

LİZENSEFALİ SPEKTRUMU OLGULARINDA GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİ

GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION IN CASES WITH LISSENCEPHALY SPECTRUM

Ayça Dilruba ASLANGER¹ , Z. Oya UYGUNER¹ , Birsen KARAMAN^{1,2} , Seher BAŞARAN¹ ,
Hülya KAYSERİLİ^{1,3} 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Pediatrik Temel Bilimler Anabilim Dalı İstanbul, Türkiye

³Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: A.D.A. 0000-0003-1770-1762; Z.O.U. 0000-0002-2035-4338; B.K. 0000-0001-8640-0176; S.B. 0000-0001-8668-4746; H.K. 0000-0003-0376-499X

Citation/Atf: Aslanger AD, Uyguner ZO, Karaman B, Basaran S, Kayserili H. Genotype-phenotype correlation in cases with lissencephaly spectrum. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2022;5(3):160-166. <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-1107813>

ÖZ

Amaç: Çalışmamızda lizensefali tanısı alan altı olgunun genotip-fenotip ilişkisi açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde lizensefali tanısı ile izlenen altı olgu dâhil edilmiştir. Ağır lizensefali olan dismorfizmin eşlik ettiği iki olgu, izole lizensefali tanılı iki olgu, subkortikal band heterotopisi olan bir olgu ve serebellar hipoplazinin eşlik ettiği lizensefali tanılı bir olguda genotip-fenotip ilişkisi göz önüne alınarak sitogenetik (karyotip ve 17p13 FISH analizi) ile moleküler testler (*LIS1*, *DCX* ve *RELN* genlerinin Sanger yöntemi ile dizilenmesi) uygulanmıştır.

Bulgular: Olgu 1 ve Olgu 2'de 17p13 delesyonu saptanarak Miller-Dieker sendromu tanısı konuldu. İzole lizensefali olan Olgu 3 ve 4'te beyin posteriyörünün daha belirgin etkilenmesi nedeniyle yapılan *LIS1* geninde sırasıyla bilinen heterozigot c.337C>T (p.Arg113Ter) ve heterozigot c.946G>C (p.Asp317His) mutasyonları saptandı. Subkortikal band heterotopisi olan olguda (Olgu 5) *DCX* geninde heterozigot c.605_607delAGA (p.Lys202del) *novel* varyantı bulundu. Lizensefaliye serebellar hipoplazinin eşlik ettiği Olgu 6'da *RELN* geninde homozigot c.204C>G (p.Tyr68Ter) *novel* varyantı saptandı.

Sonuç: Genotip-fenotip ilişkisi göz önüne alındığında, klinik ve radyolojik özellikler lizensefali olgularında genetik mutasyonların belirlenmesine yardımcı olmuştur. Ayrıca, *DCX* ve *RELN* genlerinde patojenik olduğu tahmin edilen daha önce bildirilmemiş iki varyantın tespiti, lizensefali ile ilişkili genotip bilgisine katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Lizensefali, nöronal migrasyon anomalisi, Miller-Dieker sendromu

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to evaluate six cases diagnosed with lissencephaly in terms of the genotype-phenotype correlation.

Materials and Methods: Six cases with lissencephaly, which were followed up in our outpatient clinic, were included in the study. Two cases had lissencephaly and dysmorphic facial features, two cases had isolated lissencephaly, one case had subcortical band heterotopia, and one case had lissencephaly and cerebellar hypoplasia. Cytogenetic analysis (karyotyping and fluorescence in situ hybridization technique) and molecular tests (Sanger sequencing of the *LIS1*, *DCX*, and *RELN* genes) were selected according to genotype-phenotype correlation.

Results: 17p13 deletions were detected in two cases (Case 1 and Case 2), and Miller-Dieker syndrome was diagnosed. In Cases 3 and 4 with posterior dominant isolated lissencephaly, sequencing of the *LIS1* gene revealed heterozygous c.337C>T (p.Arg113Ter) and heterozygous c.946G>C (p.Asp317His) mutations, respectively. A heterozygous novel c.605_607delAGA (p.Lys202del) mutation in the *DCX* gene was found in a female case (Case 5) with subcortical band heterotopia. In Case 6 with lissencephaly accompanied by cerebellar hypoplasia, a homozygous c.204C>G (p.Tyr68Ter) novel variant was detected in the *RELN* gene.

Conclusion: When the genotype-phenotype correlation approach was chosen for lissencephaly, clinical and radiological features helped in pinpointing the genetic mutations in cases of lissencephaly. In addition, the detection of two previously unreported variants that were predicted to be pathogenic in the *DCX* and *RELN* genes contributes to the genotype information associated with lissencephaly.

Keywords: lissencephaly, neuronal migration anomalies, Miller-Dieker syndrome

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ayça Dilruba ASLANGER E-mail: aaaslanger@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 05.07.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 08.08.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 10.08.2022 • **Kabul/ Accepted:** 26.07.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 19.09.2022



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

GİRİŞ

Kortikal gelişim malformasyonları; mikrosefali, psiko-sosyal-motor gelişme geriliği (PSMG), spastisite, epilepsi ve diğer birçok nörolojik bulgunun etiopatogenezinde yer almaktadır. Bu malformasyonlar; nöronal proliferasyon anomalileri, nöronal migrasyon anomalileri ve nöronal organizasyon anomalileri olmak üzere üç grupta incelenmektedir. Licensefali (LIS) spektrumu, nöronal migrasyon anomalisi nedeniyle oluşan girus ve sulkus gelişimi ile ilişkili bir kortikal gelişim malformasyonudur. LIS spektrumu; 3 cm'den daha büyük girus aralığının olduğu agiri (girus yokluğu), 1,5 ila 3 cm aralıklı girusların olduğu pakigiri (girusların sayısında azalma/girusların kabalaşması) ve Subkortikal Band Heterotopisini (SBH) içermektedir. Agiri ve pakigiride, yaklaşık 2,5 ila 4 mm olan normal korteks kalınlığı çok kalın (10-20 mm) veya hafif kalın (5-10 mm) olurken, SBH'de korteksin hemen altında ak maddenin içinde gri madde bilateral ve simetrik bir band oluşturur (1). Bu spektrum ile ilişkili bilinen *LIS1*, *DCX*, *ARX*, *TUBA1A*, *RELN* ve *VLDLR* genleri dahil olmak üzere 20'nin üzerinde gen tanımlanmıştır (2). Di Donato ve arkadaşları tarafından yeni tanımlanan genlerin ilişkili olduğu yollar ile biyolojik ağlar dikkate alınarak giral malformasyonun derecesi, gradyanı, kortikal kalınlığı ve eşlik eden beyin malformasyonlarının varlığına göre görüntüleme tabanlı bir sınıflandırma sistemi geliştirilerek genotip-fenotip ilişkisi kurulmuştur (3). Giral malformasyonların etkilenme derecesi (*Grade*) ağırdan hafife 1'den 6'ya kadar yapılan derecelendirme sistemine göre; diffüz agiri (*Grade 1*), anterior veya posteriyorda az sayıda kıvrım dışında diffüz agiri (*Grade 2*); anterior pakigiri ve posteriyor agiri (*Grade 3*), diffüz pakigiri (*Grade 4*), pakigiri ve SBH (*Grade 5*) ve SBH (*Grade 6*) olarak sınıflandırılmıştır (3). *LIS1* geni ile ilişkili Licensefali, Miller-Dieker sendromu (MDS), İzole Licensefali Sekansı (ILS) ve nadiren SBH içerir. Ağır licensefaliye (*Grade 1-2*) ek olarak, belirgin alın, bitemporal darlık, orta yüz hipoplazisi, antevort burun deliklerinin olduğu kısa burun ve ince üst dudak gibi dismorfik yüz özellikleri olan MDS'ye, *LIS1* genini içeren 17p13.3 mikrodelsiyonları neden olur. *LIS1* geninin monoalelik nokta mutasyonları ise licensefali derecesinin daha az olduğu (*Grade 3-4*) ve dismorfizmin eşlik etmediği ILS'ye neden olabilir. SBH, frontal loblara sınırlı çift korteks görünümünde ise tipik olarak X kromozomunda lokalize *Doublecortin* (*DCX*) genindeki mutasyonlar ile ilişkilidir. Nadiren posteriyor loblara sınırlı SBH'de *LIS1* genindeki mutasyonlar gösterilmiştir. Etkilenmiş olgularda büyüme-gelişme geriliği, ağır mikrosefali, PSMG, epilepsi ve zihinsel gerilik görülebilir. *DCX* geni ile ilişkili licensefalide ise, erkek olgularda anterior etkilenmenin daha belirgin olduğu licensefali, dişi olgularda SBH sendromu görülür. LIS spektrumundaki olguların yaklaşık %40'ında *LIS1* geninde delesyon veya nokta mutasyonları ile %23'ünde *DCX* geni mutasyonları etiolojiden sorumludur. LIS spektrumuna serebellar hipoplazinin eşlik ettiği ek beyin malformasyon grubunda ise otozomal resesif kalıtılan *RELN* geni mutasyonları olguların yaklaşık %60'ında görülür (3). Licensefalide epilepsi ve nöromotor retardasyon nedeniyle yaşam beklentisi büyük ölçüde azalır ve ölüm en sık erken çocukluk döneminde meydana gelir. Bu çalışma sitogenetik ve moleküler incelemeler ile etiopatogenezini aydınlatılmış licensefali tanılı altı olgunun verilerini genotip-fenotip ilişkisi değerlendirilerek sunmayı amaçlamıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Dosya no: 2008/2075) olup İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na 1996-2009 yılları arasında başvuran ve etiopatogenezini aydınlatılmış LIS spektrumu tanısı alan olgular üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubu 17p13.3 delesyonu ile *LIS1*, *DCX* ve *RELN* genlerinde mutasyon saptanan altı licensefali tanılı olgudan oluşmuştur. Çalışmaya dâhil edilen tüm olguların ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik yöntemler

Olgulardan alınan periferik kan hücrelerinden kromozom eldesi ile elde edilen kromozomlar metafaz ve/veya prometafaz evresinde >550 band düzeyinde HRBT (*High Resolution Banding Technique*) ile incelendi. MDS klinik tanılı olgular kromozomların belli bölgelerine özgün DNA dizilerinin problarla işaretlenerek DNA ile hibrid oluşturması ve mikroskopta görüntülenmesi esasına dayanan FISH (Floresan in Situ Hibridizasyon) tekniği ile incelendi. Bu olgularda FISH analizi ile tanı koymak için *LIS1* geninin 80kb'lık kısmını içeren 17p13.3 bölgesine bağlanıp 110kb uzunluğundaki DNA dizisini kırmızı renkli floresan ile işaretleyen SMS/MDS/ILS prob kombinasyonu kullanıldı (Cytocell/Aquarius Smith Magenis/Miller-Dieker/ILS probe combination).

Moleküler yöntemler

Olguların klinik ve radyolojik bulguları göz önüne alınarak periferik kandan DNA izolasyonları 5ml K3 EDTA'lı tüplere alınan periferik kandan kit kullanılarak firma protokolüne uygun olarak elde edildi (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche Diagnostics/Elips-İstanbul). Genomik DNA ve/veya komplementer DNA için primer tasarlanırken seçilen oligonükleotidlerin herhangi bir SNP (*single nucleotide polymorphism*) üzerine gelmemesine, tekrarlayan diziler üzerinde bulunmamasına, ileri geri nükleotidlerin bağlanma ısılarının (Tm; melting temperature) birbiri ile aynı ya da en fazla +/-2 °C farklı olmasına, içerdiği AT ve CG nükleotidlerinin olduğunca eşit dağılımlı olmasına, 18-22 nükleotid içermesine ve gen bölgesi için özgün olmasına özen gösterildi. Özgünlük, *University of California, San Diego* (UCSD) '*Genome Browser in silico PCR*' interaktif sistemi ile test edildi.

DCX ve *LIS1* genlerinin tüm ekzonlarını dizileyebilecek ve genomik DNA'nın intron-ekzon bağlantı bölgelerinden en az 100 baz çifti introna girecek şekilde ve *RELN* geninin komplementer DNA'sında ise tüm kodlanan ekzonları dizileyebilecek şekilde birbiri ile örtüşen primerler tasarlandı. Elde edilen genomik DNA'da Olgu 3 ve 4'te *LIS1* geni (NM_000430.4) kodlayan 1-11.ekzon/ekzon-intron bölgeleri ile Olgu 5'te *DCX* geni (NM_178151.3) 1-7.ekzon ve ekzon-intron sınırları için Sanger dizileme metodu ile çalışılmıştır. Olgu 6'da periferik kandan elde edilen cDNA ve gDNA örneklerinde *RELN* geni (NM_005045.4) Sanger yöntemi ile dizilendi. Olgu 3 ila 6'nın ebeveynlerinden alınan periferik kan örneklerinde segregasyon analizi Sanger yöntemi ile ya-

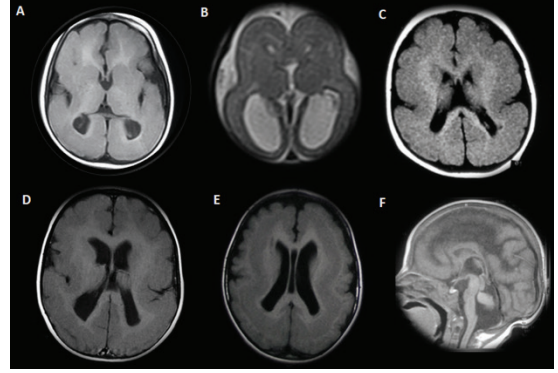
pılmıştır. PCR yöntemi ile çoğaltılan ekzon bölgeleri ABI 3730 XL otomatik kapiller DNA dizileyicisinde (*Applied Biosystems, Macrogen Inc.*, Seul, Kore) gerçekleştirildi. Dizileme sonuçları Chromas 2.32 (www.technelysium.com.au/chromas.html) ve NCBI BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) programları kullanılarak bilgisayar ortamında analiz edildi. Varyasyonların genomik lokasyonları GRCh37/hg19 göre belirlenmiş ve bulunan varyantlar ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) kriterleri üzerinden değerlendirilmiştir. Ayrıca ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) ve *Human Genome Mutation Database* (HGMD) veri tabanları (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>) taranmıştır. Alelik frekansları gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>) ve Türk toplumu ile ilişkili (*Turkish Variome*, TRV) veri tabanlarında kontrol edilmiştir (4). Patojenite skorlaması için mutasyon tipine göre *Mutation Taster* (<https://www.mutationtaster.org/>), yanlış anlamlı değişimler için *Protein Variation Effect Analyzer* (PROVEAN) <http://provean.jcvi.org/index.php>) ile *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD), <https://cadd.gs.washington.edu/snv>) *in silico* veri analiz programları kullanılmıştır.

BULGULAR

Olgulara ait radyolojik (Şekil 1) bulgular ile genetik sonuçlar (Şekil 2) Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: Licensefali spektrumu olan olguların Kraniyal MR bulguları ve genetik sonuçları

Olgu	Kraniyal MR bulgusu	Grade	Genetik sonuçlar
Olgu 1	anteriyorda birkaç kıvrım dışında posteriyorun daha ağır etkilendiği diffuz agiri	Grade 2	heterozigot 17p13 delesyonu Miller-Dieker sendromu
Olgu 2	diffuz agiri	Grade 1	heterozigot 17p13 delesyonu Miller-Dieker sendromu
Olgu 3	posteriyor agiri ve anteriyor pakigiri	Grade 3	heterozigot 17p13 delesyonu <i>LIS1</i> geninde heterozigot c.337C>T (p.Arg113Ter) bilinen varyantı [VCV000280047.11]
Olgu 4	posterior pakigiri	Grade 4	<i>LIS1</i> geninde heterozigot c.949G>C (p.Asp317His) bilinen varyantı [VCV000008077.1]
Olgu 5	Subkortikal band heterotopisi	Grade 6	<i>DCX</i> geninde heterozigot c.605_607 delAGA novel varyantı [SVC002524170]
Olgu 6	belirgin anterior ve hafif posterior pakigiri, serebellum ve beyin sapı hipoplazisi	-	<i>RELN</i> geninde homozigot c.204C>G (p.Tyr68Ter) novel varyantı [SCV002524171]



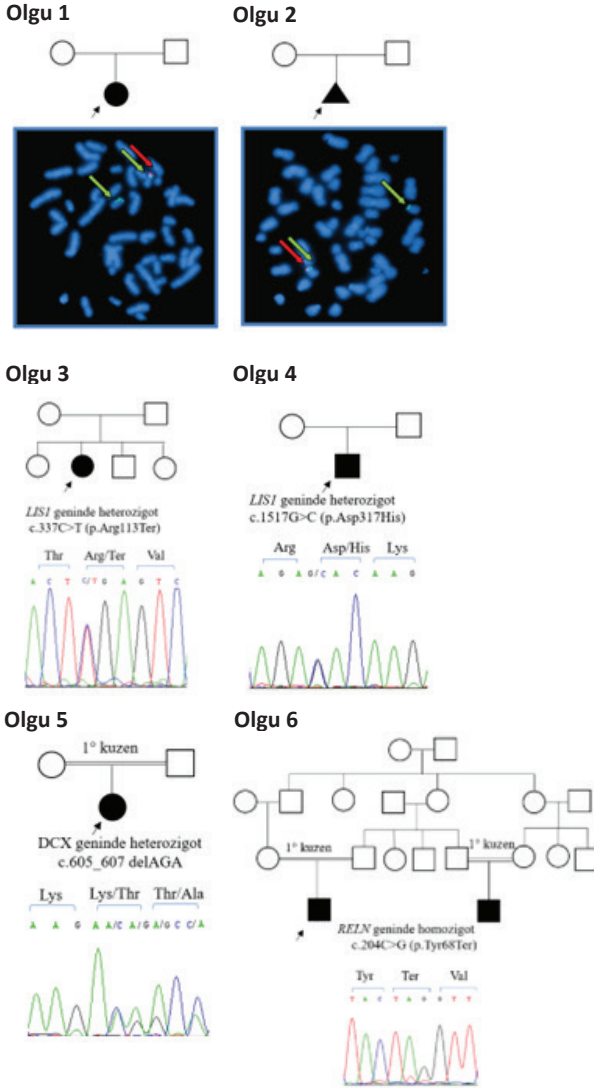
Şekil 1: Olguların Kraniyal MR görüntüleri A: Miller-Dieker sendromu tanılı Olgu 1'de T1 ağırlıklı aksiyal kesitlerde beynin anteriyorunda birkaç kıvrım dışında diffuz agiri (*Grade 2*) B: Miller-Dieker sendromu tanılı Olgu 2'de T2 ağırlıklı aksiyal kesitlerde diffuz agiri (*Grade 1*) C: *LIS1* geninde heterozigot mutasyonu olan Olgu 3'te T1 ağırlıklı aksiyal kesitlerde beynin anteriyorunda pakigiri ve posteriyorunda agiri (*Grade 3*) D: *LIS1* geninde heterozigot mutasyonu olan Olgu 4'te T1 ağırlıklı aksiyal kesitlerde beynin posteriyorunda daha belirgin diffuz pakigiri (*Grade 4*) E: *DCX* geninde heterozigot *novel* varyantı olan Olgu 5'te T1 ağırlıklı aksiyal kesitlerde kalın SBH (*Grade 6*) F: *RELN* geninde homozigot *novel* varyantı olan Olgu 6'da serebellar ve beyin sapı hipoplazisi ile birlikte pakigiri

Klinik bulgular

Olgu 1; Anne-babası arasında akraba evliliği olmayan 4 yaşında kız olgu (G1P1); PSMG, ağır mikrosefali (-3,51 SD), epilepsi ve kortikal anomali nedeniyle değerlendirilmişti. Mikrosefali, bitemporal darlık, dolgun yanakların olduğu armut şeklinde dismorfik yüz görünümü mevcuttu. Kraniyal MR bulguları; beynin anteriyorunda birkaç kıvrım dışında posteriyorun daha ağır etkilendiği diffuz agiri (*Grade 2*) ile uyumlu bulundu.

Olgu 2; Anne-babası arasında akraba evliliği olmayan kortikal anomali saptanması üzerine 32.GH'da termine edilen erkek fetüs postmortem değerlendirilmişti (G1TıbbiTahliye1). 32.GH'da II. düzey ultrasonografide ventrikülomegali, 3.Ventrikül'de dilatasyon ve korpus kollozum agenezisi (CCA) saptanmış, singular girus, pariyetooksipital ve kalkanin fissürler izlenmemiş ve insular operkulinizasyon yokluğu gözlenmişti. Fetal Kraniyal MR'da diffuz agiri ve CCA tanısı doğrulanmıştı. 32.GH'daki fetüsün postmortem fizik muayenesinde baş çevresi 26 cm (-2,70 SD) idi. Mikrosefali, bitemporal darlık, hipertelorizm, basık burun ucu, düz filtrum ve dar damağın olduğu dismorfik yüz görünümü mevcuttu. Mikrosefali, diffuz agiri (*Grade 1*), CCA, dismorfik yüz görünümü bulguları mevcuttu.

Olgu (3) Anne-babası arasında akrabalık olmayan, 2 yaşındaki kız olgu (G4P4); , mikrosefali [43 cm (-4,12 SD)], hipotoniste, PSMG, epilepsi ve kortikal anomali nedeniyle polikliniğimizde değerlendirilmişti. Nöromotor gelişiminde başını 1 yaşında tuttuğu, desteksiz oturmaya 5 yaşında başladığı öğrenildi. Kraniyal MR değerlendirmesinde posteriyor bölgenin belirgin etkilendiği posteriyor agiri ve anteriyor pakigiri (*Grade 3*) ile uyumlu bulundu ve ILS grubuna dahil edildi.



Şekil 2: Olguların ait aile ağaçları ve genetik sonuçları Olgular 1 ve Olgular 2de MDS'ye özgü FISH çalışmasında 17p13.3 MDS bölgesinde tek sinyal varlığı, Olgular 3'te *LIS1* geninde heterozigot c.337C>T (p.Arg113Ter) mutasyonu, Olgular 4'te *LIS1* geninde heterozigot c.946G>C (p.Asp317His) mutasyonu, Olgular 5'te *DCX* geninde daha önce hastalıkla ilişkisi bilinmeyen novel heterozigot c.605_607delAGA (p.Lys202del) varyantı, Olgular 6 ve benzer etkilenmiş kuzeninde *RELN* geninde daha önce hastalıkla ilişkisi bilinmeyen novel homozigot c.204C>G (p.Tyr68Ter) varyantı

Olgular (4) Anne-babası arasında akrabalık olmayan, 1 yaşındaki erkek olgu (G1P1); sınır PSMG, ve kortikal anomali nedeniyle değerlendirildi. Olgunun baş çevresi 46,2 cm (0,62 SD) normal idi. Yüzde belirgin dismorfizmi yoktu. Nöromotor gelişimde 3 aylıkken başını tuttuğu ve 9 aylıkken desteksiz oturduğu öğrenildi. Kraniyal MR değerlendirmesinde beyin posteriyör bölgesinin daha belirgin olarak etkilendiği diffuz pakigiri (Grade 4) izlendi.

Olgular (5) Anne-baba arasında 1. derece kuzen evliliği olan 6 yaşındaki kız olgu (G1P1); PSMG, epilepsi ve kortikal anomali

nedeniyle polikliniğimizde değerlendirildi. 6 yaş fizik muayenesinde baş çevresi 49,5 cm (-1,12 SD) idi. Yüzde belirgin bir dismorfizmi yoktu. Sorulara yanıt vermiyor, ancak basit emirleri yerine getiriyordu. Nöromotor gelişimde 3 yaşında yürüdüğü, 2 yaşında hecelemeye başladığı ve 4 yaşında ilk kelimesini söylediği öğrenildi. Halen 3 kelimeli cümle kuramıyordu. Kraniyal MR değerlendirmesinde supratentoriyal alanda serebral korteksler ile lateral ventriküller arasında konveksiteye dek tüm uzunluğu boyunca gri madde ile aynı intensitede homojen kalın band olan SBH (Grade 6) ile uyumlu bulundu.

Olgular (6) Anne-baba arasında 1° kuzen evliliği olan 2 yaş 4 aylık erkek çocuk (G1P1) ağır PSMG, hipotonisite, spastisite, epilepsi ve serebellar hipoplazi nedeniyle değerlendirilmişti. Ailede anne-babası arasında akraba evliliği olan benzer klinik bulguları olan kuzen öyküsü mevcuttu. 2 yaş 4 aylık fizik muayenesinde baş çevresi 46 cm (-2,38 SD) idi, halen destekli oturma becerisini kazanamamıştı. Ağır santral hipotonisite ve ekstremitelerde hipertonsitesi mevcuttu. Olgular ve benzer etkilenmiş kuzenin Kraniyal MR incelemelerinde belirgin anterior ve hafif posteriyör pakigiri, incelmış korpus kallozum, hafif derecede beyin sapı hipoplazisi ve ağır derecede serebellar hipoplazi saptandı.

Genetik Sonuçlar

Tüm olguların HRBT ile yapılan karyotip analizleri normal (Olgular 1, 3 ve 5'te 46, XX ile Olgular 2, 4 ve 6'da 46,XY) sonuçlandı. Olgular 1 ve Olgular 2'de MDS'ye özgü FISH çalışmasında 17. kromozomlardan birisinde 17p13.3 MDS bölgesinde sinyal alınmadı ve MDS tanısı kondu. ILS tanıları iki olguda *LIS1* (NM_000430.4) geninde literatürde daha önce hastalıkla ilişkisi bildirilmiş sırasıyla, Olgular 3'te heterozigot c.337C>T (p.Arg113Ter) mutasyonu ile Olgular 4'te heterozigot c.946G>C (p.Asp317His) mutasyonu saptandı. Olgular 3 ve 4'ün ebeveynlerinde yapılan segregasyon analizinde anne ve babanın bu mutasyonu taşımadığı olgularımızın *de novo* mutasyon ile etkilendiği anlaşıldı. SBH'li Olgular 5'te *DCX* geninde (NM_178153.1) daha önce hastalıkla ilişkisi bilinmeyen *novel* heterozigot c.605_607delAGA (p.Lys202del) varyantı saptandı. Bu varyant GnomAD ve TRV veri tabanında bulunmayan ACMG kriterlerine göre patojenik (PM1, PM2, PM4, PP3) ve *in silico* veri tabanlarına göre (*Mutation Taster* skoru: 0,99 hastalık yapıcı, *Provean* skoru: -12.094 zararlı) hastalık yapıcı olarak yorumlanmıştır. Anne ve babada bu varyant saptanmamış ve olguların *de novo* oluşan *novel* hastalık yapıcı olduğu öngörülen aminoasit dizisinde lizin aminoasit kaybına neden olan çerçeve-içi (*in-frame*) delesyon olduğu anlaşıldı. Serebellar hipoplazi ile birlikte LIS spektrumu olan Olgular 6'da *RELN* (NM_005045.4) geninde homozigot c.204C>G (p.Tyr68Ter) *novel* varyantı saptandı. Aynı varyant benzer etkilenmiş kuzeninde homozigot ve etkilenmiş olguların ebeveynlerinde heterozigot saptandı (Şekil 2). Bu *novel* varyant GnomAD ve TRV veri tabanında bulunmayan nadir bir varyant idi. ACMG kriterlerine göre olası patojenik (PVS1, PM2) ve erken dur kodonu oluşturması nedeniyle *in silico* veri tabanlarında (*Mutation Taster* skoru:1 hastalık yapıcı, CADD skoru: 38 zararlı) hastalık yapıcı olarak hesaplanmıştır. Bilinen varyantların ClinVar erişim numaraları [*variation in ClinVar* (VCV)] ile *novel* varyantların ClinVar veri tabanına eklenmesi için tarafımızca gönderilen bilgilere ait ka-

yıt numaraları [submitted records in ClinVar (SCV)] Tablo -1'de verilmiştir.

TARTIŞMA

LIS spektrumu sınıflandırılması ile ilgili ilk çalışmalarda, giral malformasyonlar ağırdan hafife 1'den 6'ya kadar derecelendirilmişti (5-7). Bu derecelendirme sistemine ek olarak giral malformasyonun gradientinin beyin farklı bölgelerinde değişkenlik gösterdiği anterior (A) veya posterior (P) etkilenmenin ağırlığına göre genotip-fenotip ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır. Bu sınıflandırma LIS1 ve DCX genleri ile ilişkili LIS spektrumunu ayırt etmek için faydalı olmakla birlikte yeni genlerin tanımlandığı farklı malformasyon sendromları için kullanılamamıştır. Yeni genlerin ilişkili olduğu protein yolları göz önüne alınarak genotip-fenotip korelasyonu için önerilen güncel sınıflandırmaya göre giral malformasyonun derecesine, gradyanına, kortikal kalınlığına ve ilişkili beyin malformasyonlarının varlığına göre görüntüleme tabanlı bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir (2,3). Bu yeni sınıflandırmada LIS spektrumu ile ilişkili proteinleri kodlayan 20'nin üzerinde gen, mikrotübül ve mikrotübül ilişkili proteinler [Microtubule-Associated Proteins (MAPs) başta olmak üzere hücre içi lokalizasyon ve fonksiyonuna göre 8 alt gruba ayrılmıştır. Bunlar; mikrotübülün yapısal bir proteini olan tubulinler (TUBA1A, TUBB2B, TUBA8, TUBB, TUBB3), sentrozomda eksprese edilen MAP (LIS1-YWHAE, LIS1, TUBG1, NDE1), mikrotübül motor (DYNC1H1, KIF5C, KIF2A), aktin ve aktin ilişkili MAP (DCX, ACTB, ACTG1), kompleks MAP (CDK5), Reelin sinyal yolağı (RELN, VLDLR), ön beyin transkripsiyon regülatörü (ARX) ve kaspas-aracılı apoptoz (CRADD) ile ilişkili genlerdir (2).

LIS1 geni, Platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz izoform 1B alfa subüni (PAFAH1B1) olarak da bilinen, evrimsel olarak korunmuş primer olarak göç eden nöronların sentrozomunda lokalize mikrotübül ile ilişkili LIS1 proteinini kodlamaktadır (8,9). LIS spektrumundaki olguların yaklaşık %40'ından LIS1 geninde delesyon veya nokta mutasyonları sorumludur. LIS1 geni ile ilişkili lizenfali beyin posteriorunun (pariyetooksipital bölge) anteriora (frontotemporal bölge) göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Grade 1-2 lizenfali tanılı 17p13.3'te heterozigot büyük delesyonu olan MDS'den etkilenen olgular, Grade 2-4 lizenfali tanılı LIS1 geninde heterozigot küçük gen içi delesyon ve duplikasyonu olan ILS'li olgulara göre daha ağırdır. LIS1 geninin heterozigot delesyonları veya mutasyonları LIS spektrumundaki olguların %40'ında bulunmuştur. SBH'ye neden olan LIS1 mutasyonları diffüz değil, posteriora baskın bulunur. Mozaik LIS1 mutasyonları olan olgularda posterior baskın SBH'de mutasyonlar gösterilmiştir (10). Şimdiye kadar HGMD veri tabanında 53 yanlış anlamlı/anlamsız, 13 kırılma hatası, 19 küçük delesyon, 12 küçük delesyon, insersiyon/duplikasyon, 78 büyük delesyon, 8 kompleks yeniden düzenlemeler olmak üzere 208 varyant bildirilmiştir.

Olgu 1, posterior ağıri ve anterior pakigirinin (Grade 2) görüldüğü kalın korteksin izlendiği lizenfali ve fasiyal dismorfizm ile Olgu 2, fetal dönemde diffuz ağıri ile prezente olan dismorfik bulgular nedeniyle değerlendirilmiş ve 17p13'e özgün FISH analizi ile LIS1 genini de içeren 17p13'te monoalelik delesyon saptanarak MDS tanısı almışlardı. Ağır lizenfali bulguları olan olgularda dismorfik bulgular eşlik etmesi halinde olgu serimiz-

deki olgu 1 ve 2'de olduğu gibi ilk basamakta 17p13 FISH veya array-CGH analizi ile MDS'ye tanı konulabilmektedir.

Ağır mikrosefaliye eşlik eden anterior pakigiri ve posterior ağıri (Grade 3) ile uyumlu ILS bulgusu olan Olgu 3'te LIS1 geninde heterozigot c.337C>T (p.Arg113Ter) mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon Saillour ve arkadaşları tarafından olgumuza benzer Grade 3 lizenfali olan bir olguda daha önceden bildirilmişti (11). Hafif nöromotor gelişim geriliği olan ancak mikrosefali ve epilepsinin eşlik etmediği posterior daha belirgin diffuz pakigirisi (Grade 4) olan Olgu 4'te LIS1 geninde heterozigot c.949G>C (p.Asp317His) mutasyonu ise Carlota ve arkadaşları tarafından yine olgumuza benzer Grade 4 lizenfali olan bir olguda bildirilmiştir (12). LIS1 proteininin erken sınıflandırılmasına neden olan patojenik varyantlar, yanlış anlamlı varyantlardan daha şiddetli derecede bir lizenfali fenotipi ile sonuçlanma eğiliminde olduğu öngörülmüştür. Literatürdeki bu bilgi bizim olgu serimizde anlamsız (nonsense) mutasyonu olan Olgu 3'ün yanlış anlamlı (missense) mutasyona sahip Olgu 4'ten daha ağır etkilenmesi ile uyumlu bulunmuştur.

DCX geni aktin ve aktin ilişkili MAP protein ağında kategorize edilmiştir. Mikrotübül ağı ve aktin hücre iskeleti arasındaki entegrasyon, hücre bölünmesi, nöronal göç ve aksonal büyüme gibi kritik hücre fonksiyonları için gereklidir (13,14,15). Bu gen, çoğu SBH'li olmak üzere LIS'li hastaların %23'ünü oluşturan en sık mutasyona uğramış ikinci gendir. Şimdiye kadar HGMD veri tabanında 109 yanlış anlamlı/anlamsız, 8 kırılma hatası, 12 küçük delesyon, 7 insersiyon/duplikasyon, 1 küçük indel, 12 büyük delesyon ve 1 kompleks yeniden düzenleme olmak üzere 152 varyant bildirilmiştir.

SBH'ye sahip Olgu 5'te DCX geninde literatürde daha önce bildirilmemiş novel heterozigot c.605_607 delAGA (p.Lys202del) varyantı saptanmıştı. DCX geni ile ilişkili mutasyonların kız olgularda çift korteks sendromu ile ilişkili olması olgumuzda de novo saptanan bu varyantın tahmini veri tabanında hastalık yapıcı olarak yorumlanması ile uyumlu bulunmuştur.

Serebellar hipoplazi ile giden hastalıkların ayırıcı tanı listesinde multipl konjenital anomalinin görülebildiği kromozom anomalileri, konjenital glikolizasyon bozuklukları ve Smith-Lemli-Opitz sendromu gibi metabolik hastalıklar, pons hipoplazisinin eklenmesi halinde pontoserebellar hipoplazi, molar diş bulgusu varlığında Joubert Sendromu akla gelmektedir. Ancak kortikal kalınlığın arttığı lizenfali etkilenmenin özellikle beyin anterior bölgesinde daha belirgin olduğu serebellar hipoplazi olgularında RELN genindeki mutasyonlar sorumludur (16). Reelin, gelişmekte olan beyindeki Cajal Retzius hücreleri ve serebellumun eksternal granül tabakasındaki granül hücreleri tarafından salgılanan fetal dönemde yüksek oranda serebellumda ve postnatal dönemde insan beyin ve nöronları kontrol eden hücre dışı bir proteindir. Bu proteinin reseptörü olan düşük molekül ağırlıklı lipoprotein [very low density lipoprotein receptor (VLDLR)] proteinini kodlayan VLDLR geni ise lizenfalinin belirgin olmadığı, korteks kalınlığının artmadığı basitleşmiş giral paternli düzleşmiş beyin kıvrımlarına eşlik eden serebellar hipoplazi olgularında daha çok bildirilmiştir. RELN geninin bialle-

lik mutasyonları ise, beynin ön bölümünün daha çok tutulduğu LIS ile birlikte ağır serebellar hipoplazi ile ilişkilendirilmiştir (17). Şimdiye kadar HGMD veri tabanında 131 yanlış anlamlı/anlamsız, 7 kırılma hatası, 10 küçük delesyon, 1 küçük insersiyon, 6 gros delesyon ve 1 kompleks yeniden düzenlemeler olmak üzere 157 varyant bildirilmiştir.

Frontal pakigirinin daha belirgin olduğu ağır derecede serebellar hipoplazisi olan Olgu 6 ve benzer etkilenmiş kuzeninde homozigot anlamsız (*nonsense*) c.204C>G (p.Tyr68Ter) *novel* varyant saptanmıştır. Aile içinde etkilenmiş olgularda bu varyant homozigot ve ebeveynlerde heterozigot saptanarak otozomal resesif kalıtım ile uyumlu segregasyon gösterilmiştir. *RELN* geni ile ilişkili LIS spektrumuna serebellar hipoplazi eşlik etmesi ve tahmini veri tabanlarında hastalık yapıcı olarak yorumlanması nedeniyle bu varyantın olguların klinik bulgularını açıkladığı düşünülmüştür.

LIS spektrumu; mikrosefali, PSMG, zihinsel yetersizlik ve epilepsi gibi ağır nörolojik bulgulara neden olan nadir bir kortikal gelişimi malformasyonudur. Bu spektruma yol açan 20'nin üzerinde gen olmasına karşın *LIS1* ve *DCX* genleri LIS spektrumundan en çok sorumlu olan genlerdir. Genotip-fenotip ilişkisi dikkate alındığında tüm ekzom dizi analizine gerek kalmadan hedef gen analizi ile olgulara tanı konulabilmektedir. Hedef gen seçimi için beynin posteriyorunun daha fazla etkilendiği durumlarda *LIS1* geni delesyonları ve nokta mutasyonları öncelikle dışlanmalıdır. Anteriyorunun daha belirgin etkilendiği erkek olgular ile SBH'ye sahip kız olgularda *DCX* geni dizilenmelidir. Ailede birden fazla etkilenen bireyin olduğu ve/veya akraba evliliklerinden doğan olgularda lizensefaliye serebellar hipoplazi eşlik etmesi halinde *RELN* geni mutasyonları akla gelmelidir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Dosya no: 2008/2075).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.; Veri Toplama- A.D.A., H.K.; Veri Analizi/Yorumlama- A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.; Yazı Taslağı- A.D.A., Z.O.U., H.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.; Son Onay ve Sorumluluk- A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.; Malzeme ve Teknik Destek- Z.O.U., B.K., S.B.; Süpervizyon A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 3574).

Ethics Committee Approval: This study was approved by Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (No: 2008/2075).

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.; Data Acquisition- A.D.A., H.K.; Data Analysis/Interpretation-

A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.; Drafting Manuscript- A.D.A., Z.O.U., H.K.; Critical Revision of Manuscript- A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.; Final Approval and Accountability- A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.; Material and Technical Support- Z.O.U., B.K., S.B.; Supervision- A.D.A., Z.O.U., B.K., S.B., H.K.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University (Project number: 3574).

KAYNAKLAR

1. Dobyns WB, Guerrini R, Leventer RL. Malformations of cortical development. In: Swaiman KF, Ashwal S, Ferriero DM, Schor NF, editors. Swaiman's Pediatric Neurology: Principles and Practice. ed 5. Edinburgh: Elsevier Saunders; 2012. p. 202–31.
2. Di Donato N, Timms AE, Aldinger KA, Mirzaa GM, Bennett JT, Collins S, et al. Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. *Genet Med* 2018;20(11):1354-64.
3. Di Donato N, Chiari S, Mirzaa GM, Aldinger K, Parrini E, Olds C, et al. Lissencephaly: Expanded imaging and clinical classification. *Am J Med Genet A* 2017;173(6):1473-88.
4. Kars ME, Basak AN, Onat OE, Bilguvar K, Choi J, Itan Y, et al. The genetic structure of the Turkish population reveals high levels of variation and admixture. *PNAS* 2021;118 (36):e2026076118. doi.org/10.1073/pnas.2026076118
5. Dobyns WB, Elias ER, Newlin AC, Pagon RA, Ledbetter DH. Causal heterogeneity in isolated lissencephaly. *Neurology* 1992;42(7):1375-88.
6. Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, Matsumoto N, Pilz DT, Ledbetter DH, et al. Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 1999;53(2):270-7.
7. Kato M, Dobyns WB. Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 1:R89-96.
8. Feng Y, Olson EC, Stukenberg PT, Flanagan LA, Kirschner MW, Walsh CA. LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNude, a central component of the centrosome. *Neuron* 2000;28(3):665-79.
9. Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 1993;364(6439):717-21.
10. Sicca F, Kelemen A, Genton P, et al. Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology* 2003;61(8):1042-6.
11. Saillour Y, Carion N, Quelin C, Leger PL, Boddaert N, Elie C, et al. LIS1-related isolated lissencephaly: spectrum of mutations and relationships with malformation severity. *Arch Neurol* 2009;66(8):1007-15.
12. Cardoso C, Leventer RJ, Matsumoto N, Kuc JA, Ramocki MB, Mewborn SK, et al. The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. *Hum Mol Genet* 2000;9(20):3019-28.
13. Mohan R, John A. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life* 2015;67(6):395-403.
14. des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoeck I, et al. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet* 1998;7(7):1063-70.
15. Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, et

- al. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 1998;92(1):63-72.
16. Poretti A, Boltshauser E, Doherty D. Cerebellar hypoplasia: differential diagnosis and diagnostic approach. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2014;166C(2):211-6.
17. Boycott KM, Bonnemann C, Herz J, Neuert S, Beaulieu C, Scott JN, et al. Mutations in VLDLR as a cause for autosomal recessive cerebellar ataxia with mental retardation (dysequilibrium syndrome). *J Child Neurol* 2009;24(10):1310-5.