

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**GOLDENHAR SENDROMU ÖN TANILI  
OLGULARDA GENOMİK DEĞİŞİKLİKLERİN  
İNCELENMESİ**

**DR. SEDA ÇAKMAKLI**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2016**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**GOLDENHAR SENDROMU ÖN TANILI  
OLGULARDA GENOMİK DEĞİŞİKLİKLERİN  
İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. SEDA ÇAKMAKLI**

**TEZ DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. TUFAN ÇANKAYA**

# İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
KISALTMALAR .....	v
TEŞEKKÜR .....	ix
ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Goldenhar sendromu tanım ve tarihçe.....	4
2.2. Epidemiyoloji .....	4
2.3. Embriyoloji.....	5
2.4. Goldenhar sendromunda etiyoloji .....	6
2.5. Goldenhar sendromunda görülen klinik bulgular .....	8
2.5.1. Major klinik özellikler .....	9
2.5.1.1. <i>Yüz bulguları</i> .....	9
2.5.1.2. <i>Göz bulguları</i> .....	9
2.5.1.3. <i>Kulak bulguları</i> .....	9
2.5.1.4. <i>Vertebra bulguları</i> .....	9
2.5.2. Diğer klinik bulgular .....	9
2.6. Goldenhar sendromunda genetik .....	11
2.7. OTX2 geni yapısı .....	18
2.8. OTX2 geni fonksiyonu .....	19
2.9. OTX2 geniyle ilişkili fenotipler .....	20
2.10. Goldenhar sendromunda ayırıcı tanı .....	23
2.10.2. Bixler sendromu .....	24
2.10.3. Brankioto renal sendrom .....	24
2.10.4. CHARGE sendromu .....	24
2.10.5. Mandibulofasyal dizostoz (mikrosefaliyle birlikte) .....	24
2.10.6. Miller sendromu (postaksiyal akrofasial dizostoz).....	25
2.10.7. Nager sendromu (preaksiyel akrofasial dizostoz).....	25
2.10.8. Okuloaurikulofrontonazal sendrom.....	25

2.10.9. Townes-Brocks sendromu .....	25
2.10.10. Treacher Collins sendromu.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	27
3.1.Hastaların Seçimi .....	27
3.2. Moleküler Genetik Çalışma.....	28
3.2.1. Dizi analizi .....	28
3.2.1.1. Hasta Periferik Kan Örneklerinin Alınması .....	28
3.2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	29
3.2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
3.2.1.4. Periferik Kandan DNA İzolasyonu .....	30
3.2.1.5. Spektrofotometre ile DNA Miktar ve Saflığının Belirlenmesi.....	31
3.2.1.6. OTX2 Geninin Amplifikasyonu .....	32
3.2.1.6.1. Primerlerin Sulandırılması .....	32
3.2.1.6.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması ve PCR koşulları .....	33
3.2.1.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile Amplikonların Kontrolü .....	33
3.2.1.6.3.1. Jelin Hazırlanışı ve Elektroforez Aşaması .....	34
3.2.1.6.4. PCR Ürünlerinin Enzimatik Yöntem ile Saflaştırılması .....	34
3.2.1.6.5. İkinci PCR Reaksiyonu .....	35
3.2.1.6.6. İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	36
3.2.1.6.7. PCR Örneklerin Kapiller Elektroforez Cihazına Yüklenmesi .....	36
3.2.1.6.8. Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	37
3.2.2. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).....	37
4. BULGULAR.....	40
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri .....	40
4.2. Hastaların Prenatal, Perinatal ve Soygeçmiş Özellikleri .....	40
4.3. Hastaların Klinik Bulguları .....	41
4.4. Hastalara uygulanan genetik testler.....	49
5. TARTIŞMA .....	50
6. SONUÇ .....	63
7. KAYNAKLAR.....	65
8. EKLER .....	72

## TABLO LİSTESİ

**Tablo 1.** Goldenhar sendromunda gözlenen klinik bulgular

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan kitler, içerdikleri kimyasal maddeler ve markaları

**Tablo 4.** OTX2 geni primer dizileri

**Tablo 5.** HelixAmp™ Ready-2X Multiplex version 2.0 PCR mix kiti tepkime koşulları

**Tablo 6.** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar ve markaları

**Tablo 7.** OTX2 geni amplifiye edilen bölümleri ve fragment uzunlukları

**Tablo 8.** Birinci saflaştırma aşaması tepkime koşulları

**Tablo 9.** İkinci PCR tepkime koşulları

**Tablo 10.** MLPA reaksiyonu için PCR programı

**Tablo 11.** Ligaz 65 master miks içeriği

**Tablo 12.** Polimeraz master miks içeriği

**Tablo 13.** MLPA PCR programı

**Tablo 14.** Hastaların demografik özellikleri ve klinik bulguları

**Tablo 15.** Anoftalmi/mikroftalmi bulgusu olan hastalar

## **ŞEKİL LİSTESİ**

**Őekil 1.** Goldenhar sendromunun űlkelere göre grűlme sıklığı

**Őekil 2.** OTX2 proteininin űematik gösterimi



## **KISALTMALAR**

<b>ABCB6</b>	: ATP-Binding Cassette, Subfamily B, Member 6
<b>ALDH1A3</b>	: Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member A3
<b>AP5M1</b>	: Adaptor-Related Protein Complex 5, Mu-1 Subunit
<b>array-CGH</b>	: Array- Comparative Genomic Hybridization
<b>ATOH7</b>	: Atonal, Drosophila, Homolog Of, 7
<b>ATP13A3</b>	: ATPase, Type 13A3
<b>BAPX1</b>	: Bagpipe Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 1
<b>BIRC1</b>	: Baculoviral Iap Repeat-Containing Protein 1
<b>BMP4</b>	: Bone Morphogenetic Protein 4
<b>BMP5</b>	: Bone Morphogenetic Protein 5
<b>BMP7</b>	: Bone Morphogenetic Protein 7
<b>BOR</b>	: Branchiootorenal Syndrome
<b>BOS</b>	: Brankio otik sendrom
<b>BOS3</b>	: Brankio otik sendrom 3
<b>C12orf57</b>	: Chromosome 12 open reading frame 57
<b>C14orf105</b>	: Chromosome 14 open reading frame 105
<b>C14orf37</b>	: Chromosome 14 open reading frame 37
<b>CHD7</b>	: Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 7
<b>CHX10</b>	: CEH10 Homeodomain-Containing Homolog
<b>Crkl</b>	: V-CRK Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog-Like
<b>CRX</b>	: Cone-rod homeobox
<b>DHODH</b>	: Dihydroorotate Dehydrogenase
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleosid trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit

<b>EFTUD2</b>	: Elongation Factor Tu GTP-Binding Domain-Containing 2
<b>EUROCAT</b>	: European Concerted Action on Congenital Anomalies and Twins
<b>EXOC5</b>	: Exocyst Complex Component 5
<b>EYA1</b>	: Eyes Absent, Drosophila, Homolog Of, 1
<b>FISH</b>	: Floresan in situ hibridizasyon
<b>FOXE3</b>	: Forkhead Box E3
<b>GDF3</b>	: Growth/Differentiation Factor 3
<b>GDF6</b>	: Growth/Differentiation Factor 6
<b>GDF6</b>	: Growth/Differentiation Factor 6
<b>GNAI3</b> Polypeptide 3	: Guanine Nucleotide-Binding Protein, Alpha-Inhibiting Activity
<b>GSC</b>	: Goosecoid Homeobox
<b>GSC2</b>	: Goosecoid Homeobox 2
<b>HESX1</b>	: Homeobox Gene Expressed In ES Cells
<b>Hfm</b>	: Hemifacial microsomia-associated locus
<b>HOXA2</b>	: Homeobox A2
<b>IRBP</b>	: İnterstitial Retinoid-Binding Protein
<b>IVF</b>	: İn vitro fertilizasyon
<b>Kb</b>	: Kilo baz
<b>MAC</b>	: Mikroftalmi-Anoftalmi-Kolobom
<b>MAF</b> Homolog	: V-MAF Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene
<b>MAX</b>	: MAX protein
<b>Mb</b>	: Mega baz
<b>MLPA</b>	: Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>MYT1</b>	: Myelin transkripsiyon faktör 1
<b>NAA30</b>	: N (alpha)-acetyltransferase 30



<b>NF1</b>	: Nörofibromatozis 1
<b>OCLN</b>	: Occludin
<b>OMIM</b>	: Online Mendelian Inheritance in Man
<b>OTX1</b>	: Orthodenticle, Drosophila, Homolog Of, 1
<b>OTX2</b>	: Orthodenticle, Drosophila, Homolog Of, 2
<b>OTX2OS1</b>	: Orthodenticle Homeobox 2 Opposite Strand 1
<b>OTX2P1</b>	: Orthodenticle homeobox 2 pseudogene 1
<b>PAX6</b>	: Paired Box Gene 6
<b>PCR</b>	: Polimeraz chain reaction
<b>PLCB4</b>	: Phospholipase C, Beta-4
<b>POLR1C</b>	: Polymerase I, RNA, Subunit C
<b>POLR1D</b>	: Polymerase I, RNA, Subunit D
<b>POU1F1</b>	: POU Domain, Class 1, Transcription Factor 1
<b>PRRX1</b>	: Paired-Related Homeobox Gene 1
<b>RARB</b>	: Retinoic Acid Receptor, Beta
<b>RAX</b>	: Retina And Anterior Neural Fold Homeobox Gene
<b>RAX</b>	: Retina And Anterior Neural Fold Homeobox Gene
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>SALL1</b>	: Sal-Like 1
<b>SDHA</b>	: Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit a, Flavoprotein
<b>SIX1</b>	: Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 1
<b>SIX5</b>	: Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 5
<b>SIX5</b>	: Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 5
<b>SIX6</b>	: Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 6
<b>SLC35F4</b>	: Solute carrier family 35 member F4
<b>SMOC1</b>	: SPARC-Related Modular Calcium-Binding 1
<b>SNP array</b>	: Single nucleotide polymorphism array

<b>SOX2</b>	: SRY-Box 2
<b>STRA6</b>	: Stimulated By Retinoic Acid 6
<b>TBX1</b>	: T-Box 1
<b>TCOF1</b>	: treacle ribosome biogenesis factor 1
<b>TENM3</b>	: Teneurin Transmembrane Protein 3
<b>TORCH infections</b>	: Toxoplasmosis, Other, Rubella, Cytomegalovirus and Herpes
<b>VAX1</b>	: Ventral Anterior Homeobox 1
<b>VSX2</b>	: Visual System Homeobox 2
<b>VUR</b>	: Vezikoureteral reflü
<b>WNT5B</b>	: Wingless-type MMTV integration site family, member 5b
<b>XXYLT1</b>	: Xyloside Xylosyltransferase 1
<b>ZIC3</b>	: Zinc Finger Proten Of Cerebellum 3

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin ve tezimin her aşamasında yardımını esirgemeyen, akademik ve bilimsel aŐıdan yetiŐmemde büyük emeği ve katkısı olan tez danışmanım DoÇ. Dr. Tufan ankaya' ya sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince sağladıkları her türlü katkıları için anabilim dalımızın çok değerli hocaları; Prof. Dr. M. Derya ErŐal'a, Prof. Dr. Ayfer Ülgenalp'e, Prof. Dr. Özlem Giray Bozkaya'ya ve DoÇ. Dr. ElŐin Bora'ya,

Tezimde yer alan hasta bilgilerinin oluşturulması sırasındaki desteklerinden dolayı Dr. BehŐet Uz ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve AraŐtırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Bilim Dalı'ndan Dr. Filiz Hazan' a,

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanması aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Uzm. Dr. Esra Ataman'a ve Uzm. Dr. Semra Gürsoy'a,

Bu süreçte yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarımlın hepsine,

Ayrıca, hayatımın her aşamasında sevgi, emek ve desteklerini benden bir an olsun eksik etmeyen aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Seda akmaklı

İzmir, 2016

## **ÖZET**

### **GOLDENHAR SENDROMU ÖN TANILI OLGULARDA GENOMİK DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

Dr. Seda Çakmaklı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, İZMİR

Goldenhar sendromu birinci ve ikinci faringeal arklardan köken alan kulak, ağız ve mandibula gibi yapıların malformasyonlarını kapsamaktadır. Goldenhar sendromunda gözlenen fenotipik özelliklerin spektrumu kulak önünde deri çıkıntısıyla (skin tag) birlikte hafif fasiyal asimetriden kompleks fenotipe kadar değişkenlik gösterir. Asimetrik kulak anomalileri, işitme kaybı, hemifasiyal mikrozomi, orofasiyal kleft, oküler defektler ve vertebra anomalileri Goldenhar sendromunda gözlenebilen bulgular arasındadır. Klinik bulgular heterojen olup hastalar arasında farklılık göstermektedir. Goldenhar sendromunun etiyojisi tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

Sendromun etiyojisinde suçlanan genlerden biri olan OTX2 (Orthodenticle, Drosophila, Homolog Of, 2) geni dizi analizi ve delesyon/duplikasyon analizi moleküler genetik laboratuvarımızda rutin olarak uygulanmaktadır. Goldenhar sendromun etiyojisinde rol oynayan faktörleri açıklayabilmek amacıyla son on yıl içinde bölümümüzde değerlendirilen hastaların dosyalarındaki klinik ve laboratuvar bulguları retrospektif olarak incelendi. Kayıtların incelenmesi sonucunda Goldenhar sendromu klinik bulgularını karşılayan yirmi yedi hasta araştırmaya dahil edildi. Yapılan dosya taramasında hastalarımızda OTX2 geninde mutasyon veya delesyon/duplikasyon saptanmadı.

**Anahtar kelimeler:** Goldenhar sendromu, OTX2, hemifasiyal mikrozomi, dizi analizi, anomali

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF GENOMIC CHANGES IN CASES INITIALLY DIAGNOSED AS GOLDENHAR SYNDROME**

Dr. Seda akmaklı

Dokuz Eylöl University, Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, IZMİR

Goldenhar syndrome includes malformations of structures like ear, mouth and mandibula derived from the first and second pharyngeal arches. The spectrum of phenotypic features observed in Goldenhar syndrome varies from preauricular skin tag with mild facial asymmetry to complex phenotype. Asymmetric ear anomalies, hearing loss, hemifacial microsomia, orofacial cleft, ocular defects and vertebra anomalies are among the observable findings in Goldenhar syndrome. Clinical findings are heterogeneous and vary between patients. The etiology of Goldenhar syndrome is not fully understood.

Sequence analysis and deletion/duplication analysis of OTX2 (Orthodenticle, Drosophila, Homolog Of, 2) gene which is one of the genes accused in etiology of the syndrome, are routinely applied in our molecular genetics laboratory. In order to be able to explain the factors that play a role in the etiology of Goldenhar syndrome, clinical and laboratory findings in the files of patients who were evaluated in our department within the last ten years, were examined retrospectively. Twenty-seven patients who met clinical findings of Goldenhar syndrome were included in the research. During the file scan, mutation or deletion/duplication of OTX2 gene was not detected in any patient.

**Key words:** Goldenhar syndrome, OTX2, hemifacial microsomia, sequence analysis, anomaly

## **1. GİRİŞ VE AMAC**

Goldenhar sendromu birinci ve ikinci faringeal arklardan köken alan kulak, ağız ve mandibula gibi yapıların malformasyonlarını kapsamaktadır. Asimetrik kulak anomalileri, işitme kaybı, hemifasiyal mikrozomi sonucunda yüzde asimetri, orofasiyal kleft, oküler defektler ve vertebra anomalileri Goldenhar sendromunda gözlenebilen bulgular arasındadır (1).

Goldenhar sendromunun görülme sıklığının 1/5600-1/20.000 doğum olduğu bildirilmiştir (2). Klinik bulgular heterojen olup hastalar birbirinden çok farklı bulgularla başvurabilmektedir. Tanı için minimum kriterin mikrotia, tipik fenotipin ise 'mikrotia, fasiyal asimetri ve epibulbar dermoid/ lipodermoid' olarak kabul edilmesi gerektiğini öne süren araştırmacılar bulunmaktadır. Ancak değişken ekspressiviteye bağlı olarak minimum tanı kriteri için fikir birliği bulunmamaktadır (1).

Goldenhar sendromlu olguların çoğu sporadik olmakla birlikte literatürdeki genetik yatkınlığa dair kanıtlar artmaya devam etmektedir (1). 7, 8, 9, 10p, 22. kromozomların trizomileri, 1p22.2-p31.1, 5p14, 12p13.33, 18p, 22q11.2, 22qter delesyonları gibi farklı kromozom anomalileri Goldenhar sendromuyla ilişkili bulunmuştur (3). Goldenhar sendromu klinik bulgularını taşıyan beş bireyin bulunduğu bir ailede OTX2 geninin fenotipten sorumlu en olası gen olduğu sonucuna varılmıştır (4). Goldenhar sendromlu klinik tanılı, otozomal dominant kalıtımın gözlendiği başka bir ailede yapılan genetik incelemeler sonucunda OTX2 geninin Goldenhar sendromu için iyi bir aday gen olabileceği sonucuna varılmıştır (5).

Bu araştırmada Goldenhar sendromuyla uyumlu bulguları olan yirmi yedi hastanın klinik bulguları ile bölümümüzde rutin çalışılmakta olan OTX2 geni dizi analizi ve MLPA analizi sonuçları değerlendirilerek OTX2 geninin Goldenhar sendromuyla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Goldenhar sendromu tanım ve tarihçe**

1952’ de Goldenhar tarafından epibulbar dermoid, preauriküler tag, mandibulada asimetri ve servikal vertebra anomalileri olan bir grup hasta tanımlandı ve bahsedilen anomalilere ‘Goldenhar sendromu’ adı verildi (6).

1963’ te Gorlin ve ark, epibulbar dermoid ve/veya lipodermoid, auriküler eklenti, auriküler fistül ve vertebra anomalileri ile karakterize olan sendromu tanımlamak için ‘oculo-auriculo-vertebral displazi’ teriminin kullanılmasını önerdiler (7).

Goldenhar sendromu ve ‘oculo-auriculo-vertebral displazi’ tanımlarını oluşturan fenotipik bulguların birbiriyle çok fazla örtüşmesinden dolayı bu tanımların ‘oculoaurikulovertebral spektrum’ terimi altında birleştirilebileceği öne sürüldü (8).

Sendromu tanımlamak için pek çok farklı terimin kullanılması, tanımlanan anomalilerin geniş bir spektrumda yer aldığına göstergesi olarak kabul edilebilir. Bugüne kadar hemifasiyal mikrozomi, oculo-auriculo-vertebral displazi, facio-auriculo-vertebral displazi, Goldenhar sendromu, Goldenhar-Gorlin sendromu, birinci arkus sendromu, birinci ve ikinci brankial arkus sendromu, lateral fasyal displazi, unilateral kraniofasyal mikrozomi, otomandibular dizostoz, unilateral mandibulofasyal dizostoz, unilateral intrauterin fasyal nekroz, auriculo-branchiogenic displazi ve fasyo-aurikulo-vertebral malformasyon kompleksi gibi isimlerdirmeler kullanılmıştır (2).

### **2.2. Epidemiyoloji**

Goldenhar sendromunun görülme sıklığının 1/5600-1/20.000 doğum olduğu bildirilmiştir. Poswillo, Goldenhar sendromu sıklığının 3500 doğumda bir olduğunu öne sürmüştü de bu varsayımı destekleyen bir veri bulunmamaktadır (2).

Avrupa’ daki konjenital anomali kayıtlarından oluşan büyük bir veri ağı olan EUROCAT (European Concerted Action on Congenital Anomalies and Twins) verilerine göre oculo-auriculo-vertebral spektrum, mikrotia/kulak anomalileri ve en az bir majör anomalinin birlikte bulunması olarak tanımlanmış ve prevalansı 3.8/100.000 doğum olarak bulunmuştur (9).

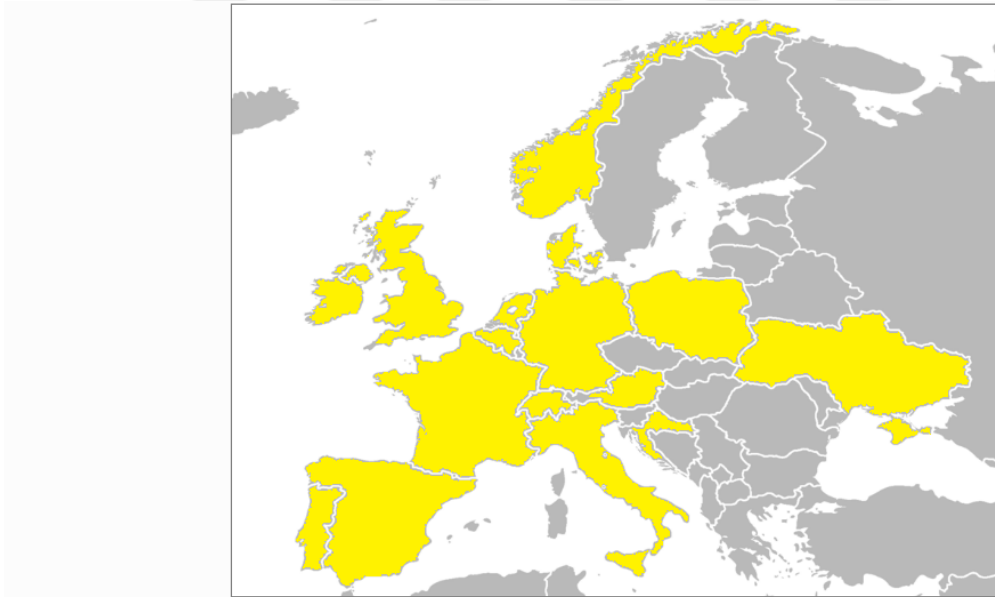
İranlı Körfez Savaşı gazilerinin çocuklarında Goldenhar sendromu sıklığının değerlendirildiği bir çalışmada Körfez savaşı sonrasında doğan 75.414 infanttan yedi tanesi Goldenhar sendromu tanı kriterlerini karşılamaktaydı. Körfez Savaşı gazilerinin çocuklarında

prevalans 100.000 canlı doğumda 14.7 bulunurken, savaşa katılmayanların çocuklarında 4.8/100.000 canlı doğum olarak bulunmuştur. Ancak araştırmacılar etkilenen vaka sayısının azlığı ve yapılan istatistiksel analizde güven aralığının geniş olması nedeniyle sonuçların dikkatle yorumlanması gerektiğini, şans faktörünün göz ardı edilemeyebileceğini ifade etmişlerdir (10).

Morrison ve ark. Kuzey İrlanda’ da Goldenhar sendromu prevalansının en az 1/45.000 olarak öngörmüştür (11).

Erkek/kadın görülme sıklığı oranı 3/2’ dir. Sağ kulak tutulumunun sola göre oranı da 3/2 ‘ dir (2).

**Şekil 1.** Goldenhar sendromunun ülkelere göre görülme sıklığı. Sarı renk ile boyanmış olan ülkelerde Goldenhar sendromu prevalansı 3.8/100.000 doğum olarak bildirilmiştir (9).



### 2.3. Embriyoloji

Kraniofasial yapıların gelişimi embriyonik ve fetal dönem boyunca düzenli bir şekilde ilerleyen kompleks bir işlemdir. Mezoderm ve kranial nöral krest hücrelerinin kompleks bir sinyal yolağı aracılığıyla kompozisyonuna bağlı olarak kranial büyüme gerçekleşir. Birinci ve ikinci brankial ark sendromları, bu arkusları oluşturan yapıların hipoplazisi ve aplazisiyle karakterizedir. Üç primer germ tabakası ektoderm, mezoderm ve endoderm, embriyonik trilaminer germ diskini ve bütün doku ve organların oluşumunun temelini oluşturur. Kranial uçtaki prekordal plak ve kaudal uçtaki kloakal plak germ diskinin embriyonik kutuplarıdır.



Prekordal plak, ie batan orofaringeal membran tarafından oluşturulur. Stomodeum yüzün oluşumdaki anahtar olay olan santral okme sonucu oluşur. Frontal çıkıntı stomodeumun yukarisında post ovulatuvar dördüncü haftada gelişir, yüzün st dudak ve alın arasındaki kısımlarının oluşumuna öncülük eder. Maksiller ve nazal kabartılar frontal çıkıntının altından gelişir. Nazofrontal çıkıntının oluşumuyla eř zamanlı olarak altı adet mezodermal arkus oluşur. Mezodermal arkuslar dıştan brankial yarık, iten faringeal poşlarla birbirinden ayrılır. Faringeal arkus, yarık ve poş gelişimi balıklardaki solungaç gelişimine benzese de insan embryosunda gerçek solungaç (brankia) hiçbir zaman oluşmaz. İnsan embryosu için faringeal terimi önerilse de brankial daha sık kullanılan bir terimdir (12).

Birinci brankial arkustan gelişen yapılar maksilla, mandibula, staki borusu, dış kulak kanalı, orta kulağın bir kısmıdır. Altıncı ve yedinci haftalarda bu gelişim süreci tamamlanır. Altı ile sekizinci haftalar arasında ağızdaki endodermden parotis bezi oluşur ve kulağın arkasına doğru dallanır. Aynı anda fasial sinir ve kas öne doğru göç eder. Parotis bezi ve fasial sinir embryolojik olarak daha geç dönemde geliştiğiyi için birinci brankial arkus anomalisi parotis bezi veya fasiyal sinirle değiyik derecelerde ilişkili olarak ortaya çıkabilir. İkinici brankial arkudan yüz kasları, stiloid çıkıntı, kulak kepçesi ve orta kulak yapılarının bir bölümü gelişir. Kulak kepçesi arkaya ve laterale g eder. Altıncı ve yedinci gestasyonel haftada bu gelişimsel süreç tamamlanır (13).

#### **2.4. Goldenhar sendromunda etiyoloji**

Goldenhar sendromunun etiyolojisi tam olarak anlaşılabilmeyi değildir. Ancak etiyopatogenezi açıklamaya yönelik pek çok hipotez ne sürülmüştür (14).

Goldenhar sendromunun ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörlerin etkisinin olduğu düşünülmektedir. Goldenhar sendromunda gözlenen anomaliler, birinci ve ikinci faringeal arklardan köken aldığı için sendromun etiyolojisinin bu yapılarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Embryonik gelişimin dördüncü haftasında gelişmeye başlayan ve mezenkimal hücrelerden oluşan faringeal arklar, kompleks sinyal yolağı aracılığıyla yüz, iskelet, kas ve nöral elementlerin oluşumuna katkıda bulunur. Faringeal arkudan köken alan dokuların farklılaşması dokuların sürekli ve karşılıklı etkileşimine bağlıdır. Kraniofasial gelişimin temel özelliklerinden biri kranial nöral krest hücrelerinin oluşumudur. Kranial nöral krest hücreleri kraniofasial yapıları oluşturmak üzere ventrolaterale g eder. Kranial nöral krest hücrelerinin spesifikasyon, migrasyon, proliferasyon, sağ kalım ve akıbetinin belirlenmesindeki bozukluklar Goldenhar sendromunda olası mekanizma olarak düşünülmüştür. Goldenhar sendromundaki fenotip ve defeklerin ağırlığı, yüz gelişimi

esnasında rol alan belli genlerin ekspresyonundaki bozulmaya bağlı olarak farklılık göstermektedir. Suçlanan risk faktörleri arasında annenin vazoaktif ilaç kullanması, ikinci trimesterde kanama, annede diabet, çoğul gebelik ve yardımcı üreme tekniklerinin kullanılması bulunmaktadır. Annenin birinci trimesterde retinoik asit kullanması nöral krest hücrelerinin anormal migrasyonu ile ilişkili mikrotia/anotia, mandibular hipoplazi, yarı damak ve kardiyak defektler (konotrunkal ve aortik ark) gibi malformasyonlara neden olabilmektedir. İmmünespresif bir ajan olan mikofenolat mofetilin gebelikte kullanımı ile de benzer malformasyonlar bildirilmiştir (15).

Gebelikte talidomid kullanımı ve sigara içimi de bildirilen risk faktörleri arasında bulunmaktadır (1).

Fetal dönemde primidona maruz kalan bir infantta Goldenhar sendromu, hemifasiyal mikrozomi, Fallot tetralojisi, aquaduktal stenoz ve anterior ensefalosel bildirilmiştir (16).

Goldenhar sendromlu 239 kişi ve 854 kontrolden oluşan bir epidemiyolojik çalışmada Goldenhar sendromlu bebeklerin doğum ağırlığının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, annenin vücut indeksi düştükçe bebekte Goldenhar sendromu görülme riskinin arttığı gösterilmiştir. Goldenhar sendromlu bebeklerin ailelerinin ortalama gelir düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (17).

En çok desteklenen hipotezlerden biri de intrauterin vasküler yetmezlik hipotezidir (18). Dördüncü gestasyonel haftada blastogenez aşamasında gelişen vasküler yetmezliğin Goldenhar sendromuna neden olduğu düşünülmektedir. Bu patogenetik mekanizmaya göre Goldenhar sendromu, birinci ve ikinci brankial arkların geliştiği bölgede azalmış kan akımı ve fokal hemorajiyle ilişkili olabilir. Bu yapılar nöroektodermal ve mezodermal hücreler tarafından oluşturulur. Nöroektodermal ve mezodermal hücreler iç ve dış kulak normal gelişiminden sorumlu olduğu kadar embryonik brankiosefalik damarların oluşumu için temel bir rehber görevi görür (19).

Jongbloet, aile öyküsü olmadan sporadik ortaya çıkan Goldenhar sendromunun olgunlaşmış ovumun fertilizasyonundan kaynaklandığını öne sürmüştür (20).

Witschi, 1952 yılında kurbağa yumurtalarında fertilizasyon öncesi yaşlanmanın teratojenik etkisini gösteren bir çalışma yapmıştır (21).

Ancak yine de ovumun fazla olgunlaşması olarak tanımlanan 'overripeness ovopathy' herhangi bir insan malformasyonunun nedeni olarak kanıtlanmak için zor bir hipotez olarak görünmektedir (22).

Goldenhar sendromu ve ikizlik birlikteliği ile ilgili yayınların çok sayıda olması üreme sistemi anomalileri, ikizlik ve Goldenhar sendromu arasındaki ilişkinin bir göstergesi olabilir.

Goldenhar sendromunda etiyoloji bilinmemekle birlikte oosit veya erken embriyonun epigenetik disregülasyonu ile ilişkili olabilir. Sporadik Goldenhar sendromlu yetmiş iki hastanın anne babasının fertilité ve gebelik sonuçlarına dair verilerin ve intrastoplazmik sperm enjeksiyonu yapılan 3372 fetus ve çocuğun prospektif izlem verilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, Goldenhar sendromlu olgularda yardımcı üreme tekniği kullanım sıklığı ve ikizlik sıklığı daha fazla bulundu. Yardımcı üreme tekniği kullanımı ve monozigotik ikizlik sıklığının Goldenhar sendromlu olgularda fazla bulunması Jongbloet tarafından öne sürülen 'overripeness ovopathy' kavramı ile uyumludur (23).

## **2.5. Goldenhar sendromunda görülen klinik bulgular**

Goldenhar sendromunda gözlenen fenotipik özelliklerin spektrumu kulak önünde deri çıkıntısıyla (skin tag) birlikte hafif fasiyal asimetriden, multipl konjenital anomalilerle karakterize kompleks fenotipe kadar değişkenlik gösterir. Asimetrik kulak anomalileri, işitme kaybı, hemifasiyal mikrozomi sonucunda yüzde asimetri, orofasiyal kleft, oküler defektler ve vertebra anomalileri Goldenhar sendromunda gözlenebilen bulgular arasındadır. Kardiyak, genitoüriner ve serebral malformasyonlar da bildirilmiştir. Klinik bulgular heterojen olup hastalar birbirinden çok farklı bulgularla başvurabilmektedir. Tanı için minimum kriterin mikrotia, tipik fenotipin ise 'mikrotia, fasiyal asimetri ve epibulbar dermoid/lipodermoid' olarak kabul edilmesi gerektiğini öne süren araştırmacılar bulunmaktadır. Ancak değişken ekspressiviteye bağlı olarak minimum tanı kriteri için fikir birliği bulunmamaktadır (1).

Tasse ve ark. izole mikrotia veya preauriküler skin tagle birlikte hemifasiyal mikrozomiyi minimum tanı kriteri olarak kabul etmiştir (24).

Beleza-Meireles ve ark. izole hemifasiyal mikrozomi ile birlikte aile hikayesinin bulunması durumunun tanı koydurucu olarak alınması gerektiğini öne sürmüşlerdir (1).

Aralarında monozigotik ikizin de bulunduğu Goldenhar sendromu klinik tanısı almış on yedi hastada en sık görülen bulgunun auriküler defektler (%94) olduğu tespit edilmiştir. %76' sında fasiyal, %65' inde oküler anomali izlenmektedir. Hastaların %70' inde tek taraflı etkilenme söz konusudur, etkilenme genellikle sağ taraflıdır. %90' ında mandibular hipoplazinin displastik kulakla aynı taraflı olduğu görülmüştür. İşitme kaybı en sık iletim tipinde olup, hastaların %76 sında gözlenmiştir. Fasiyal sinir paralizisi ve mental retardasyon da görülebilen bulgular arasındadır (25).

Stromland ve ark. tarafından incelenen 18 Goldenhar sendromlu hastada görülen malformasyonlar arasında kulak anomalisi (%100), gözlerde anomali (%72), vertebra anomalisi (%76), beyin anomalisi (%50) ve kalp defekti (%33) bulunmaktadır. İşitme kaybı

%83' ünde, görme kaybı %28' inde, beslenme güçlüğü %50' sinde, konuşma bozukluğu %53' ünde, mental retardasyon %39' unda görülmüştür (26).

### **2.5.1. Major klinik özellikler**

#### **2.5.1.1. Yüz bulguları**

Neredeyse bütün hastalarda maksiller veya mandibular hipoplazi sonucunda hemifasiyal mikrozomi bulunmaktadır. Fasiyal cleft veya yarık dudak/damak sık olmamakla birlikte gözlenen bulgulardandır. Makrostomi sık olarak görülür. Kraniofasiyal etkilenme genellikle tek taraflıdır, bilateral olduğunda ise asimetriktir. Sağ taraf daha sık olarak etkilenmektedir. Yüz felci, damak yüksekliğinde asimetri, ekstraoküler hareketlerde bozulma ve trigeminal anestezi de bildirilmiştir (1).

#### **2.5.1.2. Göz bulguları**

En sık görülen göz bulgusu epibulbar dermoiddir. Mikroftalmi veya diğer malformasyonlar nadir olmakla birlikte görülebilir. Üst göz kapağı kolobomu, lakrimal kanal atrezi/stenoza gözlenebilen bulgular arasındadır (1).

#### **2.5.1.3. Kulak bulguları**

Kulak kepçesinin konjenital küçüklüğü mikrotia olarak tanımlanırken kulak kepçesinin yokluğu ile birlikte kulak kanalının darlığı veya tamamen yokluğu anotia olarak adlandırılır. Mikrotia, anotia, aural atrezi, kulak displazisi, preauriküler tag ve pit/sinüs gibi dış kulak anomalileri Goldenhar sendromunda sık olarak görülmektedir. Etkilenen bireylerin çoğunda işitme kaybı (iletim tipi ve/veya sensörinöral) görülür, bu yüzden bütün hastalar işitme testinden geçirilmelidir (1).

#### **2.5.1.4. Vertebra bulguları**

Goldenhar sendromlularda omurga deformiteleri, omurga ve boyun hareketlerinde kısıtlılık veya tortikollis gözlenmesi vertebral anomali şüphesini akla getirmelidir (1).

Servikal vertebralarda malformasyon veya füzyon sık görülmektedir. Hemivertebra da sık olarak bildirilmektedir (15).

### **2.5.2. Diğer klinik bulgular**

Goldenhar sendromlu seksen yedi hastanın konjenital kalp hastalıkları sıklığı açısından incelendikleri bir çalışmada konjenital kalp hastalığının hastaların 28' inde (%32) saptandığı bildirilmiştir. En sık görülen konjenital kalp hastalığı membranöz veya musküler ventriküler

septal defekt (altı hastada) ve fallot tetralojisidir (altı hastada). Üç hastada atrial septal defekt, dört hastada pulmoner venöz dönüş anomalisi görülmüştür (27).

Sutphen ve ark. altmış Goldenhar sendromlu hastanın üçünde trakeoözafageal fistül (izole veya özafagus atrezisiyle birlikte) bulunduğunu bildirmişlerdir (28).

Goldenhar sendromlu iki yüz elli dokuz hastanın incelendiği bir çalışmada yirmi yedi hastada (%10.4) santral sinir sistemi anomalisi gözlenmiştir. Nöral tüp defekleri, hidrosefali, ventrikülomegali, korpus kallosum agenezisi, serebellum agenezi/hipoplazisi gözlenen anomaliler arasındadır. Kırk bir hastada (%15.8) genitoüriner anomali gözlenmiştir. En sık görülen renal anomaliler arasında unilateral renal agenezi, üreter anomalisi, konjenital hidronefroz ve renal hipoplazi/displazi bulunmaktadır (9).

Goldenhar sendromlu bireylerde fasiyal sinir değişen derecelerde etkilenebilir. Fasiyal sinirin tüm dalları tutulabileceği gibi sadece alt kısmındaki dallar da tutulabilir (29).

**Tablo 1.** Goldenhar sendromunda gözlenen klinik bulgular

<b>Major klinik bulgular</b>			
<b><i>Yüz bulguları</i></b>	<b><i>Göz bulguları</i></b>	<b><i>Kulak bulguları</i></b>	<b><i>Vertebra bulguları</i></b>
Maksiller/mandibular hipoplazi Hemifasiyal mikrozomi Fasial cleft Yarı dudak/damak Makrostomi Fasial sinir paralizisi	Epibulbar dermoid Mikroftalmi Üst göz kapağı kolobomu Lakrimal kanal atrezi/stenozu	Mikrotia Anotia Aural atrezi Kulak displazisi Preauriküler tag Preauriküler sinüs/pit İşitme kaybı	Tortikollis Servikal vertebrada malformasyon/füzyon Hemivertebra
<b>Diğer klinik bulgular</b>			
<b><i>Konjenital kalp hastalığı</i></b>	<b><i>Gastrointestinal anomaliler</i></b>	<b><i>Santral sinir sistemi anomalisi</i></b>	<b><i>Ürogenital anomaliler</i></b>
Ventriküler septal defekt Fallot tetralojisi Atrial septal defekt Pulmoner venöz dönüş anomalisi	Trakeaözafageal fistül Özafagus atrezisi	Nöral tüp defekti Hidrocefali Ventrikülomegali Korpus kallozum agenezisi Serebellum agenezi/hipoplazisi	Renal agenezi Üreter anomalisi Konjenital hidronefroz Renal hipoplazi/displazi

## 2.6. Goldenhar sendromunda genetik

Goldenhar sendromlu olguların çoğu sporadik olmakla birlikte literatürdeki genetik yatkınlığa dair kanıtlar artmaya devam etmektedir (1).

Ailesel olguların %2-10 unun otozomal dominant kalıtımla uyumlu olduğu gözlenmiştir (5).

Goldenhar sendromlu bir ailede ardışık üç jenerasyon boyunca etkilenen dokuz bireyin olması hastalığın otozomal dominant formda kalıtıldığını düşündürmüştür (30).

Kaye ve ark. Goldenhar sendromlu yetmiş dört bireyin ailelerini inceledikleri çalışmalarında, segregasyon analizinde hastalıktan etkilenmiş kabul edilmek için gereken

kriterleri belirledi. Kişiler kulak malformasyonları, mandibular anomali ve diğer kraniofasiyal anormallikler açısından muayene edildi. Çalışmanın sonucunda kanıtlar otozomal dominant kalıtım lehine olup, Goldenhar sendromunda genetik geçişin olmadığını öne süren hipotez reddedildi (31).

Tasse ve ark. bir anne ve iki kızında Goldenhar sendromu bulgularının görüldüğü, kalıtım şeklinin otozomal dominant olduğu bir aile tanımlamışlardır. Literatür değerlendirmesi ile otozomal dominant kalıtımın gözleendiği aile bireylerinde sporadik olgulara göre bilateral etkilenmenin daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır (32).

Nadiren otozomal resesif kalıtım bildirilen aileler de mevcuttur. Aralarında birinci derece akrabalık bulunan anne ve babanın kız çocuğunda yüzde asimetri, diyafragma hernisi, ensefalomeningosel, kulak önünde skin tag; erkek çocuğunda asimetric yüz ve anormal kulaklar tespit edilmiştir. İki kardeş farklı klinik bulgulara sahip olsalar da Goldenhar sendromu tanısını koymak için gereken minimum kriteri karşılamaktaydılar. Ailedeki kalıtım modelinin otozomal resesif kalıtımla uyumlu olduğu düşünülmüştür (33).

Genetik geçişin otozomal dominant kalıtımla uyumlu olduğu ailelerde linkaj analizi ve array-CGH (array-karşılaştırmalı genomik hibridizasyon) analiziyle aday lokusların tespit edilmesi patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır (5).

5p15.33-pter delesyonu ve WNT5B (Wingless-type MMTV integration site family, member 5b) genini içeren 12p13.33 delesyonu Goldenhar sendromu özellikleri taşıyan birkaç hastada gözlenmiştir. Otozomal dominant kalıtımın gözleendiği, Goldenhar sendromlu iki ailede kısmen örtüşen 14q23.1 mikroduplikasyonları tanımlanmıştır. Bu ailelerin birinde Goldenhar sendromu ve Branchio-oto-renal sendrom klinik bulguları gösteren iki kişinin birinci derece akraba oldukları gözlenmiştir. Bu sebepten 14q23.1 bölgesinin Goldenhar sendromu ile diğer birinci ve ikinci faringeal ark gelişim bozuklukları açısından aday genler içeriyor olabileceği düşünülmektedir.

22q anomalileri Goldenhar sendromlu hastalarda sıklıkla bildirilmiştir. Bunlar arasında 22qter delesyonu, 22q11.2 delesyonu, 22q11.1-q11.21 (cat-eye bölgesi) ve 22q11 bölgesinin duplike olduğu parsiyel trizomi 22 (47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11)) bulunmaktadır. Ayrıca karyotip analizinde mozaik trizomi 22 saptanan olgular da literatürde mevcuttur (1).

Goldenhar sendromlu beş hastanın bulunduğu üç nesillik ailede yapılan genetik çalışmalar sonucunda 15q26.2-q26.3 lokusunun suçlanabileceği öne sürülmüştür (34).

Rooryck ve ark. seksen altı hastadan oluşan bir kohortta uyguladıkları aCGH analizi ile dört delesyon ve sekiz duplikasyon olmak üzere on iki yeniden düzenlenme tespit etmiştir. Bu yeniden düzenlenmeler arasında daha önce Goldenhar sendromuyla ilişkili olduğu görülen de novo 12q13.33 delesyonu ve 2q11 delesyonu bulunmaktadır (3).

Farklı kromozom anomalileri Goldenhar sendromuyla ilişkili bulunmuştur: 7, 8, 9, 10p, 22. kromozomların trizomileri, 1p22.2–p31.1, 5p14, 12p13.33, 18p, 22q11.2, 22qter delesyonları, 22q11q13 duplikasyonu, t(5;8)(p15.31;p23.1) ve t(11;22)(q23;q11) dengesiz translokasyonları gibi (3).

Goldenhar sendromu ve velokardiyofasiyal sendrom klinik özellikleri gösteren bir hastada 22q11.2 bölgesinde mikrodelesyon saptandı. Hastada gözlenen bulgular arasında hafif gelişme geriliği, hemifasiyal mikrozomi, sol gözde pitoz, tübüler burun, dismorfik sağ kulak, yüksek damak, sağ depresor anguli oris kasının hipoplazisi, retrognati, eklem laksitesi, sağ kulakta işitme kaybı, beslenme ve konuşma güçlüğü bulunmaktaydı. Ekokardiyografisinde mitral kapak prolapsusu tespit edildi. Hastada saptanan delesyon bölgesinde birinci ve ikinci brankial arkların embriyogenezinde görevli olan genler bulunmaktadır. Bunlardan GSC2 geni (Gooseoid Homeobox 2) velokardiyofasiyal sendromla ilişkili olup 14q32 bölgesinde bulunan GSC (Gooseoid Homeobox) geninin homoloğudur. Yapılan bir linkaj çalışmasında GSC geninin Goldenhar sendromu için aday gen olduğu öne sürülmüştür. Bu bölgede bulunan diğer genlerden TBX1 (T-Box 1) kulak gelişiminden sorumludur (35).

Linkaj çalışmaları sonucunda GSC genini içeren 14q32' de bir lokus tanımlanmıştır. Fakat hemifasiyal mikrozomili hastalarda bu gende mutasyon bulunamamıştır (3).

Beş Goldenhar sendromlu hastada olası patojenik mekanizma olarak epigenetik kalıtım öne sürülmüştür. Histon asetilasyonuna bağlı BAPX1(Bagpipe Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 1) geninin alelik ekspresyonunda dengesizlik görülmüştür (36).

Klinik bulguları Goldenhar sendromuna uyan yirmi beş yaşındaki erkek hastada SNP array (Single nucleotide polymorphism array) analizi ile 3q29' da 723 Kb lık de novo mikroduplikasyon saptandı. Bu bölge ATP13A3 (ATPase, Type 13A3) ve XXYLT1 (Xyloside Xylosyltransferase 1) genlerinin de aralarında olduğu dokuz adet gen içermektedir. ATP13A3 geni organogenezde rol alırken, XXYLT1 geni Notch yolağının düzenlenmesinden sorumludur (37).

Dış kulak anomalileri, sensörinöral işitme kaybı, preaksiyel polidaktili ve önde yerleşimli anüs gibi Townes-Brocks sendromu bulguları gösteren bir hastanın kız kardeşinde atrezik kulak kanalı, mandibular hipoplazi, sağ preaksiyel polidaktili ve epibulbar dermoid bulgularıyla Goldenhar sendromu ön tanısı düşünülmüştür. SALL1 (Sal-Like 1) geni



moleküler analizi sonucunda her iki kız kardeşte heterozigot nonsens mutasyon tespit edilmiştir. Bu bulgu Goldenhar sendromu etiyojisinin oldukça heterojen olduğunu gözler önüne sermektedir (38).

Goldenhar sendromu klinik bulgularını taşıyan beş bireyin bulunduğu bir ailede tüm etkilenmiş bireylerde 14q22.3 bölgesinde 1.3 Mb boyutunda duplikasyon tespit edilmiştir. Duplike olan bölgede sekiz adet gen bulunmaktaydı: OTX2, OTX2OS1 (Orthodenticle Homeobox 2 Opposite Strand 1), EXOC5 (Exocyst Complex Component 5), AP5M1 (Adaptor-Related Protein Complex 5, Mu-1 Subunit), NAA30 (N (alpha)-acetyltransferase 30), C14orf105 (Chromosome 14 open reading frame 105), SLC35F4 (Solute carrier family 35 member F4) ve C14orf37 (Chromosome 14 open reading frame 37) (parsiyel). Sekiz gen arasından fenotipe en çok katkıda bulunan geni bulabilmek için diğer fasiyal malformasyonların etiyojisinde rol alan genlerle yapısal benzerliklerine göre öncelik sıralaması yapıldı. OMİM (Online Mendelian Inheritance in Man)' de yer alan klinik durumları fenotipik benzerliklerine göre sıralayan MimMiner programı kullanılarak Goldenhar sendromuyla fenotipik özellikleri en çok benzeşen üç sendromun sırasıyla CHARGE (coloboma, heart defect, choanal atresia, retarded growth and development, genital and ear abnormality) sendromu, VACTERL (vertebral anomalies, anal atresia, cardiac defects, tracheoesophageal fistula and/or esophageal atresia, renal & radial anomalies, limb defects) asosiasyonu ve Townes-Brocks sendromu olduğu tespit edildi. Duplike bölgedeki sekiz adet gen bu sendromlardan sorumlu olan CHD7(Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 7), ZIC3 (Zinc Finger Protein Of Cerebellum 3) ve SALL1 genleri ile karşılaştırıldığında OTX2' nin patolojiden sorumlu en olası gen olduğu görüldü. Hastalıkla ilişkili olan genlerin etkilenen dokularda ekspresyonunun etkilenmeyen dokulara göre fazla olabileceği düşünülmektedir. Fare embryonik dokusunun ekspresyon array profilleri kullanılarak Otx2, Otx2os1, Exoc5, Ap5m1, Naa30 ve Slc35f4 genlerinin ekspresyon profiline bakıldığında etkilenen dokularda ekspresyonu en fazla olan genin OTX2 olduğu tespit edildi. Kullanılan in silico analiz teknikleriyle OTX2' nin patolojiden sorumlu en olası gen olduğu sonucuna varıldı (4).

Goldenhar sendromlu klinik tanı, otozomal dominant kalıtımın gözleendiği diğer bir ailede saptanan 1.34 Mb lık 14q23.1 duplikasyonunun segregasyon gösterdiği ve bu bölgede bulunan OTX2 geninin Goldenhar sendromu için iyi bir aday gen olabileceği sonucuna varıldı (5).

Gelişme geriliği ve multipl konjenital anomalileri nedeniyle brankiotoorenal sendrom (BOR) veya Goldenhar sendromu ön tanısı düşünülen 26 aylık erkek hastaya yapılan tüm

genom oligonükleotit mikroarray analizi ile 14q22.3-q23.3 bölgesinde 11.79 Mb boyutunda duplikasyon, 13q21.31-q21.32 bölgesinde 4.38 Mb boyutunda kayıp saptandı. Hastanın mental retardasyon, kısa boy, hipernazal konuşma, uzun alın gibi bulguları olan babasında da aynı genomik değişiklikler saptandı. 14q22.3-q23.3 bölgesi SIX1 (Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 1), SIX6 (Sine Oculis Homeobox, Drosophila, Homolog Of, 6) ve OTX2 genlerinin de aralarında bulunduğu elli bir adet gen içermektedir. 14q21.3-q24.3 bölgesindeki değişimler Brankiootik sendrom (BOS) dan sorumlu tutularak brankiootik sendrom tip 3 (BOS3) olarak adlandırılmıştır. SIX1 mutasyonları BOR/BOS3 sendromlu hastalarda bildirilmiştir. SIX1, SIX6 veya OTX2 genlerinin artmış dozajının bu ailedeki BOR ve Goldenhar sendromu benzeri bulgulardan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (39).

Goldenhar sendromlu elli bir hastanın ve ailesinin incelendiği bir çalışmada, array-CGH uygulanan yirmi iki indeks vakanın on tanesinde 22q11 lokusunda dozaj anormallikleri görüldü. Bulunan varyantların lokustaki genlerin haployetmezliği yoluyla veya dışardaki bir geni pozisyon etkisi ile etkileyerek Goldenhar sendromunda patojenik rol oynayabileceği düşünüldü. 22q11 lokusunda bulunan ‘düşük kopya sayısı’ dizileri alelik olmayan homolog rekombinasyona neden olur ve lokusu kopya sayısı anormalliklerine yatkın hale getirir. Ayrıca 22q11 delesyon/duplikasyon sendromu ve Cat-eye sendromu olguları incelendiğinde 22q11 bölgesinin yeniden düzenlenmelere yatkın olduğu görülmüştür. 22q11 lokusunun kraniofasial simetrisinin düzenlenmesi ve brankial arkların (1 ve 2.) gelişiminde etkili olan önemli genler içerebileceği düşünülmektedir. 22q11 sendromu bölgesinde yer alan Crkl ( V-CRK Avian Sarkoma Virus CT10 Oncogene Homolog Like) geninin gelişen faringeal arklardaki sinyalleri düzenleyerek kraniofasial dismorfizme katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Crkl mutant farede retinoik asit ve endotelin sinyal yolları bozulmuştur. Bu iki sinyal yolağı embryogenez esnasında brankial arklarda nöral krest hücrelerinin migrasyon ve diferansiyasyonunda önemli rol oynamaktadır (40).

Hemifasiyal mikrozomi, asimetrik makrostomi, displastik mandibula, preauriküler tag, dış kulak kanalı atrezisi ve vertebra anomalileri gibi bulguları nedeniyle Goldenhar sendromu öntanısı düşünülen bir hastada SNP array ile 5q13.2 bölgesinde 1Mb ve 167 kb boyutunda delesyon saptandı. Delesyona uğrayan bölgede bulunan on altı genden iki tanesi apoptozda rol almakta olan BIRC1(Baculoviral Iap Repeat-Containing Protein 1) ve OCLN (Occludin) genleri olup bu genlerin haployetersizliğinin hastadaki fenotipe katkısı olabileceği düşünüldü (41).

Aralarında akrabalık olmayan anne babanın zamanında doğan erkek bebeğinde bilateral preauriküler tag, dönük kulaklar, bilateral epikantal katlantı, sol epibulbar lipodermoid ve

aksesuar meme başı gibi dismorfik bulguların yanında özafagus atrezisi ve trakeoözafagal fistülü olduğu bulunmaktaydı. Cri-du-chat sendromunun karakteristik özelliği olan tiz sesle ağlaması mevcuttu. İşitme testinden kalan hastada kromozom analizi ve FISH testi sonucunda Cri-du-chat sendromunda klinikten sorumlu olan 5p14 lokusunda terminal delesyonu olduğu görüldü. Hastanın Goldenhar ve Cri-du-chat sendromu klinik bulgularını birlikte taşıması nedeniyle 5p14 lokusunun Goldenhar sendromuna neden olabilecek bir gen içerebileceği sonucuna varıldı (42).

Goldenhar sendromu klinik bulguları taşıyan dört olgu ve Treacher-Collins sendromlu bir olgunun TCOF1 (Treacle ribosome biogenesis factor 1) genindeki mutasyonlar açısından incelendiği bir çalışmada, Treacher-Collins sendromu hastasında on dördüncü ekzonda nonsens mutasyon, Goldenhar sendromu özellikleri taşıyan hastaların birinde TCOF1 geninde dokuzuncu ekzonunda missens mutasyon saptandı. Hastada gözlenen Goldenhar sendromuyla uyumlu bulgular arasında unilateral mikrotia, dış kulak kanalında atrezi, sol kulakta sensörinöral ve iletim tipi işitme kaybı, sol mandibular ramus ve maksilla hipoplazisi, sol zigomatik ark yokluğu ve 5-7. servikal vertebralarda spina bifida bulunmaktaydı. Ayrıca çalışmaya dahil edilen tüm hastalarda TCOF1 geni 10, 11, 12, 16, 21, 22 ve 23. ekzonlarında sekiz adet daha önce tanımlanmış polimorfizm saptandı. Bu bulgular ışığında TCOF1 geninde görülen genetik değişimlerin Goldenhar sendromuyla ilişkili olabileceği sonucuna varıldı (43).

Naora ve ark. hemifasiyal mikrozomi, mikrotia ve/veya anormal ısırma davranışları olan transgenik fare serisinde otozomal dominant insersiyon mutasyonu tanımlamışlardır. Hfm (Hemifacial microsomia-associated locus) olarak adlandırılan lokus in situ hibridizasyon yöntemiyle fare onuncu kromozomuna haritalanmıştır. Homozigot mutasyonun prenatal dönemde letal seyredebileceğini, Hfm geninin prenatal gelişimde gerekli olduğuna sonucuna ulaşmışlardır (44).

Mikrotia ve Goldenhar sendromu değişen fenotipik ekspresyon, asimetric tutulum, sağ tarafın sıklıkla etkilenmesi, erkeklerde daha sık görülmesi ve ailede preauriküler tag ve pit gibi mikrotia ilişkili anomalilerin görülmesi gibi ortak özellikleri paylaşırlar. Bu gözlemlere dayanarak izole mikrotianın Goldenhar sendromunun hafif fenotipini ortaya çıkardığı düşünülmektedir. Tüm izole mikrotialı vakaların veya önemli bir kısmının aslında Goldenhar sendromu olduğu hakkında görüşler bulunmaktadır. Kulak kepçesi gelişiminin yetersizliği olarak tanımlanan mikrotia, tek gen hastalıklarının bir komponenti olarak ortaya çıkabilen bir klinik bulgudur. SIX1 ve EYA1 (Eyes Absent, Drosophila, Homolog Of, 1) mutasyonları brankiootik sendroma neden olurken, SIX5 ve EYA1 mutasyonları brankiootorenal sendroma

neden olabilir. Her iki sendromda da kraniofasial defektlerle birlikte mikrotia gözlenmektedir. Mikrotia ile ilişkili olabilecek genetik varyantların bildirildiği çalışmalar literatürde bulunmaktadır. İzole mikrotialı yüz yirmi bir kişide GSC geninin sekans analizi ile iki olguda üçüncü ekzonda missens mutasyon saptandı. Aynı çalışmada BMP5 (Bone Morphogenetic Protein 5) lokusunun taranması ile dört hastada missens mutasyon görüldü. Mikrotialı altmış dört bireyde ve otuz altı sağlıklı kontrolde EYA1 geninin promotörünün metilasyon durumunun incelendiği başka bir çalışmada, mikrotialı bireylerde kontrol grubuna göre metilasyon düzeylerinin anlamlı olarak düşük bulunması üzerine hipometilasyonun mikrotia patogenezinde rol oynayabileceği öne sürüldü (45).

HOXA2 (Homeobox A2) geninin kodlayıcı bölge mutasyonları mikrotialı hastalarda gösterilmiştir. Aralarında akrabalık bulunan İranlı bir ailede bilateral mikrotialı bireylerinde HOXA2 geninde missens mutasyon bildirilmiştir (46).

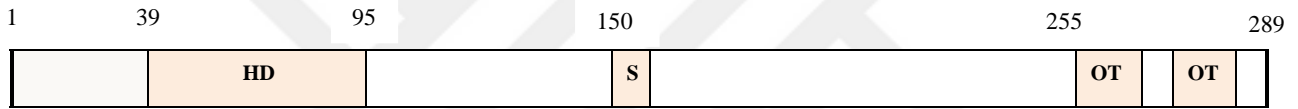
Bilateral nonsendromik mikrotia ve işitme kaybı olan bir ailenin bireylerindeki genetik geçişin otozomal dominant kalıtımla uyumlu olduğu düşünüldü ve etkilenen aile bireylerinde yapılan ekzom dizileme ile HOXA2 geninde heterozigot, nonsens patojenik varyant saptandı (47).

Goldenhar sendromunda de novo mutasyonları saptayabilmek amacıyla Goldenhar sendromlu 169 birey ve etkilenmemiş anne ve babalarından kohort oluşturulan bir çalışmada Goldenhar sendromu tanısı için minimal kriter olarak kulak anomalisi ve hemifasiyal mikrozomi varlığı kullanıldı. Bu kohorttan seçilen sporadik beş olguya ve anne babalarına tüm ekzom dizileme uygulandığında bir hastada myelin transkripsiyon faktör 1 geninde (MYT1) heterozigot nonsens mutasyon saptandı. Tüm kohorttaki bireylerde MYT1 geni sanger dizileme ile incelendiğinde başka bir hastada heterozigot missens mutasyon saptandı. Zebra balığında MYT1 geni knockdown edildiğinde spesifik kraniofasial kartilaj değişimlerine neden olduğu gösterildi. Mutasyonun zararlı etkilerini değerlendirebilmek için hücre kültüründe, Goldenhar sendromuna neden olduğu bilinen teratojen bir ajan olan all trans retinoik asit uygulandığında hücresel endojen MYT1 ekspresyonunun upregüle olduğu gösterildi. Ayrıca hücresel wild tip MYT1 overekspresyonu retinoik asit reseptör  $\beta'$ 'nin down regülasyonuna neden olurken, mutant MYT1 geninin bu etkiyi göstermediği gözlemlendi. Bu çalışma ile retinoik asit sinyal yolağındaki MYT1 geni mutasyonunun Goldenhar sendromuna neden olabileceği ilk kez kanıtlandı (48).

## 2.7. OTX2 geni yapısı

OTX2 geni on dördüncü kromozomun uzun kolunda 14q22.3 bölgesinde yer almakta ve beş ekzondan oluşmaktadır; ilk iki ekzonu kodlayıcı değildir. OTX2 proteini (Orthodenticle homeobox 2) homeodomain içeren bir transkripsiyon faktörü olup ön beyin ve göz gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Alternatif splicing ile iki izoformu kodlayan mRNA transkripti oluşmaktadır: 297 aminoasit içeren tam uzunluktaki OTX2 proteini ve daha fazla miktarda üretilen 289 aminoasit uzunluğundaki daha kısa izoform. İnsan OTX2 proteininin homeodomain bölgesi N terminal bölgenin yanında yer alır. Protein ayrıca iyi korunmuş SIWSPA peptid dizisi ve C terminal domainin içine yerleşmiş olan iki ardışık kuyruk motifi içermektedir.

**Şekil 2.** OTX2 proteininin şematik gösterimi. HD: homeodomain; S: SIWSPA motif, OT: ardışık tekrarlanan OTX kuyruk motifi (49)



OTX2 drosophiladaki orthodenticle (Otd) geninin omurgalılarıdaki ortoloğudur. Orthodenticle drosophilada ön beyin, göz ve anten oluşumu için gerekli olup fotoreseptör gelişimi ve rodopsinin ekspresyonunu düzenlemektedir. Memelilerde üç OTX geni bulunmaktadır: OTX1, OTX2 ve CRX (Cone-rod homeobox). Bu genler gelişmekte olan gözde eksprese olmaktadır. İnsanda CRX mutasyonları kon-rod distrofi, geç başlangıçlı pigmenter retinopati ve Leberin konjenital amarozi gibi retinal dejenerasyonlarda bildirilmiştir. Farede OTX1 ve OTX2 gelişmekte olan beyin, kulak, burun ve gözde eksprese olmaktadır (50).

Bugüne kadar tanımlanan OTX2 mutasyonları protein boyunca yayılmış olsa da çoğu genin son ekzonunda bulunmaktadır. OTX2 mutasyonunda ortaya çıkan fenotip, haploetersizliğe bağlı bir nöro-oküler hastalık olarak tanımlanabilir. Tipik olarak prematür sonlanma kodonu ve truncate protein oluşturan OTX2 nonsens veya frameshift mutasyonları bildirilmiştir. Fonksiyonel çalışmalar OTX2 proteininin trunkasyonunun dominant negatif etki olmadan transaktivasyon işlevinde anlamlı düşüşe neden olduğunu göstermektedir. Daha nadir olarak malformasyon, korunmuş rezidüyü etkileyen missens mutasyonla ilişkilidir. Bazı vakalarda missens mutasyon dominant negatif etki olmadan protein aktivitesinin bozulmasına

neden olabilmektedir. Örneğin R89G nokta mutasyonu sonucunda oluşan protein normal aktivitesinin sadece %25' ini gerçekleştirebilmektedir. Diğer vakalarda ise aminoasit değişikliğinin neden olduğu mutant protein gen ekspresyonu üzerine dominant negatif inhibitör olarak etki etmektedir. Örneğin N225S mutant, hedef genlere normal bağlanır ancak ön hipofiz normal gelişimi için gerekli olan HESX1 (Homeobox Gene Expressed In ES Cells) gen ekspresyonunun dominant inhibitörü olarak davranır. Bildirilen missens mutasyonların patojenik olup olmadığı bütün vakalarda net olarak belirlenemediği için P133T, P134A, T178S, A245V gibi missens mutasyon olarak tanımlanmış bazı değişikliklerin aslında nadir polimorfizm olabileceği düşünülmektedir. OTX2 mutasyonları için net bir genotip/fenotip korelasyonu henüz bildirilmiş değildir (49).

## **2.8. OTX2 geni fonksiyonu**

OTX1 ve CRX ile birlikte memeli OTX2 transkripsiyon faktörü türler arasında oldukça korunmuş olan Paired-class OTX homeoprotein ailesine aittir. OTX2 gastrulasyon esnasında ve ön beyin oluşumu gibi erken gelişimsel işlemlerde anahtar düzenleyici rolü oynadığı kadar sonraki dönemde göz dokularının oluşumu ve farklılaşmasına katkıda bulunur. Bu farklı işlevler alternatif promotorlar ve kompleks enhancerlar yoluyla ekspresyonun uzamsal ve zamansal olarak kontrol edilmesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (51).

OTX2 geni vertebralılarda ön beyin ve kafa oluşumunda önemli genlerden biridir (49).

Geç embryonik dönemde diensefalon, mezensefalon, pineal bez, koroid pleksus ve serebellum gibi beynin farklı bölgelerinde ve retinada OTX2 geni eksprese olmaktadır (52).

Farede embryonik dönemde OTX2' nin homozigot delesyonu önbeyin ve orta beyin bölgesini geliştirecek olan rostral nöroektodermin yokluğuna bağlı olarak letal seyrederek (53).

OTX2 geninin retinal fotoreseptör hücrelerinin akıbetinin belirlenmesinde ve pineal bez gelişiminde önemli olduğu gösterilmiştir. Farelerde OTX2 eksikliği retinal fotoreseptör gelişiminde ciddi bozulma ve epifiz bezinde pinealosit yokluğuyla sonuçlanmıştır (54).

OTX2 proteini Hesx1 geni promotoruna bağlanabilmektedir; Hesx1 ekspresyonu için kritik fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. OTX2 geninin aynı zamanda POU1F1 (POU Domain, Class 1, Transcription Factor 1) geninin promotörünü transaktive ettiği gösterilmiştir. Hesx1 geni ve POU1F1 geni hipofiz gelişiminin sırasıyla erken ve geç evrelerinde rol almaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak OTX2' nin ön hipofiz normal çalışması için gerekli bir gen olduğu sonucuna ulaşılabilir. Dateki ve ark. tarafından bilateral anoftalmi, boy kısalığı ve parsiyel büyüme hormonu eksikliği olan bir hastada mutasyon analizi ile OTX2 geninde de novo heterozigot frameshift mutasyon (c.402insC) saptanmıştır. Fonksiyonel çalışma ile wild

tip OTX2 proteininin IRBP (interstitial retinoid-binding protein), HESX1 (HESX homeobox 1) ve POU1F1 promotörlerinin transaktivasyonunu gerçekleştirirken, mutant OTX2 proteininin bu işlemi hemen hemen hiç gerçekleştirmediği görülmüştür. OTX2 geninin heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları HESX1 and POU1F1 geninin azalmış transaktivasyonu nedeniyle büyüme hormonu eksikliği ve boy kısalığına neden olmaktadır (55).

## 2.9. OTX2 geniyle ilişkili fenotipler

OTX2 geninde interstisyel delesyon, mikrolelesyon, frameshift ve nokta mutasyonu gibi çeşitli genetik değişimler tanımlanmıştır. Bu değişimlerin çoğu anoftalmi, mikroftalmi, Leberin konjenital amarozi veya kolobom gibi ağır oküler malformasyonları olan hastalarda bildirilmiştir (56).

Heterozigot knockout farede konjenital olarak kafa gelişiminin olmaması olarak tanımlanan ‘acephaly’, holoprosensefali, kısa burun, anoftalmi/mikroftalmi, agnati/mikrognati veya normal fenotip gibi çeşitli fenotipler gözlenmiştir (57).

Anoftalmi, mikroftalmi ve kolobom fenotipine neden olan RAX(Retina And Anterior Neural Fold Homeobox Gene), CHX10(CEH10 Homeodomain-Containing Homolog), PAX6(Paired Box Gene 6), MAF (V-MAF Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog) ve SOX2 (SRY-Box 2) gibi pek çok gen bildirilmiştir. Anoftalmilerin %10’ undan sorumlu tutulmakta olan SOX2 geni dışındaki diğer genler çok az sayıda hastada tespit edildiği için hastalığın temel nedeni olmaları söz konusu değildir. Oküler malformasyon spektrum defekti olan üç yüz otuz üç hastanın incelendiği bir çalışmada sekiz ailede OTX2 geninin kodlayıcı bölgesinde heterozigot değişimler tanımlandı. OTX2 mutasyonu taşıyan bireylerde fenotip bilateral anoftalmi, Leber’ in konjenital amarozisine benzeyen retinal defekt ve pigmenter retinopati gibi farklı şekillerde ortaya çıkmaktaydı. Manyetik rezonans görüntüleme ile optik sinir, optik kiazmada ve bazı olgularda beyinde defektler tespit edildi. OTX2 fonksiyon kaybı mutasyonlarının neden olduğu oküler fenotiplerin retinal anomalilerle birlikte bilateral anoftalmiden hafif mikroftalmiye kadar geniş bir yelpazeye yayılmış olduğu söylenebilir. Nörolojik fenotip spektrumunu da ağır gelişme geriliği ile normal bilişsel gelişim arasında olmak üzere oldukça geniştir. Heterozigot OTX2 mutasyonları olan hastalarda görülen majör fenotip ağır göz defektleriyle birlikte beyin malformasyonlarıdır (50).

Anoftalmi/mikroftalmisi olan elli iki birey OTX2 mutasyonu varlığı açısından araştırıldığında dört ailede (%8) hastalığa neden olan varyant tespit edildi. Bildirilen dört

mutasyonun OTX2 protein dizisinin trunkasyonuna neden olduğu tahmin edilmektedir. Üç tanesi de novo, bir tanesi etkilenmiş ebeveynden kalıtılmıştır. Mutasyon saptanan beş hastanın dördünde ek sistemik bulgular bulunmaktaydı. Bu sistemik bulgular arasında Wolf-Parkinson-White sendromu ve ön yerleşimli anüs gibi daha önce bildirilmemiş bulgular da mevcuttu. Çalışılan hastaların ve literatürdeki diğer olguların fenotipik özellikleri analiz edildiğinde hipofiz anomalilerinin varlığı ile genitoüriner- gastrointestinal manifestasyonların yokluğunun SOX2 anoftalmi sendromundan ayırımında önemli olabileceği gibi bir sonuca ulaşılmıştır. Ayrıca hipofiz anomalilerinin, OTX2 nin homeodomain ve SGQFTP motifinden sonra ikinci yarısında meydana gelen mutasyonlarla kuvvetli ilişki içinde olabileceği öne sürülmüştür (58).

Aniridi, mikroftalmi, mikrosefali ve cafe au lait lekeleri olan bir hastada PAX6, NF1 (nörofibromatozis tip 1) ve OTX2 mutasyonu tespit edilmiştir. PAX6 missens mutasyonu (p.R38W) oküler nörofibromatozis nedeniyle iris fenotipi belirgin olmayan anneden kalıtılmıştır. Hastada cafe au lait lekeleri varlığından ve annesinin tanısından yola çıkarak NF1 geni analiz edildiğinde nonsens mutasyon tespit edildi. (p.R192X). Ardından tespit edilen OTX2 nonsens mutasyonunun (p.Y179X) Leberin konjenital amarozişi tanımlı babadan kalıtıldığı gösterildi. PAX6, OTX2 veya NF1 mutasyonları çeşitli gelişim defektlerine neden olabilmesine rağmen hastadaki fenotipin oldukça hafif olması oldukça dikkat çekicidir (59).

Kombine hipofiz hormonu eksikliği olan doksan iki hastada OTX2 kodlayıcı bölgeleri ve ekzon intron bileşkelerinin dizi analizinin uygulandığı bir çalışmada kombine hipofiz hormonu eksikliği, hipofizer malformasyon ve sol optik siniri gelişmemiş olan bir hastada heterozigot missens mutasyon c.401COG (p.Pro134Arg) bulundu. Bildirilen mutasyonların lokalizasyonu ile klinik fenotip arasında net bir ilişki bulunmaktadır. N terminalindeki mutasyonlarda hipofiz anomalisi olmadan ağır göz malformasyonları görülürken; C terminalindeki mutasyonlar hipofiz malformasyonu ve kombine hipofiz hormonu eksikliği ile ilişkilidir. Kombine hipofiz hormonu eksikliği, izole büyüme hormonu eksikliği veya boy kısalığı olan bireylerde mutasyonlar genellikle beşinci ekzonda görüldüğü için bu vakalarda mutasyon taramasına beşinci ekzonla başlanması önerilmiştir (56).

Agnati-otosefali kompleksi, mandibula yokluğu/hipoplazisi ve anormal yerleşimli kulaklarla karakterize olan bir malformasyon olup PRRX1 (Paired-Related Homeobox Gene 1) ve OTX2 genlerindeki mutasyonlar agnati-otosefali kompleksinin gözlemlendiği az sayıda ailede tanımlanmıştır. İki gebeliğinde de fetuslarda prenatal ultrason incelemesi ile agnati-otosefali tespit edilen sağlıklı kadına ait iki fetustan birine uygulanan ekzom dizileme ile OTX2 geninde heterozigot duplikasyon c.271\_273dupCAG, p.(Gln91dup) olduğu tespit



edilmiştir. Aynı varyant probandin sağlıklı olan 38 yaşındaki eşinde ve küçük mandibula ve damağın bir yarısında kısalığa bağlı velofaringeal yetmezliği olan dokuz yaşındaki kızlarında tespit edildi. Bu olgu OTX2 geninin palatal hipoplazi vakalarında rolü olabileceğini düşündürmüştür (60).

Sağ gözde mikroftalmi, retinal vaskülarizasyon yokluğu, vitreal noktalanma ve optik sinir hipoplazisi, sol gözde hafif maküler distrofi olan bir çocukta OTX2 heterozigot mutasyon bulundu. Ektopik posterior hipofiz bezi dışında orta hat beyin yapıları ve serebral parankim normaldi. OTX2 dizi analizi ile heterozigot c.402del mutasyonu bulundu. Daha önce bildirilmemiş olan bu mutasyon prematür stop kodon oluşmasına neden olan bir frameshift mutasyondur (61).

İçlerinden yirmi bir tanesi sendromik olan altmış beş anoftalmi/mikroftalmi hastasında SOX2, OTX2 ve PAX6 genlerindeki mutasyonlar incelendi. Sendromik hastalarda ayrıca array CGH ile genomik dengesizliklerin varlığı araştırıldı. OTX2 ve PAX6 genlerinde mutasyon bulunamadı. Sendromik anoftalmide üç SOX2 mutasyonu bulundu. Sendromik bulguları ve monolateral mikroftalmili hastada 4q13.2q13.3 bölgesinde iki adet de novo 6.26 Mb ve 1.37 Mb boyutunda delesyon saptandı. Nonsendromik monolateral mikroftalmili bir bireyde SOX2 missens (p.Ala161Ser) mutasyonu bulundu (62).

Anoftalmi/mikroftalmili yirmi sekiz hastanın exom dizilemesinde üç hastada de novo mutasyon OTX2, RARB (retinoik asit reseptör, beta) ve GDF6 (Growth/Differentiation Factor 6) genlerinde saptanırken iki hastada STRA6 (Stimulated By Retinoic Acid 6) geninde kalıtılmış mutasyon tespit edildi (63).

Otozomal dominant retinal pigment epitelinin patern distrofinin görüldüğü iki ailede OTX2 geninde heterozigot missens varyant (E79K) görüldü (64).

Williamson ve ark. yayınladıkları derlemede mikroftalmi-anoftalmi-kolobom (MAC) fenotipiyle ilişkili patojenitesi onaylanmış genler SOX2, OTX2, PAX6, STRA6, ALDH1A3 (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member A3), RARB, VSX2 (Visual System Homeobox 2), RAX (Retina And Anterior Neural Fold Homeobox Gene) ve FOXE3 (Forkhead Box E3); olası patojenik BMP4, BMP7, GDF3, GDF6, ABCB6 (ATP-Binding Cassette, Subfamily B, Member 6), ATOH7 (Atonal, Drosophila, Homolog Of, 7), C12orf57 (Chromosome 12 open reading frame 57), TENM3 (Teneurin Transmembrane Protein 3) ve VAX1 (Ventral Anterior Homeobox 1) genleri olarak bildirilmiştir (65).

Anoftalmi veya ağır mikroftalmisi olan elli bir bireyde SOX2, OTX2, PAX6 (paired domain), STRA6, BMP4, SMOC1 (SPARC-Related Modular Calcium-Binding 1), FOXE3,

and RAX (Retina And Anterior Neural Fold Homeobox Gene) genlerinin kodlayıcı bölgelerinin dizi analizi ve array bazlı kopya sayısı değerlendirmesi uygulandı. On beş hastada SOX2 (9/51), OTX2 (5/51), and STRA6 (1/51) genlerinde mutasyon görüldü. Bilateral anoftalmili on iki olgunun dokuzunda (75%) genomik değişim saptandı. Bu değişimlerin üçünü SOX2 (bir olgu) ve OTX2 (iki olgu) genlerini kapsayan büyük delesyonlar oluşturmaktaydı (66).

Mandibular hipo/aplazi, kulak anomalileri, mikrostomi ve mikroglossi ile karakterize olan 'otosefali-disgnati' olgularında OTX2 ve PRRX1 (Paired-Related Homeobox Gene 1) genlerinde mutasyon bildirilmiştir. Dört otosefali olgunun OTX2 ve PRRX1 mutasyonları açısından incelendiği bir çalışmada iki olguda OTX2 mutasyonları tanımlandı. PRRX1 geninde ise mutasyon saptanmadı (67).

İzole veya sendromik anoftalmi/mikroftalmisi olan yüz elli hastadan oluşan kohortta anoftalmi/mikroftalmi genlerinden GDF6 (growth differentiation factor 6), FOXE3 (forkhead box E3), OTX2 (orthodenticle protein homolog 2), PAX6 (paired box 6), RAX (retina and anterior neural fold homeobox), SOX2 (SRY sex determining region Y-box 2) ve VSX2 (visual system homeobox 2 gene) mutasyonlarının dizi analizi ile araştırıldığı bir çalışmada yirmi beş hastada nokta mutasyonu saptandı. Mutasyonlar on üç hastada SOX2, dört hastada RAX, üç hastada OTX2, iki hastada FOXE3, bir hastada VSX2, bir hastada PAX6 ve bir hastada GDF6 geninde bulunmaktaydı. Ayrıca sekiz olguda gen delesyonu (5 SOX2, 2 OTX2 ve 1 RAX) semikantitatif multipleks PCR ile saptandı (68).

## **2.10. Goldenhar sendromunda ayırıcı tanı**

Goldenhar sendromlu bazı hastaların klinik bulguları Treacher Collins sendromu, Townes–Brocks sendromu, CHARGE sendromu, Branchio-oto-renal spectrum bozuklukları ve Guion-Almeida tipi mandibulofasiyal dizostozis gibi birinci ve ikinci faringeal arklardan köken alan yapılarla ilişkili olan diğer sendromlarla örtüşmektedir. Bu sendromların her biri kendine özgü ayırıcı bulguları olan fenotipik antitelerdir. Anal anomaliler Townes-Brocks sendromunu düşündürürken, kulak şekli ve semisirküler kanal anomalisi CHARGE sendromu için karakteristiktir. EFTUD2 (Elongation Factor Tu GTP-Binding Domain-Containing 2) mutasyonuna sahip kişilerde mikrosefali ve özafagus atrezisi görülebilir. Goldenhar sendromlu vakalarda bulgular yeterince uyumluysa bu sendromlara neden olan genlere yönelik moleküler analiz yapılabilir (1).

### **2.10.1. Aurikulokondilar sendrom**

Mandibular hipoplazi, temporomandibular eklem ankilozu, yarık damak ve kulak lobulunun dış kulaktan ayrılmasına bağlı olarak kulakta soru işareti görünümüyle bilinen bir sendromdur. Bulgular genellikle bilateral ve simetrik olmasına karşın preauriküler tag ve mandibular hipoplazinin görülmesi nedeniyle Goldenhar sendromuyla karışabilir. İşitme kaybı, belirgin yanaklar, mikrostomi de görülebilmektedir. Endotelin reseptör yolağında yer alan PLCB4 (Phospholipase C, Beta-4) ve GNAI3 (Guanine nücleotide binding protein, alpha inhibiting activity olypeptide 3) genlerinde heterozigot patojenik varyantlar bildirilmiştir (69).

### **2.10.2. Bixler sendromu**

Gözlenen bulgular hipertelorizm, yarık dudak-damak, geniş burun ucu ve mikrotia olup etiyojisi bilinmemektedir (70).

### **2.10.3. Brankiootorenal sendrom**

Dış, orta ve iç kulağın malformasyonlarıyla karakterizedir. İletim tipi, sensörinöral veya miks işitme kaybı görülebilir. Brankial fistül ve kistler ile renal malformasyonlar gözlenebilir. Tanı klinik bulgulara dayanarak konur. EYA1, SIX5 ve SIX1 genlerinden birindeki heterozigot patojenik varyant brankiootorenal sendroma neden olur.

### **2.10.4. CHARGE sendromu**

Unilateral veya bilateral iris, retina-koroid kolobomu; mikroftalmi, unilateral veya bilateral koanal atrezi, kranial sinir disfonksiyonu, anormal kulaklar, erkeklerde kriptorşidizm, hem erkek hem kadında hipogonadotrofik hipogonadizm, gelişme geriliği, kardiyovasküler malformasyon ve büyüme geriliği görülebilmektedir. Bazı kişilerde orofasiyal kleft ve trakeözafageal fistül de gözlenmektedir. Hastaların %65-70 inde CHD7 geninde heterozigot patojenik varyant sorumludur (15).

### **2.10.5. Mandibulofasyal dizostoz (mikrosefaliyle birlikte)**

Malar ve mandibular hipoplazi, konjenital veya postnatal başlangıçlı mikrosefali, dış kulak, kulak kanalı ve/veya orta kulak malformasyonu, işitme kaybı gibi bulgularla tanımlanmıştır. Belirgin glabella, geniş burun köprüsü, bulböz burun ucu, alt dudakta

eversiyon yüzde görülebilen bulgular arasındadır. Yarık damak, koanal atrezi ve fasiyal asimetri de görülebilmektedir. Mental retardasyon belirgin bir bulgu olup görülebilen ekstrakranial malformasyonlar arasında özafagus atrezisi, konjenital kalp hastalığı ve başparmak anomalileri bulunmaktadır. EFTUD2 genindeki heterozigot patojenik varyant varlığı hastalığın nedeni olarak düşünülmektedir. (71) EFTUD2 geninde de novo heterozigot patojenik varyantı tespit edilen bir hastada Goldenhar sendromunda da görülebilen tek taraflı epibulbar dermoid bildirilmiştir (72).

#### **2.10.6. Miller sendromu (postaksiyal akrofasiyal dizostoz)**

Postaksiyel parmakların hipoplazisi, sindaktilisi, yokluğu ve ulnar hipoplazi gibi postaksiyal ekstremite anomalileri görülmektedir. Miller sendromunda görülebilen yüz bulguları arasında malar hipoplazi, mikrognati, yarık damak, nadiren yarık dudak, küçük "cup-shaped" kulaklar, kolobom ve/veya ektropion bulunmaktadır. Sorumlu genin DHODH (Dihydroorotate Dehydrogenase) geni olduğu düşünülmektedir (73).

#### **2.10.7. Nager sendromu (preaksiyal akrofasiyal dizostoz)**

Preaksiyal ekstremite anomalisi (Radius hipoplazisi veya yokluğu, başparmak hipoplazisi/yokluğu, trifalangeal başparmak, radyoulnar sinostoz) ve yüz anomalileri (malar hipoplazi, aşağıya eğimli palpebral fisür, alt gözkapağı kolobomu, ağır mikrognati) görülebilmektedir (74).

#### **2.10.8. Okuloaurikulofrontonazal sendrom**

Frontonazal displazi ve okuloaurikulovertebral spektrumda görülen bulguları içeren bir kraniofasiyal sendromdur. Karakteristik bulgular oküler hipertelorizm, çentikli veya bifid burun ucu, mikrotia, kulak ve yüzde skin tag, gözkapağı kolobomu, epibulbar dermoid, mandibular hipoplazi ve fasiyal asimetridir. Kardiyak, renal bulgular ve vertebral segmentasyon anomalisi gibi ekstrakranial bulgular Goldenhar sendromunda gözlenenlere benzemektedir (75).

#### **2.10.9. Townes-Brocks sendromu**

Gözlenen klinik bulgular bir triad oluşturmaktadır: imperfore anüs, displastik kulaklar ve başparmakta malformasyonlar (trifalangeal başparmak, başparmakta duplikasyon ve nadiren hipoplazi). Böbrek yetmezliği, böbrekte yapısal anomali, konjenital kalp hastalığı, ayak anomalisi ve genitoüriner malformasyonlar da görülebilmektedir. Goldenhar sendromlu

hastaların çoğunda başparmak ve/veya anal malformasyonlar görülmemekle birlikte kulak, renal ve kardiyak bulgular Townes-Brocks sendromunda görülenlerle örtüşmektedir. SALL1 genindeki heterozigot patojenik varyant hastalığın nedenidir (15).

#### **2.10.10. Treacher Collins sendromu**

Görülen tipik bulgular malar ve mandibular hipoplazi, dış kulak anomalisi (mikrotia), alt gözkapağında kolobom ve kirpik yokluğudur. Hastaların %40-50 sinde orta kulak yapılarının anomalisi/hipoplazisine bağlı iletim tipi işitme kaybı görülür. Ekstrakranial malformasyonlar nadir olup zeka genellikle normaldir. Hastalığa neden olan mutasyonlar TCOF1, POLR1C (Polymerase I, RNA, Subunit C) ve POLR1D (Polymerase I, RNA, Subunit D) genlerinde tespit edilmiştir (76).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1.Hastaların Seçimi**

Goldenhar sendromlu hastalarda görülen klinik ve laboratuvar bulgularına dayanarak sendromun etiyojisinde rol oynayan faktörleri açıklayabilmek amacıyla son on yıl içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı' na başvuran hastaların dosyaları retrospektif olarak incelendi. Dosya taraması sonucunda Goldenhar sendromu klinik bulgularını karşılayan hastalar araştırmaya dahil edildi. Dosyalar taranırken hasta kayıt listesinde anahtar kelimelerle arama yapıldı. 'Goldenhar sendromu, hemifasiyal mikrozomi, okulo-aurikulo-vertebral spektrum, maksiller/mandibular hipoplazi, fasiyal cleft, yüzde asimetri yarık dudak/damak, makrostomi, fasiyal sinir paralizisi, epibulbar dermoid, mikroftalmi, anoftalmi, üst göz kapağı kolobomu, lakrimal kanal atrezi/stenozu, mikrotia, anotia, aural atrezi, kulak displazisi, preauriküler tag, preauriküler sinüs/pit, işitme kaybı, tortikollis, servikal vertebrada malformasyon/füzyon, hemivertebra' kelimeleri anahtar kelime olarak kullanıldı. Hastaların medikal kayıtları incelenerek elde edilen bilgiler örneği **Ek 1'** de sunulan veri kayıt formuna kaydedildi. Veri kayıt formu, kişisel bilgiler, prenatal, natal ve postnatal öykü, nöromotor gelişim basamakları, baş çevresi, boy ve kilo persentilleri, dismorfik bulgular, görüntüleme sonuçları, genetik test sonuçları, diğer laboratuvar bulguları ile aile ağacını içermekteydi. Prenatal öyküde ultrasonografide anomali varlığı, annenin ilaç ve sigara kullanım öyküsü, kanama, annede diabet, çoğul gebelik ve yardımcı üreme tekniklerinin kullanılıp kullanılmadığına dikkat edildi. Natal öyküde doğum tartısı, doğum haftası, doğum şekli, sezeryan doğum ise sebebi, zor/asfiktik doğum olup olmadığı; postnatal öyküde asfiksi, küvöz veya ventilatör gereksinimi, varsa bunların sebebi ve süresi, yenidoğan döneminde hiperbilirubinemi olup olmadığı, geçirilen ameliyat ve kullanılan ilaçlar veri kayıt formuna not edildi. Fizik muayenede maksiller/mandibular hipoplazi, yüzde asimetri, fasiyal sinir paralizisi, kulak anomalileri, dış kulak yolunun açık olup olmadığı, gözde üst/alt göz kapağı kolobomu, epibulbar dermoid varlığı, mikroftalmi/anoftalmi, yarık dudak/damak, makrostomi, boyun hareketlerinde kısıtlılık olup olmadığı, tortikollis gibi bulguların öncelikle üzerinde duruldu. Hastaların işitme testi sonuçları, kafa, servikal vertebra ve el bilek grafisi, ekokardiyografi, transfontanel ve batın ultrasonografisi, beyin ve orbita manyetik rezonans görüntüleme, beyin bilgisayarlı tomografi sonuçları ile hemogram, biyokimya, tiroid fonksiyon testleri, büyüme hormonu eksikliğini değerlendirmeye yönelik testlerde saptanan anormal bulgular veri kayıt formuna kaydedildi. Dosyalarda bulunan en az üç nesli kapsayan

pedigrinde akraba evliliği ve ailede hemifasiyal mikrozomi, mikrotia/anotia, kulak önü tag/pit ve benzeri dismorfik bulguları olan bireyler olup olmadığı araştırıldı.

Hastalara uygulanan genetik testler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda rutin olarak çalışılmakta olup; karyotip analizi, 22q11 lokusuna yönelik FISH (Floresan in situ hibridizasyon) analizi, CHARGE sendromundan sorumlu lokusa yönelik FISH analizi, CHD7 geni dizi analizi, CHD7 geni MLPA analizi, OTX2 geni dizi analizi ve OTX2 geni MLPA analizinden oluşmaktadır. Hastalara uygulanan genetik testlerin sonuçları da kayıt altına alındı.

### **3.2. Moleküler Genetik Çalışma**

#### **3.2.1. Dizi analizi**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda rutin olarak uygulanan OTX2 geni dizi analizi amacıyla ilgili laboratuvardan alınan yöntem bilgisi için aşağıdaki basamakların uygulandığı öğrenildi:

1. Beş ml periferik kan örneğinin etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren steril tüplere alınması
2. Periferik kandan DNA (deoksiribonükleik asit) izolasyonu
3. İzole edilen DNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi
4. OTX2 geninin tüm kodlayıcı ekzonlarının ve ekzon intron bileşkelerinin amplifikasyonu (ilk PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) aşaması)
5. Agaroz jel elektroforezinde ampikonların kontrolü
6. İlk saflaştırma aşaması
7. İkinci PCR reaksiyonu
8. İkinci PCR ürünlerinin saflaştırma aşaması
9. Örneklerin kapiller elektroforez cihazına yüklenmesi ve uygun programlar yardımıyla analizin değerlendirilmesi

##### **3.2.1.1. Hasta Periferik Kan Örneklerinin Alınması**

OTX2 geni dizi analizi için 5 ml periferik kan örneği EDTA içeren tüplere alındı. Hastaların kanları DNA izolasyonu yapılmaya kadar +4°C'de saklandı.

### 3.2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 2' de verilmiştir.

**Tablo 2.** kullanılan cihazlar ve markaları

<b>Cihazlar</b>	<b>Marka</b>
Mikrosantrifüj	<i>Eppendorf</i>
Termal döngü cihazı	<i>Mastercycler Gradient-Eppendorf</i>
Kapiller elektroforez cihazı	<i>Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer</i>
Otomatik pipet seti	<i>Finnpipette</i>
PCR kabini	<i>Thermo</i>
Spektrofotometre	<i>Nanodrop ND-1000</i>
Vorteks	<i>IKA MS 3 basic mini vortex</i>
Isı bloğu	<i>P. selecta</i>
Hassas terazi	<i>Denver</i>
Mikrodalga fırın	Arçelik
Yatay elektroforez tankı	<i>Hybaid</i>
Jel görüntüleme cihazı	Syngene
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu	Altus

### 3.2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kitler, içerdikleri kimyasal maddeler ve markaları **tablo 3**'te verilmiştir.



**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan kitler, içerdikleri kimyasal maddeler ve markaları

Kullanılan Kit Adı	İçerdiği Kimyasal Maddeler	Marka
<i>High Pure PCR Template Preparation</i> kiti	<i>Binding buffer</i> (6 M guanidin HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH:4,4) <i>Proteinase K</i> <i>Inhibitor removal buffer</i> (5 M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH:6,6) <i>Washing buffer</i> (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH:7,5) <i>Elution buffer</i> (10 mM Tris buffer, pH 8.5) <i>High Pure</i> filtre tüpleri	<i>Roche</i>
<i>HelixAmp™ Ready-2X Multiplex version 2.0 PCR mix</i> kiti	<i>HelixAmp™ Ready-2X Multiplex PCR master</i> miks ( <i>Hot Taq</i> DNA polimeraz, deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP), <i>2xbuffer</i> ) <i>5xTune up™</i> solüsyonu	<i>NanoHelix</i>
<i>ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup</i> kiti	<i>Exonuclease I</i> <i>Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)</i> <i>Buffer</i>	<i>Affymetrix</i>
<i>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing</i> kiti	<i>BigDye terminator v3.1 cycle,</i>	<i>Applied Biosystems</i>
	<i>1X Dilution buffer</i> <i>Dye saving solution</i>	<i>NanoHelix</i>
<i>ZR DNA Sequencing Clean-up Kiti</i>	<i>Sequencing binding buffer</i> <i>Zymo-Spin™ IB</i> kolonları <i>Sequencing wash buffer</i>	<i>Zymo Research</i>

#### 3.2.1.4. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, periferik kan ve doku örneklerinden, hücre zarı ve nükleusun kimyasal maddeler ve enzimler aracılığıyla parçalanıp, nükleer DNA'nın ortaya çıkarılması işlemidir. DNA izolasyonu, periferik kandan *spin* kolon yöntemi ile *High Pure PCR Template Preparation (Roche™)* kiti kullanılarak yapıldı. Protokol kit içeriğinde belirtilen standartlara göre gerçekleştirildi:

1. 200 µl periferik kan örneği 1,5 ml'lik steril, kapaklı bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Üzerine sırasıyla 200 µl *binding buffer* ve 40 µl proteinaz K (kullanım öncesi liyofilize halde bulunan proteinaz K 4,5 ml distile H<sub>2</sub>O'da çözüldü) eklendi ve vorteks karıştırıcı yardımıyla 2-3 sn karıştırıldı.
2. Karışım ısı bloğunda 72°C'de 10 dk inkübe edildi.
3. Süre bitiminde, karışımın üzerine 100 µl izopropanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Sonrasında karışım, *high pure* filtre bulunan 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı.

4. 8000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
5. *High pure* filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve önceki toplama tüpü atıldı. *High pure* filtreli tüp üzerine 500 µl *inhibitor removal buffer* eklendi (*inhibitor removal buffer*'a kullanım öncesi 20 ml absolüt etanol eklendi).
6. 8000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
7. *High pure* filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne alındı ve önceki toplama tüpü atıldı. *High pure* filtreli tüp üzerine 500 µl *washing buffer* eklendi (*washing buffer*'a kullanım öncesi 80 ml absolü etanol eklendi).
8. 8000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
9. *Washing buffer* ile yıkama işlemi 2 defa tekrar edildi.
10. *High pure* filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne alındı ve üzerine herhangi bir çözelti eklenmeden 13000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
11. *High pure* filtreli tüp yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve önceki toplama tüpü atıldı.
12. *High pure* filtreli tüp üzerine daha önceden 70°C'ye ısıtılan *elution buffer*'dan 100 µl eklendi ve oda ısısında 1 dk inkübasyona bırakıldı.
13. İnkübasyon sonrasında 8000 x g devirde 1 dk santrifüj edildi.
14. *High pure* filtreli tüp atıldı.
15. Elde edilen DNA'lar saflıkları ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, DNA saklama kutularına konularak -20°C'de saklandı.

### 3.2.1.5. Spektrofotometre ile DNA Miktar ve Saflığının Belirlenmesi

Spektrofotometre, DNA, RNA (ribonükleik asit), oligonükleotidler gibi ışık absorpsiyonu yapabilen maddelerin sıvı solüsyonlar içindeki miktarı hakkında kantitatif bilgi verir. Çözeltiden belirli spektrumlarda ışık geçirilir ve çözelti tarafından ne kadar ışığın absorbe (A) edildiği belirlenir. DNA ve RNA 260 nm'de ve proteinler 280 nm'de ışığı maksimum absorbe ettiği için A260/A280 oranı kullanılarak nükleik asitlerin saflığı hesaplanabilir. Saflığı, analiz için uygun olan DNA 1,8-2 değerlerinde A260/A280 oranına sahiptir. Bu değer aralığından daha az olan oranlar protein kontaminasyonunu gösterirken üzerindeki değerler RNA miktarının fazla olduğunu gösterir.

İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede (*NanoDrop*) ölçüldü. Saflık ve konsantrasyonlarında problem olan DNA'lar tekrar izole edildi.

### 3.2.1.6. OTX2 Geninin Amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu, hedeflenmiş DNA bölgesinin, bu bölgeye özgü primerler (oligonükleotidler) ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimi kullanılarak seçici çoğaltılması işlemidir. Üç temel basamak içerir: denatürasyon, primer bağlanması ve uzama (sentez). Bu üç basamak bir PCR siklusunu oluşturur. DNA'nın iki ipliğini bir arada tutan hidrojen bağlarının kırılmasını içeren denatürasyon basamağı 94-95°C'de gerçekleşir. Isıya dayanıklı *Taq* DNA polimeraz enzimi, optimum çalışma sıcaklığı olan 72°C'de, ortamdaki nükleotidleri kullanarak zincirin 5' ucundan 3' ucuna doğru uzamasını sağlar. Yaklaşık 2 dk süren bir PCR siklusu 35 kez tekrar edilir ve hedef DNA'nın  $2^{35}$  kopyası elde edilmiş olur.

OTX2 geninin tüm kodlayıcı ekzonları ve ekzon intron bileşkeleri, bu bölgeleri kapsayacak primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. OTX2 geninin üç kodlayıcı ekzonu vardır. Son kodlayıcı ekzonun büyük olmasından dolayı OTX2 geni toplam dört bölüme ayrıldı.

OTX2 geninin bazı bölgeleri ile sekans homolojisi gösteren psödogeni de bulunmaktadır. OTX2P1 (Orthodenticle homeobox 2 pseudogene 1) olarak isimlendirilen psödogen tek bir kodlayıcı olmayan ekzondan oluşup intron içermemektedir. Aktif gene özgü primerler kullanılmıştır ve aktif gen amplifiye edilmiştir.

#### 3. 2.1.6.1. Primerlerin Sulandırılması

İlk olarak, OTX2 genini amplifiye etmek için kullanılacak primerlerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu işlem için liyofilize haldeki primerler hedef konsantrasyon 100 pmol/μl olacak şekilde distile suda çözdürüldü ve 100 μl'lik primer çözeltisi hazırlandı. Tüm çözeltiler -18/-20°C'de muhafaza edildi.

**Tablo 4.** OTX2 geni primer dizileri

Gen	Ekzon/ Bölüm	Forward primer (5'->3')	Reverse primer (5'->3')
OTX2	3	TTTAAAAGCCTCTGCCTCG	GAACAGGGTGTTCATCC
	4	GAGAGCATTGGTAGGCTCC	TCTCCACAGTCCCATACTCG
	5a	GAGCCATTCTTGTCTTAAGG	GAAGCTGGTGATGCATAG
	5b	CCACTGTCAGATCCCTTGT	AATGCCTGGCTAAAAGTGG

### 3.2.1.6.2. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması ve PCR koşulları

OTX2 geni 3, 4, 5a, 5b bölümleri *HelixAmp™ Ready-2XMultiplex version 2.0 PCR mix* (*NanoHelix*) kiti kullanılarak amplifiye edildi. Protokol kit içeriğinde belirtilen standartlara göre gerçekleştirildi:

- Her bir PCR reaksiyonu için, 12,5 µl *HelixAmp™ Ready-2X Multiplex PCR* master miksi, 2 µl distile su, 3 µl *5xTune up* solüsyonu, 0,5 µl *forward* primer, 0,5 µl *reverse* primer ve 20-30 ng/µl konsantrasyonda DNA, 0,2 ml'lik steril PCR tüplerine konuldu ve pipetaj ile karıştırıldı.
- Elde edilen karışım termal döngü cihazına yerleştirilerek PCR işlemi gerçekleştirildi. PCR tepkime koşulları **tablo 5'** te verilmiştir.

**Tablo 5.** *HelixAmp™ Ready-2XMultiplex version 2.0 PCR mix* kiti tepkime koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
<b>Başlangıç denatürasyonu</b>	94°C	15 dk	1
<b>Denatürasyon</b>	94°C	30 sn	35
<b>Primer bağlanması</b>	60°C	45 sn	
<b>Uzama</b>	72°C	45 sn	
<b>Son uzama</b>	72°C	7 dk	1
<b>Bekleme</b>	4°C		∞

### 3.2.1.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi ile Amplikonların Kontrolü

PCR reaksiyonu sonucu elde edilen amplikonlar %2'lik agaroz jelde 120 voltta (V) yaklaşık 20 dk yürütüldü ve doğru bölgelerin amplifiye olup olmadığının kontrolü yapıldı. Kullanılan kimyasallar **Tablo 6'** da verilmiştir.

**Tablo 6.** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar ve markaları

Malzeme	Marka
Agaroz	<i>Sigma</i>
Etidyum bromür	<i>Sigma</i>
<i>Orange G</i>	<i>Biological Industries</i>
DNA marker	<i>Fermentas, O'Range Ruler 100bp DNA Ladder</i>
0.5xTris borat EDTA (TBE) tampon solüsyonu	<i>AppliChem® (Tris-Hydrochlorid), Sigma (EDTA), Amresco® (borik asit)</i>

### 3. 2.1.6.3.1. Jelin Hazırlanışı ve Elektroforez Aşamaları

1. İki gr agaroz ve 35 ml 0,5XTBE, 100 ml'lik erlenmayer içine konulup, mikrodalga fırında eriyene kadar ısıtıldı.
2. Çözeltide berrak görünüm sağlandığında 1,8 µl etidyum bromür ilave edildi ve iyice karıştırılarak jel tepsinine döküldü ve jelin donması beklendi.
3. Jel tamamen donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi.
4. Parafilm üzerinde, 3 µl PCR ürünü ile 4 µl *Orange G* karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.
5. Amplikonların doğruluğunu kontrol etmek için her jele *marker* yüklendi.
6. Örnekler jelde 120 V akımda 20 dk yürütülerek beklenen baz çifti uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Her bir bölümde kaç baz çiftlik (bç) bölge çoğaltıldığı **Tablo 7**'de verilmiştir.

**Tablo 7.** OTX2 geni amplifiye edilen bölümleri ve fragment uzunlukları

Gen	OTX2			
	Bölüm 3	4	5a	5b
Fragment uzunluğu (bç)	409	372	451	470

7. Süre bitiminde jel, görüntüleme cihazı ile incelendi ve bağlı bulunduğu bilgisayardaki uygun program ile fotoğraflandı.
8. Uygun amplifiye olmayan amplikonlar için ilk PCR aşaması tekrar edildi ve tekrar jel kontrolü yapıldı.

### 3.2.1.6.4. PCR Ürünlerinin Enzimatik Yöntem ile Saflaştırılması

Uygun şekilde amplifiye olan ürünler, dNTP'leri, tek zincirli DNA ipliklerini ve primerleri uzaklaştırmak için *ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Affymetrix™)* kiti

kullanılarak pürifiye edildi. Kit içeriğinde bulunan *Exonuclease I* enzimi tek zincirli DNA ipliklerini ve primerleri uzaklaştırırken *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)* enzimi ortamdaki fazla dNTP'leri uzaklaştırır. Protokol kit içeriğinde belirtilen standartlara göre gerçekleştirildi:

1. Her bir reaksiyon için, 2 µl *ExoSAP-IT* reaktifi ile 5 µl PCR ürünü 0,2 ml'lik steril PCR tüplerine konulur ve pipetaj ile karıştırıldı.
2. Elde edilen karışım termal döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi. Tepkime koşulları **Tablo 8'** de verilmiştir.

**Tablo 8.** Birinci saflaştırma aşaması tepkime koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Enzim İnkübasyon	37°C	30 dk	1
Enzim inhibisyonu	80°C	15 dk	1
Bekleme	4°C		∞

#### 3.2.1.6.5. İkinci PCR Reaksiyonu

İkinci PCR aşamasında *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* kiti kullanıldı. Protokol kit içeriğinde belirtilen standartlara göre gerçekleştirildi:

1. Her bir PCR reaksiyonu için, 3 µl *dye saving*, 2 µl *1Xdilution buffer* (PCR için gerekli kimyasalları içerir), 2 µl distile su, 1 µl *BigDye Terminator v3.1 Cycle* [dideoksiribonükleozit trifosfatları (ddNTP) ve *AmpliTaq* DNA polimerazı içerir], 1 µl primer ve 1 µl saflaştırılmış PCR ürünü 0,2 ml'lik steril PCR tüplerine konuldu ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. OTX2 geni 5a partı için ikinci PCR reaksiyonu hem *forward* hem *reverse* primerler kullanılarak iki ayrı reaksiyon şeklinde gerçekleştirildi. Diğer bölümler için ikinci PCR reaksiyonunda *forward* primerler kullanıldı.
2. PCR tüplerindeki karışımlar otomatik ısı döngü cihazına yerleştirilerek tepkime gerçekleştirildi. PCR tepkime koşulları **Tablo 9'** da verilmiştir.

**Tablo 9.** İkinci PCR tepkime koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	96°C	1 dk	1
Denatürasyon	96°C	10 sn	25
Primer bağlanması	50°C	5 sn	
Uzama	60°C	4 dk	
Bekleme	4°C		∞

### 3.2.1.6.6. İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR sonrası bağlanmayan floresan boyaları, ddNTP'ler ve diğer PCR bileşenlerini ortamdan uzaklaştırmak amacıyla ikinci saflaştırma aşaması *ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™* kiti kullanılarak yapıldı. Protokol kit içeriğinde belirtilen standartlara göre gerçekleştirildi:

1. 240 µl *sequencing binding buffer* ile PCR ürünü 0,2 ml'lik PCR tüplerine konuldu ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
2. Karışım, toplama tüpüne yerleştirilen *Zymo-Spin™ IB* kolonlarına aktarıldı.
3. 15000 x g devirde 30 sn santrifüj edildi.
4. Kolona 300 µl *sequencing wash buffer* eklendi ve 15000 x g devirde 30 sn santrifüj edildi.
5. *Zymo-Spin™ IB* kolonu, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve önceki toplama tüpü atıldı.
6. Kolon matriksine denk gelecek şekilde 15 µl distile su eklendi ve 15000 x g devirde 15 sn santrifüj edildi.
7. *Zymo-Spin™ IB* kolon atıldı. Kapiller elektroforez cihazına yüklenmeye hazır ürünü içeren mikrosantrifüj tüpü +4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.2.1.6.7. PCR Örneklerin Kapiller Elektroforez Cihazına Yüklenmesi

Saflaştırılan PCR örnekleri, kapiller elektroforez cihazı (*Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer*) için uygun olan 96 kuyucuklu plaklara sırasıyla her bir kuyuya bir örnek gelecek şekilde yerleştirildi ve bu cihaz için uygun olan POP-7 polimeri kullanılarak yürütüldü.

### 3.2.1.6.8. Elektroferez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Örneklerin analizi, *CLC Genomics Workbench 3.6.5* ve *Sequencing Analysis 5.2* yazılım programları kullanılarak yapıldı. Elektroferez sonucu elde edilen pikler renklerine göre analiz edildi. Elektroferezde, yeşil renk adenin, siyah renk guanin, kırmızı renk timin ve mavi renk sitozin bazını gösterir. Analiz sonuçları, ilgili genin referans dizisi ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Olgularda saptanan daha önce literatürde tanımlanmamış değişimlerin patolojik olup olmadığı, *Prediction of functional effects of human nsSNPs (PolyPhen-2)* ve *Mutation Taster* modelleme programları ile ve anne-babada bulunup bulunmadığına göre değerlendirildi.

### 3.2.2. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) tek bir multipleks PCR reaksiyonu ile pek çok DNA dizisinin rölatif kopya sayısı değişimlerini belirleyen semi kantitatif bir tekniktir. Çalışmamızda hasta DNA' larındaki delesyon ve duplikasyonları belirlemek için MRC-Holland firmasının SALSA MLPA P429 SDHA-MAX probemix kiti kullanılmıştır. Bu kit paraganglioma ve feokromastomalı hastalarda mutasyonu saptanan SDHA (Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit a, Flavoprotein) geninin 10 ekzonu ve MAX (MAX protein) geninin 5 ekzonuna spesifik problemler içermektedir. 15 adet referans probun yanısıra SDHA geni için 4 komşu prob ve MAX geni için 5 komşu prob kit içeriğinde bulunmaktadır. Komşu problemlerin kite eklenmesinin amacı delesyon/duplikasyonun boyutunun belirlenmesini kolaylaştırmaktır. Kite bulunan komşu problemlerden biri 14q22.3 bölgesinde bulunan OTX2 geninin beşinci ekzonuna yönelik probtur. Probun ligasyon bölgesine komşu olan 24 nükleotitlik dizi, TCCTGCATGCAG-AGGTCCTATCCC nükleotitlerinden oluşmaktadır. OTX2 geni MLPA analizi için uygulanan basamaklar aşağıda belirtilmiştir:

1. Beş ml periferik kan örneğinin etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren steril tüplere alınması
2. Periferik kandan DNA izolasyonu
3. İzole edilen DNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi
4. Her bir MLPA reaksiyonu için 5 µl hacimde 50-250 ng DNA bulunması hedeflendi.
5. Her bir MLPA reaksiyonu için referans örnekler seçildi. Her yürütmede en az 3 farklı referans örnek bulunmaktaydı. Referans örnekler genellikle normal kopya sayısına sahip



olması beklenen sağlıklı bireylerden elde edildi. MLPA reaksiyonu için gereken tepkime koşulları **tablo 10'** da verilmiştir.

**Tablo 10:** MLPA reaksiyonu için PCR programı

Aşama	Sıcaklık	Süre
<b>Denatürasyonu</b>	98°C	15 dakika
	25°C	pause
<b>Hibridizasyon reaksiyonu</b>	95°C	1dakika
	60°C	pause
<b>Ligasyon reaksiyonu</b>	54°C	Pause
	54°C	15 dakika
	98°C	5 dakika
	20°C	pause

6. 0.2 ml lik tüplere 5 µl de 200 ng DNA olacak şekilde eklendi.

7. PCR cihazına tüpler yerleştirildikten sonra MLPA programı seçilerek örnek DNA' sını 98°C' de 15 dakika boyunca denatüre edildi. Sıcaklık 25°C ye ulaştınca reaksiyon durduruldu.

8. Probemix p429' tan örnek başına 1,5 µl ve SALSA MLPA buffer' dan örnek başına 1,5 µl olacak şekilde hibridizasyon master miksi hazırlandı ve vortekslendi.

9. Her bir örneğin üzerine 3 µl hibridizasyon master miksi eklenip pipetaj yapıldı. PCR programına devam edildi, 1 dk 95°C' de ,sonra 60°C de 16-20 saat boyunca inkübe edildi.

10. Ligaz bufer kullanmadan önce vortekslenir. Ligaz 65 master miksi hazırlanır.

**Tablo 11.** Ligaz 65 master miksi içeriği

<b>Ligaz-65 master miksi</b>	
<b>Ligaz buffer A</b>	3 µl
<b>Ligaz buffer B</b>	3 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	25 µl
<b>Ligaz 65 enzimi</b>	1 µl

11. PCR sıcaklığı 54°C' ye gelince reaksiyon durdurulur. Cihazın üstünde örnek başına 32 µl ligaz miksi eklenir. Ligasyon için 54°C de 15 dakika inkübasyon gerçekleştirilir. Ligaz 65 enzimini ısıyla inaktive edilmesi için 98°C de 5 dakika boyunca bekletilir. Sıcaklık 20°C' ye gelince reaksiyon durdurulur.

12. Polimeraz master miksi hazırlanır, pipetaj yapılır.

**Tablo 12.** Polimeraz master miks içeriği

Polimeraz master miks	
dH2O	7.5 µl
SALSA PCR primer mix	2 µl
SALSA Polymerase	0.5 µl

13. Sıcaklık 20°C' ye ulaşınca örnek başına 10 µl polimeraz mix eklenir. MLPA PCR programı seçilir.

**Tablo 13.** MLPA PCR programı

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon	95°C	30 sn	35
Primer bağlanması	60°C	30 sn	
Uzama	72°C	60 sn	
Son uzama	72°C	20 dakika	
Bekleme	15°C	∞	

14. PCR bitince 10 µl formamid, 0,5 µl size standart ile miks hazırlanır, vortekslelendikten sonra 10 ar µl örnek başına dağıtılır. Karışımın üzerine 1 µl PCR ürünü eklenir.

15. 4 dakika boyunca denatüre edilir,

16. 2 dakika -20°C' de bekletildikten sonra kapiller elektroforez cihazına örnekler yüklenir.

17. Verilerin analizi için Coffalyser programı kullanılır. Her bir örneğe ait floresan pikin rölatif boyutu referans örneklerle karşılaştırılarak veriler yorumlanır.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Hastaların Demografik Özellikleri**

Bu çalışma 01.11.2015 - 01.11.2016 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Son on yıl içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na başvuran hastaların dosyalarının retrospektif olarak incelenmesi sonucunda Goldenhar sendromu klinik bulgularını karşılayan 27 hasta araştırmaya dahil edildi. Hastaların yaşları 4 ay- 28 yaş arasındaydı. Çalışma grubunun %67'si erkek (n=18), %33'ü kız (n=9) hastalardan oluşmaktaydı.

### **4.2. Hastaların Prenatal, Perinatal ve Soygeçmiş Özellikleri**

On hastanın doğum ağırlığı normal aralıkta iken yedi hastada düşük doğum ağırlığı olduğu tespit edildi. Bir hastada overgrowth dışında kalan beş hastanın doğum kilosu tıbbi kayıtlara geçmemişti ve aileler tarafından hatırlanmıyordu.

Dört hastada (hasta 7, 17, 19, 24) prematüre doğum öyküsü mevcuttu. Yedi numaralı hastanın annesinde preeklamsi öyküsü de mevcuttu.

İki hasta (hasta 3 ve 17) ikiz eşiydi. Her iki hastanın ikiz eşinde benzer bulgu veya herhangi bir dismorfik bulguya rastlanmadı. Üçüncü hastanın cinsiyeti kız, ikiz eşi ise erkekti. Cinsiyetlerin farklı olması nedeniyle dizigotik ikiz oldukları düşünüldü, ayrıca dikoryonik oldukları öyküde belirtilmişti. On yedinci hasta ve ikiz eşinin cinsiyetleri erkekti. Anneleri doğum sonrasında vefat eden ikizlerin öyküsü halalarından alındı; monozigotik-dizigotik ayrımı yapılabilmesi için öyküden yeterince veri elde edilemedi.

Prenatal dönemde oligohidramnios 8 ve 16 nolu hastada saptanmıştı. Polihidramnios ise 18 ve 26 nolu hastada mevcuttu. Bir hastada IVF (in vitro fertilizasyon) gebelik öyküsü bulunmaktaydı (10 nolu hasta). Gebelik sırasında maternal hastalık, ilaç kullanımı, X ışını ve teratojen maruziyeti, sigara ve alkol öyküsü sorgulandığında bir hastada (hasta 12) maternal sigara kullanımı, bir hastada ise (hasta 16) maternal gestasyonel diyabetes mellitus öyküsü olduğu öğrenildi. Bir hastada (hasta 18) üçlü tarama testinde risk artışı nedeniyle amniyosentez yapılmış, karyotip analizi normal olarak raporlanmıştı. Hastaların hiçbirinde hipoksik doğum öyküsü mevcut değildi.

Hastaların pedigrileri incelendiğinde %26' sında akraba evliliği olduğu görüldü. Ailede hastalarla benzer bulguları taşıyan bireyler olup olmadığı araştırıldığında bir hastanın (hasta 6) kız kardeşinde ve dayısının oğlunda dış kulak yolu atrezisi; dayısının torunlarında ise mikrotia bulgusunun olduğu görüldü.

### 4.3. Hastaların Klinik Bulguları

Hastaların klinik bulguları tablo 14' te verilmiştir. Yüz bulguları hastaların % 44.4' ünde (n= 12) bulunmaktaydı. Hastaların %11.1' inde (n= 3) maksiller/mandibular hipoplazi, %14.8' ünde (n= 4) yarık dudak/damak, %37' sinde fasiyal asimetri (n= 10) mevcuttu.

Hastaların %18.5' inde (n=5) mikro/retrognati mevcuttu.

Göz bulguları hastaların %48.1' inde (n= 13) bulunmaktaydı. Hastaların %3.7' sinde (n=1) epibulbar dermoid, %37' sinde mikroftalmi (n= 10), %7.4' sinde (n= 2) anoftalmi, %3.7' sinde (n=1) üst gözkapığı kolobomu vardı. Ayrıca hastaların %11.1' inde (n= 3) optik disk kolobomu tespit edilmişti.

Kulak anomalisi hastaların %62.9 ' unda (n= 17) bulunmaktaydı. %22.2' sinde mikrotia (n= 6), %7.4' ünde anotia (n=2), %18.5' inde aural atrezi (n=5), %7.4' ünde kulak displazisi (n=2), %33.3' ünde preaurikular skin tag (n= 9), %3.7' sinde preauriküler sinüs/pit (n= 1) mevcuttu. Ayrıca hastaların %18.5' inde (n= 5) işitme kaybı olduğu görüldü.

Vertebra anomalisi hastaların %18.5' inde (n= 5) görüldü. %14.8' inde (n= 4) skolyoz, %7.4' ünde (n= 2) hemivertebr, %3.7' sinde (n= 1) L<sub>2-3</sub> te füzyon mevcuttu.

Hastaların %29.6' sında konjenital kalp hastalığı bulunmaktaydı. (n= 8). Hastalarda gözlenen kalp hastalıkları arasında aort koarktasyonu (%3.7' sinde), patent duktus arteriozus (%7.4' ünde), atrial septal defekt (%7.4' ünde), biküspit aortik valv (%3.7' sinde), triküspit yetmezliğiyle birlikte patent foramen ovale (%3.7' sinde) ve ventriküler septal defekt (%3.7' sinde) bulunmaktaydı. Ventriküler septal defekti olan hastanın dekstroversiyonu da bulunmaktaydı.

Özafagus atrezisi hastalarda bulunan tek gastrointestinal anomalisi olup yalnızca bir hastada bulunmaktaydı (%3.7)

Santral sinir sistemi anomalisi hastaların %7.4' ünde (n= 2) bulunmaktaydı. Bir hastada korpus kollozumda incelmeye, frontal ve serebellar atrofi mevcutken başka bir hastada ise sağ serebral parietal parankimde kortikal displazi alanları, falks serebri defekti, posterior fossada inferior vermis hipoplazisi saptanmıştı.

Hastaların %29.6' sında (n= 8) ürogenital anomalisi mevcuttu. Renal agenezi %3.7' sinde (n=1), çift tolayıcı sistem %7.4' ünde (n=2), bilateral VUR %3.7' sinde (n=1), toplayıcı yapılarda dilatasyon %3.7' sinde, medüller nefrokalsinozis %3.7' sinde (n=1) mevcuttu. Genital anomalisi olarak %7.4' ünde inmemiş testis (n=2), %3.7' sinde hidrosel (n=1) bulunmaktaydı.

**Tablo 14.** Hastaların demografik özellikleri ve klinik bulguları

Olgular	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cinsiyet	E	K	K	K	E	E	E	E	E	E	E	K	K	K
İlk değerlendirme yaşı	4y	1y	2y	7y	2y	28y	1y	16y	1y	5y	5y	9 ay	10 ay	3y
Maksiller/mandibular hipoplazi														
Yarı dudak/damak			+											
Makrostomi														
Epibulbar dermoid														
Mikroftalmi			+		+		+						+	+
Anoftalmi											+			
Üst göz kapağı kolobomu														
Mikrotia			+			+		+	+					
Anotia														
Aural atrezi			+			+			+			+		
Kulak displazisi												+		
Preauriküler tag	+	+		+			+			+				
Preauriküler sinüs/pit								+						
İşitme kaybı			+			+			+					
Fasiyal asimetri	+		+	+	+	+	+							+
Mikrognati/retrognati		+		+				+						+
Vertebra anomalisi	+							+						
Konjenital kalp hastalığı	+	+	+				+	+						
Gastrointestinal anomalisi														
Santral sinir sistemi anomalisi			+											
Ürogenital anomalisi	+				+				+					
Diğer						Tırnakta distrofi	Başparmak bifid	Mikrosefali yele boyun, pektus ekskavatus		pitozis	Kepece kulak		kolobom	hipotiroidi

Olgular	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Cinsiyet	E	E	E	K	E	E	E	E	E	E	K	E	K
İlk değerlendirme yaşı	4y	3y	3y	2y	3y	6y	8y	2y	3y	4 ay	21 y	6y	5y
Maksiller/mandibular hipoplazi						+	+				+		
Yarı dudak/damak							+	+					+
Makrostomi													+
Epibulbar dermoid													+
Mikroftalmi	+	+	+					+	+				
Anoftalmi				+									
Üst göz kapağı kolobomu													+
Mikrotia	+									+			
Anotia					+		+						
Aural atrezi	+												
Kulak displazisi											+		
Preauriküler tag	+					+					+	+	
Preauriküler sinüs/pit													
İşitme kaybı				+	+								
Fasiyal asimetri	+										+	+	
Mikrognati/retrognati		+											
Vertebra anomalisi						+					+	+	
Konjenital kalp hastalığı	+				+	+							
Gastrointestinal anomalisi												+	
Santral sinir sistemi anomalisi				+									
Ürogenital anomalisi										+	+		
Diğer	kolobom	katarakt		Koanal atrezi		Anal stenoz, 1.parmak kemik hipoplazisi			Persistan fetal vaskülatür	Hipotoni, hipotiroidi		Bifid uvula, abduzens paralizisi, omuz asimetrisi	Koanal atrezi, mikrosefali, optik disk kolobomu

**Hasta 1:** 4 yaş 8 aylık erkek hastanın fizik muayene bulguları arasında fasial asimetri ve sağ preaurikular skin tag bulunmaktaydı. Renal agenezisi olan hastada gözlenen vertebra anomalileri hemivertebra ve rotoskolyozdu. Bir buçuk aylıkken aort koarktasyonu nedeniyle opere edilmişti. Dört yaşında yapılan Denver gelişim testinde her alanda gerilik saptanmıştı. İki kez febril konvülsiyon geçirdiği için nörolojide takip edilmekteydi, antiepileptik ilaç kullanılmaktaydı. Kranial manyetik rezonans görüntülemesi normaldi.

**Hasta 2:** Bir yaşındaki kız hasta 37. gestasyonel haftada C/S (sezaryan) ile 2100 gram (düşük doğum ağırlıklı) doğmuştu. Fizik muayenede sol gözde nodüler korneal opasite, dar alın, dolgun burun kemeri (gaga burun), belirgin kolumella, ince üst dudak, dar damak, sol kulak önünde ve sol yanakta skin tag, mikroretrognati saptandı. Ekokardiyografide ise ince patent duktus arteriozus ve patent foramen ovale tespit edildi.

**Hasta 3:** Otuz altıncı gestasyonel haftada C/S ile 2000 gram, ikiz eşi olarak doğan iki yaşında kız hasta yarık dudak damak nedeniyle on beş gün küvözde kalmış. Sekiz aylıkken yarık dudak damak için opere olmuş. Hastanın fasiyal asimetrisi, sağ gözünde mikroftalmi, sağ parietalde kemik defekti, dış kulak yolu atrezisi ve mikrotiası mevcuttu. Sağ kulağında orta derecede işitme kaybı olup sol kulakta işitmesi normaldi. Dış-orta-iç kulak bilgisayarlı tomografide sağda atrezik kulak ve dış kulak yolu, dismorfik orta kulak kemikçik yapıları görülmüş. Kranial manyetik rezonans görüntülemesinde ise sağ parietal bölgede kemik defekti, ansefalosel, sağ serebral parietal parankimde kortikal displazi alanları, falks defekti, posterior fossada inferior vermis hipoplazisi, kafa şeklinde plagiosefali saptanmış. Nöromotor gelişim sorgulandığında hastanın geç yürüdüğü (on sekiz aylıkken yürüme yok), diğer gelişim basamaklarının yaşıyla uyumlu olduğu öğrenildi. İkiz eşi sağlıklıydı.

**Hasta 4:** 7 yaş 2 aylık kız hastanın prenatal öyküsünden intauterin gelişme geriliği olduğu öğrenildi. Miadında NSVY (normal spontan vajinal yol ile) ile 2140 gr (düşük doğum ağırlığı) doğan hastanın nöromotor gelişim basamakları yaşıyla uyumluymuş. Yüzde asimetrisi, aşağıya dönük palpebral fisürleri, bilateral preauriküler skin tag, belirgin kulakları, retromikrognatisi ve yüksek damağı olan hastanın diğer sistem muayeneleri ve fizik muayene bulguları olağandı.

**Hasta 5:** 2 yaş 3 aylık erkek hastanın sağ gözde mikroftalmi, fasial asimetri, inmemiş testisi vardı. Hastanın kas tonusu değerlendirildiğinde hipotonik olduğu görüldü.

**Hasta 6:** Yirmi sekiz yaşında erkek hastanın anne ve babası arasında birinci kuzen evliliği mevcuttu. Bilateral mikrotia, her iki dış kulak yolu atrezik, sağ göz kapağında pitozis, sağ göz yukarı bakışta kısıtlılık, yüzde asimetrisi olan hasta işitme cihazı kullanıyor. Her iki el

üçüncü ve dördüncü parmaklarında hipertrofik tırnak distrofisi olan hastanın gelişiminde gerilik olup okuduğunu kısmen anlayabiliyor. Hastanın on beş yaşında vefat eden kız kardeşinde görme kaybı, bilateral dış kulak yolu atrezisi, hipertrofik tırnak distrofisi, özafagus atrezisi ve gelişme geriliği; doğar doğmaz vefat eden kuzeninde dış kulak yolu atrezisi; dayısının torunlarında da dış kulak yolu atrezisi ve hipertrofik tırnak distrofisi olduğu öğrenildi.

**Hasta 7:** Prenatal dönemde intrauterin gelişme geriliği ve maternal preeklampsi öyküsü olan bir yaşında erkek hasta yirmi dokuzuncu gestasyonel haftada C/S ile 1460 gram doğmuş Preterm doğum, düşük doğum ağırlığı ve hipoglisemi nedeniyle bir ay boyunca prematüre yoğun bakım ünitesinde yatış öyküsü mevcut. Dismorfik bulguları arasında geniş alın, fasiyal asimetri ,sağ gözde mikroftalmi, hipertelorizm, epikantus, basık burun kökü, bifid sağ el baş parmağı, sağ yanakta ve sol preauriküler bir adet, sağ preauriküler üç adet skin tag, sol ayakta 2-3. parmaklarda kutanöz sindaktili görüldü. Testisleri bilateral palpabl olan hastanın hidroseli mevcuttu. Baş çevresi doksan persentilde, boyu elli persentilde ve kilosu üç persentilin altında olan hastaya çekilen ekokardiyografide sekundum tip atrial septal defekt tespit edilmiştir.

**Hasta 8:** Prenatal ultrasonografide böbrekte ekojenite şüphesiyle ve oligohidramnios nedeniyle takip edilen on altı yaşında erkek hasta C/S ile 2100 gram doğmuş (düşük doğum ağırlığı). Nöromotor gelişiminde gerilik olan hastanın boy ve kilosu da yaşitlarına göre geriymiş. Hastanın fizik muayene bulguları arasında mikrosefali, sağ kulak önünde pit, bilateral mikrotia, mikroretrognati, yüksek damak dişlerde düzensizlik, yele boyun, pektus ekskavatus, elde üçüncü parmakta klinodaktili, kuru cilt, ayak ikinci ve üçüncü parmak üst üste binmiş, skolyoz bulunmaktaydı. İşitme her iki kulakta normaldi. Bilateral vezikoureteral reflüsü olan hastanın sağ böbrekte çift toplayıcı sistemi bulunmaktaydı. Hipotiroidi nedeniyle takipli olan hastaya çekilen ekokardiyografide biküspit aortik valv, birinci derece aort yetmezliği, hafif düzeyde valvuler pulmoner stenoz saptandı.

**Hasta 9:** Bir yaşında erkek hastanın natal öyküsünden miadında, C/S ile 3690 gram olarak doğduğu öğrenildi. Sağ dış kulak yolu atrezisi ve mikrotiası olan hastanın sağ kulağında iletim tipi işitme kaybı bulunmaktaydı. Diğer fizik muayene bulguları arasında dolgun burun kemeri, hafif pes ekinovarus ve testiste hiperpigmentasyonu bulunan hastaya bir aylıkken çekilen batın ultrasonografisinde toplayıcı yapıların hafif dilate olduğu görüldü. Ancak bir yaşında çekilen batın ultrasonografisinde toplayıcı yapıların normal olduğu görüldü.

**Hasta 10:** İn vitro fertilizasyon yöntemiyle dünyaya gelen beş yaşında erkek hasta prenatal dönemde böbrekte kist ve bilateral pelviektazi nedeniyle takip edilmiş. Otuz yedinci

gestasyonel haftada C/S ile 2750 gram doğmuş. Fizik muayene bulguları arasında sağ gözde pitoz, sağ preauriküler skin tag, iki adet sakral dimple, sağ inmemiş testis ve sağ inguinal hernisi bulunan hastanın renal ultrasonografisinde sağ böbrekte milimetrik kortikal kist saptandı.

**Hasta 11:** Anne ve babası arasında birinci derece kuzen evliliği olan beş yaşında erkek hasta miadında NSVY ile 3500 gram doğmuş. Nöromotor gelişim basamaklarında gerilik olan hastanın bilateral anoftalmisi, kepçe kulakları, bilateral elde beşinci parmakta klinodaktilisi mevcuttu. Kranial manyetik rezonans görüntülemesinde her iki göz küresinin yerinde kistik oluşumlar, her iki optik sinirde ileri hipoplazi izlendi.

**Hasta 12:** Prenatal dönemde maternal sigara kullanım öykü olan dokuz aylık kız hasta kırkıncı gestasyonel haftada NSVY ile 3600 gram doğmuş. Atrezik sol dış kulak yolu, disgenetik kulak kepçesi, basık burun kökü, hafif hipertelorizmi olan hastanın transfontanel ultrasonografisinde sağ lateral ventrikül gövde yerleşimli koroid pleksus içerisinde 3 milimetrik rastlantısal kistik lezyon ve ekokardiyografisinde patent foramen ovale saptanmıştır.

**Hasta 13:** Anne babası teyze çocukları olan on aylık kız hasta miadında C/S ile 4495 gram doğmuş. Sağ gözde mikroftalmi, optik disk ve koroidal kolobom, epikantus, basık burun kökü, ayakta ikinci ve üçüncü parmakta üst üste binme saptanan hastanın amcasında sağ gözde konjenital katarakt öyküsü mevcut.

**Hasta 14:** Anne ve babası aynı köyden (Köyün 300 haneli olduğu belirtildi) olan üç yaşında kız hasta miadında NSVY ile 2000 gram (düşük doğum ağırlığı) doğmuş. Mikrocefali, sağ gözde mikroftalmi, yüzde hafif asimetri, mikrognati, geniş belirgin filtrumu olan hasta konjenital hipotiroidi nedeniyle takip edilmiş. Öyküsünde kapanmış atrial septal defekti olan hastanın çekilen kemik surveyde uzun kemiklerde ekstremite proksimallerinde minör kısa görünüm saptanmış. Orbitanın manyetik rezonans görüntülemesinde sağ gözde mikroftalmi, sağ optik sinirde atrofi olduğu görülmüş.

**Hasta 15:** Fasial asimetri, mikroftalmi, preaurikular skin tag, dış kulak yolu atrezisi, mikrotia, pes ekinovarusu olan dört yaşında erkek hastanın göz muayenesinde sol optik disk kolobomu saptanmış. Ayrıca ekokardiyografide patent foramen ovale ve üçüncü derece triküspit yetmezliği görülmüştür.

**Hasta 16:** Prenatal dönemde maternal gestasyonel diyabetes mellitus ve polihidramnios öyküsü olan üç yaşında erkek hasta otuz sekizinci gestasyonel haftada C/S ile 2850 gram doğmuş. Hastanın fizik muayenesinde geniş ve belirgin alın, mikroftalmi, konjenital katarakt, hipotelorizm, basık burun kökü, gaga burun, yukarı dönük burun delikleri, mikrognati, düşük



kulak, küçük ağız mevcuttu. Kemik survey lordoz artışı dışında normaldi. Göz muayenesi sağda total katarakt, solda kuneiform katarakt, bilateral mikroftalmi saptanan hastanın galaktozemi açısından bakılan metabolik testleri normaldi. On yedi aylıkken yapılan gelişim testinde dil gelişiminde gerilik tespit edilmişti.

**Hasta 17:** Otuz beşinci gestasyonel haftada C/S ile 1870 gram, ikiz eşi olarak doğan üç yaşında erkek hasta postnatal dönemde prematürite nedeniyle küvözde kalmış. Hastanın fizik muayenesinde sol gözde mikroftalmi, basık burun kökü, yukarı dönük burun delikleri mevcuttu. Orbita manyetik rezonans görüntülemesinde sol bulbus okulinin normal morfolojide olmadığı görülmüş, TORCH paneli ise negatif olarak sonuçlanmış. Kranial manyetik rezonans görüntülemesinde her iki serebral hemisferde periventriküler alanda ve sentrum semiovale düzeyinde T2 ağırlıklı sinyal artışı görülmüş ve myelizan sürecin değerlendirilmesi için motor mental gelişimle değerlendirilmesi önerilmiş. Hastanın öyküsünden nöromotor gelişim basamaklarının yaşıyla uyumlu olduğu öğrenildi. İkiz eşinde benzer bulgulara rastlanmamıştır.

**Hasta 18:** Anne ve babası ikinci kuzen olan iki yaşında kız hastaya prenatal dönemde yapılan üçlü tarama testinde risk artışı saptanması üzerine amniyosentez yapılmış. Amniyon sıvısından yapılan karyotip analizi normal sonuçlanan hasta ayrıca prenatal dönemde polihidramnios nedeniyle de takip edilmiş. Natal öyküsünden miadında C/S ile 3300 gr doğduğu öğrenilen hasta postnatal yirminci günde koanal atrezi nedeniyle opere edilmiş. Fizik muayenesinde makrosefali, frontal bossing, bilateral anoftalmi, çökük göz küreleri, belirgin burun kökü, düşük kulak, yüksek damak, umbilikal herni, ekstremitelerde tonus artışı, bilateral pes ekinovarus saptanan hastanın her iki kulağında orta derece iletim komponentli işitme kaybı bulunmaktaydı. Ekokardiyografide patent foramen ovale saptanan hastanın kranial manyetik rezonans görüntülemesinde koanal atrezi, şiddetli hipoplazik göz küresi, optik sinir normalden ince, korpus kallosum ince olduğu görülmüş. Takipleri sırasında yeniden çekilen kranial manyetik rezonans görüntülemesinde ise ince korpus kallosuma ek olarak serebellar atrofiye bağlı posterior fossada subaraknoid mesafe ve dördüncü ventrikülde genişleme, frontal bölgede atrofi saptanmış. Dirençli epilepsi, büyüme gelişme geriliği ve nöromotor retardasyon nedeniyle hasta takip ediliyor.

**Hasta 19:** Yirmi sekizinci gestasyonel haftada, antenatal bir doz steroid alarak, sekiz saat erken membran rüptürü ile C/S ile 1067 gram doğan üç yaşında erkek hasta doğum sonrası entübe olarak prematüre yoğun bakımda izlenmiş. Fizik muayene bulguları arasında trigonosefali, metopik ridge, dar alın, bilateral epikantus, sağ aurikula agenezisi, sağ inguinal herni, umbilikal herni, ayaklarda bilateral ikinci ve dördüncü parmakta üst üste binme

saptandı. İşitme testinde sağ kulakta işitme kaybı saptandı, sol kulakta ise işitme normaldi. Temporal kemik bilgisayarlı tomografisinde bilateral vestibül ve semisirküler asimülasyon, bilateral sağda daha belirgin dış kulak yolunda stonik görünüm tespit edilen hastanın ekokardiyografisinde ince patent duktus arteriozus mevcuttu.

**Hasta 20:** Altı yaşında erkek hastanın natal öyküsünden miadında 2300 gr, NSVY ile doğduğu öğrenildi. Fizik muayenesinde sol hemifasiyal mikrozomi, sol preauriküler skin tag, solda düşük kulak, sol ağız kenarında skar (skin tag eksize edilmiş), kısa boyun, sol el baş parmak hipoplazik, sakral dimple olduğu görüldü. Nöromotor gelişim basamaklarında gerilik gözlenmeyen hastanın geçirdiği operasyonlar arasında yarık dudak onarımı ve sol yanakta skin tag eksizyonu bulunmaktaydı, ayrıca hastada anal stenoz öyküsü de mevcuttu. Ekokardiyografisinde ventriküler septal defekt ve dekstroversiyonu olduğu görülen hastanın ventriküler septal defekti ileriki dönemlerde kapanmış. Transfontanel ultrasonografisinde üçüncü ve lateral ventrikülde minimal genişleme, sağ lateral ventrikülde milimetrik çaplı birkaç adet koroid pleksus kisti saptanan hastanın torakal manyetik rezonans görüntülemesinde serviko-torakal skolyoz, servikotorakal bileşke düzeyinde üst torakal düzeyde vertebra morfolojisinde hemivertebra ve kama vertebra benzeri patoloji görülmüş. Karşılaştırmalı çekilen el grafisinde sağ el kemikleri normal iken sol elde saptanan bulgular şu şekildeydi: Baş parmak hipoplazik ve elin radyal tarafından bir ek şeklinde ele bağlantılıdır. Birinci metakarp rudimenter olup karpal kemikler ile ilişkisizdir. Birinci ve ikinci falanksları hipoplaziktir.

**Hasta 21:** Miadında 2800 gr C/S ile doğan sekiz yaşında erkek hastada postnatal yirmi ikinci günde yarık damak olduğu farkedilmiş. Fizik muayenesinde sol hemifasiyal mikrozomi ve sol anotia saptanan hastanın bilateral işitmesi normal olduğu saptanmış. Bir yaşındayken sekonder inkomplet yarık damak onarımı geçirmiş, dört yaşında geçirdiği damak fistülü operasyonu sonrasında konuşmaya başlamış. Miyop nedeniyle gözlük kullanan hastanın sol gözünde ambliyopi mevcut. Okul başarısı iyi, uzak akrabalarından birinde sol mikrotia ve sol hemifasiyal mikrozomi olduğu öğrenildi.

**Hasta 22:** Miadında C/S ile 3700 gram doğan 2 yaşında erkek hastanın sağ gözünde mikroftalmi, geniş burun yapısı, dolgun burun ucu, basık burun kökü, prognatizm, uzun filtrum, ince üst dudağı mevcuttu. İşitme testi normal olan hastanın TORCH paneli negatifti. Eşlik eden iç organ anomalisi bulunmayan hastanın gelişim basamakları yaşıyla uyumluydu.

**Hasta 23:** Miadında C/S ile 3200 gram doğan üç yaşında erkek hastanın fizik muayenesinde sol mikroftalmi, dil altında frenulum, konjenital penil kurvatür, hipospadias; ekokardiyografisinde ise patent foramen ovale saptandı. Orbitanın manyetik rezonans

görüntülemesinde bilateral bulbus küçük, lens dismorfik, solda posteriora uzanan lineer hipointens bant, her iki optik sinirde incelme tespit edildi. Göz muayenesinde aksiyal uzunluk sağda 16,30 mm, solda: 15,30 mm olarak ölçüldü; sol mikroftalmi ve sol primer fetal vaskülatür saptandı. Büyüme geriliği, kilo alım azlığı nedeniyle gastroenteroloji bölümünce takip ediliyor. Nöromotor gelişim basamakları yaşıyla uyumlu.

**Hasta 24:** Anne ve babası arasında birinci dereceden akrabalık bulunan dört aylık erkek hastanın doğumu otuz ikinci gestasyonel haftada gerçekleşmiş. Postnatal kırk sekizinci saatte dissemine intravasküler koagülasyon, hipotoni ve prematürite nedeniyle entübe edilmiş. Fizik muayenesinde hipotonisite, bilateral mikrotia ve rölatif makrosefali tespit edilmiş. Hipotiroidisi olan hastaya çekilen abdominal ultrasonografide safra kesesi duvar kalınlığında hafif artma, her iki böbrekte medüller nefrokalsinozisle uyumlu perimedüller ekojenite artışı tespit edilmiş. Transfontal ultrasonografide her iki lateral ventrikülde hafif dilatasyon, beyin manyetik rezonans görüntülemesinde ise her iki serebral hemisfer beyaz cevherde yaş ile uyumlu difüz hipomyelinizan alanlar görüldü. Ekokardiyografisinde patent foramen ovale saptanan hastaya pompe hastalığı ve sfingolipidoz öntanısıyla metabolik tetkikler yapılmaktadır. İşitme testi normal olan hastaya yapılan göz muayenesinde alt retinada difüz hemoraji dışında (doğum travmasına bağlı olabileceği düşünülmüş) anormallik saptanmamış.

**Hasta 25:** Anne ve babası birinci kuzen olan yirmi bir yaşında kız hastanın öyküsünden miadında NSVY ile düşük doğum ağırlıklı doğduğu öğrenildi. Fizik muayenede yüzde asimetri, sol mandibulasa hipoplazi, belirgin burun, sağ kulakta displastik görünüm, sağ preauriküler skin tag (iki adet), skolyoz, kubitus valgus saptandı. Üriner sistemde çift toplayıcı kanal anomalisi olan hastanın septum deviasyonu ve nazal polip nedeniyle operasyon öyküsü mevcuttu. Gelişim basamaklarının yaşıyla uyumlu olduğu öğrenildi.

**Hasta 26:** Prenatal dönemde polihidramnios öyküsü olan altı yaşında erkek hasta miadında NSVY ile 3750 gram doğmuş. Postnatal üçüncü günde özafagus atrezisi nedeniyle opere olmuş. Bir aylıkken diafragma evantrasyonu nedeni ile diyafragma plikasyonu uygulanmış. Beş yaşındayken sol kulak önünde üst ve alt olmak üzere iki adet polipoid kitle, sağ yanakta içerisinde sert silindirik oluşum mevcut olan polipoid kitle eksizyonu yapılmış. Fizik muayenesinde yüzde asimetri, sağ preauriküler skin tag, bifid uvula, bilateral abduzens paralizisi, omuz asimetrisi (sağ omuz sola göre yukarda) mevcut. Büyüme geriliği ve kilo alım azlığı nedeniyle gastroenteroloji bölümü tarafından takip ediliyor. Lumbosakral vertebra grafisinde ikinci ve üçüncü lumbar vertebralarda füzyon saptanan hastanın görme ve işitmesi normal.

**Hasta 27:** Otuz yedinci gestasyonel haftada C/S ile 2100 gram doğan (düşük doğum ağırlığı) beş yaşında kız hastanın bulguları mikrosefali, sağ göz kapağı kolobomu, sağ koanal atrezi, bifid uvula, üst dudakta yarık damak operasyon skarı, aşağı yerleşimli sağ meme başı, omuz asimetrisiydi (sağ omuz sola göre aşağıdaydı). Hasta üst dudak sol lateralinde inkomplet yarık dudak nedeniyle opere edilmişti. Hastanın kranial manyetik rezonans görüntülemesi ve vertebra grafisi normaldi. Göz muayenesinde sağ üst ve alt göz kapağı medialinde kapak kolobomu, sağ gözde medialde limbal dermoid ve sağ optik disk kolobomu saptanmıştı. İşitme testi normal olan hastanın gelişim basamakları yaşıyla uyumluuydu.

#### **4.4. Hastalara uygulanan genetik testler**

Hastalara uygulanan genetik testler arasında karyotip analizi, 22q11 FISH analizi, CHARGE FISH analizi, CHD7 geni dizi analizi, CHD7 geninde MLPA ile delesyon/duplikasyon analizi, PAX6 geni dizi analizi, OTX2 geni dizi analizi ve OTX2 geninde MLPA ile delesyon/duplikasyon analizi bulunmaktaydı.

Kromozom analizi uygulanan bütün hastalarda (hasta 1, 3, 4, 5, 8, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 26 ve 27) sonuç normal karyotiple uyumluuydu. 27. hastada karyotip analizi sonucunda 46, XX, 15 cenh+ saptanmıştı.

CHARGE FISH 14. ve 27. hastaya uygulandı, delesyon saptanmadı. CHD7 geni dizi analizi ve MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon analizi 18, 19 ve 27. hastaya uygulandı. Herhangi bir mutasyon veya delesyon/duplikasyon tespit edilmedi.

22q11 FISH 19 ve 20. hastaya uygulandı, delesyon saptanmadı.

PAX6 geni tüm kodlayıcı ekzonlar için dizi analizi iki hastaya (hasta 5, 18) uygulanmış ve normal sonuçlanmıştı.

OTX2 geni tüm kodlayıcı ekzonlar ve ekzon- intron bileşkeleri mutasyon analizi ve MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon analizi tüm hastalara uygulandı. OTX2 geni dizi analizinde hiçbir hastada patojenik varyant saptanmadı. Yalnızca üçüncü hastanın dizi analizi sonucunda 3. intronda heterozigot c.97+12C>T (IVS3+12C>T) (rs28757218) değişimi saptanmıştır. Anne ve babaya yapılan analizlerde babanın da bu değişimi heterozigot olarak taşıdığı görülmüştür.

OTX2 geninde MLPA yöntemiyle delesyon/duplikasyon analizinde hiçbir hastada delesyon veya duplikasyon saptanmadı.

## **5. TARTIŞMA**

Goldenhar sendromu birinci ve ikinci faringeal arklardan köken alan kulak, ağız ve mandibula gibi yapıların malformasyonlarını kapsamaktadır (1). Görülme sıklığının 1/5600-1/20.000 doğum olduğu bildirilmiştir (2).

'Goldenhar Sendromu Öntanıli Olgularda Genomik Değişikliklerin İncelenmesi' isimli araştırmamızda Goldenhar sendromlu hastalarda görülen klinik ve laboratuvar bulgularına dayanarak sendromun etiolojisinde rol oynayan faktörleri açıklayabilmeyi amaçladık. Bu amaçla son on yıl içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı' na başvuran hastaların dosyaları retrospektif olarak incelendi. Dosya taraması sonucunda Goldenhar sendromu klinik bulgularını karşılayan yirmi yedi hasta araştırmaya dahil edildi.

Goldenhar sendromunda gözlenen fenotipik özelliklerin spektrumu kulak önünde deri çıkıntısıyla (skin tag) birlikte hafif fasiyal asimetriden, multipl konjenital anomalilerle karakterize kompleks fenotipe kadar değişkenlik gösterir. Asimetrik kulak anomalileri, işitme kaybı, hemifasiyal mikrozomi sonucunda yüzde asimetri, orofasiyal kleft, oküler defektler ve vertebra anomalileri Goldenhar sendromunda gözlenebilen bulgular arasındadır. Kardiyak, genitoüriner ve serebral malformasyonlar da bildirilmiştir. Klinik bulgular heterojen olup hastalar birbirinden çok farklı bulgularla başvurabilmektedir. Değişken ekspressiviteye bağlı olarak minimum tanı kriteri için fikir birliği oluşturulamamasına rağmen tanı için minimum kriterin mikrotia olarak kabul edilmesi gerektiğini öne süren araştırmacılar bulunmaktadır (1). Araştırmaya dahil olan yirmi yedi hastanın %22.2' sinde (n=6) mikrotia, %7.4' ünde (n=2) anotia vardı. Mikrotiası olan hastaların ikisinde sağ tarafta, üçünde bilateral etkilenme mevcuttu. Anotialı hastaların ise birinde sağ, diğerinde sol kulak etkilenmişti. Yayınlarda sağ kulak tutulumunun sola göre oranı 3/2 olarak belirtilmiştir (2). Mikrotiası olan hastaların %50' sine (n=3) dış kulak yolu atrezisi eşlik etmekteyken, %50' sinde izole mikrotia bulunmaktaydı. Sağ kulakta mikrotiası olan hastaların tümünde (n=2), bilateral mikrotiası olan üç hastanın yalnızca birinde işitme kaybı bulunmaktaydı. Sağ anotialı hastada işitme kaybı saptanırken, sol anotialı hastanın işitmesi normaldi.

Bazı araştırmacılar Goldenhar sendromunda tipik fenotipi 'mikrotia, fasiyal asimetri ve epibulbar dermoid/lipodermoid' olarak tanımlamışlardır (1). Ancak bizim hastalarımızın hiçbirinde bu üç fenotipik bulgu aynı anda tespit edilememiştir.

Tasse ve ark. izole mikrotia veya preauriküler skin tagle birlikte hemifasiyal mikrozomiyi minimum tanı kriteri olarak kabul etmiştir (24). Bu kriteri hastaların %37' si (n=10) karşılamaktaydı. Mikrotia ile birlikte fasiyal asimetri hastaların %7.4' ünde (n=2) bulunurken, preauriküler skin tagle birlikte hemifasiyal mikrozomi hastaların %22.2' sinde

(n=6) bulunmaktaydı. Hastaların %3.7' sinde (n=1) mikrotia, preauriküler skin tag ve fasial asimetri birlikte bulunmaktaydı. Bir hastada ise sol anotia ve hemifasiyal mikrozomi saptanmıştı.

Beleza-Meireles ve ark. izole hemifasiyal mikrozomi ile birlikte aile hikayesinin bulunması durumunun tanı koydurucu olarak alınması gerektiğini öne sürmüşlerdir (1). Hastaların yalnızca %3.7' sinde (n=1) aile öyküsü mevcuttu. Anne ve babası arasında birinci kuzen evliliği mevcut olan hastanın bulguları bilateral mikrotia, her iki dış kulak yolu atrezisi, sağ göz kapağında ptozis, sağ göz yukarı bakışta kısıtlılık, yüzde asimetri ve işitme kaybı iken kız kardeşinde ve dayısının oğlunda dış kulak yolu atrezisi; dayısının torunlarında ise mikrotia bulgusunun olduğu görüldü.

Goldenhar sendromunun etiyojisinde suçlanan risk faktörleri arasında annenin vazoaktif ilaç kullanması, ikinci trimesterde kanama, annede diabet, çoğul gebelik ve yardımcı üreme tekniklerinin kullanılması bulunmaktadır. Annenin birinci trimesterde retinoik asit kullanması nöral krest hücrelerinin anormal migrasyonu ile ilişkili mikrotia/anotia, mandibular hipoplazi, yarık damak ve kardiyak defektler (konotrunkal ve aortik ark) gibi malformasyonlara neden olabilmektedir. İmmüsupresif bir ajan olan mikofenolat mofetilin gebelikte kullanımı ile de benzer malformasyonlar bildirilmiştir (15). Gebelikte talidomid kullanımı ve sigara içimi de bildirilen risk faktörleri arasında bulunmaktadır (1). Çalışma grubumuzdaki iki hasta (hasta 3 ve 17) ikiz eşiydi. Her iki hastanın ikiz eşinde benzer bulgu veya herhangi bir dismorfik bulguya rastlanmadı. Bir hastada IVF (in vitro fertilizasyon) gebelik öyküsü bulunmaktaydı (10 nolu hasta). Gebelik sırasında maternal hastalık, ilaç kullanımı, X ışını ve teratojen maruziyeti, sigara ve alkol öyküsü sorgulandığında bir hastada (hasta 12) maternal sigara kullanımı, bir hastada ise (hasta 16) maternal gestasyonel diyabetes mellitus öyküsü olduğu öğrenildi.

Goldenhar sendromlu 239 kişi ve 854 kontrolden oluşan bir epidemiyolojik çalışmada Goldenhar sendromlu bebeklerin doğum ağırlığının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu, gösterilmiştir (17). Hastalarımızın %37' sinin (n=10) doğum ağırlığı normal aralıkta iken, %25.9' unda (n=7) düşük doğum ağırlığı olduğu tespit edildi. Bir hastada overgrowth dışında kalan beş hastanın doğum kilosu tıbbi kayıtlara geçmemişti ve aileler tarafından hatırlanmıyordu.

OTX2 geni on dördüncü kromozomun uzun kolunda 14q22.3 bölgesinde yer almakta ve beş ekzondan oluşmaktadır; ilk iki ekzonu kodlayıcı değildir. OTX2 proteini (Orthodenticle homeobox 2) homeodomain içeren bir transkripsiyon faktörü olup ön beyin ve göz gelişiminde önemli rol oynamaktadır (50).

Goldenhar sendromu klinik bulgularını taşıyan beş bireyin bulunduğu ailenin incelendiği bir çalışmada yapılan kopya sayısı varyasyon analizinde 14q22.3 bölgesinde (chr14:57,141,867–58,495,517) 1.3 mega baz boyutunda duplikasyon saptandı. Duplike olan bölgede aralarında OTX2 geninin de olduğu sekiz adet gen bulunmaktaydı. Sekiz gen arasından fenotipe en çok katkıda bulunan geni bulabilmek için kullanılan in silico analiz teknikleriyle OTX2' nin patolojiden sorumlu en olası gen olduğu sonucuna varıldı. Bu ailedeki hasta bireylerin klinik bulguları şu şekildeydi: Probandın fizik muayenesinde sağ mandibular hipoplazi, fasyal asimetri, makrostomi, preauriküler skin tag, mikrotia mevcuttu. Sağ kulağında işitme kaybı olan hastada yedi yaşındayken dördüncü ventrikül yerleşimli medulloblastom tespit edildi. Probandın annesi, anneannesi ve kuzeninde hafif fasyal asimetri, unilateral cleft ve preauriküler skin tag vardı, kulak etkilenmemişti. OTX2 geninin medulloblastomda onkojenik etkisi bilinmektedir. Probanda yedi yaşında medulloblastom tanısının konulması OTX2 geni duplikasyonunun bu ailedeki fenotipin sorumlusu olabileceğini desteklemektedir (4).

Başka bir çalışmada ise Goldenhar sendromu klinik tanılı, otozomal dominant kalıtımın gözlemlendiği diğer bir ailede saptanan 1.34 mega baz boyutundaki 14q23.1 duplikasyonunun segregasyon gösterdiği ve bu bölgede bulunan OTX2 geninin Goldenhar sendromu için iyi bir aday gen olabileceği sonucuna varıldı. Ailedeki bireylerin fizik muayene ve klinik bulguları şu şekildeydi: Proband aralarında akrabalık olmayan anne ve babanın ikinci çocuğu olarak dünyaya gelmişti. Postnatal dönemde yapılan fizik muayenesinde aşağı dönük palpebral fisür, mikrognati, makrostomi, bilateral preauriküler pit ve tag, sol auriküler agenezi, sol dış kulak kanalı atrezisi, büyük sağ kulak ve tragus yokluğu saptandı. Kemik surveyi mandibula hipoplazisi dışında normaldi. Her iki kulakta işitme kaybı mevcuttu. Otuz bir yaşındaki fizik muayenesinde ise bitemporal darlık, uzun yüz, bilateral preaurikular pit (skin tag eksize edilmiş), sol anotia, mikrognati, yüksek damak, dental maloklüzyon, düşük ve arkaya dönük sağ kulak, tragus ve antitragus arasında yarı bulunmaktaydı. Skolyozu mevcut olan hastanın karyotip analizi normaldi, TCOF1 ve SALL1 geni moleküler analizinde mutasyon saptanmamıştı. Babasında preauriküler skin tag ve sağ makrostomi mevcut olup işitmesi normaldi. Annesi ve kardeşlerinde dismorfik bulguya rastlanmadı. Amcasında, kuzeninde ve kuzeninin iki çocuğunda preauriküler skin taglar mevcut olması otozomal dominant kalıtımı düşündürdü. Hastaya, babası, annesi ve kardeşlerine array CGH uygulandığında hastada ve babasında 14q23.1 duplikasyonu saptanıp annesinde ve kardeşlerinde saptanmaması segregasyonun fenotiplere uygun olduğunu göstermekteydi. Bu bölgede bulunan yedi genden

biri olan OTX2 geninin hastada ve ailedeki diğer bireylerdeki fenotipten sorumlu olduğu düşünülmüştür (5).

Gelişme geriliği ve multipl konjenital anomalileri nedeniyle brankiotoorenal sendrom (BOR) veya Goldenhar sendromu ön tanısı düşünülen yirmi altı aylık erkek hastada 14q22.3-q23.3 bölgesinde 11.79 Mb boyutunda duplikasyon, 13q21.31-q21.32 bölgesinde 4.38 Mb boyutunda kayıp saptandı. Hastanın mental retardasyon, kısa boy, hipernazal konuşma, uzun alın gibi bulguları olan babasında da aynı genomik değişiklikler saptandı. 14q22.3-q23.3 bölgesi SIX1, SIX6 ve OTX2 genlerinin de aralarında bulunduğu elli bir adet gen içermektedir. 14q21.3-q24.3 bölgesindeki değişimler Brankiotoik sendrom (BOS) dan sorumlu tutularak brankiotoik sendrom tip 3 (BOS3) olarak adlandırılmıştır. SIX1 mutasyonları BOR/BOS3 sendromlu hastalarda bildirilmiştir. SIX1, SIX6 veya OTX2 genlerinin artmış dozajının bu ailedeki BOR ve Goldenhar sendromu benzeri bulgulardan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Hastanın Goldenhar sendromuyla uyumlu bulguları arasında kulak önünde ve yanakta multipl skin tag, sağ yanakta pit, lakrimal kanal stenozu, antiheliks ve kulak lobunda anormallik, belirgin maksilla, mandibula hipoplazisi, makrostomi, tortikollis bulunmaktaydı. Göz muayenesinde sağda optik sinir hipoplazisi saptanan hastanın batin ultrasonografisinde böbreklerinin küçük olduğu görülmüştü (39).

Goldenhar sendromu ön tanılı hastalarda OTX2 geninin etiyolojiden sorumlu gen olabileceğine dair kanıtlar öne sürülmüştür (27,38,39). Literatürdeki bu kanıtları göz önünde bulundurulduğunda Goldenhar sendromu öntanıli olgulara OTX2 geni tam gen sekansının rutin olarak yapılması uygun görülmüştür. Dokuz Eylül Genetik Tanı Merkezi'ne başvuran yirmi yedi hastaya OTX2 geni tüm kodlayıcı ekzonlar ve ekzon- intron bileşkeleri mutasyon analizi ve MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon analizinin uygulandığı dosya analizinde ortaya konmuştur ancak bu testlerin sonucunda hiçbir mutasyon veya delesyon/duplikasyon saptanmadığı farkedilmiştir. Hastalarımızın hiçbirinde OTX2 geninde mutasyon bulamamamızın bir nedeni öntanıda yanılmış olmamız olabilir. Goldenhar sendromunda tanımlanan klinik bulgular heterojen olup fenotipik özelliklerin spektrumu çok geniştir. Ayrıca hastalar arasında ekspressivite değişken olduğu için minimum tanı kriteri için fikir birliği bulunmamaktadır (1). Bu nedenle hastalarımızın ön tanısını yeniden gözden geçirerek birinci ve ikinci faringeal arklardan köken alan yapıların anormallikleriyle seyreden diğer sendromları da göz önüne almamız gerekebilir. Bu sendromlar arasında Treacher Collins sendromu, Townes–Brocks sendromu, Brankio-oto-renal sendrom, Aurikulokondilar sendrom, Nager sendromu, Miller sendromu gibi sendromlar bulunmaktadır (77).



Hastalarımızda OTX2 geninde mutasyon saptayamamamızın bir diğer nedeni ise Goldenhar sendromunun etiolojisinin tıpkı klinik bulgular gibi heterojen olmasından kaynaklanabilir. 5p15 delesyonu, WNT5B genini içeren 12p13.33 delesyonu, 14q23.1 mikroduplikasyonu, 22q anomalileri, 15q26.2-q26.3 bölgesiyle ilgili yeniden düzenlemeler gibi çeşitli kromozomal ve genomik değişimler Goldenhar sendromunda suçlanmıştır. Ailesel olgularda genellikle Mendelian kalıtım düşünülmesine rağmen sporadik olguların etiolojisini poligenik veya multifaktöriyel nedenlere dayandıran görüşler de mevcuttur. Annede gestasyonel diyabet, vazoaaktif ilaç kullanımı, sigara içimi, çoğul gebelik ve intrauterin kan akışında yetersizlik gibi etkenler suçlanan çevresel faktörler arasındadır. Sporadik olguların sıklıkla görülmesi ve monozigotik ikizlerde bildirilen diskordans da Mendelian kalıtımın dışındaki faktörlerin etkisini ön plana çıkarmaktadır (1). Tüm bunların yanısıra beş Goldenhar sendromlu hastada olası patojenik mekanizma olarak epigenetik kalıtım öne sürülmüştür. Histon asetilasyonuna bağlı BAPX1 geninin alelik ekspresyonunda dengesizlik görülmüştür (36). Bütün bu verilerin ışığında Goldenhar sendromu etiolojisinde genetik, epigenetik ve çevresel faktörleri kapsayan heterojen etkenlerin rolü olduğunu söylemek en olası açıklama gibi gözükmemektedir. Multifaktöriyel ve kompleks etiolojinin bu doğumsal defektin oluşumunda rol oynayan en olası model olduğunu söyleyebiliriz (1).

OTX2 geninde interstisyel delesyon, mikroddelesyon, frameshift ve nokta mutasyonu gibi çeşitli genetik değişimler tanımlanmıştır. Bu değişimlerin çoğu anoftalmi, mikroftalmi, Leberin konjenital amarozisisi veya kolobom gibi ağır oküler malformasyonları olan hastalarda bildirilmiştir (56).

Oküler malformasyon spektrum defekti olan üç yüz otuz üç hastanın incelendiği bir çalışmada sekiz ailede OTX2 geninin kodlayıcı bölgesinde heterozigot değişimler tanımlandı. OTX2 mutasyonu taşıyan bireylerde fenotip bilateral anoftalmi, Leber' in konjenital amarozisine benzeyen retinal defekt ve pigmenter retinopati gibi farklı şekillerde ortaya çıkmaktaydı. Manyetik rezonans görüntüleme ile optik sinir, optik kiazmada ve bazı olgularda beyinde defektler tespit edildi. OTX2 fonksiyon kaybı mutasyonlarının neden olduğu oküler fenotiplerin retinal anomalilerle birlikte bilateral anoftalmiden hafif mikroftalmiye kadar geniş bir yelpazeye yayılmış olduğu söylenebilir. Nörolojik fenotip spektrumunu da ağır gelişme geriliği ile normal bilişsel gelişim arasında olmak üzere oldukça geniştir. Heterozigot OTX2 mutasyonları olan hastalarda görülen majör fenotip ağır göz defektleriyle birlikte beyin malformasyonlarıdır (50).

Williamson ve ark. yayınladıkları derlemede mikroftalmi-anoftalmi-kolobom (MAC) fenotipiyle ilişkili patojenitesi onaylanmış genler olarak SOX2, OTX2, PAX6, STRA6, ALDH1A3, RARB, VSX2, RAX ve FOXE3 genlerini bildirilmiştir (65).

Anoftalmi/mikroftalmisi olan elli iki birey OTX2 mutasyonu varlığı açısından araştırıldığında dört ailede (%8) hastalığa neden olan varyant tespit edildi. Üç tanesi de novo, bir tanesi etkilenmiş ebeveynden kalıtılmıştı. Mutasyon saptanan hastaların biri dokuz aylıkken hipopitüitarizm tanısı almıştı. Diğer bir hastada ise kranial manyetik rezonans görüntüleme bilaterale mikroftalmiye ve hipoplastik optik sinire ek olarak ön hipofizin küçük olduğu ve arka hipofiz bezinin olmadığı görüldü. Çalışılan hastaların ve literatürdeki diğer olguların fenotipik özellikleri analiz edildiğinde hipofiz anomalilerinin varlığı ile genitoüriner- gastrointestinal manifestasyonların yokluğunun SOX2 anoftalmi sendromundan ayırımında önemli olabileceği gibi bir sonuca ulaşılmıştır. Ayrıca hipofiz anomalilerinin, OTX2' nin homeodomain ve SGQFTP motifinden sonra ikinci yarısında meydana gelen mutasyonlarla kuvvetli ilişki içinde olabileceği öne sürülmüştür (58).

Sağ gözde mikroftalmi, retinal vaskülarizasyon yokluğu, vitreal noktalanma ve optik sinir hipoplazisi, sol gözde hafif maküler distrofi olan bir çocukta OTX2 dizi analizi ile heterozigot c.402del mutasyonu bulundu. Ektopik posterior hipofiz bezi dışında orta hat beyin yapıları ve serebral parankim normaldi (61).

Anoftalmi/mikroftalmili yirmi sekiz hastanın exom dizilemesinde 5 hastada mutasyon saptandı. Bu mutasyonlar OTX2, RARB, GDF6 ve STRA6 genlerindeydi. OTX2 geninde de novo mutasyon saptanan hastanın bulguları arasında bilaterale anoftalmi, büyüme geriliği, mental retardasyon ve otizm bulunmaktaydı (63).

Anoftalmi veya ağır mikroftalmisi olan elli bir bireyde SOX2, OTX2, PAX6 (paired domain), STRA6, BMP4, SMOC1, FOXE3, and RAX genlerinin kodlayıcı bölgelerinin dizi analizi ve array bazlı kopya sayısı değerlendirmesi uygulandı. 15 hastada mutasyon saptandı, bunların beşi OTX2 (5/51) genindeydi. Bilaterale anoftalmili on iki olgunun dokuzunda (75%) genomik değişim saptandı. Bu değişimlerin ikisini OTX2 genlerini kapsayan büyük delesyonlar oluşturmaktaydı (66).

İzole veya sendromik anoftalmi/mikroftalmisi olan yüz elli hastadan oluşan kohortta anoftalmi/mikroftalmi genlerinden GDF6, FOXE3, OTX2, PAX6, RAX, SOX2 ve VSX2 mutasyonlarının dizi analizi ile araştırıldığı bir çalışmada üç hastada OTX2 geninde olmak üzere yirmi beş hastada nokta mutasyonu saptandı. Ayrıca sekiz olguda gen delesyonu

semikantitatif multipleks PCR ile saptandı. İki olguda delesyon OTX2 geninde, kalan altı olguda ise diğer genlerdeydi (68).

Hastalarımızın % 22.2' sini (n=6) ön planda anoftalmi/mikroftalmi bulgusu olup, Goldenhar sendromunun komponenti olan diğer kulak ve yüz bulgularının görülmediği hastalar oluşturmaktaydı. Bu hastaların bulguları tablo 15' te özetlenmiştir. Literatürde anoftalmi/mikroftalmili hastalarda OTX2 geni mutasyonu saptanan pek çok yayın bulunması nedeniyle bu hastalara OTX2 geni dizi analizi ve MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon analizi uygulanmış ancak herhangi bir mutasyon veya delesyon/duplikasyon saptanmamıştır. OTX2 mutasyonlarına sahip hastalarda hipofiz anomalilerinin sık görüldüğü bildirilmiştir. Anoftalmi/mikroftalmisi olan elli iki birey OTX2 mutasyonu varlığı açısından araştırıldığında dört ailede hastalığa neden olan varyant tespit edildi. Mutasyon saptanan hastaların biri dokuz aylıkken hipopitüitarizm tanısı almıştı. Diğer bir hastada ise kranial manyetik rezonans görüntüleme bilateral mikroftalmiye ve hipoplastik optik sinire ek olarak ön hipofizin küçük olduğu ve arka hipofiz bezinin olmadığı görüldü. Çalışılan hastaların ve literatürdeki diğer olguların fenotipik özellikleri analiz edildiğinde hipofiz anomalilerinin varlığı ile genitoüriner- gastrointestinal manifestasyonların yokluğunun SOX2 anoftalmi sendromundan ayırımında önemli olabileceği gibi bir sonuca ulaşılmıştır (58). Çalışmamızdaki anoftalmi/mikroftalmili hastaların hiçbirinde hipofiz anomalisi bulunmaması OTX2 geninin etiolojiden sorumlu olma ihtimalini azaltan bir etken olarak görülebilir. Anoftalmi/mikroftalmili hastalarda OTX2 geni dışında SOX2, PAX6, STRA6, GDF6, ALDH1A3, RARB, VSX2 gibi pek çok gende mutasyon bildirilmiştir (65). OTX2 geninde mutasyon saptayamadığımız anoftalmi/mikroftalmili hastalarda diğer genlerin incelenmesi bir sonraki aşamada uygun olacaktır.

**Tablo 15.** Anoftalmi/mikroftalmi bulgusu olan hastalar

Hasta no	Anoftalmi/mikroftalmi	Diğer bulgular
Hasta 11	Bilateral anoftalmi	Kepçe kulak
Hasta 13	Sağ gözde mikroftalmi	Optik disk ve koroidal kolobom
Hasta 16	Bilateral mikroftalmi	Sağ gözde total katarakt, sol gözde kuneiform katarakt, mikrognați
Hasta 18	Bilateral anoftalmi	Koanal atrezi, her iki kulakta işitme kaybı, ince korpus kallosum, serebellar ve frontal atrofi
Hasta 22	Sağ mikroftalmi	
Hasta 23	Sol mikroftalmi	Persistan fetal vaskülatür

CHARGE sendromunda unilateral veya bilateral iris, retina- koroid kolobomu; mikroftalmi, unilateral veya bilateral koanal atrezi, kranial sinir disfonksiyonu, anormal kulaklar, erkeklerde kriporşidizm, hem erkek hem kadında hipogonadotrofik hipogonadizm, gelişme geriliği, kardiyovasküler malformasyon ve büyüme geriliği görülebilmektedir. Bazı kişilerde orofasiyal kleft ve trakeözafageal fistül de gözlenmektedir. Hastaların %65-70 inde CHD7 geninde heterozigot patojenik varyant sorumludur (15). Hastalarımızın %14.8' inde (n=4) CHARGE sendromu ön tanıda ilk aşamada düşünülmüştür. (hasta 14, 18, 19, 27)

On dört nolu hastada mikrosefali, sağ gözde mikroftalmi, yüzde hafif asimetri, mikrognati gibi dismorfik bulguları nedeniyle CHARGE sendromu ön tanısı düşünülmüştür. Konjenital hipotiroidisi ve kapanmış atrial septal defekt öyküsü de CHARGE sendromuyla örtüşmektedir. Ancak 8q12.1 mikrolezyonuna yönelik bakılan FISH analizinde delesyon saptanmamıştır. CHD7 geni mutasyon analizi çalışılması bu hastaya yönelik planlarımız arasında bulunmaktadır.

Koanal atrezi, bilateral anoftalmi, düşük kulak bulguları olan 18 nolu hastanın her iki kulağında orta derece iletim komponentli işitme kaybı bulunmaktaydı. Ekokardiyografide patent foramen ovale saptanmıştı, büyüme gelişme geriliği ve nöromotor retardasyonu mevcuttu. Bu bulgularla hastada CHARGE sendromu ön tanısı düşünülmüş, CHD7 geni dizi analizi ve MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon analizi uygulanmıştı. Ancak bu testlerin sonucunda hastada mutasyon veya delesyon tespit edilememiştir.

On dokuz nolu hastanın sağ aurikula agenezisi, sağ kulakta işitme kaybı mevcuttu. Temporal kemik bilgisayarlı tomografisinde bilateral vestibül ve semisirküler asimülasyon, bilateral sağda daha belirgin dış kulak yolunda stonik görünüm tespit edilen hastanın ekokardiyografisinde ince patent duktus arteriozus mevcuttu. Bu bulgularla hastada CHARGE ön tanısı düşünülerek CHD7 geni dizi analizi ve MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon analizi uygulandı ancak herhangi bir mutasyon veya delesyon saptanmadı.

Yirmi yedi nolu hastada görülen mikrosefali, sağ koanal atrezi, sağ üst ve alt göz kapağı medialinde kapak kolobomu, sağ optik disk kolobomu, bifid uvula, yarık dudak bulguları CHARGE sendromuyla uyumluydu. Hastaya hem CHARGE FISH hem de CHD7 geni dizi analizi ve MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyon analizi uygulandı ancak hastada CHARGE sendromuna neden olabilecek bir değişim saptanmadı.

22q11.2 delesyon sendromu yirmi ikinci kromozomun uzun kolundaki hemizgot üç megabaz boyutundaki mikrodelesyondan kaynaklanıp, en sık görülen mikrodelesyon sendromlarından biridir. Sıklığı 1/2000-4000 canlı doğum olarak bildirilmiştir. Konotrunkal kalp anomalileri, hipoplastik/aplastik timus, hipokalsemi, palatal defektler, immun yetmezlik, skolyoz, genitoüriner anomaliler, davranışsal ve gelişimsel problemler, öğrenme güçlüğü görülebilmektedir. Tanımlanan dismorfik bulgular arasında oküler hipertelorizm, aşağı dönük palpebral fisürler, ptozis, bulböz burun ucu, burun kanatlarında hipoplazi, mikrognati, mikrotia, kulak heliksinde malformasyon, preauriküler tag veya pit bulunmaktadır (78).

Goldenhar sendromlu elli bir hastanın ve ailesinin incelendiği bir çalışmada, array-CGH uygulanan yirmi iki indeks vakanın on tanesinde 22q11 lokusunda dozaj anormallikleri görüldü. Bulunan varyantların lokustaki genlerin haployetmezliği yoluyla veya dışardaki bir geni pozisyon etkisi ile etkileyerek Goldenhar sendromunda patojenik rol oynayabileceği düşünüldü. 22q11 lokusunun kraniyofasial simetrisinin düzenlenmesi ve birinci ve ikinci brankial arkların gelişiminde etkili olan önemli genler içerebileceği düşünülmektedir. 22q11 sendromu bölgesinde yer alan Crkl geninin gelişen faringeal arklardaki sinyalleri düzenleyerek kraniyofasial dismorfizme katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Crkl mutant farede retinoik asit ve endotelin sinyal yolları bozulmuştur. Bu iki sinyal yolağı embriyogenez esnasında brankial arklarda nöral krest hücrelerinin migrasyon ve diferansiyasyonunda önemli rol oynamaktadır (40).

22q11 bölgesinde mikrodelesyon varlığını saptamak için FISH analizi 19 ve 20. hastaya uygulandı, ancak hastalarda delesyon saptanmadı. On dokuzuncu hastada sağ aurikula agenezisi, sağ kulağında işitme kaybı, sağ inguinal ve umbilikal herni mevcuttu. Temporal kemik bilgisayarlı tomografisinde bilateral vestibül ve semisirküler asimülasyon, bilateral sağda daha belirgin dış kulak yolunda stonik görünüm tespit edilen hastanın ekokardiyografisinde ince patent duktus arteriozus mevcuttu. Yirminci hastada ise solda düşük kulak, yarı dudak, sol yanakta skin tag, anal stenoz öyküsü mevcuttu. Ekokardiyografisinde ventriküler septal defekt ve dekstroversiyonu olduğu görülen hastanın ventriküler septal defekti ileriki dönemlerde kapanmıştı. Hastanın torakal manyetik rezonans görüntülemesinde serviko-torakal skolyoz, servikotorakal bileşke düzeyinde üst torakal düzeyde vertebra morfolojisinde hemivertebra ve kama vertebra benzeri patoloji görülmüştü.

22q anomalileri Goldenhar sendromlu hastalarda sıklıkla bildirilmesine rağmen hastalarımızın sadece ikisine 22q11 FISH uygulanması bu çalışmanın eksik kalan bir boyutunu oluşturmaktadır. Ancak hastalarımızın bir kısmı başka merkezlerden bölümümüze

yönlendirilmişti ve dosya kayıtları eksik tutulmuştu. Yine aynı nedenlerden dolayı aslında bütün hastalara ilk test olarak uygulanması gereken kromozom analizi de on dört hastaya uygulanabilmişti. Bir hastaya kromozom analizi randevusu verilmesine rağmen hasta randevuya gelmemiştir.

Göz gelişiminde rol oynayan SOX2, OTX2, PAX6 gibi genlerin anoftalmi/mikroftalminin nedeni olabileceği öne sürülmüştür. PAX6 geni göz ve beyin gelişiminde önemli rol oynamakta olup aniridili olgularda mutasyonu tespit edilmiştir. PAX6 mutasyonları anoftalmi/mikroftalminin major nedeni olmamakla birlikte SOX2 geniyle birlikte işlev gösterebileceğine dair görüşler öne sürülmüştür (62).

PAX6 geni tüm kodlayıcı ekzonlar için dizi analizi iki hastaya (hasta 5, 18) uygulanmış ve normal sonuçlanmıştı. Beşinci hasta sağ gözünde mikroftalmi, fasiyal asimetri, hipotonisi bulunan iki yaşında erkek hastaydı. On sekizinci hastanın ise bilateral anoftalmisi mevcuttu.

Goldenhar sendromu ayırıcı tanısında düşünülmesi gereken Townes-Brocks sendromunda imperfore anüs, displastik kulaklar ve başparmakta malformasyonlar (trifalangeal başparmak, başparmakta duplikasyon ve nadiren hipoplazi) görülebilmektedir. Böbrek yetmezliği, böbrekte yapısal anomali, konjenital kalp hastalığı, ayak anomalisi ve genitoüriner malformasyonlar da saptanabilen diğer bulgular arasındadır. Goldenhar sendromlu hastaların çoğunda başparmak ve/veya anal malformasyonlar görülmemekle birlikte kulak, renal ve kardiyak bulgular Townes-Brocks sendromunda görülenlerle örtüşmektedir. SALL1 genindeki heterozigot patojenik varyant hastalığın nedenidir (15). Yirminci hastanın fizik muayenesinde sol hemifasiyal mikrozomi, sol preauriküler skin tag, solda düşük kulak, sol ağız kenarında skar (skin tag eksize edilmiş), kısa boyun, sol el baş parmak hipoplazisi, sakral dimple mevcuttu. Nöromotor gelişim basamaklarında gerilik gözlenmeyen hastanın geçirdiği operasyonlar arasında yarık dudak onarımı ve sol yanakta skin tag eksizyonu bulunmaktaydı, ayrıca hastada anal stenoz öyküsü de mevcuttu. Ekokardiyografisinde ventriküler septal defekt ve dekstroversiyonu olduğu görülen hastanın ventriküler septal defekti ileriki dönemlerde kapanmıştı. Transfontanel ultrasonografisinde üçüncü ve lateral ventrikülde minimal genişleme, sağ lateral ventrikülde milimetrik çaplı birkaç adet koroid pleksus kisti saptanan hastanın torakal manyetik rezonans görüntülemesinde serviko-torakal skolyoz, servikotorakal bileşke düzeyinde üst torakal düzeyde vertebra morfolojisinde hemivertebra ve kama vertebra benzeri patoloji görülmüştü. Karşılaştırmalı çekilen el grafisinde sağ el kemikleri normal iken sol elde saptanan bulgular şu şekildeydi: Baş parmak hipoplazik ve elin radyal tarafından bir ek şeklinde ele bağlantılıdır.

Birinci metakarp rudimenter olup karpal kemikler ile ilişkisizdir. Birinci ve ikinci falanksları hipoplaziktir. Hastanın baş parmak hipoplazisi, preauriküler skin tag, anal stenoz, ventriküler septal defekt gibi bulguları Townes Brocks sendromuyla örtüştüğünden SALL1 geni moleküler analizi bir sonraki aşamada planlanabilir.

İki hasta (hasta 3 ve 17) ikiz eşiydi. Her iki hastanın ikiz eşinde benzer bulgu veya herhangi bir dismorfik bulguya rastlanmadı. Üçüncü hastanın cinsiyeti kız, ikiz eşi ise erkekti. Cinsiyetlerin farklı olması nedeniyle dizigotik ikiz oldukları düşünüldü, ayrıca dikoryonik oldukları öyküde belirtilmişti. Hastada görülen yarık dudak damak, fasiyal asimetri, sağ gözde mikroftalmi, sağ parietal kemik defekti, dış kulak yolu atrezisi ve mikrotia gibi bulguların hiçbiri ikiz eşinde mevcut değildi. Bu durumda ikizlerde diskordans olduğu düşünüldü. İntrauterin ve postnatal dönemde aynı ortamı paylaşan ikizlerde bulguların bu kadar farklı seyretmesini ikizlerin genetik yapılarının farklı olmasıyla açıklayabiliriz. Bu durumda Goldenhar sendromu etiolojisinde öne sürülen ikinci trimesterde kanama, annenin vazoaaktif ilaç kullanması, gestasyonel diyabet gibi çevresel faktörler geri planda kalmakta, genetik faktörler ön plana çıkmaktadır. Literatürde de olgumuzda olduğu gibi Goldenhar sendromunda bildirilen bütün dizigotik ikizlerde diskordans mevcuttur, dizigotik ikizlerde konkordans bildirilmemiştir (79).

On yedinci hasta ve ikiz eşinin cinsiyetleri erkekti. Anneleri doğum sonrasında vefat eden ikizlerin öyküsü halalarından alındı. Hem aynı cinsiyette olmaları hem de alınan öykünün yetersizliği nedeniyle monozigotik-dizigotik ayrımı yapılamadı. Monozigotik-dizigotik ikizliğin kesin olarak tespit edilmesi için ikizlerin kan örnekleri alınarak DNA elde edilmesinin ardından kimerizm çalışılması uygun olacaktır. Hastada saptanan sol gözde mikroftalmi, basık burun kökü, yukarı dönük burun delikleri gibi bulgular ikiz eşinde görülmemiştir. Sözü edilen bulgular için ikizler diskordans göstermekteydi. İkizlerin dizigotik olduklarını düşünürsek diskordant olmaları beklediğimiz ve literatürle uyumlu olan bir bulgudur (79). İkizlerin monozigotik olma durumunda ise genetik yapıları aynı olacağından çevresel faktörlerin etiolojide rol oynaması daha olası bir durumdur. İntrauterin ve postnatal dönemde aynı ortamı paylaşan ikizlerde farklılık gösterebilecek tek çevresel faktör plasental kan akımıdır. Monozigotik ikizler çoğunlukla tek bir plasentayı paylaştıkları için intrauterin vasküler yetmezlik sık görülmektedir. Bu durum genetik yapıları aynı olan bireylerde farklı klinik bulguların görülme nedenini açıklamaktadır (80). Goldenhar sendromunda en çok desteklenen hipotezlerden biri intrauterin vasküler yetmezlik hipotezidir (18). Dördüncü gestasyonel haftada blastogenez aşamasında gelişen vasküler yetmezliğin Goldenhar

sendromuna neden olduğu düşünülmektedir. Bu patogenetik mekanizmaya göre Goldenhar sendromu, birinci ve ikinci brankial arkların geliştiği bölgede azalmış kan akımı ve fokal hemorajiyle ilişkili olabilir (19). Goldenhar sendromlu monozygotik ikizlerde diskordans bildirilen yayınlar literatürde bulunmaktadır (81).

Ülkemizde akraba evliliği oranı oldukça yüksek olup, evliliklerin %20-25' inin akraba evliliği olduğu bildirilmiştir. Akraba evliliği yapan ailelerin çocuklarında otozomal resesif kalıtımla geçen hastalıkların görülme riskinin arttığı bilinmektedir (82). Hastalarımızın pedigrileri incelendiğinde %26' sının (n=7) anne ve babası arasında akraba evliliği olduğu görüldü. Bu ailelerde otozomal resesif kalıtım sonucunda hastalığın ortaya çıkması beklenmektedir. Goldenhar sendromlu pek çok olguda genetik geçişin otozomal dominant kalıtımla uyumlu olduğu gösterilmesine rağmen (31); nadiren otozomal resesif kalıtım bildirilen aileler de mevcuttur (33). Anne ve babası akraba evliliği yapmış olan yedi hastada Goldenhar sendromu otozomal resesif geçişli olarak meydana gelmiş olabileceği gibi, otozomal resesif kalıtımın görüldüğü başka hastalıkları da ayırıcı tanıda düşünmek gerekebilir.

Goldenhar sendromlu olguların çoğu sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (1). Ailesel olgularda ise genetik geçişin çoğunlukla otozomal dominant kalıtımla uyumlu olduğu gösterilmiştir (31). Hastalarımızın %74' ünün (n=20) anne babaları arasında akrabalık mevcut değildi ve ailede benzer bulguları olan bireyler bulunmamaktaydı. Bu olgular literatürle uyumlu olarak sporadik olup de novo olarak meydana gelmiş bir mutasyonun taşıyıcısı olabilirler.

Aralarında akrabalık bulunmayan herhangi iki bireyin DNA dizileri %99.5 oranında benzerlik gösterir. İki birey arasında farklılığa neden olan kısım DNA' nın geriye kalan %0.5' lik kısmıdır. Belirli bir DNA parçasının kromozom üzerindeki lokalizasyonu lokus olarak ifade edilir. Bir lokustaki DNA dizisinin alternatif versiyonlarına ise alel adı verilir. Bir populasyonda, bir lokusta iki veya daha fazla sık görülen alel varlığında o lokusta polimorfizm varlığından söz edilir. Bir değişikliği polimorfizm olarak adlandırabilmemiz için araştırıldığı popülasyondaki bireylerin en az %1' inde ilgili DNA bölgesinde farklılıklar olması gerekmektedir (83). OTX2 geni dizi analizinde hiçbir hastada patojenik varyant saptanmamasına rağmen üçüncü hastanın dizi analizi sonucunda üçüncü intronda heterozigot c.97+12C>T (IVS3+12C>T) (rs28757218) değişimi saptanmıştır. Bu değişimle ilgili olarak literatürde; mutant alel için genel populasyon MAF (minör alel frekansı) değeri <0.01 olarak belirtilmiş olsa da, Amerika ve Avrupa toplumlarında %1 olarak tespit edilmiştir. Alel frekansı göz önüne alındığında bu değişim polimorfizm olarak değerlendirilebilir.



'MutationTaster' programı kullanılarak yapılan modellemenin sonucu polimorfizm lehine bulunmuştur. 'ClinVar' veri tabanında fenotipik etkisi belirtilmemiştir. 'dbSNP' veri tabanında fenotipik etkisinin net olmadığı belirtilmiştir. Polimorfizmin intronda yer alması nedeniyle de fenotip üzerine etkisi olması beklenmemekle birlikte intron-ekzon bileşkesinin yalnızca sekiz baz çifti uzağında olması nedeniyle mRNA'nın splayısını etkileyerek gen ekspresyonunu değiştirebilme olasılığı bulunmaktadır. Bipolar bozukluk ve şizofreni hastalarında OTX2 geninin patogenezdaki rolünün araştırıldığı bir çalışmada rs28757218 polimorfizmin bipolar bozukluğa yatkınlığa neden olduğu öne sürülmüştür (84). İki yaşında olan hastamızın mevcut bulgularını saptadığımız polimorfizme bağlamamakla birlikte ileriki dönemde bipolar bozukluk gelişmesi açısından takip edilmesi söz konusu olabilir. Anne ve babaya yapılan analizlerde babanın da bu değişimi heterozigot olarak taşıdığı görülmüştür. Bu değişimin protein fonksiyonu üzerindeki kesin etkisini belirleyebilmek için daha ileri protein fonksiyon analizlerine ihtiyaç vardır.

## 6. SONUC

Araştırdığımız hastalarda yaptığımız testlerle sonuç elde edemememizi Goldenhar sendromunda klinik bulgular kadar etiyolojisinde rol alan genetik nedenlerin de çok sayıda ve heterojen olması ile açıklayabiliriz. Ayrıca hasta sayımız kısıtlı kalmıştır, daha büyük hasta grupları ile daha etkili çalışmalar yapmak mümkün olabilecektir.

Dismorfik bulguları nedeniyle Goldenhar sendromu ön tanısı düşündüğümüz bir hastada tanıya yönelik dikkat etmemiz gereken noktaları ve uygulanması önerilen testleri şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Prenatal öyküde annede gestasyonel diabetes mellitus, ikinci trimesterde kanama, çoğul gebelik, yardımcı üreme teknikleri kullanımı, ilaç kullanımı olup olmadığı sorgulanmalıdır.
2. En az üç nesillik aile ağacı çizilerek ailedeki fasiyal asimetri, kulak önünde tag veya pit, işitme kaybı, kardiyak malformasyon ve diğer anomalileri olan bireyler sorgulanmalıdır.
3. Hastanın fizik muayenesinde fasiyal asimetri olup olmadığı, mandibula hipoplazisi var ise şiddeti, kulak bulguları, kulak önünde pit veya tag varlığı, dış kulak yolunun açık olup olmadığı, gözde epibulbar dermoid ve üst/alt göz kapağı kolobomu varlığı not edilmelidir. CHARGE sendromundan ayırıcı tanı için göz konsültasyonu istenerek koryoretinal kolobom varlığı araştırılmalıdır. Boyun inspeksiyonunda brankial sinüs veya kist olup olmadığı, tortikollis veya hareketlerde kısıtlılık varlığı açısından incelenmelidir. Kalp, vertebra, ekstremiteler muayenede değerlendirilmelidir.
4. İşitme testi mutlaka yapılmalıdır. Servikal vertebra grafisi, ekokardiyografi ve renal ultrasonografi istenmesi gereken görüntüleme yöntemleridir. İşitme kaybı veya kulak kanalı atrezisi varsa temporal kemik bilgisayarlı tomografisi ile değerlendirilmelidir. Semisirküler kanal hipoplazisi saptanırsa CHARGE sendromu ön planda düşünülebilir.
5. Goldenhar sendromunda pek çok kromozomal aberasyon bildirilmiştir. Karyotip analizi ile bu değişimlerin hepsini saptamak mümkün olmasa bile Goldenhar sendromu ön tanısı düşündüğümüz her hastada öncelikle kromozom analizi istememiz gerekmektedir.
6. 22q değişimleri Goldenhar sendromunda sık olarak bildirildiği için 22q11 FISH istenebilir.
7. Gelişme geriliği, atipik ekstrakranial malformasyonların varlığında array-CGH planlanabilir. Otozomal dominant kalıtım düşünülüyorsa da 14q23.1 bölgesinde duplikasyon olabileceğinden dolayı array-CGH istenebilir.
8. Ayırıcı tanıda Brankio-oto-renal sendrom düşünülüyorsa EYA1 geni, CHARGE sendromu için CHD7 geni, mikrosefaliyle birlikte mandibulofasiyal dizostoz için EFTUD2 geni,

Townes-Brocks sendromu için SALL1, Treacher Collins sendromu için TCOF1 geni mutasyon analizi planlanabilir.

9. Tüm bu testlerle belirli bir patojen varyant saptanamamışsa gen panelleri kullanımı veya ekzom dizileme ile patogeneizde rol oynayan genlerin tespiti mümkün olabilecektir.



## **7. KAYNAKLAR**

1. Beleza-Meireles A, Clayton-Smith J, Saraiva J. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: a review of the literature and genetic update. *J Med Genet.* 2014;51(10):635–45.
2. Gorlin R, Cohen M. *Syndromes of the Head and Neck.* 2001.
3. Rooryck C, Souakri N, Cailley D, Bouron J, Goizet C, Delrue M-A, et al. Array-CGH analysis of a cohort of 86 patients with oculoauriculovertebral spectrum. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:1984–9.
4. Zielinski D, Markus B, Sheikh M, Gymrek M, Chu C, Zaks M, et al. OTX2 duplication is implicated in hemifacial microsomia. *PLoS One.* 2014;9(5):e96788.
5. Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Dulcet LA, Rodríguez-Santiago B, García-Miñaur S, Guillen-Navarro E. Autosomal dominant oculoauriculovertebral spectrum and 14q23.1 microduplication. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(8):2030–5.
6. Goldenhar M. Associations malformatives de l'oeil et de l'oreille, en particulier le syndrome dermoïde épibulbaire – appendices auriculaires – fistule auris congenita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J Genet Hum.* 1952;1:243–82.
7. Gorlin RJ, Jue KL, Jacobsen U, Goldschmidt E. Oculoauriculovertebral dysplasia. *J Pediatr.* 1963;63:991–9.
8. Cohen MM, Rollnick BR, Kaye CI. Oculoauriculovertebral spectrum: an updated critique. *Cleft Palate J.* 1989;26(4):276–86.
9. Barisic I, Odak L, Loane M, Garne E, Wellesley D, Calzolari E, et al. Prevalence, prenatal diagnosis and clinical features of oculo-auriculo-vertebral spectrum: a registry-based study in Europe. *Eur J Hum Genet.* 2014;22 (8):1026–1033.
10. Araneta MRG, Moore C, Olney RS, Edmonds LD, Karcher JA, McDonough C, et al. Goldenhar syndrome among infants born in military hospitals to Gulf War veterans. *Teratology.* 1997;56(4):244–51.
11. Morrison J, Mulholland HC, Craig BG, Nevin NC. Cardiovascular abnormalities in the oculo-auriculo-vertebral spectrum (Goldenhar syndrome). *Am J Med Genet.* 1992;44(4):425–8.
12. Johnson JM, Moonis G, Green GE, Carmody R, Burbank HN. Syndromes of the first and second branchial arches, part 1: embryology and characteristic defects. *AJNR.* 2011;32:14–9.
13. Manfred Benson VT, Dalen K, Anthony A Mancuso V, Kerr HH, Cacciarelli A, Mafee

- M. Congenital Anomalies of the Branchial Apparatus: Embryology and V Pathologic Anatomy. *Radiographics*. 1992;12(5):943–60.
14. Sinha S, Singh AK, Mehra A, Singh R. Goldenhar Syndrome – A Literature Review. *JSM Dent*. 2015;3(1):1052.
  15. Heike CL, Hing AV. Craniofacial Microsomia Overview. *GeneReviews*™ [Internet], 2009.
  16. Gustavson EE, Chen H. Goldenhar syndrome, anterior encephalocele, and aqueductal stenosis following fetal primidone exposure. *Teratology*. 1985;32(1):13–7.
  17. Werler MM, Sheehan JE, Hayes C, Padwa BL, Mitchell AA, Mulliken JB. Demographic and Reproductive Factors Associated With Hemifacial Microsomia. *Cleft Palate Craniofac J*. 2004;41:494–50.
  18. Robinson LK, Hoyme HE, Edwards DK, Jones KL. Vascular pathogenesis of unilateral craniofacial defects. *J Pediatr*. 1987;111:236–9.
  19. Ventura E, Ormitti F, Crisi G, Sesenna E. Goldenhar syndrome associated with contralateral agenesis of the internal carotid artery. *Neuroradiol J*. 2014;27(2):150–3.
  20. Jongbloet PH. Goldenhar syndrome and overlapping dysplasias, in vitro fertilisation and ovopathy. *J Med Genet*. 1987;24(10):616–620.
  21. Witschi E. Overripeness of the egg as a cause of twinning and teratogenesis: a review. *Cancer Res*. 1952;12(11):763–86.
  22. Mellor DH, Richardson JE, Douglas DM. Goldenhar's syndrome. Oculoauriculo-vertebral dysplasia. *Arch Dis Child*. 1973;48(7):537–41.
  23. Wiczorek D, Ludwig M, Boehringer S, Jongbloet PH, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. Reproduction abnormalities and twin pregnancies in parents of sporadic patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum/Goldenhar syndrome. *Hum Genet*. 2007;121(3-4):369–76.
  24. Tasse C, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke H-J, Albrecht B, Horn D, et al. Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for a new classification. *Eur J Med Genet*. 2005;48:397–411.
  25. Touliatou V, Fryssira H, Mavrou A, Kanavakis E, Kitsiou-Tzeli S. Clinical manifestations in 17 Greek patients with Goldenhar syndrome. *Genet Couns*. 2006;17(3):359–70.
  26. Strömland K, Miller M, Sjögren L, Johansson M, Joelsson B-ME, Billstedt E, et al. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: associated anomalies, functional deficits and possible developmental risk factors. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(12):1317–25.

27. Digilio MC, Calzolari F, Capolino R, Toscano A, Sarkozy A, de Zorzi A, et al. Congenital heart defects in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum (Goldenhar syndrome). *Am J Med Genet A*. 2008;146A(14):1815–9.
28. Sutphen R, Galan-Gomez E, Cortada X, Newkirk PN, Kousseff BG. Tracheoesophageal anomalies in oculoauriculovertebral (Goldenhar) spectrum. *Clin Genet*. 1995;48(2):66–71.
29. Cline JM, Hicks KE, Patel KG. Characterization of facial paresis in hemifacial microsomia. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;150 (2):188–93.
30. Regenbogen L, Godel V, Goya V, Goodman RM. Further evidence for an autosomal dominant form of oculoauriculovertebral dysplasia. *Clin Genet*. 1982;21(3):161–7.
31. Kaye CI, Martin AO, Rollnick BR, Rollnick R, Nagatoshi K, Israel J, et al. Oculoauriculovertebral anomaly: segregation analysis. *Am J Med Genet*. 1992;43:913–7.
32. Tasse C, Majewski F, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Gillessen-Kaesbach G, et al. A family with autosomal dominant oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Clin Dysmorph*. 2007;16:1–7.
33. Farra C, Yunis K, Yazbeck N, Majdalani M, Charafeddine L, Wakim R, et al. A Lebanese family with autosomal recessive oculo-auriculo-vertebral (OAV) spectrum and review of the literature: is OAV a genetically heterogeneous disorder? *Appl Clin Genet*. 2011;4:93–7.
34. Huang X, Li X, Tan C, Xiao L, Jiang H, Zhang S, et al. Genome-wide scanning reveals complex etiology of oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Tohoku J Exp Med*. 2010;222:311–18.
35. dos Santos PAC, de Oliveira SF, Freitas EL, Safatle HPN, Rosenberg C, Ferrari I, et al. Non-overlapping 22q11.2 microdeletions in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(2):551–3.
36. Fischer S. Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of BAPX1 in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Hum Mol Genet*. 2006;15(4):581–7.
37. Guida V, Sinibaldi L, Pagnoni M, Bernardini L, Loddo S, Margiotti K, et al. A de novo proximal 3q29 chromosome microduplication in a patient with oculo auriculo vertebral spectrum. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(4):797–801.
38. Kosaki R, Fujimaru R, Samejima H, Yamada H, Izumi K, Iijima K, et al. Wide phenotypic variations within a family with SALL1 mutations: Isolated external ear

- abnormalities to Goldenhar syndrome. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(10):1087–90.
39. Ou Z, Martin DM, Bedoyan JK, Cooper ML, Chinault AC, Stankiewicz P, et al. Branchiootorenal syndrome and oculoauriculovertebral spectrum features associated with duplication of SIX1, SIX6, and OTX2 resulting from a complex chromosomal rearrangement. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(19):2480–9.
  40. Beleza-Meireles A, Hart R, Clayton-Smith J, Oliveira R, Reis CF, Venâncio M, et al. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: clinical and molecular analysis of 51 patients. *Eur J Med Genet*. 2015;58(9):455–65.
  41. Huang X, Xiao L, Li X, Xie Y, Jiang H, Tan C, et al. Two neighboring microdeletions of 5q13.2 in a child with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Eur J Med Genet*. 2010;53(3):153–8.
  42. Choong YF, Watts P, Little E, Beck L. Goldenhar and cri-du-chat syndromes: a contiguous gene deletion syndrome? *J AAPOS*. 2003;7(3):226–7.
  43. Su PH, Yu JS, Chen JY, Chen SJ, Li SY, Chen HN. Mutations and new polymorphic changes in the TCOF1 gene of patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum and Treacher-Collins syndrome. *Clin Dysmorph*. 2007;16:261–7.
  44. Naora H, Kimura M, Otani H, Yokoyama M, Koizumi T, Katsuki M, et al. Transgenic mouse model of hemifacial microsomia: cloning and characterization of insertional mutation region on chromosome 10. *Genomics*. 1994;23(3):515–9.
  45. Luquetti D V., Heike CL, Hing A V., Cunningham ML, Cox TC. Microtia: *Epidemiology & Genetics*. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(1):124–139.
  46. Cox TC, Camci ED, Vora S, Luquetti DV, Turner EE. The genetics of auricular development and malformation: new findings in model systems driving future directions for microtia research. *Eur J Med Genet*. 2014;57(8):394–401.
  47. Brown KK, Viana LM, Helwig CC, Artunduaga MA, Quintanilla-Dieck L, Jarrin P, et al. HOXA2 haploinsufficiency in dominant bilateral microtia and hearing loss. *Hum Mutat*. 2013;34(10):1347–51.
  48. Lopez E, Berenguer M, Tingaud-Sequeira A, Marlin S, Toutain A, Denoyelle F, et al. Mutations in MYT1, encoding the myelin transcription factor 1, are a rare cause of OAVS. *J Med Genet*. 2016;53:752–60.
  49. Beby F, Lamonerie T. The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Exp Eye Res*. 2013;111:9–16.
  50. Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, Clarke MP, et al. Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am J Hum*

- Genet. 2005;76(6):1008–22.
51. Chatelain G, Fossat N. Molecular dissection reveals decreased activity and not dominant negative effect in human OTX2 mutants. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(7):604–15.
  52. Larsen KB, Lutterodt MC. Expression of the homeobox genes OTX2 and OTX1 in the early developing human brain. *J Histochem Cytochem*. 2010;58(7):669–78.
  53. Acampora D, Mazan S. Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development*. 1995;121(10):3279–90.
  54. Nishida A, Furukawa A. *Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci*. 2003;6(12):1255–63.
  55. Dateki S, Fukami M. OTX2 mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial growth hormone deficiency: functional studies using the IRBP, HESX1, and POU1F1 promoters. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3697–702.
  56. Gorbenko Del Blanco D, Romero CJ. A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve. *Eur J Endocrinol*. 2012;167(3):441–52.
  57. Matsuo I, Kuratani S. Mouse *Otx2* functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev*. 1995;9(21):2646–58.
  58. Schilter KF, Schneider A. OTX2 microphthalmia syndrome: four novel mutations and delineation of a phenotype. *Clin Genet*. 2011;79(2):158–68.
  59. Henderson RA, Williamson K. Inherited PAX6, NF1 and OTX2 mutations in a child with microphthalmia and aniridia. *Eur J Hum Genet*. 2007;15(8):898–901.
  60. Sergouniotis PI, Urquhart JE. Agnathia-otocephaly complex and asymmetric velopharyngeal insufficiency due to an in-frame duplication in OTX2. *J Hum Genet*. 2015;60(4):199–202.
  61. Lonero A, Delvecchio M. A novel OTX2 gene frameshift mutation in a child with microphthalmia, ectopic pituitary and growth hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2016;29(5):603–5.
  62. Mauri L, Franzoni A. SOX2, OTX2 and PAX6 analysis in subjects with anophthalmia and microphthalmia. *Eur J Med Genet*. 2015;58(2):66–70.
  63. Slavotinek AM, Garcia ST, Chandratillake G, Bardakjian T. Exome sequencing in 32 patients with anophthalmia/microphthalmia and developmental eye defects. *Clin Genet*. 2015;88(5):468–73.



64. Vincent A, Forster N. OTX2 mutations cause autosomal dominant pattern dystrophy of the retinal pigment epithelium. *J Med Genet.* 2014;51(12):797–805.
65. Williamson KA, FitzPatrick DR. The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma. *Eur J Med Genet.* 2014;57(8):369–80.
66. Gerth-Kahlert C, Williamson K. Clinical and mutation analysis of 51 probands with anophthalmia and/or severe microphthalmia from a single center. *Mol Genet Genomic Med.* 2013;1(1):15–31.
67. Patat O, van Ravenswaaij-Arts CM. Otocephaly-Dysgnathia Complex: Description of Four Cases and Confirmation of the Role of OTX2. *Mol Syndr.* 2013;4(6):302–5.
68. Chassaing N, Causse A. Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia. *Clin Genet.* 2014;86(4):326–34.
69. Rieder MJ, Green GE. A human homeotic transformation resulting from mutations in *PLCB4* and *GNAI3* causes auriculocondylar syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012;90(5):907–14.
70. Amiel J, Faivre L ve ark. Hypertelorism-Microtia-Clefting syndrome (Bixler syndrome): report of two unrelated cases. *Clin Dysmorphol.* 2001;10(1):15–8.
71. Lines MA, Huang L, Schwartzentruber J ve ark. Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by *EFTUD2* causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am J Hum Genet.* 2012;90(2):369–77.
72. Luquetti DV, Hing AV. “Mandibulofacial dysostosis with microcephaly” caused by *EFTUD2* mutations: expanding the phenotype. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(1):108–13.
73. Chrzanowska K, Fryns JP. Miller postaxial acrofacial dysostosis syndrome. Follow-up data of a family and confirmation of autosomal recessive inheritance. *Clin Genet.* 1993;43(5):270.
74. Bonthron DT, Macgregor DF, Barr DG. Nager acrofacial dysostosis: minor familial manifestations supporting dominant inheritance. *Clin Genet.* 1993;43(3):127–31.
75. Evans KN, Gruss JS ve ark. Oculoauriculofrontonasal syndrome: case series revealing new bony nasal anomalies in an old syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(6):1345–53.
76. Schaefer E, Collet C ve ark. Autosomal recessive *POLR1D* mutation with decrease of *TCOF1* mRNA is responsible for Treacher Collins syndrome. *Genet Med.* 2014;16(9):720–4.
77. Passos-Bueno MR, Ornelas CC, Fanganiello RD. Syndromes of the first and second

- pharyngeal arches: A review. *Am J Med Genet Part A*. 2009;149(8):1853–9.
78. Couser N, Pande C. Camptodactyly and the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2016.
  79. Kokavec R. Goldenhar Syndrome With Various Clinical Manifestations. *Cleft Palate–Craniofacial J*. 2006;43(5).
  80. Prasad KN, Rajha A, Vegi PK. A Case of Monozygotic Twins: The Value of Discordant Monozygotic Twins in Goldenhar Syndrome. *Case Rep Pediatr*. 2013; 2013:591350.
  81. Verona L, Damian N. Monozygotic twins discordant for Goldenhar syndrome. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82(1):75–8.
  82. Tunçbilek E. Clinical outcomes of consanguineous marriages in Turkey. *Turk J Pediatr*. 2001;43(4):277–9.
  83. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics In Medicine*. Eighth edition. 2016.
  84. Sabunciyan S, Yolken R ve ark. Polymorphisms in the Homeobox Gene OTX2 May Be a Risk Factor for Bipolar Disorder. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatric Genet*. 2007). 2007;114:1083–1086.

## 8. EKLER

Ek 1:

<b>GOLDENHAR SENDROMU ÖNTANILI HASTALAR- VERİ KAYIT FORMU</b>
---

<b>Hastanın adı</b>		<b>Gönderen doktor</b>	
<b>Doğum tarihi</b>		<b>Hasta no</b>	
<b>Cinsiyet</b>		<b>Adres</b>	
<b>Akraba evliliği</b>		<b>Telefon</b>	

<b>Prenatal öykü</b>	
<b>Natal öykü</b>	
<b>Postnatal öykü</b>	
<b>Nöromotor gelişim</b>	
<b>Baş çevresi, boy, kilo persentilleri</b>	
<b>Dismorfik bulgular</b>	
<b>Vertebra anomalisi</b>	
<b>Kardiyak, renal anomali</b>	
<b>SSS anomalisi</b>	
<b>Diğer bulgular</b>	
<b>Lab. testleri</b>	
<b>Görüntüleme</b>	

<b>Karyotip analizi</b>	
<b>Moleküler testler</b>	
<b>Pedigri:</b>	