 ve CHD29'un 22q11.2 kromozom bandında, CDC45-1, GP1BB-2 ve DGCR8-14 ekzonunda; hasta CHD50'nin ise CDC45-1 ve GP1BB-2 ekzonunda delesyon tespit edilmiştir. Üç hastanın MLPA analiz sonuçlarının FISH

ile doğrulaması yapılmıştır. Hasta CHD21 ve hasta CHD29'un QBiogene PDEL 5141 DiGeorge DGSCR2 (CLTD) probu ile yapılan analiz sonucu 22q11.2 delesyonu tespit edilirken; hasta CHD50'nin Vysis 32-190012 DiGeorge Bölgesi N25 probu ile yapılan analiz sonucu 22q11.2 delesyonu tespit edilmemiştir.

Hasta CHD42, CHD43 ve CHD 50'de 8p23.1 kromozom bandında, GATA4'ün downstreaminde yer alan CTSB-9 ekzonunda delesyon tespit edilmiştir. Hasta CHD21 ve CHD29'da CTSB-9 ekzonunda duplikasyon tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Hasta CHD21; 22q11.2 delesyon:

Yapılan EKO'sunda ASD tespit edilen; boy ve ağırlığı <3 persentil olan; başını bir yaşında dik tutan, üç yaşında yürüyen CHD21'in muayenesinde büyüme geriliği ve gelişme geriliği tespit edilmiştir (Tablo 4.1) (Şekil 4.1). Boynunda kısalık, kulakları antevart, dişleri hafif ayırık ve skolyozu olan; ailesinde akrabalık öyküsü olmayan ve annesinin prenatal, natal ve postnatal öyküsünde bir patoloji saptanmayan 15 yaşındaki kız hastamızın bir kız ve bir erkek olmak üzere sağ ve sağlıklı iki kardeşi mevcuttur. Konuşmada ve bilişsel gelişiminde gecikme gösteren hastamız mental retardasyon açısından da değerlendirilmiştir. CHD21'in P311-A2 kiti ile yapılan MLPA analizi sonucunda 22q11.2 kromozom bölgesinde CDC45-1, GP1BB-2 ve DGCR8-14 ekzonlarının hedeflendiği problemlerde azalmış oranlar görülmüştür (0.25-0.35).

Hasta CHD29; 22q11.2 delesyon:

30 yaşındaki annenin ikinci gebeliğinden ikiz olarak 38 haftalık iken C/S ile 2700 gr olarak doğan; 5 günlük iken morarması ve üfürümü fark edilen; yapılan EKO'sunda VSD saptanan ve 2010 yılında opere edilen CHD29'un yapılan fizik muayenesinde büyüme geriliği tespit edilmiştir (ağırlık <3persentil; boy ≤ 10persentil) (Tablo 4.1) (Şekil 4.2.). Burun kökü belirgin, düşük ve antevart kulak, ayak parmaklarında overriding olan 6 yaşındaki erkek hastamızın ikiz erkek kardeşinde ve ablasında bir patoloji saptanmamıştır. Ailesinde akrabalık öyküsü olmayan hastamızın aile öyküsünde yarık damak ve dudak nedeniyle opere edilen ve sekiz aylık iken vefat eden bir halası bulunmaktadır. CHD29'un P311-A2 kiti ile yapılan MLPA analizi sonucunda 22q11.2 kromozom bölgesinde CDC45-1, GP1BB-

2 ve DGCR8-14 ekzonlarının hedeflendiği problemlerde azalmış oranlar görülmüştür (0.34-0.37).

Hasta CHD50; 22q11.2 delesyon:

25 yaşındaki annenin ikinci gebeliğinden miadında NSVY ile 3200 gr doğan; dört aylık iken EKO'sunda ASD + VSD saptanan ve opere edilen CHD50'nin yapılan muayenesinde büyüme geriliği tespit edilmiştir (boy <3 persentil, ağırlık <3 persentil) (Tablo 4.1) (Şekil 4.3.). Burun kökü belirgin ve skolyozu olan, beş yaşında inguinal herni operasyonu geçiren yedi yaşındaki kız hastamızın oniki yaşında sağ ve sağlıklı bir erkek kardeşi ve beş yaşında sağ ve sağlıklı bir kızkardeşi mevcuttur. Ailesinde uzak akrabalık öyküsü olan hastamızın anne ve babasının dedelerinin babaları kardeşlerdir. CHD50'nin P311-A2 kiti ile yapılan MLPA analizi sonucunda 22q11.2 kromozom bölgesinde CDC45-1 ve GP1BB-2 ekzonlarının hedeflendiği problemlerde azalmış oranlar görülmüştür (0.65-0.67).

Hasta CHD42 ve Hasta CHD43; 8p23.1 Kopya Sayısı Değişiklikleri Bulunan Hastalar:

İki erkek kardeş olan CHD42 ve CHD43'ün annelerinin altı gebeliğinden üç yaşayan çocuğu mevcuttur. Bir intrauterin kayıp (4 aylık gebelik), dilate kardiyomiyopati sebebiyle postnatal 16 günlük, bir de 4.5 aylık kaybı olan anne; bir kız bir de erkek kardeşini yine dilate kardiyomiyopati sebebiyle kaybetmiştir. Annenin, hastalarımız dışında, sağlıklı olan kız çocuğuna da kontrol amaçlı ekokardiyografi yapılmış olup bir patoloji saptanmamıştır. CHD42 ve CHD43'ün mental-motor gelişimleri normal bulunmuş, fizik muayenelerinde ek bir patoloji saptanmamıştır (Tablo4.1).

CHD21 ve CHD29'da saptanan 8p23.1 kromozom bandında yer alan CTSB-9 ekzonundaki duplikasyon ile CHD42, CHD43 ve CHD50'de CTSB-9 ekzonunda saptanan delesyon, polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. *Database of Genomic Variants*'da (DGV) ve *UCSC Genome Browser*'da CTSB-9 geninde tespit edilmiş olan delesyonlar ve duplikasyonlar incelendiğinde, herhangi bir hastalık saptanmamış sağlıklı bireylerde CTSB-9 genine ait delesyon ve duplikasyonların bildirildiği görülmüştür. Bu bize MLPA P-311 A2 Konjenital Kalp Hastalıkları kitinde GATA4'ün downstreamine konumlandırılmış ve GATA4'de bir delesyon

tespit edilmesi halinde bu delesyonunun boyutu hakkında bir fikir vermesi için yer verilmiş olan CTSB probunda tespit ettiğimiz delesyon ve duplikasyonların patolojik olmadığını, polimorfizm olabileceğini düşündürmüştür. Başka patolojisi olmayan iki erkek kardeşte ve 22q11.2 delesyonu olan üç hastada tespit edilen 8p23.1 kromozom bölgesinde yer alan CTSB-9 genini içeren delesyon ve duplikasyonlarla ilgili bir diğer düşüncemiz de MLPA P-311 A-2 kitinin ilgili primerinin bağlanması ve amplifikasyonunda sorun olabileceğidir.

Sonuç olarak MLPA P311 A2 Konjenital Kalp Hastalıkları kiti ile yaptığımız analiz sonrası görünüşte non-sendromik olan ve konjenital kadiyak septal defekti olan 45 hastamızın üçünde (n=3/45, %6,66) 22q11.2 kromozom bölgesinde delesyon tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

22q11.2 delesyonu tespit edilen üç hastadan biri (n=1/3, %33,33) atrial septal defekt (ASD) tanısı almışken, biri (n=1/3, %33,33) ventriküler septal defekt (VSD) tanısı almış, diğeri ise (n=1/3, %33,33) ise VSD+ASD tanısı almıştı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Kardiyak Septal Defekt Tanısı Alan 45 Hastanın Klinik Bulguları

HASTA	CİNSİYET	KKH TANISI	DİĞER KLİNİK SEMPTOMLAR	YAŞ (Ay) ¹
1-CHD1	KIZ	ASD		76
2-CHD2	ERKEK	ASD		100
3-CHD3	KIZ	ASD	SKOLYOZ	139
4-CHD4	KIZ	VSD	İNGUİNAL HERNİ	235
5-CHD5	ERKEK	ASD		69
6-CHD6	ERKEK	VSD	HİPOTİROİDİ	7
7-CHD7	ERKEK	AVSD	BÜYÜME GERİLİĞİ	120
8-CHD8	KIZ	VSD		6
9-CHD9	KIZ	ASD		23
10-CHD10	KIZ	ASD		150
11-CHD11	KIZ	ASD	KONJENİTAL ADRENAL HİPERPLAZİ,AMBİGÜS GENİTALYA	12
12-CHD12	KIZ	VSD	EPİLEPSİ	96
13-CHD13	KIZ	ASD		16
14-CHD14	ERKEK	VSD	BÜYÜME GERİLİĞİ	5
15-CHD15	ERKEK	ASD		162
16-CHD17	ERKEK	VSD+ASD	HİDROSEFALİ,TRİGONOSEFALİ	8
17-CHD19	ERKEK	ASD	İNGUİNAL HERNİ	84
18-CHD20	KIZ	VSD	GELİŞME GERİLİĞİ	89
19-CHD21	KIZ	ASD	BÜYÜME VE GELİŞME GERİLİĞİ,PALPEBRAL ARALIK UZUN,ANTEVERT KULAK,SKOLYOZ,DİKKAT EKSİKLİĞİ	174
20-CHD22	KIZ	VSD+ASD		7
21-CHD23	ERKEK	VSD+ASD		37
22-CHD24	ERKEK	VSD	EPİKANTUS	8
23-CHD25	ERKEK	ASD		5
24-CHD26	ERKEK	AVSD	BÜYÜME GERİLİĞİ	5
25-CHD27	KIZ	ASD	İŞİTME AZLIĞI	139
26-CHD28	KIZ	VSD		12
27-CHD29	ERKEK	VSD	BÜYÜME GERİLİĞİ,AYAK PARMAKLARINDA OVERRİDİNG,DÜŞÜK VE ANTEVERT KULAK,BURUN KÖKÜ BELİRGİN,BÜLBÖZ BURUN UCU,ASİMETRİK AĞLAMA	67
28-CHD30	KIZ	VSD+ASD	BÜYÜME GERİLİĞİ	45
29-CHD32	KIZ	ASD	BÖBREK KİSTİ	177
30-CHD34	KIZ	ASD	ALIN VE BACAĞA HİPOPIGMENTE ALAN	56
31-CHD36	KIZ	VSD		170
32-CHD37	KIZ	VSD+ASD	İNTRAKRANIAL KİST,HİPOTİROİDİ, BÜYÜME GERİLİĞİ	5
33-CHD38	KIZ	VSD+ASD	ÖZAFAGUS ATREZİSİ	27
34-CHD39	ERKEK	ASD	KONUŞMA BOZUKLUĞU(KEKEME), GELİŞME GERİLİĞİ	34
35-CHD40	ERKEK	VSD		25
36-CHD41	KIZ	VSD	BÜYÜME VE GELİŞME GERİLİĞİ	15
37-CHD42	ERKEK	ASD		6
38-CHD43	ERKEK	ASD		83
39-CHD44	KIZ	ASD		4
40-CHD45	KIZ	ASD		78
41-CHD46	KIZ	VSD	MİKROGNATI,KOANAL ATREZİ	105
42-CHD47	KIZ	ASD	YARIK DUDAK,YARIK DAMAK, SAĞ KULAKTA MALFORMASYON (ANTEVERT KULAK)	9
43-CHD48	ERKEK	VSD+ASD		77
44-CHD49	KIZ	VSD		3
45-CHD50	KIZ	VSD+ASD	BÜYÜME GERİLİĞİ,SKOLYOZ, BURUN KÖKÜ BELİRGİN	82

¹ Hastaların kan örneği alındığı zamanda yaşları.

Tablo 4.2. Kardiyak Septal Defekti Olan 45 Hastanın Klinik Özellikleri ve Sıklıkları

BÜYÜME VE GELİŞME	SIKLIK
Büyüme Geriliği	9/45
Motor ve/veya Konuşma Geriliği	4/45
Öğrenme Güçlüğü	1/45
Mental Retardasyon	0/45
Gelişme Geriliği	4/45
EKSTRAKARDİYAK KONJENİTAL ANOMALİ	
Koanal Atrezi	1/45
Konjenital Adrenal Hiperplazi	1/45
YÜZ ÖZELLİKLERİ	
Palpebral aralık uzun	1/45
Epikantus	1/45
Antevert kulak	3/45
Bulböz burun ucu	1/45
Burun kökü belirgin	2/45
Mikrognati	1/45
Yarık dudak/Yarık damak	1/45
BAŞ VE SANTRAL SİNİR SİSTEMİ BULGULARI	
Hidrocefali	1/45
Trigonosefali	1/45
İntrakranial Kist	1/45
ENDOKRİN SİSTEM BULGULARI	
Hipotiroidi	2/45
GASTROENTEROLOJİ SİSTEM BULGULARI	
İnguinal Herni	2/45
Özafagus Atrezisi	1/45
GENİTOÜRİNER SİSTEM BULGULARI	
Ambiguous Genitelya	1/45
Böbrek Kisti	1/45
KAS VE İSKELET SİSTEMİ BULGULARI	
Skolyoz	2/45
Ayak parmaklarında overriding	1/45
NÖROLOJİ SİSTEM BULGULARI	
Epilepsi	1/45
NÖROPSİKİYATRİK SİSTEM BULGULARI	
Dikkat eksikliği	1/45
DERMATOLOJİ SİSTEM BULGULARI	
Hipopigmentasyon	1/45
DİĞER	
İşitme azlığı	1/45
Konuşma bozukluğu	1/45
AİLE HİKAYESİ	
Akrabalık	9/45
Konjenital Kalp Hastalığı Aile Öyküsü	4/45



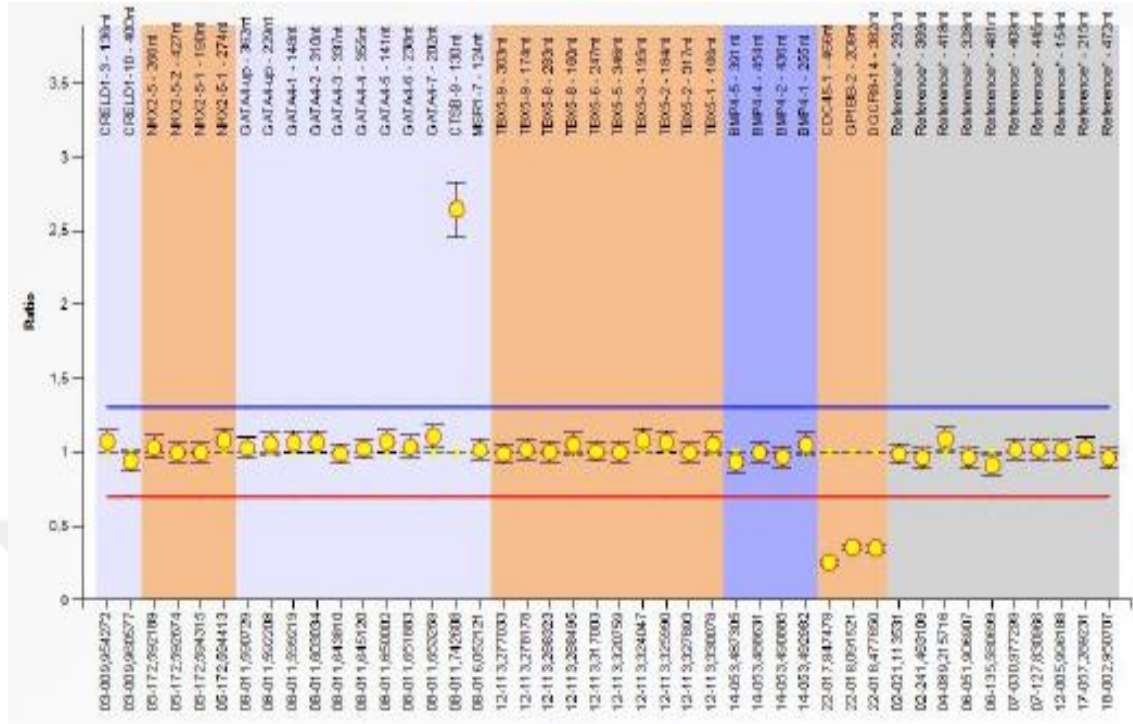
Şekil 4.1. 22q11.2 delesyonu tespit edilen CHD 21, CHD 29 ve CHD 50 nolu hastaların yüz bulguları.

Tablo 4.3. Kardiyak Septal Defekti Olan 45 Hastanın MLPA Analizi İle Saptanan Kopya Sayısı Varyantları ve Kopya Sayısı Polimorfizmleri

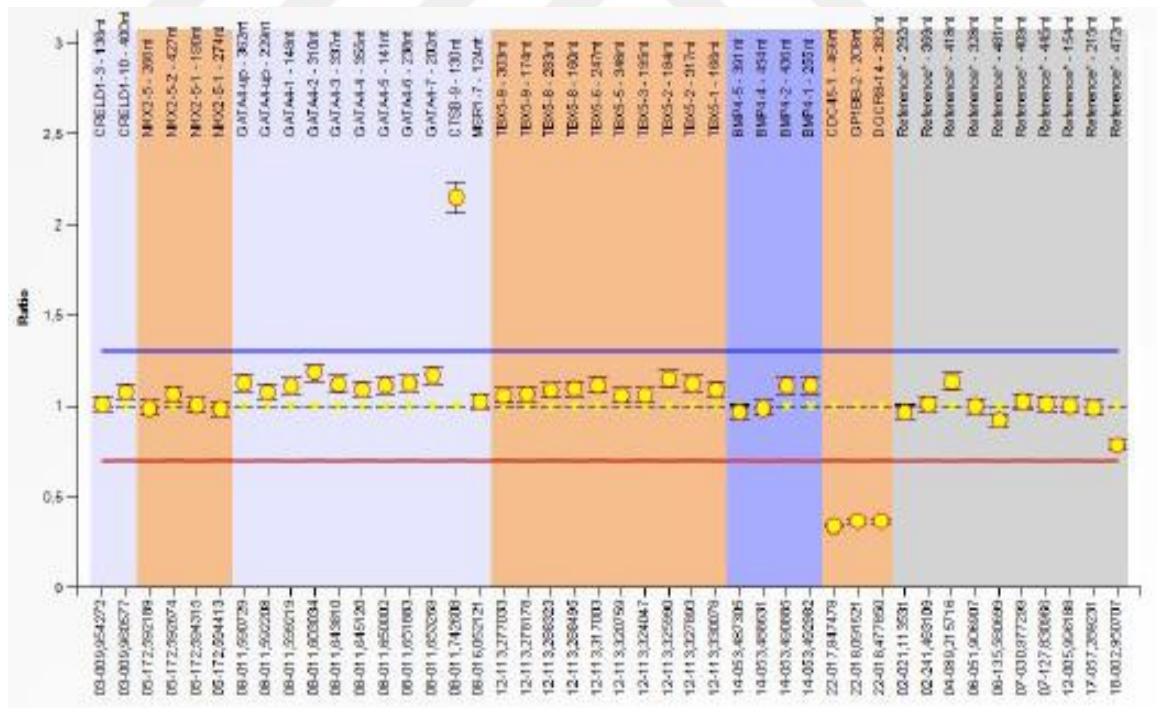
Hasta Numarası	İmbalans	Kromozom Bandı	Status	Fenotip	Yaş ¹
CHD42	Delesyon	8p23.1	CNP	ASD	6 ay
CHD43	Delesyon	8p23.1	CNP	ASD	7 yıl
CHD21	Delesyon Duplikasyon	22q11.2 8p23.1	Nedensel CNV CNP	ASD	15 yıl
CHD29	Delesyon Duplikasyon	22q11.2 8p23.1	Nedensel CNV CNP	VSD	6 yıl
CHD50	Delesyon Delesyon	22q11.2 8p23.1	Nedensel CNV CNP	VSD+ASD	7 yıl

ASD, atrial septal defekt; VSD, ventriküler septal defekt; CNV, kopya sayısı varyantı; CNP, kopya sayısı polimorfizmi; ¹kan örneği alındığı zamanda yaşı.

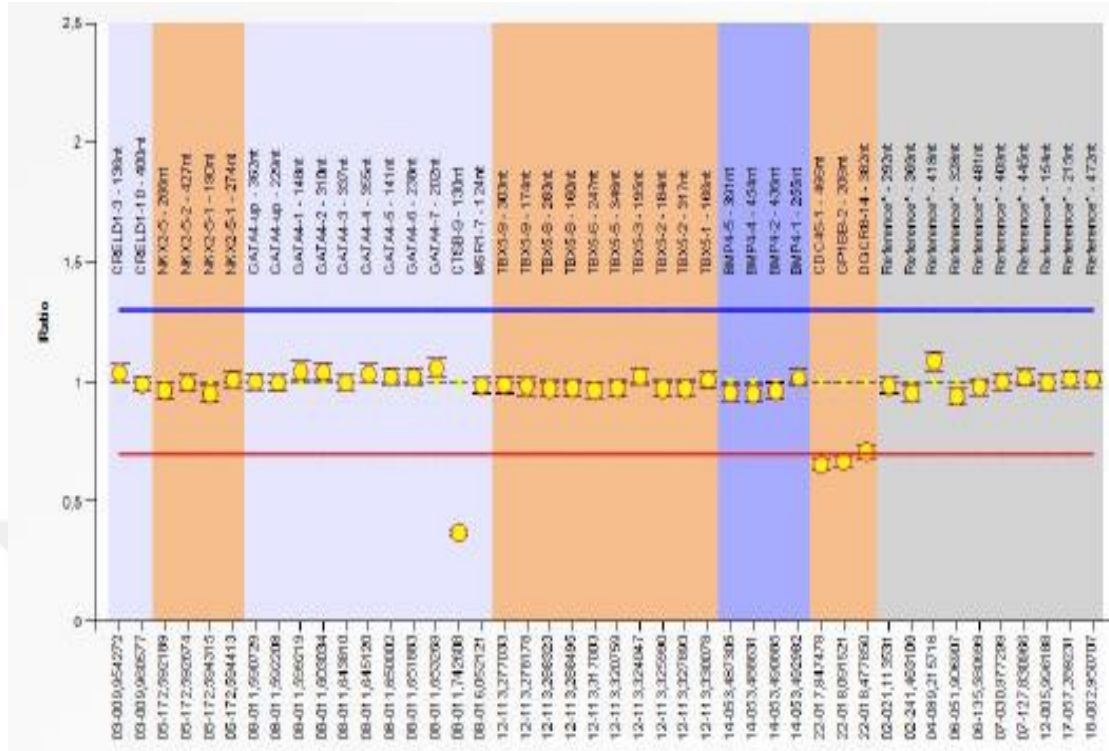
CHD21 nolu Hastanın P311-A2 Kiti ile Yapılan MLPA Analiz Sonuçları



CHD29 nolu Hastanın P311-A2 Kiti ile Yapılan MLPA Analiz Sonuçları

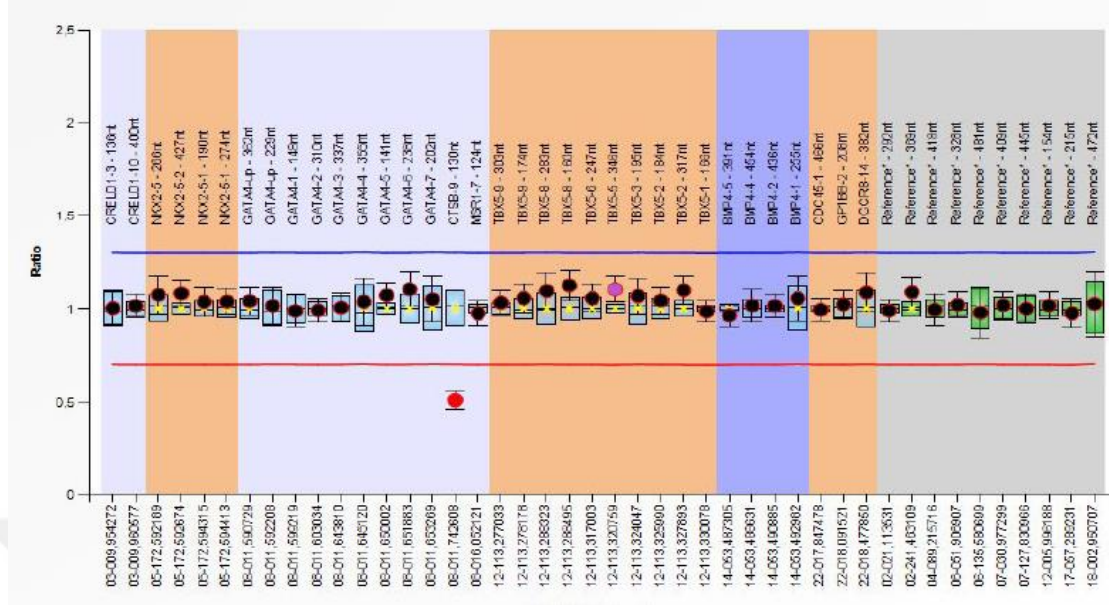


CHD50 nolu Hastanın P311-A2 Kiti ile Yapılan MLPA Analiz Sonuçları

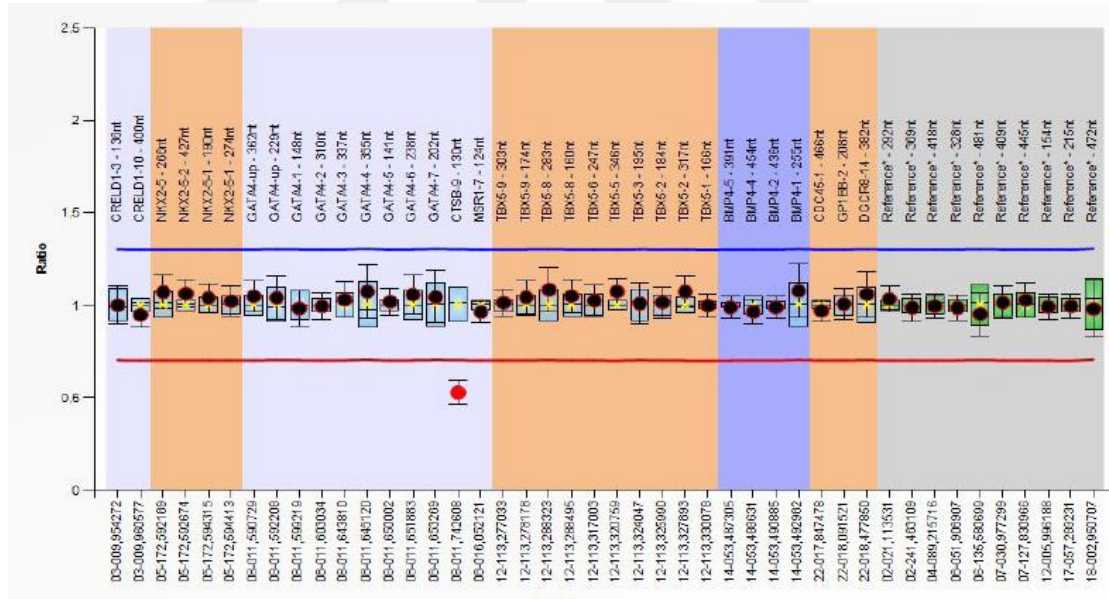


Şekil 4.2. 22q11.2 Delesyonu Tespit Edilen Hastaların MLPA Analiz Sonuçları

CHD42 nolu Hastanın P311-A2 Kiti ile Yapılan MLPA Analiz Sonuçları



CHD43 nolu Hastanın P311-A2 Kiti ile Yapılan MLPA Analiz Sonuçları



Şekil 4.3. CTSB-9 Geninde Delesyon Tespit Edilen Hastaların MLPA Analiz Sonuçları

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı Polikliniğinde kardiyak septal defekt tanısı alan, çalışmamız öncesi genetik tanı almamış olan, görünüşte non-sendromik 45 hastanın genetik etyopatogenezi; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Bilim Dalı Polikliniğinde ve Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Genetik Tanı Laboratuvarında; MLPA P311-A2 Konjenital Kalp Hastalıkları kiti kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmamızda üç hastada 22q11.2 kromozom bölgesinde delesyon tespit edilmiştir.

SALSA MLPA probemix P311-A2 Konjenital Kalp Hastalıkları kitinde 22q11.2 kromozom bölgesindeki kopya sayısı değişikliklerinin saptanması amacıyla üç lokus bulunmaktadır. Bu üç lokus LCR-A ve LCR-B arasında olup; sırasıyla CDC45, GP1BB ve DGCR8 genleri hedeflenmiştir. Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı Polikliniğinde ekokardiyografi ile ASD saptanan CHD21 ve VSD saptanan CHD29 nolu hastalarımızda, CDC45 geni ekzon1, GP1BB geni ekzon2 ve DGCR8 geni ekzon14 ile uyumlu bölgede; VSD+ASD saptanan CHD50 nolu hastamızda ise CDC45 geni ekzon1 ve GP1BB geni ekzon2 ile uyumlu bölgede delesyon tespit edilmiştir.

22q11.2 delesyonu sıklıkla kardiyovasküler malformasyonlara sebep olmaktadır ve çoğunlukla konotrunkal malformasyonlarla birlikte görülmektedir [276]. 22q11.2 delesyonunun fenotipik çeşitliliği sadece klinik değerlendirme ile tanı koyulmasını güçleştirmektedir. Tanıdaki gecikme veya tanının atlanması, etkilenen bireylerin 22q11.2 delesyon sendromunun çok çeşitli bulgularına karşı önleyici genetik, medikal, psikolojik ve sosyal ilgiden mahrum kalmalarına yol açmaktadır [275].

Konjenital Kalp Hastalıklarını içeren sendromlarda, kalp hastalıkları sıklıkla ilk belirti veren semptomlardır. Bizim çalışmamızda da ekokardiyografilerinde septal defekt saptanan üç hastamızın MLPA analizi sonucunda erken sendrom tespiti mümkün olmuştur. Retrospektif bakıldığında bu üç hastada 22q11.2 delesyonunda görülen klinik özellikler bulunmaktadır, ancak MLPA analizi öncesinde klinik

değerlendirme ile tanı koymak mümkün olmamıştır. 22q11 delesyonu olan çocuklarda postoperatif komplikasyon riski daha yüksektir bu yüzden erken tanı ve ekstrakardiyak anomalilerin farkındalığı kritik öneme sahiptir. 22q11 delesyonunda erken tanı hasta üreme çağına eriştiğinde doğru genetik danışmanlık verilebilmesi açısından da çok önemlidir. Bu araştırmamızda; MLPA analizi ile 45 non-sendromik, kardiyak septal defekti olan hastaların üçünde (%6.6) erken sendrom tanısı koymak mümkün olmuştur ve bu sonuç pediatrik kardiyoloji kliniklerinde klinik öneme sahip CNVlerin saptanması amacıyla MLPA'nın ilk seçenek olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

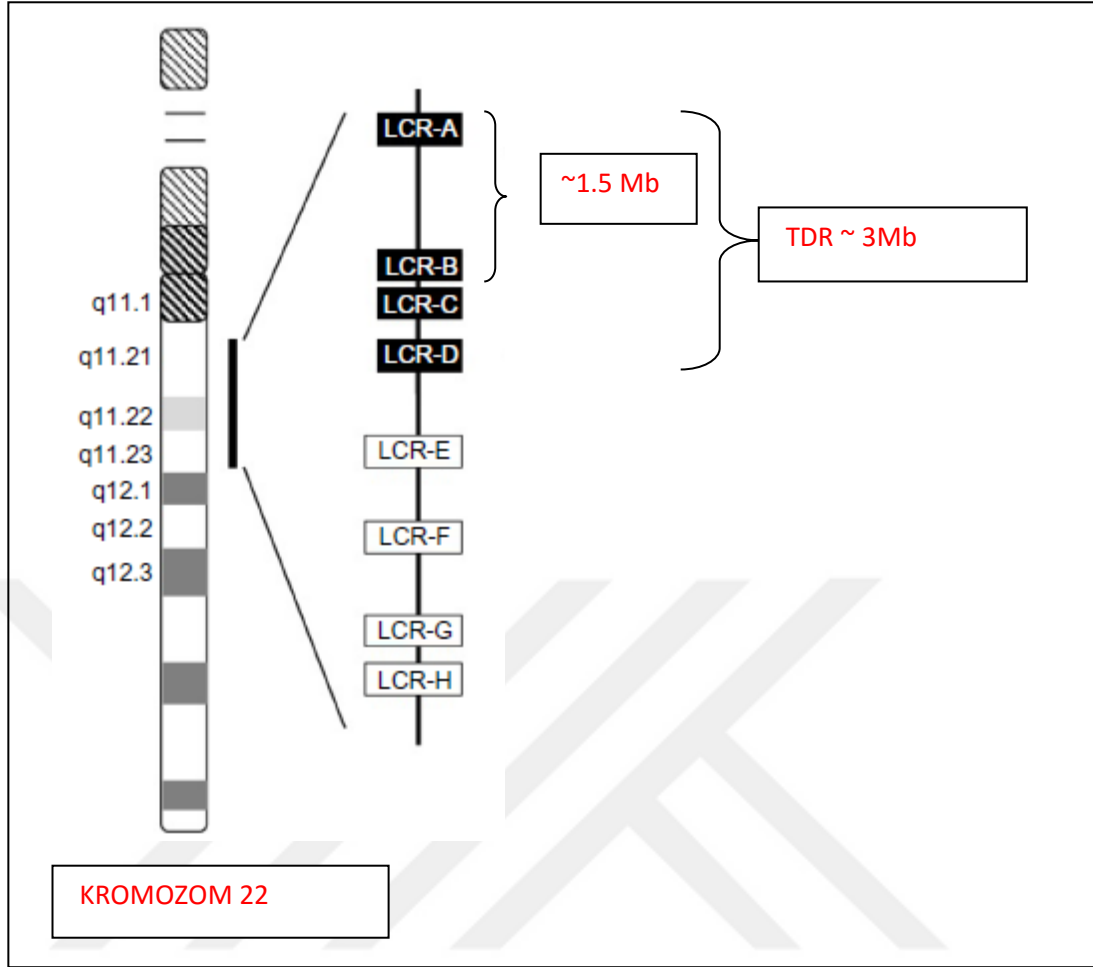
MLPA kullanımı array CGHe göre daha basit, spesifik uzmanlık gerektirmemesi ve ucuz olması sebebiyle avantajlıdır.

Kromozom 22q11 bölgesi kromozoma özgü düşük kopya tekrarları veya segmental duplikasyonlarla karakterizedir. Bu bölge stabil değildir ve mutasyonlara açıktır. Nonallelik homolog rekombinasyon sırasında düşük kopya tekrarlarının yanlış sıralanması sonucunda 22q11.2 bölgesinde delesyonlar meydana gelmektedir ve bu durum 22q11 delesyon sendromuna (22q11DS) sebep olmaktadır. 22q11.2 bölgesindeki genlerin haplo-yetersizliği faringeal arkın, kalbin, iskeletin ve beynin erken morfogenezinde etkili olmaktadır. Bu sendrom pek çok organı ve sistemi etkileyebildiği için geniş bir fenotipik çeşitlilik göstermektedir. Aynı genetik etyolojinin farklı presentasyonları arasında; DiGeorge sendromu (DGS; MIM 188400), velokardiyofasiyal sendromu (MIM 192430), konotrunkal anomali yüz sendromu (MIM 217095) ve kalbin izole çıkış yolu defektleri bulunmaktadır. Bu farklı klinik presentasyonların belirtildiği akronim CATCH22 (Kardiyak anomali, anomalili yüz, timus hipoplazisine bağlı T-hücre eksikliği, yarık damak, hipoparatiroidizme bağlı hipokalsemi) de 22q11 delesyonu için kullanılmıştır. Pek çok klinisyen 22q11 delesyonunun ayrı-farklı sendromlardan ziyade tek bir sendrom olduğu kanaatini taşımaktadır ve 22q11DS terimi 22q11.2 delesyonunun neden olduğu tüm fenotipik varyasyonları ifade etmektedir [233].

22q11DS'da 22q11.2 bölgesinde 1.5-3 Mb'lık bir mikrodelesyon görülmektedir. Delesyonun boyutu farklılık göstermektedir ancak hastaların %90'unda aynı ~3Mb'lık delesyon dikkat çekmektedir. Bu bölge, tipik delesyon

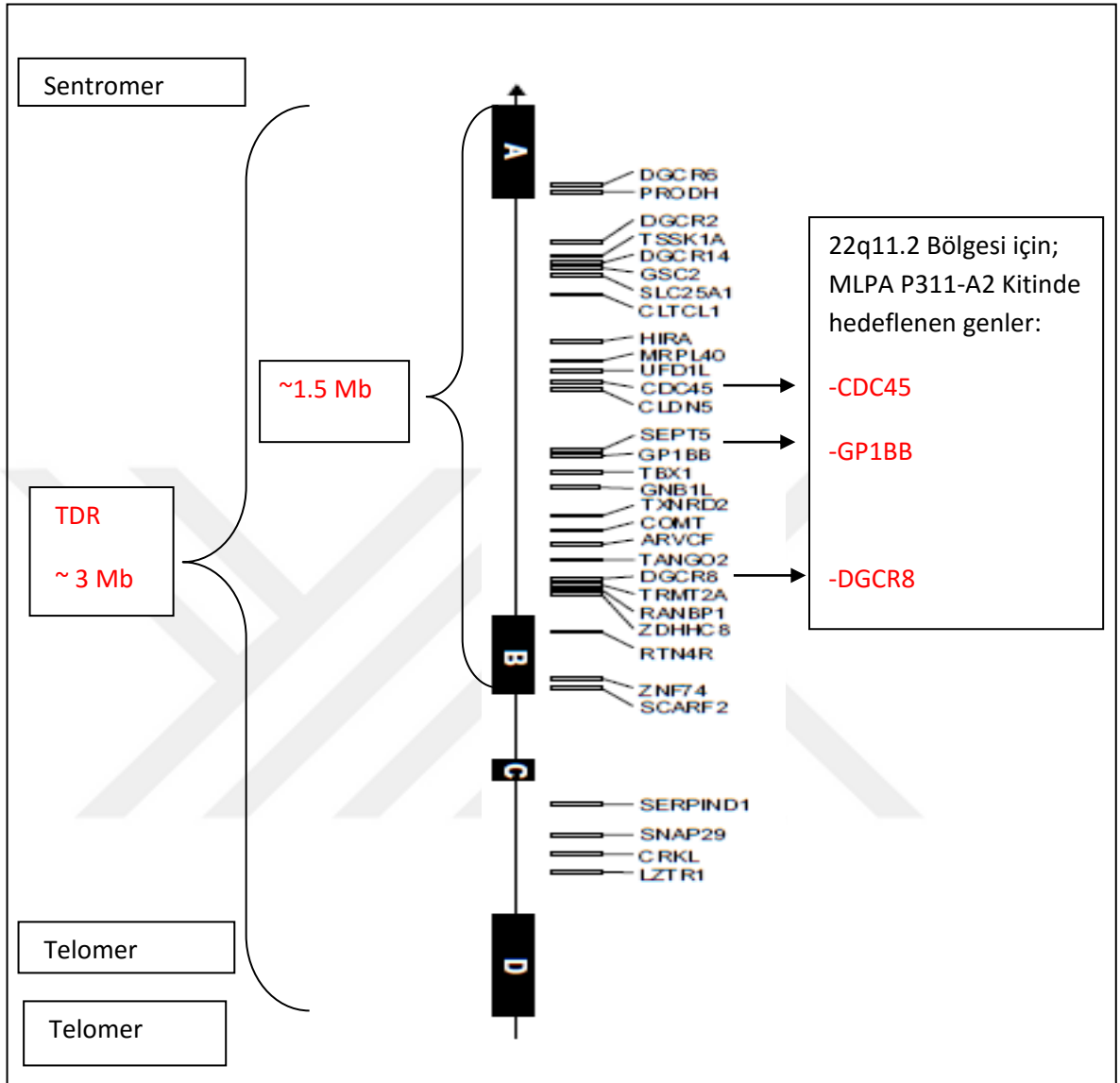
bölgesi (TDR)olarak isimlendirilmiştir. Hastaların ~%7'inde ~1.5 Mb'lık bir delesyon görülürken daha az bir kısmında aynı bölgede daha küçük delesyonlar tespit edilmiştir [233]. Kompleks düşük kopya tekrarları (LCRs), çok sayıda tekrar elementler içermektedir ve çeşitli genomik varyasyonlara yapısal bir zemin oluşturmaktadır. Bu bölgeler, translokasyonlara, inversiyonlara, delesyonlara, duplikasyonlara açıktır. Düşük kopya tekrarları genellikle >5-10 kb boyutlarında olup >%95- %97 birbirleriyle benzerlik gösterirler. Non-allelik homolog rekombinasyon (NAHR); allel olmayan, ancak yüksek sekans benzerliği gösteren iki DNA parçasının arasında oluşan bir homolog rekombinasyon formudur. Pek çok rekürren genomik yeniden düzenlemeler, iki düşük kopya tekrarları arasındaki NAHR sebebiyle oluşmaktadır. Düşük kopya tekrarları arasındaki NAHR sebebiyle delesyonlar ve/veya duplikasyonlar oluşmaktadır. NAHR sırasında, düşük kopya tekrarlarının yanlış sıralanması; 22q11DS ve pek çok diğer kromozomal mikrodelesyon bozukluklarının altında yatan önemli bir mekanizmadır [235,274]. 22q11.2'nin proksimal bölgesi düşük kopya tekrarları açısından zengindir. Bu bölgede kromozom 22'ye özel sekiz düşük kopya tekrarları bulunmaktadır (LCR22A- LCR22H).

Tipik 3 Mb'lık delesyon en proksimal (LCR22A) ile en distal (LCR22D) arasında görülürken; 1.5 Mb'lık delesyon (LCR22A) ile (LCR22B) veya ~ 2 Mb'lık delesyon (LCR22A) ile (LCR22C) arasında olabilir (Şekil 5.1.) [233].



Şekil 5.1. 22q11 bölgesindeki düşük kopya tekrarlarının şematik prezentasyonu

22q11 bölgesindeki düşük kopya tekrarlarının şematik prezentasyonu.
LCRs, düşük kopya tekrarları; TDR, tipik delesyon bölgesi



Şekil 5.2. Tipik delesyon bölgesindeki genlerin şematik prezentasyonu

Tipik delesyon bölgesindeki genler gösterilmektedir. Tipik delesyon bölgesi en proksimal LCR22A ile en distal LCR22D arasında oluşmaktadır. MLPA P311-A2 Konjenital Kalp Hastalıkları Kitinde 22q11.2 bölgesi için hedeflenen genler şematize edilmiştir.

LCR22, kromozom 22'ye spesifik LCRs

Bizim çalışmamızda; ekokardiyografi ile ASD saptanan CHD21 ve VSD saptanan CHD29 nolu hastalarımızda, CDC45 geni ekzon1, GP1BB geni ekzon2 ve DGCR8 geni ekzon14 ile uyumlu bölgede; VSD+ASD saptanan CHD50 nolu hastamızda ise CDC45 geni ekzon1 ve GP1BB geni ekzon2 ile uyumlu bölgede

delesyon tespit edilmiştir. MLPA P311-A2 kitinde 22q11 bölgesi için hedeflenmiş üç gen (CDC45, GP1BB ve DGCR8) de LCR22A ile LCR22B arasındadır. Hastalarımızın ikisinde (CHD21 ve CHD29 nolu hastalar) üç genin hedeflendiği bölgede delesyon tespit ettik; ancak CHD50 nolu hastamızda DGCR8 geni ekzon 14 ile uyumlu bölgede delesyon görülmedi. Bu durum; CHD50 nolu hastamızda var olan küçük bir delesyonun, MLPA P311-A2 kiti ile başarılı bir şekilde tespit edilebildiğini göstermiştir.

22q11 DS'da görülen klinik bulgulara; 22q11.2 bölgesindeki azalmış gen ekspresyonu neden olmaktadır. Tipik delesyon bölgesinde; 3 Mb'lık bölgede bilinen yaklaşık 60 gen bulunmaktadır [271] (Şekil 5.2.). Ancak bu genlerin bir çoğunun işlevi netlik kazanmamıştır. Bu genlerin haplo-yetersizliği, muhtemelen; faringeal ark, kalp, iskelet sistemi ve beyinin erken morfogenezinde etkili olmaktadır. Fakat, fenotip ile delesyonun boyutu arasında bir korelasyon görülmemiştir [235].

22q11.2 bölgesinde yer alan en önemli gen TBX1 genidir. TBX1, faringeal arkın endoderm ve mesoderminde ve distal faringeal aparatın ektoderminde eksprese olur. Faringeal aparat embriyonik bir yapı olup; yüz, boyun ve kardiyak çıkış yolu oluşumunu sağlar. Hayvan modellerinde, TBX1'in haplo-yetersizliğinin faringeal aparatta anormal büyümeye ve gelişime yol açtığı görülmüştür. Bu da sendromda görülen, dismorfik yüz bulguları, damak defektleri, timus ve paratiroid bezinin hipoplazisi, beslenme-yutma problemleri gibi pek çok klinik bulguya açıklık getirmektedir [236]. Kardiyak çıkış yolunun aorta ve pulmoner artere bölünmesi için nöroepitelden gelişen kardiyak nöral krest hücrelerine (cNCCs) ihtiyaç vardır. TBX1 de cNCCs'nin diferansiyasyonunu ve migrasyonunu regüle etmektedir. TBX1 haplo-yetersizliği, 22q11DS'da sıklıkla görülen kardiyak çıkış yolu ve konotrunkal anomalilere yol açmaktadır. 22q11.2 bölgesinde en çok üzerinde çalışılan gen TBX1'dir. 22q11DS'da görülen klinik bulgulardan özellikle fiziksel malformasyonlardan TBX1'in sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ancak TBX1'in haplo-yetersizliği; 22q11DS'da görülen tüm klinik fenotiplere açıklık getirememektedir.

Son çalışmalar 22q11 genlerinin azalmış dozlarının, ön-beynin ilk şekillenmesini, ardından kortikal nörogenez ve migrasyonunu modifiye edebildiğini

göstermiştir. Ancak hangi genlerin bu işlemler üzerinde etkin olduğu henüz belirlenememiştir [237]. Katekol-O-metil transferaz (COMT) geni, 22q11.2 bölgesinde olup; dopamin ve epinefrin gibi katekolaminleri degrade eder. Prolin dehidrogenaz oksidaz 1 (PRODH) geni de 22q11.2 bölgesinde yer almaktadır ve bu genin oluşturduğu mitokondrial enzim prolini degrade eder. Bu enzimin eksikliği hiperprolinemiye yol açar. 22q11DS'da görülen davranış bozukluklarında COMT ve PRODH genlerinin haplo-yetersizliğinin etkili olduğu düşünülmektedir [238].

Glikoprotein Ib β (GP1BB) geni de 22q11.2 bölgesinde yer almaktadır ve haplo-yetersizliği trombositopeni oluşumuna neden olur. 22q11DS'lu hastalarda, dev platelet, trombositopeni ve uzamış kanama zamanı ile karakterize Bernard-Soulier sendromu tanımlanmıştır [239].

22q11DS'lu hastalar yaklaşık %20-25 oranında şizofreni ve şizoaffektif bozukluk gibi benzer psikotik bozukluk riski taşımaktadırlar [265, 266]. 22q11.2 delesyonu şizofreni için bilinen en güçlü risk faktörüdür (odds ratio = 20.3)[267] ve tüm şizofreni vakalarının yaklaşık %1-2'ine tekabül etmektedir [268, 266]. 22q11DS'lu fare modellerinde yapılan çalışmalar; şizofreni ile asosiyasyon beyin bölgelerinde en fazla down-regülasyon gösteren mikro RNA olarak miR-185'i belirlemiştir [269]. DiGeorge sendromu kritik bölge gen 8 (DGCR8) eksikliğinin; hipokampustaki miR-185 ekspresyonunda yaklaşık %20'lik bir azalmaya neden olduğu görülmüştür [270]. MiR-185 geni ve DGCR8 geni LCR22-A ve LCR22-B arasındaki 1.5 Mb'lık bölgede yer almaktadırlar. Bu bölgedeki mikrodelesyon, miR-185 ve DGCR8'in hemizigositesine yol açmaktadır. Heterozigot DGCR8 eksikliği belli bir grup mikro-RNA'ların azalmış biyogenezine neden olmaktadır, bunlardan biri de miR-185'dir. MiR-185'de belirlenen azalmış ekspresyona; miR-185 genindeki hemizigosite ile birlikte azalmış DGCR8 düzeylerine sekonder pri-miR-185 transkriptinin bozulmuş maturasyonunun birleşik etkisinin neden olduğu düşünülmüştür [270]. Matür mikro-RNA düzeylerinde oluşan değişikliklerin sonuç olarak hedef genlerin ekspresyonunda farklılığa yol açabileceği ve bu durumun 22q11DS'da görülen nöral, kognitif ve davranış bozukluklarının bir kısmından sorumlu olabileceği belirtilmiştir [270].

22q11DS'a neden olan Tipik Delesyon Bölgesinde (3 Mblık bölgede yaklaşık bilinen 60 gen; 1.5 Mblık bölgede yaklaşık bilinen 35 gen) pek çok gen vardır [271]. Ancak 22q11DS'da görülen fenotipik çeşitlilik ile genler arasındaki sebep-sonuç ilişkisi henüz açıklık kazanamamıştır [235, 273].

22q11 DS'u insanlarda en sık görülen mikrodelesyon sendromudur. Populasyon bazlı insidans ve prevalans tahminleri değişiklik gösterse de pek çok çalışmada prevalans, 4000 yenidoğanda bir olarak belirtilmiştir [240]. Ancak tanı atlandığı için bu sayının gerçek sayıdan az olduğu düşünülmektedir. Genetik merkezlerde; çocuklarında tespit edilen delesyon sonrası erişkinlerin tanı alması bu düşünceyi pekiştirmektedir [272].

22q11DS'da erkek ve kız cinsiyetleri eşit etkilenmektedir. Bazı etnik gruplarda özellikle Hispaniklerde 22q11 DS daha sık görülmektedir [240]. Genel olarak DiGeorge Sendromu'nda vakaların > %90'ında fetal gelişim sırasında oluşan de novo delesyonlar görülmektedir. Kendisi etkilenmemiş bir ebeveyn delesyonu kendi yumurtasında veya sperminde taşıyor olabilir ve bu durumda, tekrarlama riski yaklaşık %1'dir. Ancak ailesel kalıtım da söz konusu olabilir; otozomal dominant geçişli kalıtım hastaların yaklaşık %8-28'inde rapor edilmiştir [242].

22q11 DS'da geniş bir fenotipik spektrum vardır. Görülen klinik bulgular arasında dismorfik yüz, konjenital kalp hastalıkları, velofaringeal yetersizlik, yarı damak, timus hipoplazisi, immün yetmezlik, paratiroid bezinde hipoplazi, gelişme geriliği, öğrenme güçlüğü, psikiyatrik bozukluklar, renal, okular ve iskelet malformasyonları, işitme kaybı, laringeal anomaliler sayılabilir.

Prenatal dönemde, yenidoğanlarda, çocukluk döneminde veya erişkin yaşta klinik tanı alan hastalar vardır [243]. Bizim çalışmamızda; Pediatrik kardiyoloji polikliniğinde, ekosunda ASD saptanan; CHD21 nolu 15 yaşındaki kız hastamızın genetik kliniğinde yapılan değerlendirilmesinde büyüme ve gelişme geriliği tespit edilmiştir, mental retardasyon açısından da değerlendirilmiştir. Belirgin bir diğer ekstrakardiyak bulgusu skolyozdur. 22q11DS'lu hastalarda, servikal spinal anomaliler ve skolyoz gibi iskelet deformitelerinde artmış risk söz konusudur [234, 250]. Pediatrik kardiyoloji polikliniğinde yapılan ekosunda ASD+VSD saptanan; CHD50 nolu yedi yaşındaki kız hastamızda da skolyoz ile birlikte büyüme geriliği

göze çarpmaktadır. Boy ve ağırlık her iki hastamızda da <3 persentil olarak tespit edilmiştir. Pediatrik kardiyoloji polikliniğinde yapılan ekonda VSD saptanan CHD29 nolu altı yaşındaki erkek hastamızda da genetik kliniğinde yapılan değerlendirilmesinde, diğer iki hastamız gibi büyüme geriliği tespit edilmiştir (boy \leq 10 persentil, ağırlık < 3 persentil). Üç hastamızın da kardeşleri, anne ve babaları sağ ve sağlıklı olup, ailelerinde genetik olarak patolojik tanı almış bir yakınları bulunmamaktadır. Belirgin büyüme geriliği olan, pediatrik kardiyoloji polikliniğinde kardiyak septal defekt saptanan bu üç hastada; Genetik Bilim Dalı polikliniğinde sadece klinik değerlendirme ile 22q11 DS tanısı koymak mümkün olmamıştır.

22q11 delesyonlarının en belirgin prenatal sonografi bulgusu konjenital kalp hastalıklarıdır. Bunlar arasında konotrunkal defektler en sık görülen kardiyak anomalilerdir [244]. Timus anomalileri de önemli prenatal sonografik bulgular arasındadır. Yenidoğanlarda ve pediatrik yaş grubunda klinik bulgular çok değişkendir. Çoklu organ sistemlerini içeren ve hastadan hastaya değişkenlik gösteren belirtiler görülür. En sıklıkla, davranış bozuklukları, gelişim bozukluğu, öğrenme güçlüğü, konotrunkal kardiyak anomaliler, damak defektleri, immün yetmezlik, hipokalsemi ve dismorfik yüz bulguları görülür. Konjenital Kalp Hastalıkları 22q11 DS'lu hastaların yaklaşık %80'inde görülmektedir. Konotrunkal defektler (Fallot Tetralojisi, pulmoner atrezi, trunkus arteriozus, kesintili aortik ark, çift çıkışlı sağ ventrikül) en tipik kardiyak malformasyonlardır. Bizim çalışmamızda belirlediğimiz gibi ventriküler septal defektler, atrial septal defektler ve atrioventriküler septal defektleri içeren non-konotrunkal defektler de bildirilmiştir. 22q11 DS'da en sık görülen kardiyak defekt Fallot Tetralojisidir ancak en spesifik olan kesintili aortik ark tip B'dir [245].

Pediyatrik yaş grubunda; hipoparatiroidizm nadir görülse de, hipoparatiroidizmin neden olduğu hipokalsemi, 22q11DS'nun klasik semptomlarından biridir. Hipoparatiroidizm tanısı sıklıkla yenidoğan döneminde konular, genellikle geçicidir ve neonatal dönem sonrasında iyileşme görülür ancak enfeksiyon, cerrahi işlemler, gebelik gibi stresli dönemlerde hipokalsemi atakları görülebilir. Kalıcı hipoparatiroidizm nadiren gelişir.

Neonatal hipokalsemi ile sonradan gelişen kalıcı hipoparatiroidizm arasında bir ilişki yoktur. Ancak hipoparatiroidizmin erken yaşta görülmesi ileri yaşlardaki rekürens riskinde artışla ilişkilendirilmiştir [246, 247]. Hipokalseminin klinik belirtileri değişkendir, parestezi, hissizlik, uyuşukluk, konvülsiyon görülebilir [243]. Konjenital kardiyak defektler ile neonatal hipokalsemi iki yaş altı dönemde en sık 22q11DS şüphesi uyandıran durumlardır.

İki yaşından büyük çocuklarda ise, en sıklıkla, nöropsikolojik belirtiler, otorinolaringolojik belirtiler ve tipik yüz bulguları 22q11DS'u şüphesi uyandırmaktadır [233, 243]. Hipokalsemiye bağlı neonatal nöbetlerin varlığı; 22q11DS'lu hastalarda entelektüel defisitlerin daha ağır görülme riskini arttırmaktadır [248]. 22q11DS'da nörokognitif profil çok değişkendir. Entelektüel fonksiyonları çoğunlukla sınırdan seyrederek (IQ ~ 70-75). Matematik yetenekleri zayıftır ancak hafızaları iyidir. Dikkat eksikliği görülür. Sözel konularda daha başarılıdır. Okul öncesi dönemde ve ilköğretim çağlarında öğrenme güçlüğü sık görülür. Bizim çalışmamızda gelişme geriliği olan; bir yaşında başını dik tutabilen, üç yaşında yürüyen, CHD21 no'lu onbeş yaşındaki kız hastamız konuşmada ve bilişsel gelişiminde de gecikme göstermiş olup mental retardasyon açısından değerlendirilmiştir. Annesi, hastamızın sınıfını geçmekte zorlandığını belirtmiştir. Büyüme geriliği olan ancak belirgin gelişme geriliği olmayan altı yaşındaki erkek CHD29 nolu ve yedi yaşındaki kız CHD50 nolu hastalarımızın aileleri, çocuklarının okulda henüz bir uyumsuzluk ve başarısızlık göstermediklerini belirtmişlerdir.

22q11DS'da çocuklarda ve adölesanlarda dikkat eksikliği hiperaktivite bozuklukları, anksiyete bozuklukları, depresyon ve otizm spektrum bozuklukları gibi psikiyatrik problemler bildirilmiştir [251]. Onbeş yaşındaki CHD21 nolu kız hastamızda Genetik Bilim Dalı polikliniğinde yapılan muayenesinde çok ileri düzeyde olmasa da dikkat eksikliği olduğu düşünülmüştür ancak yaşları küçük olan altı yaşındaki CHD29 ve yedi yaşındaki CHD50 nolu hastalarımızda henüz bir psikiyatrik bozukluk tespit edilmemiştir.

22q11DS'da konuşma bozuklukları sıklıkla görülmektedir. En sık görülen, velofaringeal yetersizliklerdir ki artmış nazal rezonans, nazal regürjitasyon ve

hipernazal konuşma şeklinde görülmektedir. 22q11DS'da işitme problemleri de sıklıkla görülmektedir [254].

22q11DS'da görülen bir diğer durum, immünyetmezliktir. İmmün yetmezlik derecesi hastadan hastaya farklılık gösterir. T-lenfosit sayısında ve fonksiyonunda defektler görülürken, az bir hasta grubunda antikor eksiklikleri özellikle IgA eksiklikleri bildirilmiştir. Enfeksiyon sıklığı özellikle solunum yolu enfeksiyonları sık görülür ancak ilerleyen yaşla birlikte görülme sıklığı azalır [252, 253].

22q11DS'da değişkenlik gösterse de karakteristik dismorfik yüz bulguları vardır. Uzun yüz, hipertelorizm, şiş gözkapakları, geniş ve belirgin burun kökü, bülböz burun ucu, mikrognati, küçük ağız, asimetric yüz hareketleri, malforme düşük ve küçük kulaklar görülmektedir [256]. Bizim çalışmamızda Genetik Bilim Dalı polikliniğinde yapılan muayenesinde CHD21 nolu hastamızda palpebral aralık uzun ve antevort kulak tespit edilirken, CHD29 nolu hastamızda belirgin burun kökü, bülböz burun ucu, düşük ve antevort kulak ve asimetric ağlama tespit edilmiştir. CHD50 nolu hastamızda hafif hipertelorizm ve belirgin burun kökü tespit edilmiştir.

22q11DS'da, renal problemler; displastik böbrek, renal agenezi gibi yapısal bozukluklar, obstrüktif anomaliler, vezikoureteral reflü sıklıkla görülmektedir [233, 234]. Bizim çalışmamızda CHD50 nolu yedi yaşındaki kız hastamızda sol böbrek toplayıcı sistemde genişleme tespit edilmiştir.

22q11DS'da, özellikle infantlarda ve erken çocukluk döneminde sıklıkla görülen bir diğer durum büyüme geriliğidir. Mamafih büyüme hormonu eksikliği nadirdir [255]. Bizim çalışmamızda; yapılan ekolarında kardiyak septal defekt saptanan ve MLPA P311-A2 kiti ile yaptığımız analiz sonrası 22q11DS tanısı alan üç hastamızda da tespit ettiğimiz belirgin büyüme geriliği en çok dikkat çeken durumdur. 22q11DS'da belirti ve bulgular çok belirgin değildir. Dismorfik yüz bulguları sıklıkla belirsizdir. Antropometrik ölçümler, 22q11DS şüphesi olan hastalarda kritik öneme sahiptir [257]. Bizim çalışmamız da antropometrik ölçümlerin önemini doğrulamıştır. MLPA analizi sonrası 22q11DS tanısı alan üç hastamızda da analiz öncesi, genetik kliniğinde yapılan değerlendirilmelerinde belirlenen büyüme geriliği en çok dikkat çeken ortak özellikleri olup; iki kız

hastamızın, boy ve ağırlığı <3 persentil olarak tespit edilirken, erkek hastamızın boyu ≤10 persentil, ağırlığı <3 persentil olarak tespit edilmiştir.

22q11 delesyonu tüm konjenital kalp hastalıklarının yaklaşık %5'inden sorumludur [258]. 22q11 delesyonu bazı kalp defektlerinde daha fazla görülmektedir. Populasyon bazında; kesintili aortik ark vakalarının yaklaşık %47'inde, trunkus arteriozus vakalarının %19'unda, fallot tetralojisinin yaklaşık %12'inde, ventriküler septal defektlerin yaklaşık %1.1'inde genetik etyopatogenez 22q11 delesyonudur [263,264,262].

Konjenital Kalp Hastalıklarında genetik etyolojinin doğru tanısı hastanın genetik, medikal, psikolojik ve sosyal açıdan doğru değerlendirilmesi için kritik öneme sahiptir. Amerikan Medikal Genetik Koleji gelişme geriliği, mental retardasyonu, otizm spektrum bozukluğu ve çoklu konjenital anomalileri olan bireylerde; klasik sitogenetik analizin yanında array komperatif genomik hibridizasyonun (array-CGH) ilk seçenek olarak kullanılmasını önermiştir. Ancak konjenital kalp hastalıkları olan kişilerde öneride bulunmak için yeterli veri henüz yoktur [259]. Lu ve arkadaşları, görünüşte izole ve sendromik konjenital kalp hastalığı olan yenidoğanlarda array-CGH ile %21.8 saptama oranı bildirmişlerdir [260]. Breckpot ve arkadaşları, önceki çalışmalardaki hastalarda, sendromik ve izole konjenital kalp hastalıklarında, yaş sınırlaması koymadan kopya sayısı varyantlarının sebep-sonuç ilişkisini array-CGH ile araştırmışlardır. Görünüşte sendromik konjenital kalp hastalığı olan hastalarda %19 saptama oranı; izole konjenital kalp hastalığı olanlarda %3.6 saptama oranı bildirmişlerdir ve görünüşte sendromik olan hastalarda array-CGH kullanımının daha faydalı olduğunu belirtmişlerdir [261]. Erdoğan ve arkadaşları ise, array-CGH ile izole konjenital kalp hastalıklarında, sendromik konjenital kalp hastalığına benzer bir saptama oranı bildirmişlerdir (%17) ve array-CGH'in diğer semptomlar oluşmadan önce sendromik hastaları belirleyebileceğini belirtmişlerdir [134].

Biz çalışmamızda, MLPA P-311 A-2 Konjenital Kalp Hastalıkları kitini kullanarak görünüşte izole (non-sendromik) sadece konjenital kardiyak septal defekti olan 45 hastada kopya sayısı varyantlarının sebep-sonuç ilişkisini araştırdık ve %6.6 saptama oranı ile üç hastada 22q11.2 delesyonu tespit ettik. MLPA, bilinen kopya

sayısı varyantlarının belirlenmesi için etkili bir tekniktir. Array-CGH'ten çok daha ucuz olması ve çok daha basit bir kullanımı olması, ileri uzmanlık gerektirmemesi sebebiyle array-CGH'ten daha avantajlıdır.

Sorensen ve arkadaşları, görünüşte non-sendromik konjenital kalp hastalığı olan 402 hastada MLPA analizi ile kopya sayısı varyantlarını analiz ettikleri çalışmalarında, iki hastada 22q11.2 bölgesinde delesyon; üç hastada 22q11.2 bölgesinde duplikasyon ve diğer bölgelerde tespit ettikleri ile toplamda on dört nadir CNV tespit etmişlerdir; %3.2 saptama oranı bildirmişlerdir [82]. Bizim hasta grubumuzda 22q11.2 bölgesinde tespit ettiğimiz kopya sayısı varyansı frekansı (45 hastada 3 CNV; %6,6) ile Sorensen ve arkadaşlarının 22q11.2 bölgesinde tespit ettikleri kopya sayısı varyansı frekansını karşılaştırdığımızda (402 hastada 5 CNV; %1,24); bizim çalışmamızda saptama oranımız daha yüksektir. Çalışma grubumuzda hastaların %6.6'ında patolojik genomik imbalans tespit etmiş olmamız; önceki çalışmalarda olduğu gibi; non-sendromik konjenital kalp hastalıklarında reküren CNVlerin sebep-sonuç ilişkisini doğrulamıştır [134, 82].

Çalışmamız; Pediatrik Kardiyoloji Bilim Dalı polikliniğinde konjenital kalp hastalığı saptanan, non-sendromik, öncesinde genetik tanı almamış çocuklarda reküren CNV'lerin MLPA P311-A2 kiti ile araştırılmasının bu çocuklarda, erken tanı imkanı yaratabileceğini göstermiştir. 22q11DS'nun erken tanısı; hastaların, genetik, medikal, psikolojik ve sosyal açıdan doğru değerlendirilmesini sağlayacaktır. Verilen genetik danışmanlık sayesinde; çocuklarında var olan veya ileride gelişebilecek kognitif disfonksiyon, ekstrakardiyak malformasyon gibi durumlar karşısında hasta ebeveynleri bilinçli davranabileceklerdir ve hastalara erken müdahale ile erken tedavi imkanı oluşacaktır. Hasta ebeveynleri veya hastalar kendileri erişkin yaşa geldiklerinde, prenatal ve preimplantasyon genetik tanı imkanlarından faydalanarak, isterlerse sağlıklı çocuk sahibi olabileceklerdir. 22q11DS'lu hastaların optimal bakımı için genetik uzmanları, pediatri, endokrinoloji, plastik cerrahi, immunoloji, otorinolaringoloji uzmanları ve konuşma terapistlerinden oluşan geniş bir medikal takıma ihtiyaç vardır. Erken tanı ile hastaların karşılaşılabilecekleri olumsuz durumların modifikasyonu mümkün olacak ve optimize sonuçlar elde edilecektir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1- Konjenital Kalp Hastalıklarının (KKH) etyopatogenezinde GATA4, NKX2-5, TBX5 transkripsiyon faktörlerini kodlayan genleri içeren bölgelerde kopya sayısı varyansı (CNV) saptanmamıştır.
- 2- GATA4, NKX2-5, TBX5 transkripsiyon faktör genlerinde nokta mutasyonları çeşitli çalışmalarda KKH etyopatogenezinde tespit edilmiştir. Bu çalışmanın hasta grubunda transkripsiyon faktör genlerinde nokta mutasyonu araştırmak bir başka çalışma için planlanabilir.
- 3- 22q11.2 Delesyon Sendromu (DS) en sık görülen mikrodelsyon sendromudur. KKH etyopatogenezinin araştırıldığı bu çalışmada da üç hastada 22q11.2 DS tespit edilmiştir.
- 4- KKH'nin etyopatogenezinde kopya sayısı varyansları (CNVs) çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir. Bu çalışma da kopya sayısı varyanslarının (CNVs) KKH'nin etyopatogenezinde rol aldığını doğrulamıştır.
- 5- 22q11.2 DS olan hastalarda fenotipik çeşitlilik vardır. Klinik tanısı zordur. Bu çalışmada 22q11 DS tespit edilen üç hastada major klinik bulguların (immün yetmezlik, hipokalsemi gibi) olmaması klinik tanıyı zorlaştırmıştır. MLPA analizi sonrası bu üç hastaya tanı konabilmiştir.
- 6- Bu çalışmada tespit edilen %6,6 saptama oranı KKH'larında MLPA ile kopya sayısı varyanslarının (CNVs) analiz edilmesinin etkin bir yöntem olduğunu göstermiştir.
- 7- KKH' ları çoklu sistem anomalileri ile birlikte görülebilmektedir. Bu tür hastalarda ilk bulgu veren kalp hastalıkları olduğu için KKH tespit edilen hastalarda genetik etiolojinin araştırılması erken sendrom tanısını mümkün kılmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Hoffman, J.I. (1995). Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence. *Pediatr Cardiol* 16, 155-165.
2. Hoffman, J.I. (1995). Incidence of congenital heart disease: I. Postnatal incidence. *Pediatr Cardiol* 16, 103-113.
3. Hoffman, J.I., and Kaplan, S. (2002). The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 39, 1890-1900.
4. Pierpont, M.E., Basson, C.T., Benson, D.W., Jr., Gelb, B.D., Giglia, T.M., Goldmuntz, E., McGee, G., Sable, C.A., Srivastava, D., Webb, C.L., et al. (2007). Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 115, 3015-3038.
5. Bruneau, B.G. (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 451, 943-948.
6. Jenkins, K.J., Correa, A., Feinstein, J.A., Botto, L., Britt, A.E., Daniels, S.R., Elixson, M., Warnes, C.A., Webb, C.L., and American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the, Y. (2007). Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 115, 2995-3014.
7. Gelb, B.D., and Chung, W.K. (2014). Complex genetics and the etiology of human congenital heart disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a013953.
8. Soemedi, R., Wilson, I.J., Bentham, J., Darlay, R., Topf, A., Zelenika, D., Cosgrove, C., Setchfield, K., Thornborough, C., Granados-Riveron, J., et al. (2012). Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Genet* 91, 489-501.
9. Bentham, J., and Bhattacharya, S. (2008). Genetic mechanisms controlling cardiovascular development. *Ann N Y Acad Sci* 1123, 10-19.
10. Oyen, N., Poulsen, G., Boyd, H.A., Wohlfahrt, J., Jensen, P.K., and Melbye, M. (2009). Recurrence of congenital heart defects in families. *Circulation* 120, 295-301.
11. Yunis, K., Mumtaz, G., Bitar, F., Chamseddine, F., Kassab, M., Rashkidi, J., Makhoul, G., and Tamim, H. (2006). Consanguineous marriage and congenital heart defects: a case-control study in the neonatal period. *Am J Med Genet A* 140, 1524-1530.

12. Van Praagh, S., Truman, T., Firpo, A., Bano-Rodrigo, A., Fried, R., McManus, B., Engle, M.A., and Van Praagh, R. (1989). Cardiac malformations in trisomy-18: a study of 41 postmortem cases. *J Am Coll Cardiol* 13, 1586-1597.
13. Musewe, N.N., Alexander, D.J., Teshima, I., Smallhorn, J.F., and Freedom, R.M. (1990). Echocardiographic evaluation of the spectrum of cardiac anomalies associated with trisomy 13 and trisomy 18. *J Am Coll Cardiol* 15, 673-677.
14. Wolf, M., and Basson, C.T. (2010). The molecular genetics of congenital heart disease: a review of recent developments. *Curr Opin Cardiol* 25, 192-197.
15. Cheng, C., Lin, Y., Yang, F., Wang, W., Wu, C., Qin, J., Shao, X., and Zhou, L. (2011). Mutational screening of affected cardiac tissues and peripheral blood cells identified novel somatic mutations in GATA4 in patients with ventricular septal defect. *J Biomed Res* 25, 425-430.
16. Robinson, S.W., Morris, C.D., Goldmuntz, E., Reller, M.D., Jones, M.A., Steiner, R.D., and Maslen, C.L. (2003). Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet* 72, 1047-1052.
17. Reamon-Buettner, S.M., and Borlak, J. (2010). NKX2-5: an update on this hypermutable homeodomain protein and its role in human congenital heart disease (CHD). *Hum Mutat* 31, 1185-1194.
18. Posch, M.G., Perrot, A., Berger, F., and Ozcelik, C. (2010). Molecular genetics of congenital atrial septal defects. *Clin Res Cardiol* 99, 137-147.
19. Li, Q.Y., Newbury-Ecob, R.A., Terrett, J.A., Wilson, D.I., Curtis, A.R., Yi, C.H., Gebuhr, T., Bullen, P.J., Robson, S.C., Strachan, T., et al. (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 15, 21-29.
20. Benson, D.W., Silberbach, G.M., Kavanaugh-McHugh, A., Cottrill, C., Zhang, Y., Riggs, S., Smalls, O., Johnson, M.C., Watson, M.S., Seidman, J.G., et al. (1999). Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 104, 1567-1573.
21. Biben, C., Weber, R., Kesteven, S., Stanley, E., McDonald, L., Elliott, D.A., Barnett, L., Koentgen, F., Robb, L., Feneley, M., et al. (2000). Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5. *Circ Res* 87, 888-895.
22. Bruneau, B.G., Nemer, G., Schmitt, J.P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., Conner, D.A., Gessler, M., Nemer, M., Seidman, C.E., et al. (2001). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106, 709-721.

23. Hiroi, Y., Kudoh, S., Monzen, K., Ikeda, Y., Yazaki, Y., Nagai, R., and Komuro, I. (2001). Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28, 276-280.
24. Olson, E.N. (2006). Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 313, 1922-1927.
25. Srivastava, D. (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126, 1037-1048.
26. Lindsay, E.A., Vitelli, F., Su, H., Morishima, M., Huynh, T., Pramparo, T., Jurecic, V., Ogunrinu, G., Sutherland, H.F., Scambler, P.J., et al. (2001). Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410, 97-101.
27. Guris, D.L., Duester, G., Papaioannou, V.E., and Imamoto, A. (2006). Dose-dependent interaction of Tbx1 and Crkl and locally aberrant RA signaling in a model of del22q11 syndrome. *Dev Cell* 10, 81-92.
28. Moon, A.M., Guris, D.L., Seo, J.H., Li, L., Hammond, J., Talbot, A., and Imamoto, A. (2006). Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. *Dev Cell* 10, 71-80.
29. Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J.K., Arruda, E.P., Kathiriya, I.S., Mo, R., Hui, C.C., Srivastava, D., and Bruneau, B.G. (2006). Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nat Genet* 38, 175-183.
30. Richards, A.A., and Garg, V. (2010). Genetics of congenital heart disease. *Curr Cardiol Rev* 6, 91-97.
31. Fahed, A.C., Gelb, B.D., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (2013). Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res* 112, 707-720.
32. Andersen, T.A., Troelsen Kde, L., and Larsen, L.A. (2014). Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci* 71, 1327-1352.
33. Lage, K., Greenway, S.C., Rosenfeld, J.A., Wakimoto, H., Gorham, J.M., Segre, A.V., Roberts, A.E., Smoot, L.B., Pu, W.T., Pereira, A.C., et al. (2012). Genetic and environmental risk factors in congenital heart disease functionally converge in protein networks driving heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14035-14040.
34. Ware, S.M., and Jefferies, J.L. (2012). New Genetic Insights into Congenital Heart Disease. *J Clin Exp Cardiol* S8.
35. Bruneau, B.G. (2013). Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008292.

36. Rana, M.S., Christoffels, V.M., and Moorman, A.F. (2013). A molecular and genetic outline of cardiac morphogenesis. *Acta Physiol (Oxf)* 207, 588-615.
37. Meilhac, S.M., Esner, M., Kelly, R.G., Nicolas, J.F., and Buckingham, M.E. (2004). The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell* 6, 685-698.
38. Zaffran, S., Kelly, R.G., Meilhac, S.M., Buckingham, M.E., and Brown, N.A. (2004). Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res* 95, 261-268.
39. Dyer, L.A., and Kirby, M.L. (2009). The role of secondary heart field in cardiac development. *Dev Biol* 336, 137-144.
40. Buckingham, M., Meilhac, S., and Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6, 826-835.
41. Verzi, M.P., McCulley, D.J., De Val, S., Dodou, E., and Black, B.L. (2005). The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev Biol* 287, 134-145.
42. Butcher, J.T., and Markwald, R.R. (2007). Valvulogenesis: the moving target. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 1489-1503.
43. Li, S., Zhou, D., Lu, M.M., and Morrisey, E.E. (2004). Advanced cardiac morphogenesis does not require heart tube fusion. *Science* 305, 1619-1622.
44. Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J., and Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126, 3437-3447.
45. Kuo, C.T., Morrisey, E.E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M.M., Parmacek, M.S., Soudais, C., and Leiden, J.M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11, 1048-1060.
46. Molkenin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A., and Olson, E.N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11, 1061-1072.
47. Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J., and Constam, D.B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 125, 4863-4876.
48. Constam, D.B., and Robertson, E.J. (2000). Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/SPC1 during embryonic turning and heart looping. *Development* 127, 245-254.

49. Madabhushi, M., and Lacy, E. (2011). Anterior visceral endoderm directs ventral morphogenesis and placement of head and heart via BMP2 expression. *Dev Cell* 21, 907-919.
50. Christoffels, V.M., Habets, P.E., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W.H., Bao, Z.Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R.P., et al. (2000). Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol* 223, 266-278.
51. Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev* 83, 1223-1267.
52. Meilhac, S.M., Kelly, R.G., Rocancourt, D., Eloy-Trinquet, S., Nicolas, J.F., and Buckingham, M.E. (2003). A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development* 130, 3877-3889.
53. Meilhac, S.M., Esner, M., Kerszberg, M., Moss, J.E., and Buckingham, M.E. (2004). Oriented clonal cell growth in the developing mouse myocardium underlies cardiac morphogenesis. *J Cell Biol* 164, 97-109.
54. Bajolle, F., Zaffran, S., Kelly, R.G., Hadchouel, J., Bonnet, D., Brown, N.A., and Buckingham, M.E. (2006). Rotation of the myocardial wall of the outflow tract is implicated in the normal positioning of the great arteries. *Circ Res* 98, 421-428.
55. Aanhaanen, W.T., Brons, J.F., Dominguez, J.N., Rana, M.S., Norden, J., Airik, R., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., Brown, N.A., Kispert, A., et al. (2009). The Tbx2⁺ primary myocardium of the atrioventricular canal forms the atrioventricular node and the base of the left ventricle. *Circ Res* 104, 1267-1274.
56. Soufan, A.T., van den Berg, G., Ruijter, J.M., de Boer, P.A., van den Hoff, M.J., and Moorman, A.F. (2006). Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation. *Circ Res* 99, 545-552.
57. van den Berg, G., Abu-Issa, R., de Boer, B.A., Hutson, M.R., de Boer, P.A., Soufan, A.T., Ruijter, J.M., Kirby, M.L., van den Hoff, M.J., and Moorman, A.F. (2009). A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube. *Circ Res* 104, 179-188.
58. Aanhaanen, W.T., Boukens, B.J., Sizarov, A., Wakker, V., de Gier-de Vries, C., van Ginneken, A.C., Moorman, A.F., Coronel, R., and Christoffels, V.M. (2011). Defective Tbx2-dependent patterning of the atrioventricular canal myocardium causes accessory pathway formation in mice. *J Clin Invest* 121, 534-544.

59. Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M.D., Chien, K.R., et al. (2004). BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* 131, 2219-2231.
60. Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390-394.
61. Meyer, D., and Birchmeier, C. (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378, 386-390.
62. Grego-Bessa, J., Luna-Zurita, L., del Monte, G., Bolos, V., Melgar, P., Arandilla, A., Garratt, A.N., Zang, H., Mukoyama, Y.S., Chen, H., et al. (2007). Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell* 12, 415-429.
63. Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741-753.
64. Franco, D., Meilhac, S.M., Christoffels, V.M., Kispert, A., Buckingham, M., and Kelly, R.G. (2006). Left and right ventricular contributions to the formation of the interventricular septum in the mouse heart. *Dev Biol* 294, 366-375.
65. Bruneau, B.G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C.J., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (1999). Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol* 211, 100-108.
66. Koshiba-Takeuchi, K., Mori, A.D., Kaynak, B.L., Cebra-Thomas, J., Sukonnik, T., Georges, R.O., Latham, S., Beck, L., Henkelman, R.M., Black, B.L., et al. (2009). Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature* 461, 95-98.
67. Takeuchi, J.K., Ohgi, M., Koshiba-Takeuchi, K., Shiratori, H., Sakaki, I., Ogura, K., Saijoh, Y., and Ogura, T. (2003). Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development* 130, 5953-5964.
68. Nadeau, M., Georges, R.O., Laforest, B., Yamak, A., Lefebvre, C., Beauregard, J., Paradis, P., Bruneau, B.G., Andelfinger, G., and Nemer, M. (2010). An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4, and Nos3 required for atrial septum formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19356-19361.
69. Xie, L., Hoffmann, A.D., Burnicka-Turek, O., Friedland-Little, J.M., Zhang, K., and Moskowitz, I.P. (2012). Tbx5-hedgehog molecular networks are essential in the second heart field for atrial septation. *Dev Cell* 23, 280-291.
70. Ma, L., Lu, M.F., Schwartz, R.J., and Martin, J.F. (2005). Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning. *Development* 132, 5601-5611.

71. Harrelson, Z., Kelly, R.G., Goldin, S.N., Gibson-Brown, J.J., Bollag, R.J., Silver, L.M., and Papaioannou, V.E. (2004). Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development. *Development* 131, 5041-5052.
72. Luna-Zurita, L., Prados, B., Grego-Bessa, J., Luxan, G., del Monte, G., Benguria, A., Adams, R.H., Perez-Pomares, J.M., and de la Pompa, J.L. (2010). Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J Clin Invest* 120, 3493-3507.
73. Tao, G., Levay, A.K., Gridley, T., and Lincoln, J. (2011). Mmp15 is a direct target of Snai1 during endothelial to mesenchymal transformation and endocardial cushion development. *Dev Biol* 359, 209-221.
74. Chang, C.P., Neilson, J.R., Bayle, J.H., Gestwicki, J.E., Kuo, A., Stankunas, K., Graef, I.A., and Crabtree, G.R. (2004). A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* 118, 649-663.
75. Rivera-Feliciano, J., Lee, K.H., Kong, S.W., Rajagopal, S., Ma, Q., Springer, Z., Izumo, S., Tabin, C.J., and Pu, W.T. (2006). Development of heart valves requires Gata4 expression in endothelial-derived cells. *Development* 133, 3607-3618.
76. Timmerman, L.A., Grego-Bessa, J., Raya, A., Bertran, E., Perez-Pomares, J.M., Diez, J., Aranda, S., Palomo, S., McCormick, F., Izpisua-Belmonte, J.C., et al. (2004). Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 18, 99-115.
77. Stankunas, K., Ma, G.K., Kuhnert, F.J., Kuo, C.J., and Chang, C.P. (2010). VEGF signaling has distinct spatiotemporal roles during heart valve development. *Dev Biol* 347, 325-336.
78. Park, E.J., Ogden, L.A., Talbot, A., Evans, S., Cai, C.L., Black, B.L., Frank, D.U., and Moon, A.M. (2006). Required, tissue-specific roles for Fgf8 in outflow tract formation and remodeling. *Development* 133, 2419-2433.
79. Park, E.J., Watanabe, Y., Smyth, G., Miyagawa-Tomita, S., Meyers, E., Klingensmith, J., Camenisch, T., Buckingham, M., and Moon, A.M. (2008). An FGF autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart. *Development* 135, 3599-3610.
80. Stottmann, R.W., Choi, M., Mishina, Y., Meyers, E.N., and Klingensmith, J. (2004). BMP receptor IA is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium. *Development* 131, 2205-2218.
81. Merscher, S., Funke, B., Epstein, J.A., Heyer, J., Puech, A., Lu, M.M., Xavier, R.J., Demay, M.B., Russell, R.G., Factor, S., et al. (2001). TBX1 is responsible

- for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 104, 619-629.
82. Sorensen, K.M., El-Segaier, M., Fernlund, E., Errami, A., Bouvagnet, P., Nehme, N., Steensberg, J., Hjortdal, V., Soller, M., Behjati, M., et al. (2012). Screening of congenital heart disease patients using multiplex ligation-dependent probe amplification: early diagnosis of syndromic patients. *Am J Med Genet A* 158A, 720-725.
 83. Hu, T., Yamagishi, H., Maeda, J., McAnally, J., Yamagishi, C., and Srivastava, D. (2004). Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development* 131, 5491-5502.
 84. Xu, H., Morishima, M., Wylie, J.N., Schwartz, R.J., Bruneau, B.G., Lindsay, E.A., and Baldini, A. (2004). Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development* 131, 3217-3227.
 85. Hinton, R.B., Jr., Lincoln, J., Deutsch, G.H., Osinska, H., Manning, P.B., Benson, D.W., and Yutzey, K.E. (2006). Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res* 98, 1431-1438.
 86. Lincoln, J., Kist, R., Scherer, G., and Yutzey, K.E. (2007). Sox9 is required for precursor cell expansion and extracellular matrix organization during mouse heart valve development. *Dev Biol* 305, 120-132.
 87. Levay, A.K., Peacock, J.D., Lu, Y., Koch, M., Hinton, R.B., Jr., Kadler, K.E., and Lincoln, J. (2008). Scleraxis is required for cell lineage differentiation and extracellular matrix remodeling during murine heart valve formation in vivo. *Circ Res* 103, 948-956.
 88. Bruneau, B.G., Bao, Z.Z., Tanaka, M., Schott, J.J., Izumo, S., Cepko, C.L., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (2000). Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev Biol* 217, 266-277.
 89. McFadden, D.G., Barbosa, A.C., Richardson, J.A., Schneider, M.D., Srivastava, D., and Olson, E.N. (2005). The *Hand1* and *Hand2* transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development* 132, 189-201.
 90. Shiratori, H., and Hamada, H. (2006). The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development* 133, 2095-2104.
 91. Galli, D., Dominguez, J.N., Zaffran, S., Munk, A., Brown, N.A., and Buckingham, M.E. (2008). Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field, which acquires left-right identity as *Pitx2c* is expressed. *Development* 135, 1157-1167.

92. Mommersteeg, M.T., Hoogaars, W.M., Prall, O.W., de Gier-de Vries, C., Wiese, C., Clout, D.E., Papaioannou, V.E., Brown, N.A., Harvey, R.P., Moorman, A.F., et al. (2007). Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* 100, 354-362.
93. Wang, J., Klysik, E., Sood, S., Johnson, R.L., Wehrens, X.H., and Martin, J.F. (2010). Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9753-9758.
94. Hoogaars, W.M., Engel, A., Brons, J.F., Verkerk, A.O., de Lange, F.J., Wong, L.Y., Bakker, M.L., Clout, D.E., Wakker, V., Barnett, P., et al. (2007). Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* 21, 1098-1112.
95. Frank, D.U., Carter, K.L., Thomas, K.R., Burr, R.M., Bakker, M.L., Coetzee, W.A., Tristani-Firouzi, M., Bamshad, M.J., Christoffels, V.M., and Moon, A.M. (2012). Lethal arrhythmias in Tbx3-deficient mice reveal extreme dosage sensitivity of cardiac conduction system function and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E154-163.
96. Hoogaars, W.M., Tessari, A., Moorman, A.F., de Boer, P.A., Hagoort, J., Soufan, A.T., Campione, M., and Christoffels, V.M. (2004). The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* 62, 489-499.
97. Moskowitz, I.P., Pizard, A., Patel, V.V., Bruneau, B.G., Kim, J.B., Kupersmidt, S., Roden, D., Berul, C.I., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2004). The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development* 131, 4107-4116.
98. Moskowitz, I.P., Kim, J.B., Moore, M.L., Wolf, C.M., Peterson, M.A., Shendure, J., Nobrega, M.A., Yokota, Y., Berul, C., Izumo, S., et al. (2007). A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development. *Cell* 129, 1365-1376.
99. Zhang, S.S., Kim, K.H., Rosen, A., Smyth, J.W., Sakuma, R., Delgado-Olguin, P., Davis, M., Chi, N.C., Puvion-Randall, V., Gaborit, N., et al. (2011). Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13576-13581.
100. Costantini, D.L., Arruda, E.P., Agarwal, P., Kim, K.H., Zhu, Y., Zhu, W., Lebel, M., Cheng, C.W., Park, C.Y., Pierce, S.A., et al. (2005). The homeodomain transcription factor Irx5 establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* 123, 347-358.
101. Naito, A.T., Shiojima, I., Akazawa, H., Hidaka, K., Morisaki, T., Kikuchi, A., and Komuro, I. (2006). Developmental stage-specific biphasic roles of

- Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19812-19817.
102. Basson, C.T., Bachinsky, D.R., Lin, R.C., Levi, T., Elkins, J.A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T.A., Leblanc-Straceski, J., et al. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* 15, 30-35.
 103. Rajagopal, S.K., Ma, Q., Obler, D., Shen, J., Manichaikul, A., Tomita-Mitchell, A., Boardman, K., Briggs, C., Garg, V., Srivastava, D., et al. (2007). Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation. *J Mol Cell Cardiol* 43, 677-685.
 104. Ichida, F., Tsubata, S., Bowles, K.R., Haneda, N., Uese, K., Miyawaki, T., Dreyer, W.J., Messina, J., Li, H., Bowles, N.E., et al. (2001). Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation* 103, 1256-1263.
 105. Baujat, G., and Le Merrer, M. (2007). Ellis-van Creveld syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2, 27.
 106. Koide, T., Hayata, T., and Cho, K.W. (2006). Negative regulation of Hedgehog signaling by the cholesterologenic enzyme 7-dehydrocholesterol reductase. *Development* 133, 2395-2405.
 107. Stennard, F.A., and Harvey, R.P. (2005). T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development* 132, 4897-4910.
 108. Schott, J.J., Benson, D.W., Basson, C.T., Pease, W., Silberbach, G.M., Moak, J.P., Maron, B.J., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (1998). Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 281, 108-111.
 109. Garg, V., Kathiriya, I.S., Barnes, R., Schluterman, M.K., King, I.N., Butler, C.A., Rothrock, C.R., Eapen, R.S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., et al. (2003). GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424, 443-447.
 110. Kirk, E.P., Sunde, M., Costa, M.W., Rankin, S.A., Wolstein, O., Castro, M.L., Butler, T.L., Hyun, C., Guo, G., Otway, R., et al. (2007). Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 81, 280-291.
 111. Ching, Y.H., Ghosh, T.K., Cross, S.J., Packham, E.A., Honeyman, L., Loughna, S., Robinson, T.E., Dearlove, A.M., Ribas, G., Bonser, A.J., et al. (2005). Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet* 37, 423-428.

112. Matsson, H., Eason, J., Bookwalter, C.S., Klar, J., Gustavsson, P., Sunnegardh, J., Enell, H., Jonzon, A., Vikkula, M., Gutierrez, I., et al. (2008). Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects. *Hum Mol Genet* 17, 256-265.
113. Hilton, E., Johnston, J., Whalen, S., Okamoto, N., Hatsukawa, Y., Nishio, J., Kohara, H., Hirano, Y., Mizuno, S., Torii, C., et al. (2009). BCOR analysis in patients with OFCD and Lenz microphthalmia syndromes, mental retardation with ocular anomalies, and cardiac laterality defects. *Eur J Hum Genet* 17, 1325-1335.
114. Johnston, J.J., Teer, J.K., Cherukuri, P.F., Hansen, N.F., Loftus, S.K., Center, N.I.H.I.S., Chong, K., Mullikin, J.C., and Biesecker, L.G. (2010). Massively parallel sequencing of exons on the X chromosome identifies RBM10 as the gene that causes a syndromic form of cleft palate. *Am J Hum Genet* 86, 743-748.
115. Sperling, S., Grimm, C.H., Dunkel, I., Mebus, S., Sperling, H.P., Ebner, A., Galli, R., Lehrach, H., Fusch, C., Berger, F., et al. (2005). Identification and functional analysis of CITED2 mutations in patients with congenital heart defects. *Hum Mutat* 26, 575-582.
116. Hartman, R.J., Rasmussen, S.A., Botto, L.D., Riehle-Colarusso, T., Martin, C.L., Cragan, J.D., Shin, M., and Correa, A. (2011). The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol* 32, 1147-1157.
117. Giglio, S., Graw, S.L., Gimelli, G., Pirola, B., Varone, P., Voullaire, L., Lerzo, F., Rossi, E., Dellavecchia, C., Bonaglia, M.C., et al. (2000). Deletion of a 5-cM region at chromosome 8p23 is associated with a spectrum of congenital heart defects. *Circulation* 102, 432-437.
118. Shuib, S., McMullan, D., Rattenberry, E., Barber, R.M., Rahman, F., Zatyka, M., Chapman, C., Macdonald, F., Latif, F., Davison, V., et al. (2009). Microarray based analysis of 3p25-p26 deletions (3p- syndrome). *Am J Med Genet A* 149A, 2099-2105.
119. Maslen, C.L., Babcock, D., Robinson, S.W., Bean, L.J., Dooley, K.J., Willour, V.L., and Sherman, S.L. (2006). CRELD1 mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down syndrome. *Am J Med Genet A* 140, 2501-2505.
120. Roberts, K.E., McElroy, J.J., Wong, W.P., Yen, E., Widlitz, A., Barst, R.J., Knowles, J.A., and Morse, J.H. (2004). BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Eur Respir J* 24, 371-374.
121. Smith, K.A., Joziase, I.C., Chocron, S., van Dinther, M., Guryev, V., Verhoeven, M.C., Rehmann, H., van der Smagt, J.J., Doevendans, P.A., Cuppen, E., et al. (2009). Dominant-negative ALK2 allele associates with congenital heart defects. *Circulation* 119, 3062-3069.

122. Sheffield, V.C., Pierpont, M.E., Nishimura, D., Beck, J.S., Burns, T.L., Berg, M.A., Stone, E.M., Patil, S.R., and Lauer, R.M. (1997). Identification of a complex congenital heart defect susceptibility locus by using DNA pooling and shared segment analysis. *Hum Mol Genet* 6, 117-121.
123. Wessels, M.W., and Willems, P.J. (2010). Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations. *Clin Genet* 78, 103-123.
124. Srivastava, D., and Olson, E.N. (2000). A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 407, 221-226.
125. Chen, Y., Han, Z.Q., Yan, W.D., Tang, C.Z., Xie, J.Y., Chen, H., and Hu, D.Y. (2010). A novel mutation in GATA4 gene associated with dominant inherited familial atrial septal defect. *J Thorac Cardiovasc Surg* 140, 684-687.
126. Moskowitz, I.P., Wang, J., Peterson, M.A., Pu, W.T., Mackinnon, A.C., Oxburgh, L., Chu, G.C., Sarkar, M., Berul, C., Smoot, L., et al. (2011). Transcription factor genes Smad4 and Gata4 cooperatively regulate cardiac valve development. [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4006-4011.
127. Posch, M.G., Perrot, A., Schmitt, K., Mittelhaus, S., Esenwein, E.M., Stiller, B., Geier, C., Dietz, R., Gessner, R., Ozcelik, C., et al. (2008). Mutations in GATA4, NKX2.5, CRELD1, and BMP4 are infrequently found in patients with congenital cardiac septal defects. *Am J Med Genet A* 146A, 251-253.
128. Blue, G.M., Kirk, E.P., Sholler, G.F., Harvey, R.P., and Winlaw, D.S. (2012). Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust* 197, 155-159.
129. Foffa, I., Ait Ali, L., Panesi, P., Mariani, M., Festa, P., Botto, N., Vecoli, C., and Andreassi, M.G. (2013). Sequencing of NOTCH1, GATA5, TGFBR1 and TGFBR2 genes in familial cases of bicuspid aortic valve. *BMC Medical Genetics* 14, 44.
130. Metcalfe, K., Rucka, A.K., Smoot, L., Hofstadler, G., Tuzler, G., McKeown, P., Siu, V., Rauch, A., Dean, J., Dennis, N., et al. (2000). Elastin: mutational spectrum in supravalvular aortic stenosis. *Eur J Hum Genet* 8, 955-963.
131. Granados-Riveron, J.T., Ghosh, T.K., Pope, M., Bu'Lock, F., Thornborough, C., Eason, J., Kirk, E.P., Fatkin, D., Feneley, M.P., Harvey, R.P., et al. (2010). Alpha-cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects. *Hum Mol Genet* 19, 4007-4016.
132. Silversides, C.K., Lionel, A.C., Costain, G., Merico, D., Migita, O., Liu, B., Yuen, T., Rickaby, J., Thiruvahindrapuram, B., Marshall, C.R., et al. (2012). Rare copy number variations in adults with tetralogy of Fallot implicate novel risk gene pathways. *PLoS genetics* 8, e1002843.

133. Payne, A.R., Chang, S.W., Koenig, S.N., Zinn, A.R., and Garg, V. (2012). Submicroscopic chromosomal copy number variations identified in children with hypoplastic left heart syndrome. *Pediatr Cardiol* 33, 757-763.
134. Erdogan, F., Larsen, L.A., Zhang, L., Tumer, Z., Tommerup, N., Chen, W., Jacobsen, J.R., Schubert, M., Jurkatis, J., Tzschach, A., et al. (2008). High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *Journal of Medical Genetics* 45, 704-709.
135. Tomita-Mitchell, A., Maslen, C.L., Morris, C.D., Garg, V., and Goldmuntz, E. (2007). GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease. *Journal of Medical Genetics* 44, 779-783.
136. Greenway, S.C., Pereira, A.C., Lin, J.C., DePalma, S.R., Israel, S.J., Mesquita, S.M., Ergul, E., Conta, J.H., Korn, J.M., McCarroll, S.A., et al. (2009). De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet* 41, 931-935.
137. Li, L., Krantz, I.D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A.B., Collins, C.C., Qi, M., Trask, B.J., Kuo, W.L., Cochran, J., et al. (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 16, 243-251.
138. Oda, T., Elkahloun, A.G., Pike, B.L., Okajima, K., Krantz, I.D., Genin, A., Piccoli, D.A., Meltzer, P.S., Spinner, N.B., Collins, F.S., et al. (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16, 235-242.
139. Emerick, K.M., Rand, E.B., Goldmuntz, E., Krantz, I.D., Spinner, N.B., and Piccoli, D.A. (1999). Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology* 29, 822-829.
140. Kamath, B.M., Bauer, R.C., Loomes, K.M., Chao, G., Gerfen, J., Hutchinson, A., Hardikar, W., Hirschfield, G., Jara, P., Krantz, I.D., et al. (2012). NOTCH2 mutations in Alagille syndrome. *Journal of Medical Genetics* 49, 138-144.
141. McDaniell, R., Warthen, D.M., Sanchez-Lara, P.A., Pai, A., Krantz, I.D., Piccoli, D.A., and Spinner, N.B. (2006). NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* 79, 169-173.
142. McKellar, S.H., Tester, D.J., Yagubyan, M., Majumdar, R., Ackerman, M.J., and Sundt, T.M., 3rd. (2007). Novel NOTCH1 mutations in patients with bicuspid aortic valve disease and thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 134, 290-296.

143. Tidyman, W.E., and Rauen, K.A. (2009). The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current Opinion in Genetics & Development* 19, 230-236.
144. Sznajder, Y., Keren, B., Baumann, C., Pereira, S., Alberti, C., Elion, J., Cave, H., and Verloes, A. (2007). The spectrum of cardiac anomalies in Noonan syndrome as a result of mutations in the PTPN11 gene. *Pediatrics* 119, e1325-1331.
145. Marino, B., Digilio, M.C., Toscano, A., Giannotti, A., and Dallapiccola, B. (1999). Congenital heart diseases in children with Noonan syndrome: An expanded cardiac spectrum with high prevalence of atrioventricular canal. *J Pediatr* 135, 703-706.
146. Niihori, T., Aoki, Y., Narumi, Y., Neri, G., Cave, H., Verloes, A., Okamoto, N., Hennekam, R.C., Gillissen-Kaesbach, G., Wieczorek, D., et al. (2006). Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 38, 294-296.
147. Schubbert, S., Zenker, M., Rowe, S.L., Boll, S., Klein, C., Bollag, G., van der Burgt, I., Musante, L., Kalscheuer, V., Wehner, L.E., et al. (2006). Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 38, 331-336.
148. Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., et al. (2001). Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 29, 465-468.
149. Tartaglia, M., Pennacchio, L.A., Zhao, C., Yadav, K.K., Fodale, V., Sarkozy, A., Pandit, B., Oishi, K., Martinelli, S., Schackwitz, W., et al. (2007). Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* 39, 75-79.
150. Roberts, A.E., Araki, T., Swanson, K.D., Montgomery, K.T., Schiripo, T.A., Joshi, V.A., Li, L., Yassin, Y., Tamburino, A.M., Neel, B.G., et al. (2007). Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 39, 70-74.
151. Razzaque, M.A., Nishizawa, T., Komoike, Y., Yagi, H., Furutani, M., Amo, R., Kamisago, M., Momma, K., Katayama, H., Nakagawa, M., et al. (2007). Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 39, 1013-1017.
152. Pandit, B., Sarkozy, A., Pennacchio, L.A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., Pogna, E.A., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Landstrom, A., et al. (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 39, 1007-1012.

153. Cirstea, I.C., Kutsche, K., Dvorsky, R., Gremer, L., Carta, C., Horn, D., Roberts, A.E., Lepri, F., Merbitz-Zahradnik, T., Konig, R., et al. (2010). A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet* 42, 27-29.
154. Aoki, Y., Niihori, T., Kawame, H., Kurosawa, K., Ohashi, H., Tanaka, Y., Filocamo, M., Kato, K., Suzuki, Y., Kure, S., et al. (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37, 1038-1040.
155. Rodriguez-Viciana, P., Tetsu, O., Tidyman, W.E., Estep, A.L., Conger, B.A., Cruz, M.S., McCormick, F., and Rauen, K.A. (2006). Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* 311, 1287-1290.
156. Cordeddu, V., Di Schiavi, E., Pennacchio, L.A., Ma'ayan, A., Sarkozy, A., Fodale, V., Cecchetti, S., Cardinale, A., Martin, J., Schackwitz, W., et al. (2009). Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* 41, 1022-1026.
157. Martinelli, S., De Luca, A., Stellacci, E., Rossi, C., Checquolo, S., Lepri, F., Caputo, V., Silvano, M., Buscherini, F., Consoli, F., et al. (2010). Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet* 87, 250-257.
158. De Luca, A., Bottillo, I., Sarkozy, A., Carta, C., Neri, C., Bellacchio, E., Schirinzi, A., Conti, E., Zampino, G., Battaglia, A., et al. (2005). NF1 gene mutations represent the major molecular event underlying neurofibromatosis-Noonan syndrome. *Am J Hum Genet* 77, 1092-1101.
159. Posch, M.G., Waldmuller, S., Muller, M., Scheffold, T., Fournier, D., Andrade-Navarro, M.A., De Geeter, B., Guillaumont, S., Dauphin, C., Yousseff, D., et al. (2011). Cardiac alpha-myosin (MYH6) is the predominant sarcomeric disease gene for familial atrial septal defects. *PLoS One* 6, e28872.
160. Dai, Y.S., Cserjesi, P., Markham, B.E., and Molkenin, J.D. (2002). The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism. *J Biol Chem* 277, 24390-24398.
161. Ghosh, T.K., Song, F.F., Packham, E.A., Buxton, S., Robinson, T.E., Ronksley, J., Self, T., Bonser, A.J., and Brook, J.D. (2009). Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development. *Mol Cell Biol* 29, 2205-2218.
162. Postma, A.V., van Engelen, K., van de Meerakker, J., Rahman, T., Probst, S., Baars, M.J., Bauer, U., Pickardt, T., Sperling, S.R., Berger, F., et al. (2011). Mutations in the sarcomere gene MYH7 in Ebstein anomaly. *Circulation Cardiovascular Genetics* 4, 43-50.

163. Zhu, L., Vranckx, R., Khau Van Kien, P., Lalande, A., Boisset, N., Mathieu, F., Wegman, M., Glancy, L., Gasc, J.M., Brunotte, F., et al. (2006). Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet* 38, 343-349.
164. Hang, C.T., Yang, J., Han, P., Cheng, H.L., Shang, C., Ashley, E., Zhou, B., and Chang, C.P. (2010). Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* 466, 62-67.
165. Mano, H. (2008). Epigenetic abnormalities in cardiac hypertrophy and heart failure. *Environmental Health and Preventive Medicine* 13, 25-29.
166. Saladi, S.V., and de la Serna, I.L. (2010). ATP dependent chromatin remodeling enzymes in embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews* 6, 62-73.
167. Ho, L., and Crabtree, G.R. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature* 463, 474-484.
168. Morrison, A.J., and Shen, X. (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 373-384.
169. Ho, L., Ronan, J.L., Wu, J., Staahl, B.T., Chen, L., Kuo, A., Lessard, J., Nesvizhskii, A.I., Ranish, J., and Crabtree, G.R. (2009). An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5181-5186.
170. Kidder, B.L., Palmer, S., and Knott, J.G. (2009). SWI/SNF-Brg1 regulates self-renewal and occupies core pluripotency-related genes in embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 317-328.
171. Takeuchi, J.K., and Bruneau, B.G. (2009). Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459, 708-711.
172. Huang, X., Gao, X., Diaz-Trelles, R., Ruiz-Lozano, P., and Wang, Z. (2008). Coronary development is regulated by ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling component BAF180. *Dev Biol* 319, 258-266.
173. Hannibal, M.C., Buckingham, K.J., Ng, S.B., Ming, J.E., Beck, A.E., McMillin, M.J., Gildersleeve, H.I., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Mefford, H.C., et al. (2011). Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 155A, 1511-1516.
174. Digilio, M.C., Marino, B., Toscano, A., Giannotti, A., and Dallapiccola, B. (2001). Congenital heart defects in Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 100, 269-274.
175. Shilatifard, A. (2008). Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 341-348.

176. Lalani, S.R., Safiullah, A.M., Fernbach, S.D., Harutyunyan, K.G., Thaller, C., Peterson, L.E., McPherson, J.D., Gibbs, R.A., White, L.D., Hefner, M., et al. (2006). Spectrum of CHD7 mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 78, 303-314.
177. Wyse, R.K., al-Mahdawi, S., Burn, J., and Blake, K. (1993). Congenital heart disease in CHARGE association. *Pediatr Cardiol* 14, 75-81.
178. Jongmans, M.C., Admiraal, R.J., van der Donk, K.P., Vissers, L.E., Baas, A.F., Kapusta, L., van Hagen, J.M., Donnai, D., de Ravel, T.J., Veltman, J.A., et al. (2006). CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *Journal of Medical Genetics* 43, 306-314.
179. Schnetz, M.P., Bartels, C.F., Shastri, K., Balasubramanian, D., Zentner, G.E., Balaji, R., Zhang, X., Song, L., Wang, Z., Laframboise, T., et al. (2009). Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Research* 19, 590-601.
180. Bajpai, R., Chen, D.A., Rada-Iglesias, A., Zhang, J., Xiong, Y., Helms, J., Chang, C.P., Zhao, Y., Swigut, T., and Wysocka, J. (2010). CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature* 463, 958-962.
181. Keyte, A., and Hutson, M.R. (2012). The neural crest in cardiac congenital anomalies. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 84, 25-40.
182. McDonald-McGinn, D.M., and Zackai, E.H. (2008). Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. *Developmental Disabilities Research Reviews* 14, 69-74.
183. Ou, Z., Berg, J.S., Yonath, H., Enciso, V.B., Miller, D.T., Picker, J., Lenzi, T., Keegan, C.E., Sutton, V.R., Belmont, J., et al. (2008). Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genetics in medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 10, 267-277.
184. Jerome, L.A., and Papaioannou, V.E. (2001). DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet* 27, 286-291.
185. Yagi, H., Furutani, Y., Hamada, H., Sasaki, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Ichida, F., Joo, K., Kimura, M., Imamura, S., et al. (2003). Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* 362, 1366-1373.
186. Zweier, C., Sticht, H., Aydin-Yaylagul, I., Campbell, C.E., and Rauch, A. (2007). Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am J Hum Genet* 80, 510-517.
187. Liao, J., Kochilas, L., Nowotschin, S., Arnold, J.S., Aggarwal, V.S., Epstein, J.A., Brown, M.C., Adams, J., and Morrow, B.E. (2004). Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage. *Hum Mol Genet* 13, 1577-1585.

188. Funke, B., Epstein, J.A., Kochilas, L.K., Lu, M.M., Pandita, R.K., Liao, J., Bauerndistel, R., Schuler, T., Schorle, H., Brown, M.C., et al. (2001). Mice overexpressing genes from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome have middle and inner ear defects. *Hum Mol Genet* 10, 2549-2556.
189. Garcia-Minaur, S., Fantes, J., Murray, R.S., Porteous, M.E., Strain, L., Burns, J.E., Stephen, J., and Warner, J.P. (2002). A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *Journal of Medical Genetics* 39, E62.
190. Guris, D.L., Fantes, J., Tara, D., Druker, B.J., and Imamoto, A. (2001). Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet* 27, 293-298.
191. Liao, J., Aggarwal, V.S., Nowotschin, S., Bondarev, A., Lipner, S., and Morrow, B.E. (2008). Identification of downstream genetic pathways of Tbx1 in the second heart field. *Dev Biol* 316, 524-537.
192. Ivins, S., Lammerts van Beuren, K., Roberts, C., James, C., Lindsay, E., Baldini, A., Ataliotis, P., and Scambler, P.J. (2005). Microarray analysis detects differentially expressed genes in the pharyngeal region of mice lacking Tbx1. *Dev Biol* 285, 554-569.
193. Roberts, C., Ivins, S.M., James, C.T., and Scambler, P.J. (2005). Retinoic acid down-regulates Tbx1 expression in vivo and in vitro. *Dev Dyn* 232, 928-938.
194. Garg, V., Yamagishi, C., Hu, T., Kathiriyai, I.S., Yamagishi, H., and Srivastava, D. (2001). Tbx1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is regulated by sonic hedgehog during pharyngeal arch development. *Dev Biol* 235, 62-73.
195. Yamagishi, H., Maeda, J., Hu, T., McAnally, J., Conway, S.J., Kume, T., Meyers, E.N., Yamagishi, C., and Srivastava, D. (2003). Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes Dev* 17, 269-281.
196. Vitelli, F., Taddei, I., Morishima, M., Meyers, E.N., Lindsay, E.A., and Baldini, A. (2002). A genetic link between Tbx1 and fibroblast growth factor signaling. *Development* 129, 4605-4611.
197. Fulcoli, F.G., Huynh, T., Scambler, P.J., and Baldini, A. (2009). Tbx1 regulates the BMP-Smad1 pathway in a transcription independent manner. *PLoS One* 4, e6049.
198. Ewart, A.K., Morris, C.A., Atkinson, D., Jin, W., Sternes, K., Spallone, P., Stock, A.D., Leppert, M., and Keating, M.T. (1993). Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 5, 11-16.
199. Pober, B.R. (2010). Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med* 362, 239-252.

200. Del Pasqua, A., Rinelli, G., Toscano, A., Iacobelli, R., Digilio, C., Marino, B., Saffirio, C., Mondillo, S., Pasquini, L., Sanders, S.P., et al. (2009). New findings concerning cardiovascular manifestations emerging from long-term follow-up of 150 patients with the Williams-Beuren-Beuren syndrome. *Cardiology in the Young* 19, 563-567.
201. Eronen, M., Peippo, M., Hiippala, A., Raatikka, M., Arvio, M., Johansson, R., and Kahkonen, M. (2002). Cardiovascular manifestations in 75 patients with Williams syndrome. *Journal of Medical Genetics* 39, 554-558.
202. Frangiskakis, J.M., Ewart, A.K., Morris, C.A., Mervis, C.B., Bertrand, J., Robinson, B.F., Klein, B.P., Ensing, G.J., Everett, L.A., Green, E.D., et al. (1996). LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 86, 59-69.
203. Tassabehji, M., Metcalfe, K., Karmiloff-Smith, A., Carette, M.J., Grant, J., Dennis, N., Reardon, W., Splitt, M., Read, A.P., and Donnai, D. (1999). Williams syndrome: use of chromosomal microdeletions as a tool to dissect cognitive and physical phenotypes. *Am J Hum Genet* 64, 118-125.
204. Li, D.Y., Toland, A.E., Boak, B.B., Atkinson, D.L., Ensing, G.J., Morris, C.A., and Keating, M.T. (1997). Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet* 6, 1021-1028.
205. Yoshimura, K., Kitagawa, H., Fujiki, R., Tanabe, M., Takezawa, S., Takada, I., Yamaoka, I., Yonezawa, M., Kondo, T., Furutani, Y., et al. (2009). Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9280-9285.
206. Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., et al. (2003). The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 113, 905-917.
207. Bozhenok, L., Wade, P.A., and Varga-Weisz, P. (2002). WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *EMBO J* 21, 2231-2241.
208. Cavellan, E., Asp, P., Percipalle, P., and Farrants, A.K. (2006). The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription. *J Biol Chem* 281, 16264-16271.
209. Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L., Steffensen, S., Ferreira, F., Grimaldi, M., Gilbert, N., Ferreira, J., and Varga-Weisz, P.D. (2004). The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nature Cell Biology* 6, 1236-1244.

210. Maas, N.M., Van Buggenhout, G., Hannes, F., Thienpont, B., Sanlaville, D., Kok, K., Midro, A., Andrieux, J., Anderlid, B.M., Schoumans, J., et al. (2008). Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridisation (CGH). *Journal of Medical Genetics* 45, 71-80.
211. Nimura, K., Ura, K., Shiratori, H., Ikawa, M., Okabe, M., Schwartz, R.J., and Kaneda, Y. (2009). A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature* 460, 287-291.
212. Catela, C., Bilbao-Cortes, D., Slonimsky, E., Kratsios, P., Rosenthal, N., and Te Welscher, P. (2009). Multiple congenital malformations of Wolf-Hirschhorn syndrome are recapitulated in Fgfr11 null mice. *Disease Models & Mechanisms* 2, 283-294.
213. Wat, M.J., Shchelochkov, O.A., Holder, A.M., Breman, A.M., Dagli, A., Bacino, C., Scaglia, F., Zori, R.T., Cheung, S.W., Scott, D.A., et al. (2009). Chromosome 8p23.1 deletions as a cause of complex congenital heart defects and diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet A* 149A, 1661-1677.
214. Zhang, W., Li, X., Shen, A., Jiao, W., Guan, X., and Li, Z. (2008). GATA4 mutations in 486 Chinese patients with congenital heart disease. *European Journal of Medical Genetics* 51, 527-535.
215. Lage, K., Mollgard, K., Greenway, S., Wakimoto, H., Gorham, J.M., Workman, C.T., Bendtsen, E., Hansen, N.T., Rigina, O., Roque, F.S., et al. (2010). Dissecting spatio-temporal protein networks driving human heart development and related disorders. *Molecular Systems Biology* 6, 381.
216. McElhinney, D.B., Krantz, I.D., Bason, L., Piccoli, D.A., Emerick, K.M., Spinner, N.B., and Goldmuntz, E. (2002). Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a JAG1 mutation and/or Alagille syndrome. *Circulation* 106, 2567-2574.
217. Garg, V., Muth, A.N., Ransom, J.F., Schluterman, M.K., Barnes, R., King, I.N., Grossfeld, P.D., and Srivastava, D. (2005). Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437, 270-274.
218. Chang, C.P., and Bruneau, B.G. (2012). Epigenetics and cardiovascular development. *Annual Review of Physiology* 74, 41-68.
219. Pediatric Cardiac Genomics, C., Gelb, B., Brueckner, M., Chung, W., Goldmuntz, E., Kaltman, J., Kaski, J.P., Kim, R., Kline, J., Mercer-Rosa, L., et al. (2013). The Congenital Heart Disease Genetic Network Study: rationale, design, and early results. *Circ Res* 112, 698-706.
220. Kodo, K., Nishizawa, T., Furutani, M., Arai, S., Ishihara, K., Oda, M., Makino, S., Fukuda, K., Takahashi, T., Matsuoka, R., et al. (2012). Genetic analysis of

- essential cardiac transcription factors in 256 patients with non-syndromic congenital heart defects. *Circ J* 76, 1703-1711.
221. McCulley, D.J., and Black, B.L. (2012). Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol* 100, 253-277.
222. Jiao, K., Kulesa, H., Tompkins, K., Zhou, Y., Batts, L., Baldwin, H.S., and Hogan, B.L. (2003). An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev* 17, 2362-2367.
223. Ge, J., Zhao, G., Chen, R., Li, S., Wang, S., Zhang, X., Zhuang, Y., Du, J., Yu, X., Li, G., et al. (2006). Enhanced myocardial cathepsin B expression in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 8, 284-289.
224. Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T.G., Kolodgie, F.D., Hajjar, R.J., Schmidt, U., Semigran, M.J., Dec, G.W., and Khaw, B.A. (1996). Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335, 1182-1189.
225. Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J.A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Krajewski, S., et al. (1997). Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336, 1131-1141.
226. Tsuchida, K., Aihara, H., Isogai, K., Hanada, K., and Shibata, N. (1986). Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs is reduced by Ep459, a cysteine proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* 367, 39-45.
227. Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106, 1127-1137.
228. Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., et al. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276, 3149-3157.
229. Wu, Q.Q., Xu, M., Yuan, Y., Li, F.F., Yang, Z., Liu, Y., Zhou, M.Q., Bian, Z.Y., Deng, W., Gao, L., et al. (2015). Cathepsin B deficiency attenuates cardiac remodeling in response to pressure overload via TNF-alpha/ASK1/JNK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308, H1143-1154.
230. Gudkova, A., Kostareva, A., Sjoberg, G., Smolina, N., Turalchuk, M., Kuznetsova, I., Rybakova, M., Edstrom, L., Shlyakhto, E., and Sejersen, T. (2013). Diagnostic challenge in desmin cardiomyopathy with transformation of clinical phenotypes. *Pediatr Cardiol* 34, 467-470.
231. Garcia-Pavia, P., Syrris, P., Salas, C., Evans, A., Mirelis, J.G., Cobo-Marcos, M., Vilches, C., Bornstein, B., Segovia, J., Alonso-Pulpon, L., et al. (2011). Desmosomal protein gene mutations in patients with idiopathic dilated

- cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation: a clinicopathological study. *Heart* 97, 1744-1752.
232. Elliott, P., O'Mahony, C., Syrris, P., Evans, A., Rivera Sorensen, C., Sheppard, M.N., Carr-White, G., Pantazis, A., and McKenna, W.J. (2010). Prevalence of desmosomal protein gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation Cardiovascular Genetics* 3, 314-322.
233. Kobrynski LJ, Sullivan KE. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*. 370 (9596):1443–1452.
234. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome) *Medicine (Baltimore)* 2011; 90(1):1–18.
235. Emanuel BS. (2008). Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev*. 14(1):11–18.
236. Gao S, Li X, Amendt BA. (2013). Understanding the role of TBX1 as a candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep*. 13(6): 613-621.
237. Meechan DW, Maynard TM, Tucker ES, LaMantia AS. (2011). Three phases of DiGeorge/22q11 deletion syndrome pathogenesis during brain development: patterning, proliferation, and mitochondrial functions of 22q11 genes. *Int J Dev Neurosci*. 29(3):283–294.
238. Raux G, Bumsel E, Hecketsweiler B, et al. (2007). Involvement of hyperprolinemia in cognitive and psychiatric features of the 22q11 deletion syndrome. *Hum Mol Genet*. 16(1):83–91.
239. Rosa RF, Rosa RC, Dos Santos PP, Zen PR, Paskulin GA. (2011). Hematological abnormalities and 22q11.2 deletion syndrome. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 33(2):151–154.
240. Botto LD, May K, Fernhoff PM, et al. (2003). A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics*. 112(1 pt 1):101–107
241. Devriendt K, Fryns JP, Mortier G, van Thienen MN, Keymolen K. (1998). The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J Med Genet*. 35(9):789–790.
242. Sandrin-Garcia P, Macedo C, Martelli LR, et al. (2002). Recurrent 22q11.2 deletion in a sibship suggestive of parental germline mosaicism in velocardiofacial syndrome. *Clin Genet*. 61(5):380–383.

243. Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, et al. (2011). International 22q11.2 Deletion Syndrome Consortium Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr.* 159(2):332–339.
244. Noël AC, Pelluard F, Delezoide AL, et al. (2014). Fetal phenotype associated with the 22q11 deletion. *Am J Med Genet A.* 16(11):2724–2731.
245. Momma K. (2010). Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Cardiol.* 105(11):1617–1624.
246. Lima K, Abrahamsen TG, Wolff AB, et al. (2011). Hypoparathyroidism and autoimmunity in the 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Endocrinol.* 165(2):345–352.
247. Cheung EN, George SR, Costain GA, et al. (2014). Prevalence of hypocalcaemia and its associated features in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 81(2):190–196.
248. Cheung EN, George SR, Andrade DM, Chow EW, Silversides CK, Bassett AS. (2014). Neonatal hypocalcemia, neonatal seizures, and intellectual disability in 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Med.* 16(1):40–44.
249. Maggadottir SM, Sullivan KE. (2013). The diverse clinical features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome) *J Allergy Clin Immunol Pract.* 1(6):589–594.
250. Tsirikos AI, Khan LA, McMaster MJ. (2010). Spinal deformity in patients with DiGeorge syndrome. *J Spinal Disord Tech.* 23(3):208–214.
251. Schneider M, Debbané M, Bassett AS, et al. (2014). International Consortium on Brain and behavior in 22q11.2 Deletion Syndrome Psychiatric disorders from childhood to adulthood in 22q11.2 deletion syndrome: results from the International Consortium on Brain and Behavior in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Am J Psychiatry.* 171(6):627–639.
252. Gennery AR. (2012). Immunological aspects of 22q11.2 deletion syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 69(1):17–27.
253. Björk AH, Óskarsdóttir S, Andersson BA, Friman V. (2012). Antibody deficiency in adults with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 158A(8):1934–1940.
254. Persson C, Friman V, Óskarsdóttir S, Jönsson R. (2012). Speech and hearing in adults with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 158(12):3071–3079.
255. Weinzimer SA. (2001). Endocrine aspects of the 22q11.2 deletion syndrome. *Genet Med.* 3(1):19–22.

256. Oskarsdóttir S, Holmberg E, Fasth A, Strömmland K. (2008). Facial features in children with the 22q11 deletion syndrome. *Acta Paediatr.* 97(8):1113–1137.
257. Monteiro FP, Vieira TP, Sgardioli IC, et al. (2013). Defining new guidelines for screening the 22q11.2 deletion based on a clinical and dysmorphicologic evaluation of 194 individuals and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 172(7):927–945.
258. Wilson DJ, Burn J, Scambler P, Goodship J. (1993). DiGeorge syndrome: part of CATCH22. *J Med Genet.* 30: 852-856.
259. Manning M, Hudgens L. (2010). Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 12: 742-745.
260. Lu X-Y, Phung M, Shaw CA, et al. (2008). Genomic imbalances in neonates with birth defects: High detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatr.* 122: 1310-1318.
261. Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, et al. (2011). Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res.* 135: 251-259.
262. Boudjemline Y, Fermont L, Le Bidois J, Lyonnet S, Sidi D, Bonnet D. (2001). Prevalence of 22q11 deletion in fetuses with conotruncal cardiac defects: A 6-year prospective study. *J Pediatr.* 138: 520-524.
263. Rauch A, Hofbeck M, Leipold G, et al. (1998). Incidence and significance of 22q11.2 hemizyosity in patients with interrupted aortic arch. *Am J Med Genet.* 78: 322-331.
264. Borgmann S, Luhmer J, Arslan-Kirchner M, Kallfelz HC, Schmidtke J. (1999). A search for chromosome 22q11.2 deletions in a series of 176 consecutively catheterized patients with congenital heart disease: no evidence for deletions in non-syndromic patients. *Eur J Pediatr.* 158: 958-963.
265. Chow E. W., Watson M., Young D. A., Bassett A. S. (2006). Neurocognitive profile in 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *Schizophr. Res.* 87 270–278 10.1016/j.schres.2006.04.007.
266. Bassett A. S., Chow E. W. (2008). Schizophrenia and 22q11.2 deletion syndrome. *Curr. Psychiatry Rep.* 10 148–157 10.1007/s11920-008-0026-1
267. Levinson D. F., Duan J., Oh S., Wang K., Sanders A. R., Shi J., et al. (2011). Copy number variants in schizophrenia: confirmation of five previous findings and new evidence for 3q29 microdeletions and VIPR2 duplications. *Am. J. Psychiatry* 168 302–316 10.1176/appi.ajp.2010.10060876.

268. International Schizophrenia Consortium. (2008). Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 455 237–241.10.1038/nature07239.
269. Stark K. L., Xu B., Bagchi A., Lai W. S., Liu H., Hsu R., et al. (2008). Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat. Genet.* 40 751–760.10.1038/ng.138.
270. Xu B., Hsu P. K., Stark K. L., Karayiorgou M., Gogos J. A. (2013). Derepression of a neuronal inhibitor due to miRNA dysregulation in a schizophrenia-related microdeletion. *Cell* 152 262–275.10.1016/j.cell.2012.11.052.
271. Shaikh T. H., Kurahashi H., Saitta S. C., O'Hare A. M, Hu P., Roe B. A., et al. (2000). Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum. Mol. Genet.* 9 489–501.10.1093/hmg/9.4.489.
272. Vogels A, Schevenels S, Cayenberghs R, et al. (2014). Presenting symptoms in adults with the 22q11 deletion syndrome. *Eur J Med Genet.* 57(4):157–162.
273. Scambler PJ. (2000). The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet.* 9(16):2421–2426.
274. Dittwald P, Gambin T, Gonzaga-Jauregui C, et al. (2013). Inverted low-copy repeats and genome instability – a genome-wide analysis. *Hum Mutat.* 34(1):210–220.
275. Agergaard, P., A. Hebert, et al. (2011). Can clinical assessment detect 22q11.2 deletions in patients with cardiac malformations? A review. *Eur J Med Genet* 54(1): 3-8.
276. Goldmuntz, E., B. J. Clark, et al. (1998). Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *Journal of the American College of Cardiology* 32(2): 492-498.

EKLER

EK-1: Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -29

10 Ocak 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 08.01.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/01
Proje No : GO 13/568 (Değerlendirme Tarihi 11.12.2013)
Karar No : GO 13/568 - 18

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Koray BODUROĞLU'nun sorumlu araştırmacısı olduğu Doç. Dr. Gülen Eda UTINE ve Prof. Dr. Tevfik KARAGÖZ ile birlikte çalışacakları Uzm. Dr. Esra Tuba MUTLU'nun tezi olan GO13/568 kayıt numaralı ve "Konjenital Kalp Hastalıklarında MLPA Kullanılarak Gen Kopya Sayısı Varyasyonlarının Analiz Edilmesi" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. Müjdat Sarı (Üye) | 11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 14. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Songül Varizoğlu (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

EK-2: Hasta Değerlendirme Formu

Uz.Dr.Esra Tuba Mutlu 2014

KONJENITAL KALP HASTALIKLARINDA MLPA İLE GEN KOPYA SAYISI VARYASYONLARININ ANALİZ EDİLMESİ

GENETİK TANI İZLEM FORMU

HASTANIN

Soyadı, Adı:
Dosya No:
Doğum Tarihi-Yaşı:
Cinsiyeti: K E
Doğum Yeri:
Genetik Prot.No:
Baba:
Anne:
Tel No:

AĞIZ

Yarık Dudak
Yarık Damak
Yüksek Damak
Mikrognati
Diğer:

BURUN

Burun Kökü Basık Antevert Burun Ucu

ÖN TANI

Baş Çevresi:
Boy:(percentile)
Ağırlık:(percentile)
Boy Yaşı:
Ağırlık Yaşı:
Doğum Ağırlığı:

BOYUN VE ÇÖĞÜS

Yelelenme
Tortikollis Düşük Arka Saç Çizgisi Pektus Ekskavatum

GENEL GÖRÜNÜM

Gelişme Gerliği
Değişik Yüz Görünümü
Mental Retardasyon
Kısa Boy
Konjenital Anomali
Diğer:

GENİTAL ORGANLAR

Kriptorşidizm Anal Atrezi
İnguinal Herni Diğer:
Hipospadias

EKSTREMİTELER

Simian Çizgi Sindaktili Polidaktili Klinodaktili

DERİ

Skin Tag
Siyanoz
Diğer:

AİLE HİKAYESİ

Akrabalık
Konjenital Kalp Hastalığı Aile Öyküsü

Anne Tanı:

Baba Tanı:

Kardeş Tanı:

Diğer:

BAS VE SANTRAL SİNİR SİSTEMİ

Mikrosefali
Diğer:

ANNENİN GEBELİK ÖYKÜSÜ

Geçirilmiş Hastalık:

Kronik Hastalık:

İlaç Kullanımı:

GÖZLER

Epikantus
Hipertelorizm
Mikroftalmi
Ptozis
İris Kolobomu
Diğer:

HASTANIN EKO BULGULARI

VSD VSD+ ASD
ASD AVSD

KULAK

Düşük kulak
Preauriküler Pit/tag
Diğer:

MLPA

EK-3: MLPA P311-A2 Konjenital Kalp Hastalıkları Kiti

SALSA MLPA probemix P311-A2 Congenital Heart Disease

Lot A2-0312: compared to the previous lot A1-0309 QDX2 control fragments have been added and one CRELD1 probe has been removed.

Congenital heart disease (CHD) is a common birth defect, of which ventricular septal defects are collectively the most common type. Abnormal cardiac development originates from both environmental and genetic factors. Multiple studies postulate that mutations in several genes could be implicated in CHD.

The transcription factor GATA4 forms a complex with TBX5 which interacts with a heart muscle protein, α -myosin heavy chain. Another factor, the homeobox (developmental) gene, NKX2-5 also interacts with MYH6. Mutations of all these proteins are associated with both atrial and ventricular septal defects. In addition, NKX2-5 is associated with defects in the electrical conduction of the heart and TBX5 is related to the Holt-Oram syndrome which includes electrical conduction defects and abnormalities of the upper limb (Srivastava, D., 2006, *Cell*). Atrioventricular septal defect (AVSD) can also be caused by mutation in the gene encoding cell adhesion molecule CRELD1. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) was shown to have a critical role in functional heart formation in model animals; the loss of this protein resulted in various developmental defects (McCulley, D. J. et al., 2008, *Dev Dyn*).

The GATA4 gene (7 exons) spans ~55.8 kb of genomic DNA and is located on chromosome 8p23, ~11.6 Mb from p-telomere. Probes for each of the 7 exons of GATA4 and two probes upstream and downstream of the gene are included in the P311-A2 probemix.

The NKX2-5 gene (2 exons) spans ~3.2 kb of genomic DNA and is located on chromosome 5q35, ~172.5 Mb from p-telomere. For each exon, two probes are included.

The TBX5 gene (10 exons) spans ~52.2 kb of genomic DNA and is located on chromosome 12q24, ~113.3 Mb from p-telomere. Probes for 8 of the 10 exons are included, with two probes for exon 9 and 10.

The BMP4 gene (5 exons) spans ~4.8 kb of genomic DNA and is located on chromosome 14q22, ~53.5 Mb from p-telomere. Probes for 4 of the 5 exons of BMP4 are included.

The CRELD1 gene (11 exons) spans ~11.6 kb of genomic DNA and is located on chromosome 3p25, ~10 Mb from p-telomere. Probes for exons 3 and 10 are included.

This probemix furthermore contains 3 probes for chromosome region 22q11 (DiGeorge). In addition, 10 reference probes are included in this probemix, detecting several different autosomal chromosomal locations.

This SALSA® MLPA® probemix is designed to detect deletions/duplications of one or more sequences in the aforementioned genes in a DNA sample. Heterozygous deletions of recognition sequences should give a 35-50% reduced relative peak area of the amplification product of that probe. Note that a mutation or polymorphism in the sequence detected by a probe can also cause a reduction in relative peak area, even when not located exactly on the ligation site! In addition, some probe signals are more sensitive to sample purity and small changes in experimental conditions. Therefore, deletions and duplications detected by MLPA should always be confirmed by other methods. Not all deletions and duplications detected by MLPA will be pathogenic; users should always verify the latest scientific literature when interpreting their findings. We have no information on what percentage of defects in these genes is caused by deletions/duplications of complete exons. Finally, note that most defects in this gene are expected to be small (point) mutations which will not be detected by this SALSA® MLPA® test.

SALSA® MLPA® probemixes and reagents are sold by MRC-Holland for research purposes and to demonstrate the possibilities of the MLPA technique. They are not CE/FDA certified for use in diagnostic procedures. Purchase of the SALSA® MLPA® test probemixes and reagents includes a limited license to use these products for research purposes.

The use of a SALSA® MLPA® probemix and reagents requires a thermocycler with heated lid and sequence type electrophoresis equipment. Different fluorescent PCR primers are available. The MLPA technique has been first described in *Nucleic Acid Research* 30, e57 (2002).

More information

Website : www.mlpa.com

E-mail : info@mlpa.com (information & technical questions); order@mlpa.com (for orders)

Mail : MRC-Holland bv; Willem Schoutenstraat 6, 1057 DN Amsterdam, the Netherlands

Related SALSA® MLPA® probemixes

- P250 DiGeorge syndrome
- P234 GATA4: Contains probes for GATA4 and GATA3

References for SALSA® MLPA® probemix P311 CHD

- Guida, V. *et al.*, 2010. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of GATA4 gene copy number variations in patients with isolated congenital heart disease. *Dis Markers* 28:287-292.

Data analysis

The P311-A2 CHD probemix contains 44 MLPA probes with amplification products between 124 and 481 nt. In addition, it contains 9 control fragments generating an amplification product smaller than 120 nt: four DNA Quantity fragments (Q-fragments) at 64-70-76-82 nt, three DNA denaturation control fragments (D-fragments) at 88-92-96 nt, one X-fragment at 100 nt and one Y-fragment at 105 nt. More information on how to interpret observations on these control fragments can be found in the MLPA protocol.

Data generated by this probemix can first be normalised intra-sample by dividing the peak area of each probe's amplification product by the total area of only the reference probes in this probemix (block normalisation). Secondly, inter-sample normalisation can be achieved by dividing this intra-normalised probe ratio in a sample by the average intra-normalised probe ratio of all reference samples. Please note that this type of normalisation assumes no changes occurred in the genomic regions recognised by the reference probes.

Data normalisation should be performed within one experiment. Only samples purified by the same method should be compared. Confirmation of most exons deletions and amplifications can be done by e.g. Southern blotting, long range PCR, qPCR, FISH.

Note that Coffalyser, the MLPA analysis tool developed at MRC-Holland, can be downloaded free of charge from our website www.mlpa.com.

Many copy number alterations in healthy individuals are described in the database of genomic variants: <http://projects.tcag.ca/variation>. For example, a duplication of a complete gene might not be pathogenic, while a partial duplication or a deletion may result in disease. For some genes, certain in-frame deletions may result in a very mild, or no disease. Copy number changes of reference probes are unlikely to be the cause of the condition tested for. Users should always verify the latest scientific literature when interpreting their findings.

This probemix was developed by R. Vijzelaar at MRC-Holland. In case the results obtained with this probemix lead to a scientific publication, it would be very much appreciated if the probemix designer could be made a coauthor.

Info/remarks/suggestions for improvement: info@mlpa.com.

Table 1. SALSA MLPA P311-A2 CHD probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position					
		reference	GATA4	TBX5	NKX2-5	22q11	BMP4 CRELD1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA						
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation						
100	X-fragment: Specific for the X chromosome						
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome						
124 ~	MSR1 probe 04235-L08770		8p22				
130	CTSB probe 01212-L00766		Downstream GATA4				
136	CRELD1 probe 02141-L01620					Exon 3	
142	GATA4 probe 07641-L07326		Exon 5				
148	GATA4 probe 08309-L08282		Exon 1				
154	Reference probe 11356-L12081	12p13					
160	TBX5 probe 05694-L05136			Exon 9a			
166	TBX5 probe 06207-L05127			Exon 1			
174	TBX5 probe 05696-L05138			Exon 10			
184	TBX5 probe 05687-L05129			Exon 3a			
190	NKX2-5 probe 12465-L13480				Exon 1		
195	TBX5 probe 05688-L05130			Exon 4			
202	GATA4 probe 07643-L07328		Exon 7				
208 ±	GP1BB probe 05464-L10114				22q11		
215	Reference probe 08570-L08571	17q23					
229	GATA4 probe 07697-L07414		Upstream GATA4				
238	GATA4 probe 07642-L07327		Exon 6				
247	TBX5 probe 05691-L05133			Exon 7			
255	BMP4 probe 12467-L14521					Exon 1b	
266	NKX2-5 probe 11629-L12386				Exon 2c		
274	NKX2-5 probe 12468-L13483				Exon 1		
283	TBX5 probe 05695-L05137			Exon 9a			
292 ±	Reference probe 11087-L11770	2p24					
303	TBX5 probe 05697-L05139			Exon 10			
310	GATA4 probe 07638-L07323		Exon 2				
317	TBX5 probe 05686-L05128			Exon 2			
328	Reference probe 10682-L11264	6p12					
337	GATA4 probe 07639-L07324		Exon 3				
346	TBX5 probe 06209-L05132			Exon 6			
355	GATA4 probe 07640-L07325		Exon 4				
362	GATA4 probe 07696-L07413		Upstream GATA4				
369	Reference probe 12377-L13386	2q37					
382	DGCR8 probe 08476-L10765				22q11		
391	BMP4 probe 12469-L13484					Exon 5	
400	CRELD1 probe 12470-L13485					Exon 10	
409	Reference probe 07208-L06858	7p14					
418	Reference probe 11008-L11679	4q22					
427	NKX2-5 probe 12471-L13486				Exon 2c		
436	BMP4 probe 12472-L13487					Exon 2	
445	Reference probe 11010-L11680	7q32					
454	BMP4 probe 12473-L13488					Exon 4	
465	CDC45 probe 05463-L05808				22q11		
472	Reference probe 09205-L14667	18p11					
481	Reference probe 12530-L13580	6q23					

~ This probe is less reliable, as it targets a sequence in a CNV region.

± This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.

Note: Exon numbering might be different as compared to literature! Please notify us of any mistakes. The identity of the genes detected by the reference probes is available on request: info@mlpa.com.

Table 2. P311 probes arranged according to chromosomal location

Table 2a. GATA4

Length (nt)	SALSA MLPA probe	GATA4 Exon	Ligation site NM_002052.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
362	07696-L07413	upstream	8.4 kb upstream of exon 1	CATGCTCAAGAT-AGGCACTGGAGC	1.5 kb
229	07697-L07414	upstream	6.9 kb upstream of exon 1	GAGGTTCTTCTT-TAAAATCCATTC	7.0 kb
		<i>start codon</i>	<i>555-557 (ex 2)</i>		
148	08309-L08282	Exon 1	21 nt after exon 1	TTTCTTCCCTTT-CTTTGCTCCTTC	3.8 kb
310	07638-L07323	Exon 2	388-389	TGCTGGATTTAA-TACGTATATATT	40.8 kb
337	07639-L07324	Exon 3	1174-1175	CTCAGTAGATAT-GTTTGACGACTT	1.3 kb
355	07640-L07325	Exon 4	1456-1457	CTACATGAAGCT-CCACGGGGTACG	4.9 kb
142	07641-L07326	Exon 5	1532-1533	AAGAACCCTGAAT-AAATCTAAGACA	1.9 kb
238	07642-L07327	Exon 6	1609-1610	CAACTCCAGCAA-CGCCACCACCAG	1.4 kb
202	07643-L07328	Exon 7	1785-1786	CACAAGGCTATG-CGCTCCCCGTCA	89.3 kb
		<i>stop codon</i>	<i>1881-1883 (ex 7)</i>		
130	01212-L00766	CTSB gene	89.3 kb downstream	AAGGTAGCAAG-ATCTGTGAGCCT	4309.5 kb
124 ~	04235-L08770	MSR1 gene	4.3 Mb downstream	GGTGATCGGGGA-GCAATTGGCTTT	

~ This probe is less reliable, as it targets a sequence in a CNV region.
The NM_002052.3 sequence is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.

Table 2b. NKX2-5

Length (nt)	SALSA MLPA probe	NKX2-5 Exon	Ligation site NM_004387.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>230-232 (ex 1)</i>		
274	12468-L13483	Exon 1	475-476	CCGGCCAAGTGT-GCGTCTGCCTTT	0.1 kb
190	12465-L13480	Exon 1	10 nt after exon 1	AGGTGAGGAGGA-AACACAGGCCCC	1.6 kb
427	12471-L13486	Exon 2c	682-681 reverse	CGCTCCAGCTCA-TAGACCTGCGCC	0.5 kb
266	11629-L12386	Exon 2c	1158-1159	CGGGATTCCGCA-GAGCAACTCGGG	
		<i>stop codon</i>	<i>1202-1204 (ex 2c)</i>		

The NM_004387.3 sequence represents transcript variant 1 and is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.

Table 2c. TBX5

Length (nt)	SALSA MLPA probe	TBX5 Exon	Ligation site NM_000192.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>668-670 (ex 3)</i>		
166	06207-L05127	Exon 1	509-510	GACGTTGGAAGA-AGACCTGGCCTA	2.2 kb
317	05686-L05128	Exon 2	341-342; NM_181486.1	CTATTCTGGGTA-AGCAGTAAACCC	1.9 kb
184	05687-L05129	Exon 3a	726-727	GCCTGACGCAAA-AGACCTGCCCTG	1.9 kb
195	05688-L05130	Exon 4	837-838	AATCAAAGTGT-TCTCCATGAAAG	3.3 kb
	No probe	Exon 5			
346	06209-L05132	Exon 6	1138-1139	TCCTTCCAGAAA-CTCAAGCTCACC	3.8 kb
247	05691-L05133	Exon 7	1213-1214	TACCAGCCTAGA-TTACACATCGTG	28.5 kb
	No probe	Exon 8			
160	05694-L05136	Exon 9a	1465-1466	GTGAGGCAAAAA-GTGGCCTCCAAC	0.2 kb
283	05695-L05137	Exon 9a	1641-1642	CCATTGTACCAA-GAGGAAAGGTGA	10.1 kb
174	05696-L05138	Exon 10	1724-1725	AAGAAGATTCTT-TCTACCCTCTA	1.1 kb
303	05697-L05139	Exon 10	2869-2870	TTTGCTTTGGTT-TTGCTCCTGCTT	
		<i>stop codon</i>	<i>2222-2224 (ex 10)</i>		

Exon 2 is present in transcript variant 4 (NM_181486.1).
The NM_000192.3 sequence represents transcript variant 1 and is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.

Table 2d. BMP4

Length (nt)	SALSA MLPA probe	BMP4 Exon	Ligation site NM_001202.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>420-422 (ex 4)</i>		
255	12467-L14521	Exon 1b	285-286	TGCAGGGACCTA-TGGTGAGCAAGG	2.1 kb
436	12472-L13487	Exon 2	98-99; NM_130851.2	CGCAGGCCGAAA-GCTGTTACCGT	2.3 kb
	No probe	Exon 3			
454	12473-L13488	Exon 4	439-440	TGGTAACCGAAT-GCTGATGGTCGT	1.3 kb
391	12469-L13484	Exon 5	801-802	AACATCTGGAGA-ACATCCCAGGGA	
		<i>stop codon</i>	<i>1644-1646 (ex 5)</i>		

The NM_001202.3 sequence represents transcript variant 1 and is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project. Exon 2 is present in transcript variant 3 (NM_130851.2).

Table 2e. CRELD1

Length (nt)	SALSA MLPA probe	CRELD1 Exon	Ligation site NM_001031717.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	<i>100-102 (ex 1b)</i>		
136	02141-L01620	Exon 3	407-408	CAAGTCAGACTT-CGAGTGCCACCG	6.3 kb
400	12470-L13485	Exon 10	1161-1162	GCAATCCCCATC-TTAACTGATTTA	
		<i>stop codon</i>	<i>1366-1368 (ex 11)</i>		

The NM_001031717.3 sequence represents transcript variant 1 and is a reference standard in the NCBI RefSeqGene project.

Table 2f. 22q11 region (DiGeorge)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene	Ligation site, region	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>telomere</i>			
465	05463-L05808	CDC45	NM_001178010.1; 90-91, region A-B	ATGTTCTGTGCC-GATTTCCGCAAA	244.0 kb
208 ±	05464-L10114	GP1BB	NM_000407.4; 206-207, region A-B	CACAACCGAGCT-GGTGCTGACCGG	386.3 kb
382	08476-L10765	DGCR8	NM_022720.6; 2993-2994, region A-B	GACTCAGCGACT-GCACCAGTGGCA	

± This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA.

Note: Exon numbering is according to the genbank mRNA reference sequences (NM_) and may be different compared to literature! Complete probe sequences are available on request: info@mlpa.com. Please notify us of any mistakes: info@mlpa.com.

SALSA MLPA probemix P311-A2 CHD sample picture

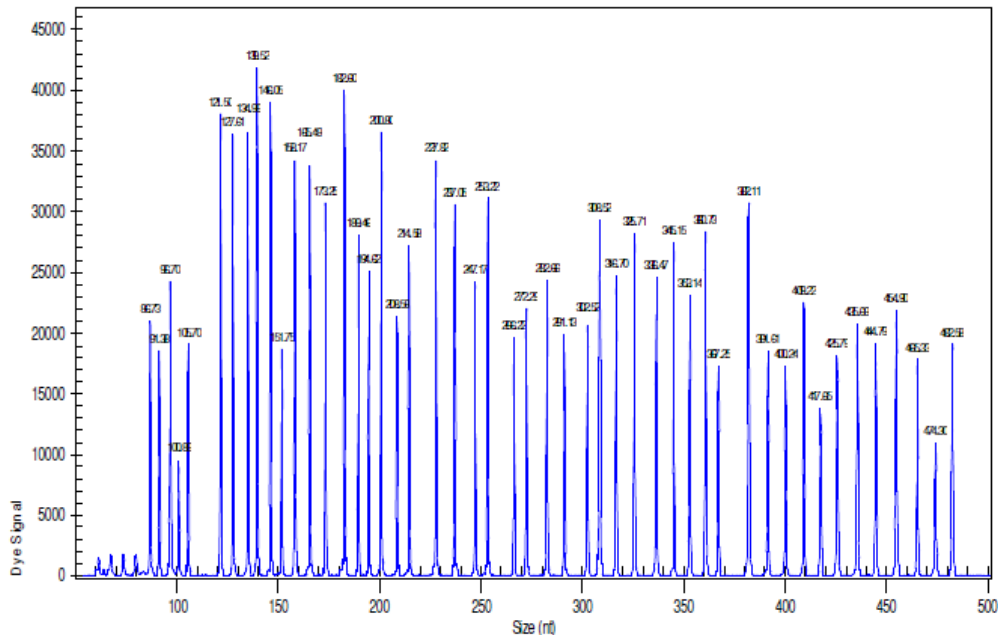


Figure 1. Capillary electrophoresis pattern of a sample of approximately 50 ng human male control DNA analysed with SALSA® MLPA® probemix P311-A2 CHD (lot A2-0312).

Implemented Changes – compared to the previous product description version

Version 06 (48)- 07 August 2015

- Electropherogram picture(s) using the old MLPA buffer (replaced in December 2012) removed.

Version 05 (48)

- Electropherogram pictures using the new MLPA buffer (introduced in December 2012) added.

Version 04 (48)

- Product description adapted to a new lot (lot number added, small changes in Table 1 and Table 2, new picture included).

Version 03 (48)

- Various minor textual changes on page 1.
- Remark on RefSeqGene standard and transcript variant added below Table 2.
- The text "Many copy number alterations in healthy individuals are described in..." added to page 2.

Version 02 (46)

- More details added to disease description.
- New reference added on page 2.
- Partial sequence of 148 nt probe 08309-L08282 corrected in Table 2.
- Warnings added in Table 1 and 2: 124 nt probe 04235-L08770, 208 nt probe 05464-L10114, 465 nt probe 05463-L05808.
- Ligation sites of the probes targeting the NKX2-5 and CRELD1 genes updated according to new version of the NM_reference sequence.
- Ligation sites added to probes targeting the 22q11 region.
- Small changes of probe lengths in Table 1 and 2 in order to better reflect the true lengths of the amplification products.
- Data analysis method has been modified.
- Various minor textual changes on page 1.
- Various minor layout changes.

EK-4: Çocuk ve Ebeveyn Onam Formları

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ÇOCUK RIZA FORMU

Sevgili Kardeşim,

Benim adım Koray Boduroğlu. Konjenital Kalp Hastalıklarında bir araştırma yapıyoruz. Bu çalışma ile Konjenital Kalp Hastalıklarına neden olan genetik faktörleri araştırmayı hedefledik. Amacımız bu grup hastalığa doğru tanı koymak ve ileride daha etkin tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkıda bulunabilmektir. Bu araştırma ile yeni bilgiler öğreneceğiz. Bu araştırmaya katılmayı öneriyoruz.

Araştırmayı ben, Koray Boduroğlu ve başka bazı doktorlarla birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursan senden kan alacağız. Kan alırken canın biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir.

Bu araştırmanın sonuçları senin gibi Konjenital Kalp Hastalığı olan çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, sonuçları bildireceğiz, ama senin adını söylemeyeceğiz.

Bu araştırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce anne ve baban ile konuşup onlara danışmalısın. Onlara da bu araştırmadan bahsedip onaylarını ve izinlerini alacağız. Anne ve baban tamam deseler bile sen kabul etmeyebilirsin. Bu araştırmaya katılmak senin isteğine bağlı ve istemezsen katılmazsın. Bu nedenle hiç kimse sana kızmaz ya da küsmez. Önce katılmayı kabul etsen bile sonradan vazgeçebilirsiniz. Bu tamamen sana bağlı. Kabul etmediğin durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde sana önceden olduğu gibi iyi davranırlar. Önceye göre farklılık olmaz.

Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğin zaman bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim bu kağıtta yazıyor. Bu araştırmayı kabul ediyorsan aşağıya lütfen adını ve soyadını yaz ve imzanı at. İmzaladıktan sonra sana ve ailene bu formun bir kopyası verilecektir.

Çocuğun adı ve soyadı:

Tarih:

Çocuğun imzası:

Velisinin adı ve soyadı:

Tarih:

Velisinin imzası:

Araştırmacının adı ve soyadı:

Tarih:

Araştırmacının imzası:

Araştırmacının adresi: Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi

Çocuk Genetik Ünitesi, Sıhhiye, Ankara, Türkiye

Telefon: 0312 3051173

0532 5096726

GENETİK ARAŞTIRMALARDA AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU (EBEVEYNLER İÇİN)

(Hekimin Açıklaması)

Sayın.....

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Pediatrik Temel Bilimler Ana Bilim Dalı, Çocuk Genetik Ünitesi Bilim Dalı'nda "Konjenital Kalp Hastalıklarında MLPA kullanılarak gen kopya sayısı varyasyonlarının analiz edilmesi." isimli bir araştırma yapmaktayız. Konjenital Kalp Hastalıkları (KKH); doğumsal defektler arasında yüksek mortalite ve morbidite nedenlerindedir, insidansı yaklaşık %2-%3'tür. Klinik önemine rağmen KKH'nın genetik patogenezi hakkında bilgimiz azdır. Bu çalışma ile Konjenital Kalp Hastalıklarına neden olan genetik faktörleri araştırmayı hedefledik. Amacımız bu grup hastalığa doğru tanı koymak ve ileride daha etkin tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkıda bulunabilmektir. Bu tip bir çalışma için az miktarda kan veya tükürük örneği yeterli olmaktadır. Konjenital Kalp Hastalığı bulunması nedeni ile eğer kabul ederseniz çocuğunuzu araştırmaya katmak istiyoruz.

Bu araştırmanın sonuçları yalnızca bilimsel amaçlarla kullanılacak ve kimliğiniz her zaman gizli tutulacaktır. Bu araştırmaya katılmanızdan dolayı sizden herhangi bir para talep edilmeyecektir. Aynı şekilde size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır. Toplanan kanlar öncelikle yurt içi, çok gerekli olduğu zaman yurtdışında bir laboratuvarında tetkik edilecektir.

Araştırmaya katılmak isterseniz Prof.Dr. Koray Boduroğlu tarafından çocuğunuz değerlendirilecektir. Genetik analiz için çocuğunuzun kolundan 1 tüp (10ml) kan alınacaktır. Bazen ikinci bir tüp kan daha almak veya cilt biyopsisi yapmak gerekli olabilir. Ayrıca bazı durumlarda yanak içinden sürüntü ya da tükürük örneğinden de yararlanabiliriz. Toplanan kanda yeterli genetik materyal elde edilemediği durumda ya da farklı bir metodla çalışılma gerekliliğinde toplanan kandan/dokudan hücre çoğaltması yoluna gidilebilir. Bu işlem "hücre kültürü" olarak adlandırılır ve bu yolla hücreleriniz ölümsüz olarak çoğaltılabilir. Kan alınırken iğne batması nedeniyle çocuğunuz hafif bir acı duyabilir. Çok düşük bir ihtimal olsa da kan alırken kanamanın uzaması ya da enfeksiyon gelişmesi riskleri olabilir. Yanak içinden sürüntü alınması halinde düşük bir ihtimalle de olsa sürüntü yerinde enfeksiyon görülebilir.

Kişiye ait genetik bilgiler maddi ve sosyal açıdan istismar edilebilecek bilgilerdir. Örneğin genetik testte biyolojik anne ve babayı belirlemek mümkündür. O nedenle, araştırma sonuçlarının yalnızca bilimsel amaçlarla ve kimliğinizi gizli tutarak kullanılacağını tekrar vurgulamak istiyoruz.

Bu risklere ek olarak çocuğunuzun örneğinde tüm genom bilgilerinizin elde edileceği geniş ölçekli bir analiz yapılması da gerekli olabilir. Bu analiz sonucunda çocuğunuzun başka hastalıklar için taşıyıcı olduğu ya da ileride bu tarz hastalıkları geliştirebileceği bilgisi edinilebilir. Buna ek olarak bazı hastalıklara yatkınlık yaratan genom değişikliklerini de taşıdığı saptanabilir. Bu bilgilerin büyük bir kısmı henüz klinik önemi ispatlanmamış araştırma düzeyinde olan bilgilerdir. Bu nedenle çalışmada klinik önemi olduğu kesinlik kazanmış olan bilgileri herhangi bir ücret talep etmeksizin size iletebiliriz. Diğer bilgiler kimlik bilgileriniz ile ilişkilendirilmeden veri bankalarına eklenerek araştırmacıların kullanımına açılabilir.

Çocuğunuzdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımını ancak sizin iznimize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar saklanabilir ve başka genetik araştırmalarda örneğin kontrol örneği olarak kullanılabilir. Lütfen yazılı formun altındaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyerek bu konudaki görüşünüzü belirtiniz.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir. Sizinle ilgili tıbbi bilgiler kimlik belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçlar dışında kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Araştırmaya katılmak zorunda olmadığınız gibi araştırmaya katılmayı kabul ettiğinizde, istediğiniz anda ayrılma hakkına da sahipsiniz. Ancak bu kararınızı bize önceden bildirirseniz araştırmanın bozulmasına meydan vermemiş olursunuz. Katılmak istemediğinizde şu anda sürdürülen tedavi işlemleri bundan etkilenmeyecektir.

Katılımcının Beyanı

Prof.Dr. Koray Boduroğlu tarafından yürütülecek olan "Konjenital Kalp Hastalıklarında MLPA kullanılarak gen kopya sayısı varyasyonlarının analiz edilmesi." isimli bir araştırma hakkında bana bilgi verildi. Araştırmanın amacı, uygulama biçimi ile riskleri ve tıbbi bilgilerimle ilgili gizliliğin sağlanacağı konusunda yeterli açıklama yapıldı. Araştırma ile ilgili sorularım için Prof.Dr. Koray Boduroğlu ile temas edebileceğim (0532 5096726) bana bildirildi. İstedğim zaman araştırmadan çekilebileceğimi biliyorum. Araştırmaya katılımımın tamamen gönüllü olduğu, katılmam ya da katılıp daha sonra araştırmadan çekildiğim durumda tedavi ve tetkiklerimin bundan etkilenmeyeceği belirtildi. Bu araştırmaya kendi gönüllü onayım ile çocuğumun katılmasına olurum vardır.

Veli/Vasi: Adı Soyadı Doğum Tarihi Adres/Tel İmza

Tanık: Adı Soyadı Doğum Tarihi Adres/Tel İmza

Hekim: Adı Soyadı Doğum Tarihi Adres/Tel İmza

Görüşme tarih ve saati:

Bu çalışmada elde edilecek çocuğumla ilgili bilgileri,

Öğrenmek istiyorum () Öğrenmek istemiyorum ()

Çocuğumdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

Çocuğumdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer

Çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

ocuğumdan alınan kodlanmış örneğin gelecekte her türlü genetik çalışmada (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış rnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırıcı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırıcı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.



