






RADİYAL İŞİN DEFİKTLERİNİN KLİNİK SINIFLANDIRMASI VE ETYOPATOGENEZİNİN ARAŞTIRILMASI

CLINICAL CLASSIFICATION OF RADIAL RAY DEFECTS AND RESEARCH INTO ETIOPATHOGENESIS

Şahin Avcı* , Güven Toksoy* , Gülemdam Bağirova* , Umur Altunoğlu* , Birsen Karaman* , Seher Başaran* , Hülya Kayserili** , Z. Oya Uyguner* 

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

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

Cite this article as: Avcı Ş, Toksoy G, Bağirova G, Altunoğlu U, Karaman B, Başaran S, et al. Clinical Classification of Radial Ray Defects and Research into Etiopathogenesis. J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 127-138.

ÖZET

Amaç: Radyal ışın defektleri (RID) 1/30.000 prevalansı ile üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalisidir. Olguların yaklaşık %30'unda RID izole olarak, %70'inde ek anomaliler veya sendromlar ile birlikte gözlenir. Bu nedenle, olgularda tanının kesinleşmesi, izlemi, ailelere özgün genetik danışma verilmesi ve sonraki gebeliklerinde prenatal tanı seçeneğinin sunulabilmesi için önemlidir. Bu çalışma ile RID olgularının ayırıcı tanısında yol gösterici olması, moleküler tanıya katkı sağlaması amacıyla yeni nesil dizileme (YND) gen-paneli oluşturuldu ve panelin moleküler tanıdaki etkinliği araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, 2004-2014 yılları arasında kliniğimizde RID bulgusu ile değerlendirilen 37 aileden 48 etkilenmiş olgunun klinik, moleküler ve sitogenetik bulguları değerlendirildi. Karyotipi normal saptanan ve moleküler tanısı olmayan 31 ailenin indeks olgusunda 14 farklı fenotip ile ilişkili 43 gen, RID için tasarladığımız hedefe yönelik YND paneli ile dizilendi.

Bulgular: Sitogenetik analiz ile bir olguda trizomi 18 ve diğer bir olguda ise ailevi t(2;12)(q31;q24.3) translokasyonu saptandı. Dört ailede ilişkili genlerdeki (*SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*, *FANCA*) mutasyonlar çalışma öncesinde moleküler analizlerle belirlenmişti. Tanısı olmayan 31 indeks olgunun 5'inde (%16), 4 farklı gende (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*) 6 farklı mutasyon saptandı.

Sonuç: RID nedeniyle değerlendirilen 37 ailenin 2'sinde (%5.4) kromozom anomalisi ve 9'unda (%24.3) 7 farklı gende 9 farklı mutasyon saptandı. Bulgularımız, RID olgularında özgün tasarlanan yeni nesil dizileme panelimizin moleküler tanıya önemli oranda katkı sağladığını; RID'in etyopatogenezinde kromozom anomalilerinin de yer aldığını, ayırıcı tanıda yer alması ve RID-panel çalışmasından önce kromozom anomalilerinin dışlanması gerektiğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Fanconi anemisi, radial ışın defektleri, yeni nesil dizileme

ABSTRACT

Objective: Radial ray defects (RRDs) are the most common congenital abnormality of the upper extremities, with a prevalence of 1:30,000. 70% of RRDs are syndromic or accompanied by additional malformations, whereas 30% are in isolated form. Definitive diagnosis is critical for follow-up and provides an opportunity for prenatal diagnosis. The aim of this study was to provide a guide for the differential diagnosis of patients with RRD via contributing to their molecular diagnosis by constructing a next-generation sequencing (NGS) gene-panel test.

Materials and Methods: 48 probands from 37 families, referred for genetic consultation due to RRD, between the years of 2004–2014, were evaluated by cytogenetic and molecular tools following clinical examinations. 31 probands, with normal karyotype, were screened for 43 RRD associated genes of 14 syndromes by using in-house-designed targeted NGS gene-panel.

Results: Chromosomal abnormalities [a trisomy 18 and a familial reciprocal translocation t(2;12)(q31;q24.3)] in two families and mutations in related genes (*SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*, *FANCA*) in four families were known before the initiation of this study. In remaining 31 probands, five families identified to have six different mutations in four different genes (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*).

Conclusion: Chromosomal abnormalities in two of the 37 families (5.4%) and gene mutations in nine of the 37 families (24.3%) were identified. Our study demonstrated that an in-house-designed targeted NGS containing 43 genes made considerable contribution to the diagnosis of RRD. Moreover, chromosomal abnormalities must always be considered in the differential diagnosis and excluded before gene-panel screening.

Keywords: Fanconi anemia, next-generation sequencing, radial ray defects

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: avci-sahin@hotmail.com

Geliş tarihi/Received Date: 25.05.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 05.11.2018

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Yenidoğanların %1-2'sinde gözlenen konjenital anomalilerin %10'unu üst ekstremite anomalileri oluşturur (1). Farklı bir deyişle, konjenital üst ekstremite anomalilerinin sıklığı yaklaşık 600 yenidoğanda 1'dir ve konjenital kalp anomalilerinden sonra ikinci sırada yer alır (1, 2). Konjenital ekstremite anomalilerinin etiyojisinde monogenik sendromlar (Fanconi anemisi, TAR sendromu, Holt-Oram sendromu vd.), kromozom anomalileri (trizomi 18), teratojen maruziyetleri (talidomid, mizoprostol), ile 9. gebelik haftasından önce uygulanan koryon villus örnekleme yer almaktadır (3).

Swanson sınıflamasına göre üst ekstremitenin farklılaşma bozuklukları arasında yer alan RID, radius, el bileğinde yer alan skafoid ve trapezium kemiği, birinci metakarpal kemik ve el başparmağının hipo- veya aplazisine neden olan gelişimsel defekt ile karakterizedir ve 1/30.000 prevalansı ile üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalisidir (1, 4). RID, izole (%30), sendromik veya ek anomaliler ile birlikte (%70) gözlenebilir (4, 5). Sıklıkla RID gözlenen sendromlar arasında trombositopeni-radius yokluğu (TAR) sendromu [OMIM #274000], VACTERL birlikteliği, (vertebral anomaliler, anal atrezi, kardiyak anomaliler, trakeoözofageal fistül, renal anomaliler ve ekstremite anomalileri) [OMIM #192350], Holt-Oram sendromu [OMIM #142900] ve Fanconi anemisi [OMIM #227650] yer alır (6). Bunlar dışında radyal ışın defektleri ile seyreden 200 civarında sendrom tanımlanmıştır. Bu sendromlar arasında, Gershoni-Baruch sendromu (OMIM 609545), X'e bağlı radyal ışın defektleri (OMIM #300378), radyal-renal sendrom (OMIM 179280), hemifasiyal mikrozomi-radyal ışın defektleri (OMIM #141400) gibi RID ile ilişkisi bilinen, ancak ilişkili geni/genleri henüz tanımlanmamış birçok nadir sendrom da bilinmektedir. Bu nedenle, RID saptanan olguda olası ek anomalilerin araştırılması için tüm sistemlerin gözden geçirilmesi, özellikle kardiyovasküler sistem, ürogenital sistem ve hematopoetik sistemin taranması son derece önemlidir. Ayrıca, prenatal dönemde RID saptanan bir fetusun, doğru klinik ve moleküler tanı alması çiftlere verilecek genetik danışma açısından çok önemlidir.

Bu çalışmada, 2004-2014 yılları arasında kliniğimizde RID bulgusu ile değerlendirilen 37 aileden 48 etkilenmiş olgunun klinik olarak sınıflandırılması ve genetik etyopatogenezlerinin araştırılması amaçlandı. Klinik değerlendirme sonrasında olgular sitogenetik analiz, yeni nesil ve Sanger dizileme yöntemleri ile incelendi. Sonuçlar, klinik bulgular eşliğinde yorumlandı. Mutasyon saptanan ailelere özgün genetik danışma verildi. Çalışma ile ülkemizde RID ile giden sendromların ve ilişkili mutasyonlarının sıklığının belirlenmesi, tanıda kullanılmak üzere hazırladığımız özgün gen panelinin moleküler genetik tanıya olan katkısının değerlendirilmesi amaçlandı. Bu çalışmada etyo-

patogenezi belirlenemeyen olgular, ileride RID ile ilişkili yeni genlerin araştırılmasını amaçlayan yeni projeler için önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubu

Çalışma grubumuzu, 2004-2014 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine genetik konsültasyon amacıyla çeşitli Pedyatri ve Tıbbi Genetik kliniklerinden yönlendirilen, unilaterale ya da bilaterale RID bulgusu olan 37 aileden 48 etkilenmiş olgu oluşturdu. Bu gruptaki 6 aile daha önce moleküler veya sitogenetik bir tanı almıştı.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (25.12.2014 tarih ve 1939 sayı). Çalışmaya katılan ailelerden aydınlatılmış onam alındı.

Olguların her biri tıbbi genetik uzmanı tarafından değerlendirilerek öykü ve fizik muayene bulguları kaydedildi. Aile öykülerine göre aile ağaçları hazırlandı. Etkilenmiş bireylerin fotoğrafları ve ekstremite grafileri arşivlendi. Bilinen bir sendromla uyumlu bulunan olgulara gerekli ek tetkikler (EKO, batin ultrasonografi vd.) ile laboratuvar testleri (hematolojik, sitogenetik, moleküler genetik vd.) yapıldı. Bilinen bir sendromla uyumlu bulunmayan olgular, RID'a eşlik eden ek bulgular açısından detaylı olarak değerlendirildi.

Kromozom analizi

Psikososyal motor gerilik (PSMG), mental retardasyon ya da ek anomalilerin eşlik ettiği olgularda, moleküler çalışmalardan önce ayırıcı tanıda yer alan kromozom anomalilerinin dışlanması amacıyla Na-heparinli enjektörlere alınan 2-3 cc periferik kanda yüksek çözünürlüklü bant tekniği (HRBT) ile 550-600 bant düzeyinde kromozom analizi yapıldı.

Yeni Nesil Dizileme (YND)

Çalışma grubumuzda yer alan, klinik bulgular ışığında daha önce kromozom analizi (n:2) veya moleküler analizlerle (n:4) tanı alan olgular dışında kalan 31 olgu, RID ile giden sendromlar için Ion Torrent PGM platformunda tasarladığımız YND gen paneli (tablo 1) ile araştırıldı. RID ile giden sendromlar, LMD (London Medical Database) ve OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)'den tarandı. İlişkili geni/genleri bilinen 14 fenotip seçildi. Bu fenotiplerle ilişkilendirilmiş genler, HGMD (Biobase Professional) veri tabanından tarandı. Her bir genin HGMD transkripti referans alınarak Ion AmpliSeq Designer (<http://www.ampliseq.com>) ile tablo 1'de gösterilen fenotiplerle ilişkili genlerin kodlayan bölgelerini, ekzon-intron sınır bölgelerini ve varsa mutasyon tanımlanmış diğer bölgelerini (derin intron, UTR vs.) içine alan, 765 ampikondan ve iki primer havuzundan oluşan özgün yeni nesil dizileme paneli oluşturuldu.

Tablo 1. RID ile giden sendromlar için oluşturulan YND panelinde yer alan genler ve ilişkili fenotipler

Fenotip	Gen
Cornelia de Lange sendromu 1 (OMIM #122470)	NIPBL (NM_133433.3)
Cornelia de Lange sendromu 2 (OMIM #300590)	SMC1A (NM_006306.3)
Cornelia de Lange sendromu 3 (OMIM #610759)	SMC3 (NM_005445.3)
Cornelia de Lange sendromu 4 (OMIM #614701)	RAD21 (NM_006265.2)
Cornelia de Lange sendromu 5 (OMIM #300882)	HDAC8 (NM_001166419.1)
Roberts sendromu (OMIM #268300)	ESCO2 (NM_001017420.2)
Thrombositopeni-radius yokluğu sendromu (TAR) (OMIM #274000)	RBM8A (NM_001031743.2)
Duane-radyal ışın sendromu (OMIM #607323)	SALL4 (NM_020436.3)
Akrofasiyal Dizostoz 1, Nager tip (OMIM #154400)	SF3B4 (NM_005850.4)
Holt-Oram sendromu (OMIM #142900)	TBX5 (NM_000192.3)
	FANCA (NM_000135.2)
	FANCC (NM_000136.2)
	FANCG (NM_004629.1)
	FANCD2 (NM_033084.3)
	FANCB (NM_001018113.1)
	FANCM (NM_020937.2)
	BRCA2 (NM_000059.3)
	FANCL (NM_018062.3)
Fanconi anemisi (OMIM #227650)	BRIP1 (NM_032043.2)
	PALB2 (NM_024675.3)
	FANCE (NM_021922.2)
	FANCF (NM_022725.3)
	FANCI (NM_001113378.1)
	RAD51C (NM_058216.2)
	SLX4 (NM_032444.2)
	XRCC2 (NM_005431.1)
	ERCC4 (NM_005236.2)
Mandibulofasiyal dizostoz, Guion-Almeida tip (OMIM #610536)	EFTUD2 (NM_004247.3)
Baller-Gerold sendromu (OMIM #218600)	RECQL4 (NM_004260.3)
Rapadilino sendromu (OMIM #266280)	
Rothmund-Thomson sendromu (OMIM #268400)	
Townes-Brocks sendromu (OMIM #107480)	SALL1 (NM_002968.2)
	RPS19 (NM_001022.3)
	RPL15 (NM_002948.3)
	RPS10 (NM_001014.4)
	RPL11 (NM_000975.3)
	RPL35A (NM_000996.2)
	RPS17 (NM_001021.4)
	RPS24 (NM_033022.3)
	RPL26 (NM_000987.3)
	RPS7 (NM_001011.3)
	GATA1 (NM_002049.3)
	RPL15 (NM_002948.3)
	RPS29 (NM_001032.4)
İskelet Defektleri-genital hipoplazi-MR (OMIM #612447)	PLZF (ZBTB16) (NM_006006.4)

Kütüphane hazırlanması, Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı. Kütüphane ürünleri, Ion Xpress Barcode Adapters Kit (Life Technologies) ile barkodlandı. Barkodlanan kütüphane ürünleri Agentcourt AMPure XP reagent ve %70'lik etanol kullanılarak firma protokollerine uygun olarak saflaştırıldı. Normalizasyon için miktar tayini, Ion Library Quantitation Kit kullanılarak qPCR ile yapıldı. Dizileme için Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit kullanıldı.

Firma protokollerine uygun olarak; Ion PGM™ dizileme cihazının klorid tablet ve 18 MΩ su ile yıkamaları, pH kalibrasyonları yapıldı ve zenginleştirilmiş ürünler çipe (Ion 318™ Chip v2) yüklenerek dizileme işlemi yapıldı. Dizileme sonrasında Torrent server yazılımına aktarılan verilere ait BAM dosyaları, analiz için Ion Reporter yazılımına aktarıldı. Hedef bölgelere ve hotspot bölgelere ait BED dosyası eklenerek ve gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, Ion Reporterda analiz akış şeması oluşturuldu. Her bir hasta, bu akış şeması ile analiz edildi. Her hastada bulunan değişimler, filtreleme tabii tutularak birkaç aşamada değerlendirildi. İlk aşama filtreleme işleminde, çerçeve kaymasına, dur kodunu oluşumuna veya aminoasit değişimine yol açan değişimler listelendi. Fenotip ile uyumlu bulgu elde edilemeyen olgularda ikinci aşama filtreleme ile kodlayan bölgeler, kırılma bölgeleri ve UTR (untranslated regions) bölgelerindeki sıklığı bilinmeyen veya nadir (MAF<0.01) değişimler listelenerek incelendi. Daha önce tanımlanmamış değişimlerin in silico olarak

patolojik olup olmadığı, Mutation Taster, <http://www.mutationtaster.org/>), Prediction of functional effects of human nsSNPs (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) ve Scale-invariant feature transform (<http://sift.jcvi.org/>) veritabanları kullanılarak değerlendirildi.

Sanger Dizileme

YND ile saptanan mutasyonların veya nadir / tanımlanmamış varyantların konfirmasyonu ve aile içi segregasyonu Sanger dizileme ile yapıldı. Sanger dizileme için mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak bölgeleri kapsayan özgün ileri ve geri primerler tasarlandı. Oligonükleotid sentezi ticari firmaya (Sentromer, İstanbul/Türkiye) yaptırıldı. Özgün ileri ve geri primerler ile PZR reaksiyonu termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. PZR ürünlerinin saflaştırma işlemi *Exonuclease-I* (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve *Rapid Alkaline Fosfataz* (04898133001-Roche) enzimleri ile firma protokollerine uygun olarak yapıldı. PZR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan ampikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapillerli elektroforezinde (*Applied Biosystem*) gerçekleştirildi. Dizi reaksiyonu, *bigdye® terminator v3.1 cycle sequencing kit* kullanılarak firma protokollerine uygun şekilde yapıldı.

BULGULAR

Otuzyedi ailenin 48 etkilenmiş olgusundan oluşan semrimizde erkek/dişi oranı 1.3 (erkek:27, dişi:21), ilk klinik



Şekil 1. Olgulara ait yüz ve ekstremiteler fotoğrafları. RID-1, RID-2, RID-5, RID-6.1 ve 6.2, Fanconi anemisi, radyal ışın defektlerine eşlik eden benzer fasiyal dismorfik bulgular (dar palpebral fissürler, midfasiyal hipoplazi, ince üst dudak). RID-3, CdLS ile uyumlu fasiyal dismorfik bulgular (kavsi belirgin kaşlar, sinofiri, uzun ve düz filtrum, ince dudaklar). RID-4, Roberts sendromu ile uyumlu yüz görünümü (sığ orbitalar, belirgin gözler, hipoplastik ala naziler). RID-7, Nager sendromu, tipik dismorfik bulgular (aşağı çekik palpebral fissürler, alt göz kapak kenarlarında düzensizlik ve kıpık yokluğu, düşük ve displastik kulaklar, mikroretrognati) ve hipoplastik başparmaklar. RID-8, Okihiro sendromu, radyal ışın defektlerine eşlik eden Duane anomalisi. RID-9, Holt-Oram sendromu, fasiyal dismorfizm yok, fasiyal hemanjiyomlar ve radyal ışın defektleri izleniyor. RID-11, trizomi 18, fasiyal dismorfik bulgular (sığ orbitalar, kısa ve dar palpebral fissürler, tübüler burun, mikroretrognati, düşük kulaklar) ve ellerde sindaktili, hipoplastik başparmaklar, bilateral PEV nedeniyle alt ekstremiteler alçıda.

Tablo 2. Mutasyon saptanan olgulara ait klinik bulgular, moleküler ve sitogenetik sonuçlar

	RID-1	RID-2	RID-3	RID-4	RID-5	RID-6.1 ve RID-6.2
Klinik Tanı	Fanconi anemisi	Fanconi anemisi	Cornelia de Lange sendromu	Roberts sendromu	Fanconi anemisi	Fanconi anemisi
Akrabalık	1.5° kuzen evliliği	1° kuzen evliliği	(-)	1° kuzen evliliği	(-)	1° kuzen evliliği
Kalıtım	OR	OR	OD	OR	OR	OR
Cinsiyet	Erkek	Erkek	Dişi	Dişi	Dişi	Erkek, erkek
Yaş	19/12 yaş	8.5 ay	33/12 yaş	14 ay	33/12 yaş	196/12yaş, 138/12 yaş
Ekstremitte bulgular	Sağ el başparmağında hipoplazi ve fleksiyon kısıtlılığı, proksimal yerleşimli sol el başparmağı, 2-3. ayak parmaklarında parsiyel sindaktili	Bilateral radyal agenezi, sağ elde başparmak agenezisi, sol elde hipoplastik başparmak	Hipoplastik el başparmakları El 5. parmak klinodaktili (bilateral) Ayaklarda 2-3 arası total sindaktili	Hafif hipoplastik el başparmakları, Sağ başparmakta fleksiyon kısıtlılığı, Bilateral humeroradyal sinostoz	Bilateral radyal hipoplazi, el başparmaklarında agenezi	RID-6.1: Bilateral opere preaksiyel polidaktili, sağ el başparmağında hipoplazi ve fleksiyon kısıtlılığı RID-6.2: Sol elde opere preaksiyel polidaktili
Ek bulgular	Mikrosefali, büyüme geriliği, multipl sütlü kahverengi lekeler, fasiyal dismorfizm, trombositopeni	Mikrosefali, büyüme geriliği, fasiyal dismorfizm	Mikrosefali, Büyüme geriliği, PSMG, sırtta hirsutizm, hipoplastik dış genitalya, fasiyal dismorfik bulgular	Mikrosefali, Seyrek saçlar, Fasiyal dismorfizm	Mikrosefali, büyüme geriliği, hidrosefali, multipl sütlü kahverengi lekeler, anal atrezi, at nalı böbrek, biküspit aorta	RID-6.1: Büyüme geriliği, strabismus, nistagmus, bilateral ptozis, mikropenis, mikroorşidi, sağ lomber bölgede 2x3 cm sütlü kahverengi leke, trombositopeni, hafif anemi RID-6.2: Multipl sütlü kahverengi lekeler, trombositopeni
Karyotip	46,XY	46,XY	46,XX	46,XY,PCD+	46,XX	46,XY
Moleküler sonuç	FANCA: c.894-2A>G homozigot1	FANCA: c.894-2A>G homozigot2	NIPBL: c.6893G>A, (p.Arg2298His) heterozigot1	ES-CO2:c.1104_1105 insA, (Thr371 Asnfs*32) homozigot1	BRIP1:c.205+5G>Ta+c.761_764delAGCbA, (p.Lys254Argfs*19) birleşik heterozigot1	FANCA: c.4261-2A>C homozigot1
Referans	Bilinen mutasyon (7, 8)	Bilinen mutasyon (7, 8)	Bilinen mutasyon (9)	Bilinen mutasyon (10)	a: bilinen mutasyon (8, 11) b: yeni mutasyon	Bilinen mutasyon (12)

Tablo 2. Mutasyon saptanan olgulara ait klinik bulgular, moleküler ve sitogenetik sonuçlar (devamı)

	RID-7	RID-8	RID-9	RID-10	RID-11
Klinik Tanı	Nager sendromu	Okihiro sendromu	Holt-Oram sendromu	Holt-Oram sendromu	Trizomi 18
Akrabalık	1.5° kuzen evliliği	(-)	(-)	(-)	(-)
Kalıtım	OD	OD	OD	OD	(-)
Cinsiyet	Dişi	Erkek	Dişi	Dişi	Erkek
Yaş	2.5 ay	7 ay	47 günlük	30 yaş	1 ay
Ekstremitte bulgular	El başparmaklarında hipoplazi ve fleksiyon kısıtlılığı, bilateral PEV	Sağ elde başparmak agenezisi, sol elde 1-2 arası total kutanöz sindaktili	Sağ elde trifalangeal başparmak, sol el başparmak ve radius-ta hipoplazi	Her iki elde tenar hipoplazi ve hafif supinasyon kısıtlılığı	Her iki elde 3-4 arası total, 1-2 ve 4-5 arası parsiyel sindaktili, başparmaklarda hipoplazi, bilateral PEV, ayaklarda 3-4 arası total sindaktili
Ek bulgular	Mikrosefali, büyüme geriliği, Pierre-Robin sekansı, dış kulak yollarında atrezi, fasyal dismorfik bulgular	Dış kulak yollarında darlık, Duane anomalisi, anal stenoz ve anokutanöz fistül (opere) +Benzer etkilenmiş anne	Müsküler VSD Sekundum ASD PDA	Opere VSD Benzer etkilenmiş aile bireyleri (Babasinda bilateral başparmak agenezisi, amcasında başparmak hipoplazisi, babasının amcasında bilateral radyal agenezi)	Hipotoni, Skafosefali Pektus karinatus Korpus kallozum agenezisi, fasyal dismorfik bulgular
Karyotip	46,XX	(-)	46,XX	46,XX,t(2;12)(q31;q24.3)	47,XY,+18
Moleküler sonuç	SF3B4: c.1147delC (p.His383Metfs*75) heterozigot3	SALL4: c.2484 delG (p.Phe829 Leufs*27) heterozigot4	TBX5: c.481A>C (p.Thr160Pro) heterozigot5	(-)	(-)
Referans	Bilinen mutasyon (13, 14)	Yeni mutasyon	Yeni mutasyon		

PSMG: psikososyal motor gerilik, OR: otozomal resesif, OD: otozomal dominant, PEV: pes ekinovarus, VSD: ventriküler septal defekt, ASD: atriyal septal defekt, PDA: patent duktus arteriozus.

1:RID yeni nesil dizileme ile saptanan mutasyon, Sanger dizileme ile konfirme edildi.

2:Fanconi anemisi yeni nesil dizileme paneli Almanya'da (Centogene AG, Schillingallee 68, 18057, Rostock) yapıldı.

3:Sanger dizilemesi Almanya'da (Institut für Humangenetik, University Duisburg, Essen) yapıldı.

4:Sanger dizilemesi Fransa'da (Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire, Hormonologie, Metabolisme-Nutrition, Oncologie, Centre de Biologie et Pathologie-CHRU 59037 Lille Cedex) yapıldı.

5:Hedefe yönelik (TBX5 geni) Sanger dizileme merkezimizde yapıldı.

değerlendirmede ortalama yaş 4.2 (aralık 3 gün-51 yaş) idi. Olgu grubunda bir indekste sitogenetik analizde trizomi 18 ve bir ailede t(2;12)(q31;q24.3) saptanmıştı. Dört ailede ise ilişkili genlerdeki (SF3B4, SALL4, TBX5, FANCA) mutasyonlar çalışma öncesinde moleküler analizlerle belirlenmişti. YND incelemesi ile 31 ailenin indeks olgularının beşinde, 4 farklı gende (FANCA, NIPBL, ESCO2, BRIP1) 6 farklı mutasyon saptandı. Sonuç olarak, RID nedeniyle değerlendirilen 37 ailenin 2'sinde (%5.4) kromozom anomalisi ve 9'unda (%24.3) 7 farklı gende (FANCA, NIPBL, ESCO2, BRIP1, SF3B4,

SALL4, TBX5) 9 farklı mutasyon saptandığı gösterildi (Tablo 2). Mutasyonlardan ikisi yanlış anlamlı, üçü kırılma hatasına yol açması beklenen intronik bölge ve dördü çerçeve kayması mutasyonu idi. Bu mutasyonlardan altısı daha önce tanımlanmış bilinen mutasyonlar iken üçü ilk kez bu çalışmada tanımlanan yeni (novel) mutasyonlardı. Mutasyon saptanan olgulara ait klinik bulgular, moleküler ve sitogenetik sonuçlar tablo 2'de, olgulara ait fotoğraflar şekil 1'de gösterilmektedir.

Klinik bulgular ve DEB testi ile Fanconi anemisi tanısı alan RID-1 ailesinin indeks olgusunda FANCA geninde daha

önce tanımlanmış homozigot c.894-2A>G saptandı (7, 8). Bu mutasyon Sanger dizileme ile doğrulandı ve aynı değişimi anne ve babanın heterozigot olarak taşıdıkları gösterildi. Benzer şekilde, Fanconi anemisi tanımlı RID-2 ailesinin indeks olgusunda dış merkezde hedefe yönelik yeni nesil dizileme ile incelemede (Fanconi anemisi paneli, Centogene/Almanya) FANCA geninde homozigot c.894-2A>G mutasyonu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı. Anne ve babanın aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı gösterildi.

CdLS klinik tanısı alan RID-3 ailesinin indeks olgusunda NIPBL geninde daha önce CdLS ile ilişkisi gösterilmiş c.6893G>A (p.Arg2298His) mutasyonu heterozigot olarak saptandı (9) ve Sanger dizileme ile doğrulandı, sağlıklı anne ile babanın bu mutasyonu taşımadıkları gösterilerek gonadal mozaizm dışlanamamakla birlikte *de novo* olduğu belirlendi.

Aile RID-4'den klinik ve sitogenetik bulgular (kromozomlarda erken sentromer ayrışması) ile Roberts sendromu kesin tanısı alan indeks olguda ESCO2 geninde daha önce bildirilmiş c.1104_1105insA (p.T371Nfs*32) mutasyonu homozigot olarak saptandı (10). Sanger dizileme ile doğrulanan mutasyonu anne ve babanın heterozigot olarak taşıdıkları gösterildi.

Fanconi anemisi tanımlı RID-5 ailesinin indeksinde, BRIP1 geninde daha önce tanımlanmış c.205+5G>T mutasyonu heterozigot ve ayrıca c.761_764delAGCA (p.K254Rfs*19) varyantı saptandı. (8, 11). İlk kez bu çalışmada gösterilen dört nükleotidlik delesyon sonucu ile çerçeve kaymasına yol açan c.761_764delAGCA varyantının patolojik olması beklenmektedir. Her iki mutasyon Sanger dizileme ile doğrulandı. Ebeveynlerde analiz ile c.205+5G>T mutasyonunun paternal, c.761_764delAGCA mutasyonunun maternal kaynaklı olduğu gösterilerek, olgunun birleşik heterozigot olduğu kesinlik kazandı.

RID-6 ailesinden, Fanconi anemisi tanımlı iki kardeşten biri olan RID-6.2'de, FANCA geninde homozigot c.4261-2A>C mutasyonu saptandı. Kırılma hatasına yol açması beklenen bu mutasyon, daha önce bildirilmişti (12). Sanger dizileme ile etkilenmiş kardeşin (olgu RID-6.1) aynı mutasyonu homozigot, anne ve babanın heterozigot olarak taşıdığı gösterildi.

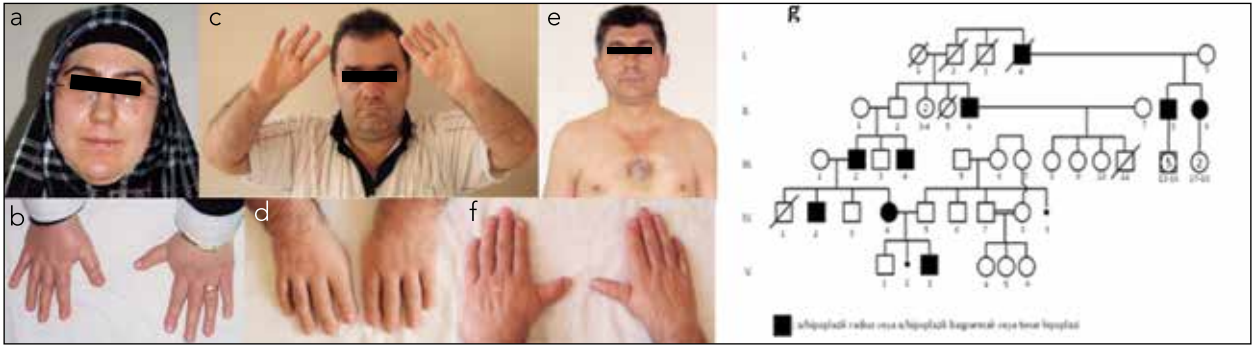
Aile RID-7'den Nager sendromu klinik tanımlı indeks olgu ve anne-babasına ait EDTA'lı kanlar, moleküler analiz için araştırma kapsamında yurtdışına (Dagmar Wieczorek, Institut für Humangenetik, University Duisburg, Essen, Germany) gönderilmiş ve indeks olguda, Nager sendromu ile ilişkili SF3B4 geninin 6. ekzonunda, daha önce bildirilmiş, çerçeve kaymasına yol açan c.1147delC (p.H383Mfs*75) mutasyonu heterozigot taşıdığı saptanmıştı (13, 14). Aynı mutasyonun anne ve babada olmadığı ve mutasyonun

gonadal mozaizm dışlanamasa da *de novo* olduğu gösterildi.

Aile RID-8'den benzer etkilenmiş anne ve oğluna ait DNA örnekleri, TBX5 moleküler analizi için yurt dışına (Laboratoire de Biochimie, Biologie Moleculaire, Hormonologie, Metabolisme-Nutrition, Oncologie, Centre de Biologie et Pathologie-CHRU 59037 Lille Cedex, Fransa) gönderilmişti. TBX5 geninde dizi analizi ve MLPA ile mutasyon saptanmamıştı. Olgularda ayırıcı tanıda yer alan Okihiro sendromu için SALL4 dizi analizi ile heterozigot c.2484delG (p.Phe829Leufs*27) mutasyonu saptanmıştı. Mutasyon, daha önce literatürde bildirilmemişti, ancak çerçeve kaymasına yol açan bir değişim olması nedeniyle patolojik olarak değerlendirildi. Moleküler sonuçlar ışığında tekrar değerlendirilen olguların her ikisinde de Duane anomalisi saptandı. Her iki olguda Okihiro sendromu ile uyumlu dış kulak yolunda darlık ve etkilenmiş erkek çocukta anal stenoz saptanarak anne ve oğlunda Okihiro sendromu (Duane-radial ray syndrome- DRRS) tanısı kesinleşti. Olası renal anomaliler açısından yapılan renal ultrasonografi incelemesinde patoloji saptanmadı.

RID-9 ailesinden Holt-Oram sendromu klinik tanımlı indeks olguda TBX5 geninin kodlayan bölgeleri, intron ve ekzon sınır bölgeleri Sanger yöntemiyle dizilendi ve ekzon 5'te daha önce literatürde tanımlanmamış heterozigot c.481A>C değişimi saptandı. Bağımsız örnek tekrarında aynı değişim gözlemlendi ve olası taq polimeraz hatası dışlandı. Anne ve babanın bu değişimi taşımadıkları gösterildi. TBX5 geninde saptanan c.481A>C değişimi, protein zincirinde, 160. kodondan kodlanan "yüksüz polar hidroksil grubu" olan treonini, "nonpolar" proline dönüştürmektedir (p.Thr160Pro). Değişimin olduğu bölge, TBX5 geninin kodladığı T-box transkripsiyon faktörünün, transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli olan ve DNA bağlanma özelliği gösteren T-box domaini'nde yer almaktadır. Yanlış anlamalı değişimlerin patolojik olup olmadığını değerlendiren interaktif web tabanlı Mutation Taster programı, bu değişimin >% 99,9 patolojik bir mutasyon olduğu tahminini verdi. Bu nedenle, olguda saptanan c.481A>C değişimi, Holt-Oram sendromu ile ilişkili bir mutasyon olarak değerlendirildi.

RID-10 ailesinde Holt-Oram sendromu klinik tanımlı indeks olgunun değerlendirilmesi sırasında annenin 28 haftalık gebeliği mevcuttu. Antenatal ultrasonda fetusta her iki ön kolda tek kemik, sağ elinde başparmak agenezisi, kalpte inlet tipi VSD ve tek umbilikal arter bulguları saptandı. Amniyosentez ile elde edilen fetal hücrelerin karyotip analizinde görünürde dengeli bir resiprokal translokasyon (46,XY,t(2;12)(q31;q24.3)) saptandı. Translokasyona katılan kromozomlardan 12. kromozomun kırık noktası, TBX5 geninin bulunduğu lokustan (12q24.21) geçmekteydi. Kırık noktasının, TBX5 geninin yapısını bozarak Holt-Oram sendromuna yol açabileceği düşünüldü. Etkilenmiş olgunun da fetustaki dengeli translokasyonu



Şekil 2. a-g. Aile RID-10. (a). İndeks olgu (IV-4), (b). etkilenmiş annede bilateral tenar hipoplazi ve proksimal yerleşimli başparmaklar, (c) ve (d). etkilenmiş annenin babası (III-2), bilateral başparmak agenezisi, (e) ve (f). etkilenmiş annenin amcası (III-4), pektus ekskavatus ve bilateral hipoplastik el başparmakları, (g). aile ağacı.

taşıdığı gösterildi. Gebeliğin terminasyonu seçeneğini aile kabul etmedi. Doğan erkek bebeğin postnatal 12. günde öldüğü öğrenildi. Ölü bebeğin postmortem muayenesi aile izin vermediğinden yapılamadı. Olgunun eşi ve sağlıklı oğlunun kromozom analizi normal sonuçlandı. Etkilenmiş olguda array-CGH analizinde herhangi bir kromozomal kopya sayısı değişikliği saptanmadı. Aile ağacı genişletildiğinde toplam 9 etkilenmiş birey olduğu belirlendi (Şekil-2). Bu olgulardan IV-4 ve V-3'te ek olarak kalp anomalileri mevcuttu.

RID-11 ailesinde indeks olguda dismorfik bulgulara eşlik eden hipotoni ve ekstremitte anomalileri nedeniyle ayırıcı tanıda kromozom anomalileri (özellikle trizomi 18) düşünüldü ve sitogenetik analizde trizomi 18 tanısı kesinlik kazandı.

TARTIŞMA

RID, üst ekstremitelerin preaksiyel kısımlarını (radius, skafoid ve trapezium kemiği, başparmağa ait metakarp ve falanks yapıları) tutan gelişimsel defektlerle karakterizedir ve başparmak hipoplazisinden, radius ve başparmağın yokluğuna kadar değişen ağırlıkta gözlenebilmektedir (15). Üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalileri olan RID, izole ya da sendromik olabilir. İzole RID, olguların % 8-30'unu oluşturmaktadır (16, 17). RID, çoğunlukla eşlik eden bir ya da daha fazla major anomali ile birlikte gözlenmekte, özellikle bilateral RID olgularında perinatal ölüm oranı %35 gibi yüksek oranda olabilmektedir (4, 17).

RID'in yaklaşık üçte ikisinin sendromik olması ve sıklıkla kardiyolojik, hematolojik, ürogenital ve/veya sindirim sistemi anomalileri ile birlikte gözlenmesi (18) nedeniyle, bu olguların doğru klinik ve moleküler tanı alması, olguların izlemi açısından önemlidir. Ayrıca, RID ile ilişkili birçok sendromun ortak klinik bulgular göstermesi, özellikle antenatal dönemde saptanan RID'de hasta yönetimi açısından zorluklara yol açabilmektedir. Bu nedenle klinik tanının moleküler tanı ile doğrulanmasının önemi büyüktür.

RID ilişkili genlerin büyük ve çok sayıda olması, ayrıca mutasyonların heterojen dağılımı moleküler genetik analizleri zorlaştırmakta ve maliyeti arttırmaktaydı. Bu nedenle moleküler analizleri hızlandırmak ve ekonomik açıdan uygun hale getirmek amacıyla YND teknolojisi için "radyal ışın defekti sendromları" paneli oluşturuldu. Hazırlanan panelin, ülkemizde RID ve ilişkili sendromların tanısında etkinliğini, RID sendromları ile ilişkili gen/ler ve özgün mutasyon/ları araştırmak, ayrıca herhangi bir mutasyon saptanmayan olguların DNA örneklerinin bir sonraki aşamada tüm ekzom veya tüm genom dizileme çalışmaları için bankalanarak önemli bir kaynak oluşturması öngörüldü.

Serimizdeki 37 ailenin 2'sinde kromozom analizi (%5,4), 4'ünde ise özgün klinik tanının yönlendirmesi ile hedef genlerde yapılan moleküler analizlerle (%10,8) tanı konulmuştu. Diğer 31 ailenin indeks olguları YND paneli ile incelendiğinde tanı oranı %16 (5 aileden 5 olgu) olarak gerçekleşti, böylece tüm serideki tanı oranı %29,7 ye ulaştı.

YND paneli ile tanı alan olguların üçünde, Fanconi anemisi ile ilişkili *FANCA* (n:2) ve *BRIP1* (n:1) genlerinde, bir olguda CdLS ile ilişkili *NIPBL* geninde ve bir olguda ise Roberts sendromu ile ilişkili *ESCO2* geninde mutasyon saptandı. Bu sendromların klinik olarak tanınabilen özgün sendromlar olması nedeniyle ilişkili genlerin Sanger tekniği ile incelenmesi düşünülebilirdi, ancak genlerin büyük olması ve CdLS ve Fanconi anemisi ile ilişkili birden fazla gen olması nedeniyle YND yöntemi bu olguların moleküler analizlerinde zaman ve maliyet açısından daha etkin olmaktadır. Ayrıca, ortak klinik bulgular gösteren RID ilişkili sendromların klinik ayırıcı tanısında güçlükler yaşanabilmesi, birçok sendrom ile ilişkili genlerin eş zamanlı moleküler analizine olanak tanınması nedeniyle YND tekniğini Sanger dizilemeye göre daha avantajlı bir yöntem haline getirmektedir.

Fanconi anemisi ile ilişkili 21 gen (OMIM #227650) tanımlanmıştır. Fanconi anemili olgularda en sık *FANCA* geninde (~% 60) mutasyon saptanırken, olguların yalnızca %2'inde *BRIP1* geni mutasyonları bildirilmekte-

dir (19). Bizim çalışmamızda ise Fanconi anemisi kesin tanıılı 4 ailenin 3'ünde (%75) *FANCA* geninde, 1 ailede (%25) *BRIP1* geninde mutasyon saptanmış olması ülkemizdeki Fanconi anemisi ile ilişkili genlerin sıklık sıralamasının yapılmasına olgu sayısının azlığı nedeniyle katkı sağlayamamaktadır. Ancak, *BRIP1* geninde mutasyon saptanan ailede (RID-5) ebeveynler arasında akraba evliliği olmaması ve etkilenmiş olguda birleşik heterozigot mutasyon saptanması, *BRIP1* mutasyon taşıyıcılığının ülkemizde Avrupa topluluklarına göre daha sık gözlenebileceğini ve moleküler tanıılı Fanconi sendromlu olgu sayısının arttığı durumda ülkemizdeki Fanconi anemisi ile ilişkili genlerin sıklık sıralamasının farklı olabileceğini işaret etmektedir.

FANCA geninde mutasyon saptanan 3 farklı aileden (4 birey) ikisinde c.894-2A>G mutasyonu, diğerinde ise (iki kardeş) c.4261-2A>C homozigot mutasyonu saptandı. Her iki mutasyon da *FANCA* geninde kırılma hatasına yol açan ve daha önce Fanconi anemili olgularda bildirilmiş mutasyonlardı (7, 8, 12). Çalışmamızda, *FANCA* geninde saptanan c.4261-2A>C mutasyonunun *FANCA* geninde 42. intronun kırılmamasına yol açan patolojik bir değişim olduğu, cDNA düzeyinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12). Aynı çalışmada, c.4261-2A>C mutasyonu saptanan aynı aileden etkilenmiş üç olgunun üçünde de hipoplastik el başparmakları, ikisinde mikrosefali, mental retardasyon ve işitme kaybı ve iki olguda da böbrek anomalisi (unilateral renal agenezi/pelvik ektopik böbrek) saptanmıştır. Ayrıca bu olgularda ortalama 8.5 yaşında kemik iliği yetmezliği ve iki olguda ise sırasıyla 26 ve 30 yaşlarında yassı hücreli deri kanseri gelişmiştir. Bizim çalışmamızda aynı mutasyonu taşıyan etkilenmiş iki kardeş (RID-6.1 ve RID-6.2) olguda ise klinik bulgular daha hafifti. Her iki olguda da başparmak anomalisi mevcuttu. Ancak böbrek anomalisi, mikrosefali, mental retardasyon ve işitme kaybı bulguları yoktu. En son 19 yaş 6 aylık (RID-6.1) ve 13 yaş 8 aylık (RID-6.2) değerlendirilen iki olguda belirgin bir transfüzyon gereksinimi oluşmamıştı, kemik iliği naklini gerektirecek düzeyde kemik iliği yetmezliği ve malignite gelişmemişti. Ancak olgularımıza malignite açısından izlem önerilmişti (12). *FANCA* geninde protein ürününün hiç oluşmamasına yol açan homozigot *null* mutasyonların, anormal protein ürünlerine yol açan mutasyonlara kıyasla daha erken yaşta anemi gelişmesine ve daha yüksek malignite insidansına neden olduğu gösterilmiştir (20). Olgularımızdaki *FANCA* c.4261-2A>C mutasyonunun, kırılma hatasına yol açarak anormal protein ürününün oluşmasına neden olduğu göz önünde bulundurulduğunda, daha hafif bir fenotipin gözlenmesi literatürle uyumlu bir bulgudur. Bu mutasyon, literatürde sadece bir Arap ailesinden etkilenmiş üç olguda bildirilmiştir (12) ve bu nedenle, mutasyon özelinde genotip-fenotip korelasyonu yapmak için olgu sayısının yetersiz olduğunu düşünmekteyiz. Fanconi anemisi moleküler etyopatogenezi ve genotip-fenotip korelasyonu çalışmaları ile bu

konu daha fazla aydınlatıldığında, hastaların prenatal ve postnatal yönetimlerinde daha etkin olunacaktır.

Fanconi anemisi ile ilişkili genlerden *BRIP1* (*FANCI*) (11, 21, 22) geninin önemli DNA tamir yollarından biri olan FA-yolunda yer aldığı ve monoubikuitine-FANCD2'nin BRCA1 ile etkileşimi için gerekli olan bir helikaz geni olduğu gösterilmiştir (23, 24). Biallelik mutasyonları Fanconi anemisi ile ilişkili olan *BRIP1*'in, monoallelik mutasyonlarının ise meme kanserine yakınlık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (25).

BRIP1 mutasyonu taşıyan Fanconi anemili olgularda genellikle ağır fiziksel anomaliler gözlenmekte ve ortalama 4-5 yaşlarında kemik iliği yetmezliği gelişmektedir (21). Tüm olgularda büyüme geriliği ile RID ve bazı olgularda ek olarak ürogenital, kardiyovasküler, iskelet anomalileri, hidrosefali, yarık damak, mikroftalmi, psikomotor gerilik gibi ek bulgular gözlenmiştir (21). Çalışmamızda, *BRIP1* geninde birleşik heterozigot mutasyon saptadığımız olguda (RID-5), literatürdeki olgular ile uyumlu olarak ağır büyüme geriliği, mikrosefali, bilateral RID, anal atrezi, at nalı böbrek ve hidrosefali gibi majör anomaliler mevcuttu (21). *BRIP1* geninde saptanan iki farklı heterozigot değişimden c.205+5G>T mutasyonu daha önce Fanconi anemisi ile ilişkili bir mutasyon olarak tanımlanmıştır (8, 11). Bu mutasyonun, kırılma hatasına yol açarak, *BRIP1*'in helikaz motif I bölgesini kodlayan 3. ekzonunun delesyonuna yol açtığı, cDNA düzeyinde gösterilmiştir (11). Bu ailede saptanan c.761_764de-*LAGCA* değişimi ise daha önce literatürde bildirilmemiştir. Ancak bu değişimin, protein düzeyinde 254. kodonda lizin yerine arjinin gelmesine, çerçeve kaymasına ve ardışık 19. kodonda dur şifresi oluşturarak protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (p.K254Rfs*19) patojenik bir değişim olarak değerlendirildi.

Cornelia de Lange sendromu klinik tanıılı olgu RID-3'te saptanan *NIPBL* genindeki c. 6893G>A (p.Arg2298His) yanlış anlamlı mutasyonu, daha önce CdLS olgularında bildirilmiştir (9). Ayrıca, *NIPBL* geninde yanlış anlamlı mutasyon saptanan olgularda, diğer mutasyon tiplerine (çerçeve kayması, anlamsız veya kırılma hatasına yol açan mutasyonlar) göre fenotipin daha hafif olduğu, özellikle ekstremite anomalileri ve psikomotor gerilik bulgularında bu farkın daha belirgin olduğu bildirilmiştir (9). Bizim olgumuzda da literatürle uyumlu olarak ekstremite anomalileri daha hafif ve psikomotor gerilik orta düzeyde idi.

Klinik olarak Roberts sendromu tanısı alan ve sitogenetik analiz ile erken sentromer ayrışması gösterilerek, tanısı kesinleşen olguda (RID-4) YND ile *ESCO2* geninde homozigot c.1104_1105insA değişimi saptanmıştı. Peptid zincirinde 371. kodondaki treonin aminoasidinin yerine asparajinin gelmesine ve ardışık 32 kodon sonra çerçeve kayması (p. T371Nfs*32) ile dur kodonuna neden olan değişim, daha önce bildirilmiş Roberts sendromu ile ilişkili bir mutasyondur (10). Roberts sendromu'nda genotip-fenotip korelasyonu yapılamamaktadır. *ESCO2* genindeki

mutasyonların yeri ve/veya tipi ile klinik fenotip arasında bir bağlantı kurulamamakta, hatta aynı ailede aynı mutasyonu taşıyan bireyler arasında bile belirgin klinik farklılıklar gözlenebilmektedir (26, 27). Bizim olgumuzda da ESCO2 geninde homozigot çerçeve kaymasına yol açan bir mutasyon saptanmasına rağmen, klinik bulgular oldukça hafifti.

Nager sendromu klinik tanılu olgu RID-7'de, SF3B4 geninde saptanan c.1147delC mutasyonu, protein düzeyinde 383. pozisyonadaki histidin aminoasidinin yerine metiyoninin gelmesine ve sonraki 75 aminoasidin değişmesine neden olan çerçeve kaymasına yol açmaktadır (p.H383Mfs*75). Bu mutasyon, daha önceki çalışmalarda Nager sendromu ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmiştir (13, 14). Literatürde olgumuz ile aynı mutasyonu taşıyan iki olgudan birinde ek olarak konjenital diafragma hernisi, mikrosefali ve SGA doğum öyküsü mevcuttu ve doğum sırasında kaybedilmişti (14). İki yaşındayken tanı alan diğer olguda ise, psikomotor gerilik saptanmıştı (13). Ayrıca, her iki olguda radius ve başparmak aplazilerini içeren ağır RID mevcuttu. Bizim olgumuzun ise doğum boy, tartı ve baş çevresi normaldi. Radyal ışın defektleri (hipoplastik ve ankiloze el başparmakları) daha hafifti. Ancak, iki buçuk aylık muayenesinde büyüme geriliği ve mikrosefali saptanan olgu 5 aylıkken solunum yetmezliği nedeniyle kaybedildi. Olgumuzda saptanan c.1147delC mutasyonunun daha ağır bir fenotiple ilişkili olabileceği düşünülebilir. Ancak olgu sayısının sınırlı sayıda olması nedeniyle, bu konuda kesin bir kanaate varmak güçtür, yeni olguların tanımlanması ile bu görüşün desteklenmesi gerekmektedir.

DRRS (*Duane-Radial Ray syndrome*, Okihiro sendromu), RID ve *Duane* anomalisi ile karakterizedir ve Holt-Oram sendromu'nun ayırıcı tanıları arasında yer alır. Her iki sendromda da radyal ışın defektlerine eşlik eden kalp anomalileri gözlenir. Ancak DRRS'de farklı olarak *Duane* anomalisi, ürogenital anomaliler ve nadiren gastrointestinal anomaliler (Hirschsprung hastalığı) de gözlenebilir. Holt-Oram sendromu klinik ön tanısı alan ve *TBX5* geninde mutasyon saptanmayan bazı olgularda *SALL4* geninde mutasyon saptanması, bu sonuç üzerine tekrar değerlendirilen olguların çoğunda *Duane* anomalisi veya renal anomalilerin varlığı ile tanının DRRS ile uyumluluğu moleküler analizlerin tanıdaki önemini göstermektedir (28, 29). RID- 8 ailesinden etkilenmiş her iki olgu ilk aşamada Holt-Oram sendromu klinik tanısı almış, *TBX5* geninde mutasyon saptanmayınca *SALL4* geninde heterozigot c. 2484delG (p.Phe829Leufs*27) mutasyonu gösterilmesiyle klinik tanı DRRS olarak kesinleşmiş oldu. Klinik açıdan her iki olgu yeniden değerlendirildiğinde, DRRS ile uyumlu bulguların varlığı gözlemlendi. Olgularımız ve literatürdeki benzer olgular, RID ve/veya kalp anomalileri varlığı ile değerlendirilen olguların ayırıcı tanısında Holt-Oram sendromu ile birlikte DRRS'nin de mutlaka yer alması, olguların *Duane* anomalisi ve ürogenital anomaliler açısından değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

RID ile ilişkili en sık gözlenen sendrom Holt-Oram sendromu'dur (30). Holt-Oram sendromu için kesin tanı kriterleri; olguda veya aile öyküsünde kardiyak septal defektler (ASD, VSD) ve/veya kardiyak ileti defektlerine eşlik eden RID olarak tanımlanmıştır ve bu tanı kriterlerini karşılayan olguların %74'ünde, *TBX5* geninde mutasyon saptandığı (31) bildirilmişse de bazı çalışmalar *TBX5* geninde mutasyon saptama oranını %22-35 arasında vermektedir (28, 32, 33). Bizim çalışmamızda da Holt-Oram sendromu kesin tanı kriterlerini karşılayan biri ailevi olmak üzere 7 olgunun sadece ikisinde (~%29) *TBX5* geni ile ilişkili mutasyon gösterilmesi literatür ile uyumlu idi. Bu durum, Holt-Oram sendromu'nun genetik heterojenitesini, sendrom ile ilişkili olası tanımlanmamış yeni gen/genlerin varlığını düşündürmektedir. Holt-Oram sendromlu iki aileden birinde (RID-9) *TBX5* geninde daha önce tanımlanmamış c.481A>C değişimi saptanırken, diğer olguda (ailevi, RID-10) *TBX5* lokusundan geçen (12q24) dengeli resiprokal bir translokasyon varlığı saptanmıştı. *TBX5* geninde saptanan c.481A>C değişimi, protein zincirinde, 160. kodondan kodlanan "yüksüz polar hidroksil grubu" olan treonini, "nonpolar" proline dönüştürmektedir (p.Thr160Pro). *TBX5* geninde saptanan mutasyonların büyük çoğunluğu 55-237. aminoasitler arasında yer alan, ileri derecede korunmuş bir bölge olan ve DNA bağlanma özelliği gösteren *T-box* domaininde gözlenmektedir (33). Olgumuzda saptanan c.481A>C değişimi de bu bölgede bulunmaktadır. Ayrıca, yanlış anlamlı değişimlerin patolojik olup olmadığını değerlendiren interaktif web tabanlı *Mutation Taster* programına göre, bu değişim >%99.9 patolojik bir mutasyon olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, olguda saptanan c.481A>C değişimi, Holt-Oram sendromu ile ilişkili yeni bir mutasyon olarak değerlendirilmiştir. RID-10 ailesinde ise, etkilenmiş anne ve oğlunda, 2 ve 12. kromozomlar arasında kırık noktalarından biri *TBX5* lokusundan (12q24) geçen dengeli resiprokal bir translokasyon saptandı. Etkilenmiş diğer aile bireyleri kromozom analizinin yapılmasına izin vermediğinden aile içi segregasyon gösterilemedi. Holt-Oram sendromlu olgularda 12q24 lokusundan geçen kromozomal yeniden düzenlenmeler ender de olsa bildirilmiştir ve sendrom-*TBX5* geni ilişkisi ilk kez, benzer bir translokasyon taşıyan olguda tanımlanmıştır (34, 35). Otozomal dominant ya da X'e bağlı kalıtmı tek gen sendromlarında kromozomal yeniden düzenlenmeler ilişkili geni/leri henüz bilinmeyen sendromlarda, genlerin lokalizasyonlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Benzeri kromozomal yeniden düzenlenmelerin, genlerde yıkıma (güdük protein kodlanması ile) yol açtığı kabul edilmektedir. Bu bulgu, otozomal dominant hastalıklarda, ilişkili gende mutasyon saptanmadığı durumda, kromozom anomalilerinin de etyopatogenezden sorumlu olabileceğini göstermesi açısından çok anlamlı bir örnek oluşturmaktadır.

RID ile giden 14 farklı fenotip ile ilişkili 43 genin YND yöntemi ile analiz edildiği çalışmamızda, 26 olguda mutasyon saptanmadı. Mutasyon saptanmayan olgular klinik bulgular açısından değerlendirildiğinde; 4 olgu VACTERL birlikteliği ile uyumlu bulundu. VACTERL birlikteliği, verteb-

ral anomaliler, anal atrezi, trakeo-özofageal fistül, renal anomaliler ve ekstremite anomalilerinin rastgele olmayan birliktelikleri ile karakterizedir. VACTERL klinik tanısı için beş bulgudan en az üçünün olması ve fenotipin başka sendromlarla uyumlu olmaması gerekir (36). *Hilger ve ark.* (2015), siliyopati ile ilişkili 25 aday genin hedefe yönelik YND ile yaptıkları çalışmada, 4 olguda *ZIC3* geninde, 1 olguda ise *FOXF1* geninde mutasyon saptamıştır. Gelişimin erken evrelerinde fare embriyolarındaki çalışmalar, VACTERL birlikteliğinde etkilenen organlarla uyumlu olarak presomitik mezoderm ve ekstremiteler, özofagus, trakea, vertebral, anal ve genital tüberkül dokularında *Zic3* ve *Foxf1*'in ifade edildiğini göstermiştir (37). Bu iki gen YND panelimizi tasarladığımız 2014 yılında henüz bilinmediğinden panelde yer almamaktadır. Bir sonraki aşamada, olgu serimizde yer alan VACTERL birlikteliği ile uyumlu 4 olguda *ZIC3* ve *FOXF1* genleri dizi analizi tamamlanabilir. Bu iki gendeki mutasyonların VACTERL ile ilişkisi protein düzeyinde yapılacak çalışmalarla kesinlik kazandığında ise RID ile giden sendromlar için tasarlanan gen panelimize *ZIC3* ve *FOXF1* genlerinin de eklenmesi, bu gruptaki olguların moleküler tanısına katkı sağlayabilir.

Serimizde yer alan olgulardan biri RID'a eşlik eden konjenital kalp anomalileri, vertebral anomaliler, fasyal asimetri ve preauriküler deri uzantısı bulguları ile klinik olarak ökulo-aurikulo-vertebral spektrum (hemifasyal mikrozomi, Goldenhar sendromu, OMIM %164210) fenotipi ile uyumlu bulundu. Goldenhar sendromu ile ilişkili bir gen henüz tanımlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında incelenen genlerde olgumuzda da herhangi bir mutasyon saptanamadı.

RID'a eşlik eden ek malformasyonların gözleendiği 13 olgumuzda ise özgün klinik tanımımız yoktu ve YND panelinde mutasyon saptanmadı.

Özetle, çalışmamızda yer alan 37 aileden etkilenmiş 48 olgu klinik ve moleküler/sitogenetik bulgular eşliğinde değerlendirildiğinde; 37 aileden 11 ailede klinik tanı, laboratuvar bulguları (moleküler/sitogenetik) ile desteklendi (tablo-2). Bu 11 aileden 6 olgu Fanconi anemisi, 2 olgu Holt-Oram sendromu, 1 olgu Okihiro sendromu, 1 olgu Cornelia de Lange sendromu, 1 olgu Roberts sendromu, 1 olgu Nager sendromu ve 1 olgu trizomi 18 tanısı aldı. Bu olgular içerisinde, daha önce moleküler/sitogenetik tanı almamış olan 5 aileden 5 indeks olgu, RID ile giden sendromlar için tasarladığımız yeni nesil dizileme paneli ile moleküler tanı aldı. Mutasyon saptanmayan 26 indeks olgu klinik bulguları ile değerlendirildiğinde; 5 olgu Holt-Oram sendromu ile, 4 olgu VACTERL birlikteliği ile, 1 olgu Goldenhar sendromu ile, 1 olgu ise CdLS ile uyumluydu. İki olgu ise izole RID olarak değerlendirildi. Klinik olarak bilinen bir sendromla uyumlu bulunmayan 13 RID olgusunda moleküler analiz ile mutasyon saptanmadığı için bilinen gen mutasyonları ilişkili sendromlar dışlanmış oldu.

Olgu serimizde RID ile giden sendromlar içerisinde en sık Holt-Oram sendromu, Fanconi anemisi ve VACTERL bir-

likteliği gözlenmekteydi. Mutasyon saptanmayan olgular, RID ile giden sendromlarla ilişkili yeni genlerin araştırılacağı ileri moleküler araştırmalar için değerli bir kohort oluşturmaktadır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (25.12.2014 tarih ve 1939 sayı).

Hasta Onamı: Çalışmaya katılan hastalardan veya ailelerinden aydınlatılmış yazılı onam alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - Ş.A., H.K., Z.O.U.; Tasarım - Ş.A., G.T., Z.O.U.; Denetleme - Ş.A., Z.O.U., S.B., G.T., H.K.; Kaynaklar - S.B., Z.O.U., G.T., G.B., B.K., U.A.; Malzemeler - Ş.A., G.T., G.B.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - Ş.A., G.B., G.T., Z.O.U., U.A., H.K.; Analiz ve/veya Yorum - Ş.A., Z.O.U., G.T., S.B., B.K.; Literatür Taraması - Ş.A., G.B., G.T.; Yazıyı Yazan - Ş.A., G.B., S.B., Z.O.U.; Eleştirel İnceleme - Ş.A., Z.O.U., S.B., B.K., H.K., G.B., G.T., U.A.

Teşekkür: Bu çalışmaya maddi destek sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, çalışmaya katılan hastalara ve ailelerine teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2748/53123 ve 50170 proje numaraları ile desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: This study was approved by Ethical Committee of Istanbul University, Faculty of Medicine (Dec 25th, 2014 - 1939).

Informed Consent: All affected individuals or their legal guardians gave written informed consent to the study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - Ş.A., H.K., Z.O.U.; Design - Ş.A., G.T., Z.O.U.; Supervision - Ş.A., Z.O.U., S.B., G.T., H.K.; Resources - S.B., Z.O.U., G.T., G.B., B.K., U.A.; Materials - Ş.A., G.T., G.B.; Data Collection and/or Processing - Ş.A., G.B., G.T., Z.O.U., U.A., H.K.; Analysis and/or Interpretation - Ş.A., Z.O.U., G.T., S.B., B.K.; Literature Search - Ş.A., G.B., G.T.; Writing Manuscript - Ş.A., G.B., S.B., Z.O.U.; Critical Review - Ş.A., Z.O.U., S.B., B.K., H.K., G.B., G.T., U.A.

Acknowledgements: We thank Istanbul University Scientific Research Projects Unit for funding this study. We also thank the patients and their families for participating in this study.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was funded by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (project numbers: 2748/53123 and 50170).

KAYNAKLAR

1. Ashhurst DE. The influence of mechanical conditions on the healing of experimental fractures in the rabbit: a microscopical study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1986;313(1161):271 - 302. [CrossRef]
2. Bellaiche N. Imaging in oral implantology. In: Scortecchi GM, Misch CE, Benner KU (eds). *Implants and Restorative Dentistry*. London, England: Martin Dunitz Ltd, 2001;181.
3. Bouckennooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9(6):728-33. [CrossRef]
4. Buckwalter JA. Musculoskeletal tissue healing. In: Weinstein SL, Buckwalter JA (eds). *Turek's Orthopaedics, Principles and Their Applications*, 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005;57-63.
5. Cetinus E, Kilinc M, Uzel M, et al. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* 2005;125(6):376-80. [CrossRef]
6. Demers LM. Bone specific alkaline phosphatase. In: Eastell R, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek L (eds). *Bone Markers Biochemical and Clinical Perspectives*, London, England: Martin Dunitz Ltd, 2001;57-8.
7. Durak K, Sönmez G, Sarisozen B, Özkan S, Kaya M, Öztürk C. Histological assessment of the effect of alpha-tocopherol on fracture healing in rabbits. *J Int Med Res* 2003;31(1):26-30. [CrossRef]
8. Duygulu F, Yakan B, Karaoğlu S, Kutlubay R, Karahan OI, Öztürk A. The effect of zymosan and the protective effect of various antioxidants on fracture healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 2007;127(7):493-501. [CrossRef]
9. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res* 1989;248:283-93.
10. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1990;85(3):632-9. [CrossRef]
11. Göktürk E, Turgut A, Baycu C, Günal I, Seber S, Gülbaş Z. Oxygen free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1995;66(5):473-5. [CrossRef]
12. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 1985;3(4):389-404. [CrossRef]
13. Halıcı M, Öner M, Güney A, Canöz Ö, Narin F, Halıcı C. Melatonin promotes fracture healing in the rat model. *Eklemler Hastalıkları* 2010;21(3):172-7.
14. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 1991;9(3):383-90. [CrossRef]
15. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992;72(1):101-63. [CrossRef]
16. Kim JW, Kim C. Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 2005;70(9):1352-60. [CrossRef]
17. Lykkesfeldt J. Determination of malondialdehyde as dithio-barbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clin Chem* 2001;47(9):1725-7.
18. Mohamad S, Shuid AN, Mohamed N, et al. The effects of alpha-tocopherol supplementation on fracture healing in a postmenopausal osteoporotic rat model. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67(9):1077-85. [CrossRef]
19. Mohamadnia AR, Shahbazkia HR, Sharifi S, Shafaei I. Bone-specific alkaline phosphatase as a good indicator of bone formation in sheepdogs. *Comp Clin Pathol* 2007;16(4):265-70. [CrossRef]
20. Park E, Alberti J, Quinn MR, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the production of superoxide anion, IL-6 and IL-8 in activated human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Exp Med Biol* 1998;442:177-82. [CrossRef]
21. Park S, Kim H, Kim SJ. Stimulation of ERK2 by taurine with enhanced alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblast-like UMR-106 cells. *Biochem Pharmacol* 2001;62(8):1107-11. [CrossRef]
22. Petrovich YA, Podorozhnaya RP, Kichenko SM, Kozlova MV. Effects of selenium-containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. *Bull Exp Biol Med* 2004;137(1):74-7. [CrossRef]
23. Pincemail J. Free radicals and antioxidants in human diseases. In: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL eds. *Analysis of free radicals in biological systems*, Basel, Switzerland: Birkhäuser; 1995: 83-98. [CrossRef]
24. Roysommuti S, Azuma J, Takahashi K, Schaffer S. Taurine cytoprotection: From cell to system. *Thai J Physiol Sci* 2003;16(2):17-27.
25. Rozen N, Lewinson D, Bick T, Meretyk S, Soudry M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2007;17(3):197-213. [CrossRef]
26. Sarisozen B, Durak K, Dincer G, Bilgen OF. The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats. *J Int Med Res* 2002;30(3):309-13. [CrossRef]
27. Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Res* 2004;29(1):117-26. [CrossRef]
28. Shuid AN, Mohamad S, Muhammad N, et al. Effects of alpha-tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing. *J Orthop Res* 2011;29(11):1732-8. [CrossRef]
29. Silverton SF, Mesaros S, Markham GD, Malinski T. Osteoclast radical interactions: NADPH causes pulsatile release of NO and stimulates superoxide production. *Endocrinology* 1995; 136(11):5244-7. [CrossRef]
30. Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta* 2002;318(1-2):145-8. [CrossRef]
31. Turgut A, Göktürk E, Köse N, Kaçmaz M, Öztürk HS, Seber S, et al. Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1999;70(5):487-90. [CrossRef]
32. Turk C, Halıcı M, Guney A, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S. Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. *J Int Med Res* 2004;32(5):507-12. [CrossRef]
33. Volkmer DL, Sears B, Lauing KL, Nauer RK, Roper PM, Yong S, et al. Antioxidant therapy attenuates deficient bone fracture repair associated with binge alcohol exposure. *J Orthop Trauma* 2011;25(8):516-21. [CrossRef]
34. Wojtecka-Lukasik E, Czuprynska K, Maslinska D, Gajewski M, Gujski M, Maslinski S. Taurine-chloramine is a potent anti-inflammatory substance. *Inflamm Res* 2006;55 Suppl 1:S17-S18. [CrossRef]
35. Yeler H, Tahtabas F, Candan F. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochem Funct* 2005;23(2):137-9. [CrossRef]
36. Yilmaz C, Erdemli E, Selek H, Kinik H, Arıkan M, Erdemli B. The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121(7):426-8. [CrossRef]
37. Yuan LQ, Liu W, Cui RR, Wang D, Meng JC, Xie H, et al. Taurine inhibits osteoclastogenesis through the taurine transporter. *Amino Acids* 2010;39(1):89-99. [CrossRef]
38. Yuan LQ, Xie H, Luo XH, Wu XP, Zhou HD, Lu Y, et al. Taurine transporter is expressed in osteoblasts. *Amino Acids* 2006;31(2):157-63. [CrossRef]
39. Zhou C, Zhang X, Xu L, Wu T, Cui L, Xu D. Taurine promotes human mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblast through the ERK pathway. *Amino Acids* 2014;46(7):1673 - 80. [CrossRef]