

# SENDROMİK VE NON-SENDROMİK KRANIYOSİNOSTOZ OLGULARINDA *FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* VE *RAB23* GENLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

## MOLECULAR ANALYSIS OF *FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* AND *RAB23* GENES IN SYNDROMIC AND NON-SYNDROMIC CRANIOSYNOSTOSIS CASES

Volkan KARAMAN<sup>1</sup> , Güven TOKSOY<sup>1</sup> , Birsen KARAMAN<sup>1</sup> , Hülya KAYSERİLİ KARABEY<sup>1</sup> , Seher BAŞARAN<sup>1</sup> , Umur ALTUNOĞLU<sup>1</sup> , Şahin AVCI<sup>1</sup> , Zehra Oya UYGUNER<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** V.K. 0000-0001-8777-3548; G.T. 0000-0002-8103-9980; B.K. 0000-0001-8640-0176, H.K. 0000-0003-0376-499X; S.B. 0000-0001-8668-4746; U.A. 0000-0002-3172-5368; Ş.A. 0000-0001-9545-6657; Z.O.U. 0000-0002-2035-4338

**Cite this article as:** Karaman V, Toksoy G, Karaman B, Kayserili Karabey H, Basaran S, Altunoglu U, et al. Molecular analysis of *FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* and *RAB23* genes in syndromic and non-syndromic craniosynostosis cases. J Ist Faculty Med 2019;82(2):116-22. doi: 10.26650/IUITFD.422258

### ÖZET

**Amaç:** Sendromik (SCS) ve non-sendromik kraniyosinostozlu (NSCS) olgularda, kraniyosinostoz tipleriyle ilişkilendirilmiş genlerde (*FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* ve *RAB23*) mutasyonların araştırılması ve moleküler genetik tanı için akılcı bir akış şeması oluşturulması.

**Gereç ve Yöntem:** İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD'da kromozom anomalisi dışlanmış, altısı prenatal ve 34'ü postnatal tanı alan, dokuzu NSCS ve 31'i SCS toplam 40 olgu ile 34 sağlıklı ebeveyn çalışmamıza dahil edildi. SCS'li olguların dokuzu Pfeiffer (PS), altısı Crouzon (CRS), beşi Apert (AS), yedisi Saethre-Chatzen (SaCS) ve dördü Muenke (MUS)/Saethre Chatzen (SaCS) idi. Kraniyosinostoz tipine göre mutasyonların en sık görüldüğü gen/ekzon bölgelerinden başlanarak, tüm gen ve ilişkili diğer genler aşamalı olarak Sanger dizileme yöntemi ile incelendi. Mutasyon saptanmayan olgularda incelenen genlerdeki büyük delesyon ve duplikasyonlar *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) yöntemi ile araştırıldı.

**Bulgular:** Olgularımızın %50'sinde dizi analizi ile ve %2,5'unda MLPA yöntemi ile klinik bulguları destekleyen moleküler genetik sonuçlara ulaşıldı. Moleküler tanı oranı SCS grubunda %64,5, NSCS grubunda %11,1 oldu.

**Sonuç:** Sendromik olgularda moleküler tanı oranı seri ortalamasının üzerinde idi. Birinci basamakta *FGFR2* geni ekzon 7-8'de olası mutasyonlar dışlandıktan sonra, ikinci basamaktaki hedef ekzonlara (3, 5, 11, 14-17) ekzon 12 ve 13'ün ilavesi PS'de mutasyon saptama oranını %33 arttırdı. Çalışmamız, moleküler tanı alan ailelere özgün genetik danışma olanağı sağladı. CS olgularında izlenen akış şemasında Sanger dizileme ile 1. ve 2. basamak testlerden sonra mutasyon saptanmayan olguların yeni nesil dizileme tekniği ile klinik ekzom ve yüksek çözünürlüklü mikroarray çalışmasına alınmasının uygun olacağına karar verildi.

**Anahtar Kelimeler:** Kraniyosinostoz, *FGFR*, *TWIST1*

### ABSTRACT

**Objective:** Craniosynostosis (CS) associated genes (*FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* and *RAB23*) were investigated in order to determine the mutation rates and establish an effective flow chart for molecular genetic diagnosis for syndromic (SCS) and non-syndromic craniosynostosis (NSCS).

**Material and Method:** A total of 40 cases, including six prenatal cases, with normal karyotypes, and 34 parents were investigated in the Medical Genetics Department of Istanbul Medical Faculty. The clinical diagnosis was NSCS in 9, Pfeiffer in 9 (PS), Crouzon in 6 (CRS), Apert in 5 (AS), Saethre-Chatzen in 7 (SaCS) and Muenke/Saethre Chatzen in 4 (MUS/SaCS) of the cases. According to the clinical diagnosis, the hot spot mutation sites of genes/exons were screened initially and the whole gene and other genes were progressively examined by Sanger sequencing. The Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) technique was applied to detect deletions/duplications.

**Results:** Molecular results were achieved in 50% of cases by sequencing and in 2.5% by MLPA. Molecular diagnosis rate was 64.5% in SCSs and 11.1% in NSCSs.

**Conclusion:** Molecular diagnosis rate was higher in the SCS than in the NSCS group. Including exons 12 and 13 to target exons (3, 5, 11, 14-17) of *FGFR2* gene increases the mutation rate by 33% in the second step of the molecular investigation in PS cases. Genetic counseling with the families following molecular diagnosis is important. Our results supported the fact that CS cases with un-identified pathogenic variants in the first and second steps of the algorithmic chart, should be followed by clinical exome and high resolution microarray techniques.

**Keywords:** Craniosynostosis, *FGFR*, *TWIST1*

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** volkan.karaman@istanbul.edu.tr

**Geliş tarihi/Received Date:** 09.05.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 08.10.2018

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

## GİRİŞ

Kafatası kemiklerini birleştiren kraniyal sütürler, fibröz dokular olup doğum sırasında kafanın kanaldan rahat geçmesine ve ilerleyen süreçte beynin büyümesine olanak sağlar (1, 2). Beyin kubbesinde sagittal, koronal, metopik ve lambdoid olmak üzere sekiz adet kraniyal sütür bulunur. Sütürlerin erken füzyonu sinostoz, sütürlerden bir veya birkaçının erken kapanması ile ortaya çıkan malformasyon da kraniyosinostoz (CS) olarak tanımlanır. 1/2100-1/2500 canlı doğumda bir gözlenen (3, 4) bu malformasyonun varlığında beyin, kranyumun açık olan sütürleri yönünde büyümeye devam eder ve kapanan sütüre özgün (trigonosefali, skafosefali, akrosefali, plagiosefali, ve brakisefali vb.) deformasyonlar ortaya çıkar. CS'ların önemli bir kısmı izole formda non-sendromik (NSCS), pek azı ek bulguların eşlik ettiği sendromik formda (SCS) gözlenir. İzole formlar; sagittal, lambdoid, koronal (tek veya çift taraflı sütürün etkilenmesiyle), metopik ya da çoklu sütür sinostozlarıdır (4, 5). Prevelansı 3-5/10.000 olarak verilen CS'ların %70-85'inini oluşturan NSCS'ların %92'si sporadiktir ve patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (6-8).

CS'lu olguların %15-40'ını oluşturan SCS'lar, bugüne kadar 180'den fazla sendromla ilişkilendirilmiştir (8, 9). SCS'lar, otozomal dominant (OD), otozomal resesif (OR) ve X-e bağlı kalıtım göstermektedir (8, 10, 11). SCS'lar içinde en iyi bilinenler; Apert (AS), Pfeiffer (PS), Crouzon (CRS) ve Saethre-Chotzen (SaCS) sendromudur. AS, el ve ayaklarda bilateral simetrik kompleks sindaktili ve bikoronal sinostoz ile (4, 12), geniş bir klinik spektrumu olan PS genellikle geniş, radyale dönük başparmak ve/veya büyük ayak baş parmak, nadiren kutanöz sindaktili ile, CRS, el ve ayaklarda herhangi bir bulgu olmaksızın *kruzonooid* yüz görünümü ile (4, 13) SaCS uni/veya bilateral koronal sinostoz, fasyal asimetri, pitoz, anormal kulak görünümü ile karakterizedir (4, 8, 14).

CS ile ilişkili ilk tek gen mutasyonu, *MSX2* geninde Jabs ve ark.'ları (1993) tarafından tanımlanmıştır (15), ancak günümüze kadar başka hiçbir olguda gösterilememiştir (4, 8). Son yıllarda yeni nesil dizileme teknolojilerinin kullanılmasıyla CS ilişkili genlerin ve yolların belirlenmesine yönelik çalışmaların sayısı artmıştır. Günümüzde, İnsan Genomu Mutasyon Veri Bankasında (HGMD) CS'la ilişkilendirilmiş 73 gen bildirilmektedir. CS ilişkili gen sayısı artmasına rağmen, BCS ile ilişkili genler arasında *FGFR2* %32 ile ilk sırada yer alırken, bunu %25 ile *FGFR3* ve %19 ile *TWIST1* genleri izlemektedir (4, 16). *FGFR* (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) grubundan CS ilişkisi tanımlanmış diğer bir gen ise, *FGFR1*'dir.

*FGFR* genlerinin kodladığı fibroblast büyüme faktörü reseptörlerin, fibroblast büyüme faktörlerine bağlanan, membran dışına uzanan ligand domaininde üç adet immunoglobulin benzeri domain (Ig I, II ve III), heliks yapısında olan tek bir transmembran domaini ve hücre içine

uzanan tirozin kinaz aktivitesi gösteren intrasellüler domaini bulunmaktadır (4, 8). *FGFR2* ve *FGFR3*'de saptanan mutasyonların büyük çoğunluğu genin IgII (D2) ve IgIII (D3), *TWIST1*'de ise "helix-loop-helix" domaini kodlayan bölgelerinde saptanmaktadır (4). CS ilişkisi iyi tanımlanmış ancak nadir sayıda olguda gözlenen genler ise *POR*, *FREM1* ve *RAB23*'dür (4, 8, 17, 18).

*FGFR2*'deki mutasyonlar, AS ve CRS'lu olguların %100'ünden, PS'nun ise >%95'inden sorumlu tutulmaktadır (8). Bu gendeki farklı tip mutasyonların, AS, CRS ve PS'na yol açması ekspresivite değişkenliğini göstermektedir (4, 19). PS'da olguların %5'inde *FGFR1* geni mutasyonları tanımlanmıştır. *TWIST1* ve *FGFR2* genlerindeki heterozigot mutasyonlar, SaCS'na yol açmaktadır (4, 8, 20).

CS olgularındaki genetik çalışmalar, *FGFR* mutasyonlarının çoğunun reseptör dimerizasyonunu, ligand bağlanma aktivitesini ve reseptörün kinaz aktivasyonunu arttıran mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (21, 22). Fibroblast Büyüme Faktör (FGF)'leri, *FGFR* gen ailesinin ligantlarıdır. Günümüze kadar FGF ailesinden 23 üye (FGF1-FGF23) tanımlanmıştır (21, 23-25). Gebeliğin oluşumuyla FGF ve *FGFR*'ler, kraniyal sütürlerde ifade edilir. Ekstraselüler matrikste ve hücre yüzeyinde bulunan heparan sülfat proteoglikan (HSPG) molekülleri, FGF moleküllerinin uzaysal ve zamansal aktivitesini belirleyici özelliğe sahiptir. Hücre yüzeyinde HSPG'lerin, FGF/FGFR etkileşiminde FGF'leri ısı, pH ya da proteazlara bağlı yıkımdan koruyarak stabilize ettikleri bildirilmiştir (24, 26, 27). Aktive olan FGF/FGFR sinyal yolları kafatası ve kraniyal sütür gelişiminde önemli bir yer tuttuğundan bu yolaktaki proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar normal gelişimin bozulmasına ve *FGFR* ilişkili kraniyosinostozlara neden olmaktadır (7, 28).

Bu çalışma ile CS ilişkili fenotiplerde, sekiz gende (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* ve *RAB23*) olguların klinik tanıları dikkate alınarak, moleküler genetik test akış şeması ile incelenmesi, SCS ile NSCS olgularında moleküler tanı saptama oranlarının belirlenmesi ve elde edilen veriler ile etkin bir akış şeması oluşturulması hedeflendi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

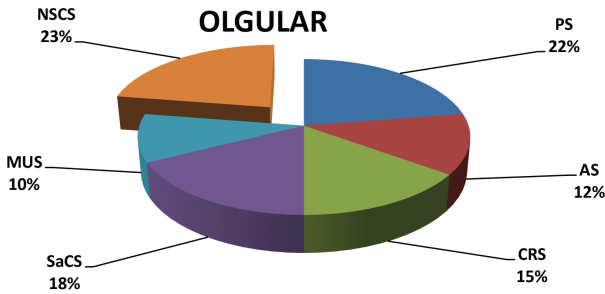
1990-2014 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD polikliniğinde kraniyosinostoz tanısı alan ve izlenen, kromozom anomalisi dışlanan ve projeye katılmaya onam veren, altısı prenatal ve 34'ü postnatal olan toplam 40 olgu ve 34 aile bireyi çalışmaya alındı. Olguların 31'i (AS n:5, PS n:9, CRS n:6, MUS n:4, SaCS n:7) SCS ve dokuzu NSCS grubunda değerlendirildi. Postnatal olgularda periferik kan (n=68), prenatal olgularda kordon kanı (n=2), fetal deri (n=2), amniyotik sıvı hücre kültürü (n=1) ve kardiyosentez (n=1) örnekleri DNA izolasyonu için kullanıldı, test için -20°C'de saklandı.

Aday genlerin transkriptleri HGMD ile uyumlu olarak seçildi. Primerlerin tasarımında Ensembl'dan yararlanıldı, özgünlük UCSC'de test edildi. Sanger dizileme yöntemi ilk 21 olguda hizmet alımı (Macrogen), 19 olguda ve ailelerinde laboratuvarımızda (ABI3500) gerçekleştirildi. Varyant değerlendirilmesinde *in silico* veri taban analizleri uygulandı, ClinVar, HGMD ve çeşitli literatürlere başvuruldu.

Delesyon/duplikasyon analizleri için SALSA-MLPA-Kraniofasial (P080-B1 Lot.0710) kiti firma protokollerine uygun olarak çalışıldı. İncelenen bölgeler; ALX1/ekzon/1-4; ALX3/ekzon/1-4; ALX4/ekzon/2-4; EFN1/ekzon/1-5; RUNX2/ekzon/2,3a,4-9; TWIST1/ekzon/1-2; TWISTNB/ekzon/4; FGFR1/ekzon/4-8; FGFR2/ekzon/8,11b; FGFR3/ekzon/7; MSX2/ekzon 1-2 idi.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan olguların (n=40), 31'i SCS (%77,5) ve 9'u NSCS (%22,5) idi. Olguların klinik tanı dağılımı Şekil 1'de, bulguları Tablo 1'de sunulmaktadır.



Şekil 1: CS olgularının klinik tanıya göre dağılımı

Genel seride mutasyon saptanma oranı %52,5 (21/40) olup OD kalıtım gösteren üç gende (*FGFR2*, *FGFR3* ve *TWIST1*) 13 farklı mutasyon saptandı. Bu mutasyonlardan 12'si dizi analizi ile gösterilen değişimlerdi: sekiz yanlış anlamlı, iki anlamsız, biri daha önce tanımlanmamış sessiz ve biri 21 bç'lik duplikasyon; 1'i ise MLPA analizinde saptanan tüm gen delesyonu idi (Tablo 2). Ebeveyn çalışmasında mutasyonların dört olgunun ikisinde maternal, ikisinde paternal kaynaklı olduğu gösterildi. Maternal kalıtılan iki olgu SaCS, paternal kalıtılan iki olgunun biri PS tanılı, diğeri NSCS grubunda idi. Diğer 13 olgunun ebeveynleri mutasyon taşımadığından, gonadal mozaizm dışlanamamakla birlikte, mutasyonun *de novo* oluştuğu öngörüldü.

## TARTIŞMA

AS'lu olguların %95-98'inde *FGFR2* geninde özellikle ekzon 7'deki yanlış anlamlı c.755C>G (p.Ser252Trp) ve c.758C>G (p.Pro253Arg) mutasyonları sendromla ilişkilendirilmişti (4, 29). Uyguladığımız test akış şemasında 1.basamakta yer alan *FGFR2* geni ekzon 7'nin dizilenmesi, AS'li olguların tamamına tanı olanağı sağladı. Bu sonuç literatür ile uyumlu bulundu (4).

PS'lu olgularda, 1. basamakta *FGFR2* ekzon 8 dizilemesi ile, üçte birine tanı konuldu. Literatürde 2. basamak testi olan ekzon 3, 5, 11, 14-17'nin dizilenmesi, ekzon 12 ve 13'ün ise 3. basamakta dizilenmesi önerilmektedir (4). Çalışmada ekzon 12-13, 2. basamakta dizilenmiş ve iki olguda saptanan mutasyonlarla tanı oranı PS'unda %66,6'ya yükselmiştir. Literatürde önerildiği gibi 1. basamakta *FGFR2* ekzon 7-8 dizilemesi ile CRS'lu altı olgunun üçüne tanı konulabilmiş (%50), mutasyon saptanmayan olgularda diğer ekzon ve genlerde dizileme ve MLPA tekniğiyle herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Ayırıcı tanıda bilişsel geriliğin önemli olduğu MUS ile fenotipi sıklıkla örtüşen SaCS olgularında 1. basamak testi olarak *FGFR3* ekzon 7 ve *TWIST1* ekzon 1'in dizilenmesi önerilmekte ve mutasyon saptanan gene göre adlandırılmaktadır. Serimizdeki MUS klinik tanılı dört olgunun ikisinde (%50), birinci basamakta çalışılan *FGFR3* ekzon 7'de c.749C>G (p.Pro250Arg) mutasyonu saptanmıştır. SaCS olgularında en sık *TWIST1* geninde mutasyon gözlenmektedir. Literatürde sadece bir SaCS olgusunda *FGFR2* geninde mutasyon bildirilmiştir (30). Çalışmamızda SaCS olgularında, 1. basamakta *TWIST1* ekzon 1 incelenmiş (Tablo 3) ve yedi olgunun üçünde mutasyon saptanmıştır (%42,8). 2. basamakta uygulanan delesyon/duplikasyon testi ile bir olguda tüm gen delesyonu saptanmış ve SaCS olgularında mutasyon saptama oranımız %57'ye yükselmiştir. MLPA çalışması ile bir olguda mutasyon saptanmış olduğu için, SaCS olgularında 2. basamak testi olarak MLPA önerilmektedir.

Çalışma grubumuzda yer alan genlerde ekzon dizileme ve MLPA tekniği ile taranmasına rağmen (Tablo 3) mutasyon saptanmayan, PS (n=3), CRS (n=3) ve bir MUS (n:2) olgusunda akraba evliliği varlığı, çalışmamızda yer almayan OR kalıtlı CS ilişkili genlerin sorumlu olabileceğini düşündürdü.

SCS olgularında *MSX2*, *POR*, *FREM1*, *RAB23* genlerinin, kraniyosinostozların etiopatogenezinde çok nadir yer aldığı bildirilmektedir (4). Çalışmamızda son basamakta yer alan bu dört gende dizileme ile mutasyon saptanmamıştır.

NSCS ön tanılı dokuz olguda eş zamanlı olarak *FGFR3* ekzon 7-9, *FGFR2* ekzon 7 (IIIa) ve 8 (IIIc) ve *TWIST1* dizi analizi gerçekleştirildi (4). Sadece 1 olguda *FGFR2* geninde literatürde daha önce tanımlanmamış c.234C>T (p.His78=) sessiz değişim saptandı. Bu değişim için *in silico* programlarda "patojenik varyant" öngörüsü yapılması ve ailedeki segregasyon çalışmasında sadece etkilenmiş bireylerde gösterilmesi, etkilenmemişlerde gösterilememesi bulgularla ilişkili olduğu yönünde değerlendirildi, ancak 1,5° kuzen evliliği ürünü olan bu olgudaki sonucun rastgele birliktelik olabileceği de göz ardı edilmemelidir. İleride bu değişimi taşıyan farklı etkilenmiş bireylerin varlığı fenotip-genotip ilişkisini destekleyecektir. Mutasyon saptanmayan olgularda delesyon ve duplikasyon tanısı için MLPA analizi ve eş zamanlı olarak *FGFR2* ve *FGFR3* genlerinin diğer

**Tablo 1:** CS olgularının demografik ve klinik bulguları

Olgu	C.	Akraba Evliliği	Tanı yaşı	Mat/pat yaş	Ailede Taşıcılık	Etkilenmiş sütür	Sd.	Kd.	Geniş el/ayak baş parmağı	Proptozis	Mutasyon +/-
AS1	E	-	25 GH	36/38	-	Koronal	+	-	+	+	+
AS2	E	-	2 ay	32/38	-	Koronal	+	-	+	+	+
AS3	E	-	1 ay	28/36	-	Koronal	+	-	-	+	+
AS4	E	-	1,5 yaş	34/36	-	Koronal	+	-	-	+	+
AS5	D	-	27 GH	26/30	-	Koronal	+	-	+	+	+
PS1	D	-	23 GH	32/35	-	Koronal, sagittal ve lambdoid	-	-	+	+	+
PS2	D	-	2,5 yaş	32/36	-	Koronal, sagittal	+	-	+	+	+
PS3	D	-	3,5 ay	27/34	-	Koronal, sagittal	-	-	+	+	+
PS4	D	-	1,5 ay	39/38	-	Sagittal	+	+	+	+	+
PS5	E	1° kuzen	6 ay	30/33	-	Koronal, sagittal	+	+	-	-	-
PS6	E	-	9 yaş	28/32	pat.	Koronal	+	+	+	+	+
PS7	E	1° kuzen	5 yaş	26/32	-	Koronal, sagittal	+	+	+	-	-
PS8	E	1° kuzen	2 ay	21/24	-	Koronal	-	-	-	+	-
PS9	D	-	22 GH	22/25	-	Koronal, sagittal ve lambdoid	-	-	+	+	+
CRS1	E	1° kuzen	6 yaş	28/34	-	Koronal, sagittal	-	+	-	+	-
CRS2	E	-	14 yaş	24/30	-	Bikoronal	-	-	-	+	+
CRS3	D	1,5° kuzen	14 yaş	27/31	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
CRS4	D	-	2 yaş	30/37	-	Bikoronal	-	-	-	+	+
CRS5	E	1° kuzen	4,5 yaş	27/31	-	Koronal, sagittal	-	-	-	+	-
CRS6	D	-	2 ay	25/28	-	Bikoronal	-	-	-	+	+
SaCS1	E	-	3,5 yaş	37/41	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
SaCS2	D	-	7 ay	37/49	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
SaCS3	E	-	1,5 ay	28/36	-	Bikoronal	-	-	+	+	+
SaCS4	D	1° kuzen	3 ay	28/26	mat.	Bikoronal	+	-	-	+	+
SaCS5	D	-	2 ay	35/37	-	Bikoronal	-	-	-	+	+
SaCS6	D	-	11 ay	33/38	mat.	Bikoronal	-	-	+	+	+
SaCS7	D	-	2,5 ay	30/37	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
MUS1	E	1° kuzen	1 yaş	35/34	-	Koronal	+	-	-	-	-
MUS2	D	-	3,5 ay	29/34	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
MUS3	D	-	2 ay	28/29	-	Bikoronal	-	+	-	+	+
MUS4	D	-	2,5 ay	28/30	-	Koronal	-	-	-	+	+
NCS1	D	1,5° kuzen	10 gün	26/30	pat.	Sagittal	-	-	-	+	+
NCS2	E	-	2,5 yaş	28/36	-	Sagittal	-	-	-	-	-
NCS3	E	-	25 GH	20/20	-	Koronal	-	-	+	-	-
NCS4	E	1,5° kuzen	2 yaş	27/26	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
NCS5	D	1° kuzen	36 GH	21/25	-	Koronal	-	-	+	+	-
NCS6	D	1,5° kuzen	1 yaş	29/30	-	Sagittal	+	-	-	+	-
NCS7	E	1° kuzen	8 gün	26/38	-	Sagittal	-	-	-	+	-
NCS8	E	-	2 yaş	33/35	-	Sagittal	-	-	-	-	-
NCS9	E	1° kuzen	5 ay	30/30	-	Bikoronal	-	-	-	-	-

GH: gebelik haftası, C.Cinsiyet, \*İlk değerlendirme, Sd:Sindaktili, Kd:Klinodaktili,mat.:maternal,pat.:paternal

**Tablo 2:** FGFR2, FGFR3, TWIST1 genlerinde mutasyon saptanan olgularda, fenotip, ilişkili gen mutasyonları ve aminoasit değişimleri (n:21)

Fenotip	Gen ve NM numarası	Ekzon	Nükleotid	Aminoasit Değişimi
Apert sendromu n:5		7	c.755C>G	p.Ser252Trp
Pfeiffer sendromu n:3		8	C.1019A>G	p.Tyr340Cys
Pfeiffer sendromu n:1		5	c.514_515delGCinsTT	p.Ala172Phe
Pfeiffer sendromu n:1	FGFR2 NM_000141.4	12	c.1646A>C	p.Asn549Thr
Pfeiffer sendromu n:1		13	c.1694A>C	p.Glu565Ala
Crouzon sendromu n:2		7	c.833G>T	p.Cys278Phe
Crouzon sendromu n:1		8	c.1025G>A	p.Cys342Tyr
Muenke sendromu n:2	FGFR3 NM_000142.4	7	749C>G	p.Pro250Arg
Saethre-Chotzen sendromu n:1		1	355C>T	p.Gln119*
Saethre-Chotzen sendromu n:1		1	c.376G>T	p.Glu126*
Saethre-Chotzen sendromu n:1	TWIST1 NM_000474.3	1	c.396_416, 21bp dup	-
Saethre-Chotzen sendromu n:1		tüm gen	MLPA TWIST1 heterozigot tüm gen delesyonu	-
Non-sendromik kraniyosinostoz n:1	FGFR2 NM_000141.4	3	c.234C>T	p.His78=

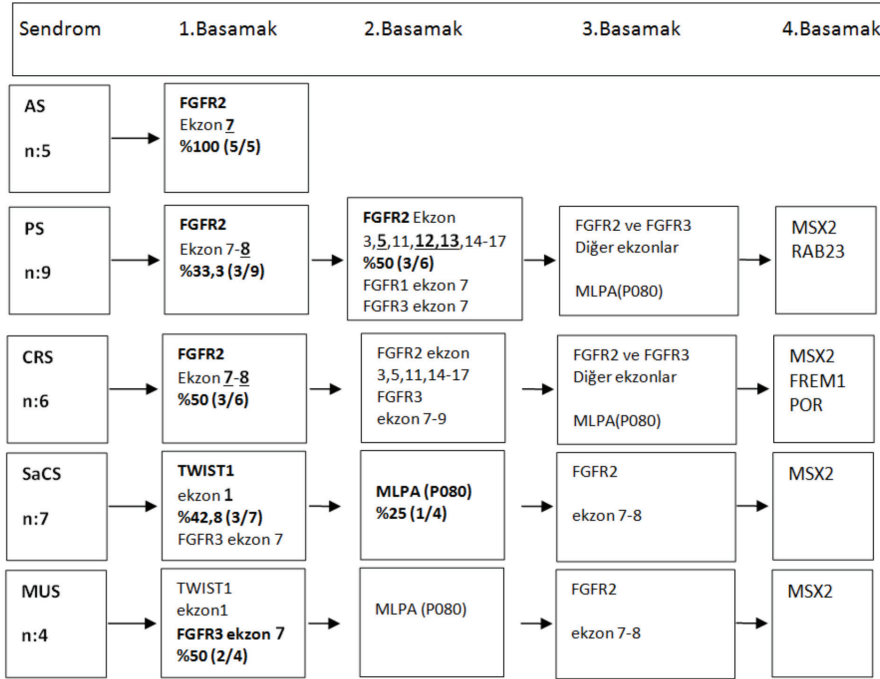
ekzonları dizilendi ve herhangi bir mutasyon saptanmadı. NSCS olgularının altısının ebeveyninde 1° ya da 1,5° kuzen evliliği varlığı (%66,6), OR kalıtım modeline uygun, henüz tanımlanmamış yeni genlerin varlığını düşündürmektedir.

Çalışmamızın başladığı 2011 yılından sonra, özellikle yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanımı ile geniş seri çalışmaları yayınlanmaya, yeni genler ve yolaklar belirlenmeye başlamıştır. 2012 yılında Justice ve ark.'ları 172 NSCS olgusu ve 548 kontrolden oluşan serilerinde genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile BMP2 ve BBS9 genlerinin de CS ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (31). Twigg ve ark.'ları 2013 yılında tüm ekzom dizileme (TED) ile bir olguda ERF geninde mutasyon saptamışlar, aile çalışmasını takiben SCS ve NSCS olgularından oluşan 412 olguluk serilerinde bu gende 12 olguda daha ERF geninde farklı mutasyonların varlığını göstermişlerdir (32). Sharma ve ark.'ları 2013 yılında SCS ve NSCS olgularında önce FGFR2-3 ve TWIST1'de mutasyon oranlarının

yüksek olduğu gen bölgelerini dizilemişler ve mutasyon saptamadıkları bilateral koronal sinostozu olan yedi olguda WES uygulamışlardır. Bu olgularda TCF12 geninde patojenik özellikte farklı varyantlar saptamaları üzerine bu genin CS ile ilişkili olabileceği öngörüsü ile aynı geni 347 olguluk serilerinde çalışmışlar ve 38 olguda daha mutasyon saptadıklarını bildirmişlerdir (33). Lee ve ark.'nın 2017 yılındaki çalışmasında FGFR1-3 genlerinin hastalık ilişkili hedef bölgeleri ve TWIST1 geni mutasyonlar açısından dışlanmış 233'ü retrospektif ve 86'sı ise prospektif olan kohortlarında, CS ilişkileri daha önce bildirilen 20 genden oluşan panel çalışmasında retrospektif gruptaki olguların %14'ünde ve prospektif gruptaki olguların ise %15'inde mutasyon saptamışlardır. Toplamda 33 olgunun 22'sinde TCF12 (55%), altısında EFNB1 (18%), ikisinde ALX4, ikisinde POR, ikisinde FGF10 ve birer olguda EFNA4, IL11RA ve ER'de mutasyon saptadıklarını bildirmişlerdir (34).

Sonuçlarımız, özgün klinik tanının varlığında, CS'un mo-

**Tablo 3:** SCS olgularında uygulanan moleküler analiz akış şeması (mutasyon saptanan gen/ekzonlar koyu gösterilmiştir)



leküler analiz akış şeması uygulanarak (1. ve 2. basamak testler) hızlı ve hedefe yönelik olarak planlanabileceğini, mutasyon saptanmayan olgularda ise YND temelli klinik ekzom ya da panel-gen testlerinin daha ekonomik, hızlı ve etkin moleküler tanıya yardımcı olabileceğini göstermektedir. Her TED'de olduğu gibi test öncesi yüksek çözünürlüklü mikroarray/aCGH analizleri ile mikrodelyasyon ve duplikasyonların dışlanması mutlaka önerilmelidir.

24379) ve CRANIRARE-2 konsorsiyum (ERA-NET) TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 112S398).

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Ethics Committee of Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine (No: 2012-1305-1177).

**Informed Consent:** Informed consent was obtained from all participants.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- V.K., H.K., Z.O.U., S.B.; Data Acquisition- V.K., H.K., Z.O.U., U.A., Ş.A.; Data Analysis/Interpretation- V.K., H.K., S.B., Z.O.U., U.A., Ş.A.; Drafting Manuscript- V.K., S.B., H.K., Z.O.U., U.A., Ş.A.; Critical Revision of Manuscript- V.K., H.K., S.B., Z.O.U., U.A., Ş.A., B.K., G.T.; Final Approval and Accountability- V.K., H.K., S.B., Z.O.U., U.A., Ş.A., B.K., G.T.; Technical or Material Support- V.K., H.K., S.B., Z.O.U., U.A., Ş.A., B.K., G.T.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** This study was funded by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (project numbers: 24379) and CRANIRARE-2 konsorsiyum (ERA-NET) TÜBİTAK (project numbers: 112S398).

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı alınmıştır (Dosya No: 2012-1305-1177).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No:

## KAYNAKLAR

1. Tunçbilek G. Kraniyofasiyal cerrahinin temel prensipleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2009;40(1):33-44.

2. Slater BJ, Lenton KA, Kwan MD, Gupta DM, Wan DC, Longaker MT. Cranial sutures: A brief review. *Plast Reconstr Surg* 2008;121(4):170e-8e. [\[CrossRef\]](#)
3. Boulet SL, Rasmussen SA, Honein MA. A population-based study of craniosynostosis in metropolitan Atlanta, 1989-2003. *Am J Med Genet A* 2008;146A(8):984-91. [\[CrossRef\]](#)
4. Johnson D, Wilkie AO. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 2011;19(4):369-76. [\[CrossRef\]](#)
5. Önal Ç. Çocukta Baş Muayenesi. *TND Pediatrik Nöroflürüji Öğretim ve Eğitim Grubu Bülteni* 2008;(3):15-8.
6. Boyadjiev SA, Consortium IC. Genetic analysis of non-syndromic craniosynostosis. *Orthod Craniofac Res* 2007;10(3):129-37. [\[CrossRef\]](#)
7. Cohen MM, MacLean RE. Craniosynostosis : Diagnosis, evaluation, and management. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2000; 454.
8. Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA. Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol* 2007;14(3):150-61. [\[CrossRef\]](#)
9. Çeltikçi E, Börcek AÖ, Baykaner MK. Kraniyosinostozlar. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2013;23(2):132-7.
10. Twigg SR, Wilkie AO. A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 2015;97(3):359-77. [\[CrossRef\]](#)
11. Levi B, Wan DC, Wong VW, Nelson E, Hyun J, Longaker MT. Cranial Suture Biology: From Pathways to Patient Care. *J J Craniofac Surg* 2012;23(1):13-9. [\[CrossRef\]](#)
12. Slaney SF, Oldridge M, Hurst JA, Moriss-Kay GM, Hall CM, Poole MD, et al. Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 1996;58(5):923-32.
13. Hoefkens MF, Vermeij-Keers C, Vaandrager JM. Crouzon syndrome: Phenotypic signs and symptoms of the postnatally expressed subtype. *J Craniofac Surg* 2004;15(2):233-40;41-2.
14. Kress W, Schropp C, Lieb G, Petersen B, Busse-Ratzka M, Kunz J, et al. Saethre-Chatzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: Functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006;14(1):39-48. [\[CrossRef\]](#)
15. Jabs EW, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, et al. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 1993;75(3):443-50. [\[CrossRef\]](#)
16. Azoury SC, Reddy S, Shukla V, Deng CX. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Mutation Related Syndromic Craniosynostosis. *Int J Biol Sci* 2017;13(12):1479-88. [\[CrossRef\]](#)
17. Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, Mowat D, et al. Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* 2005;76(5):729-49. [\[CrossRef\]](#)
18. Vissers LE, Cox TC, Maga AM, Short KM, Wiradajaja F, Janssen IM, et al. Heterozygous mutations of FREM1 are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. *PLoS Genet* 2011;7(9):e1002278. [\[CrossRef\]](#)
19. Wilkie AO, Byren JC, Hurst JA, Jayamohan J, Johnson D, Knight SJ, et al. Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics* 2010;126(2):e391-400. [\[CrossRef\]](#)
20. Freitas EC, Nascimento SR, de Mello MP, Gil-da-Silva-Lopes VL. Q289P mutation in FGFR2 gene causes Saethre-Chatzen syndrome: some considerations about familial heterogeneity. *Cleft Palate Craniofac J* 2006;43(2):142-7. [\[CrossRef\]](#)
21. Park J, Park OJ, Yoon WJ, Kim HJ, Choi KY, Cho TJ, et al. Functional characterization of a novel FGFR2 mutation, E731K, in craniosynostosis. *J Cell Biochem* 2012;113(2):457-64. [\[CrossRef\]](#)
22. Kelleher FC, O'Sullivan H, Smyth E, McDermott R, Viterbo A. Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease. *Carcinogenesis* 2013;34(10):2198-205. [\[CrossRef\]](#)
23. Guillemot F, Zimmer C. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Neuron* 2011;71(4):574-88. [\[CrossRef\]](#)
24. Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez-Garcia J, Adamo B, Felip E, et al. Genomic aberrations in the FGFR pathway: Opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol* 2014;25(3):552-63. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhang X, Ibrahim OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 2006;281(23):15694-700. [\[CrossRef\]](#)
26. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)* 2011;3(10):920-33. [\[CrossRef\]](#)
27. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahim OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(2):107-37. [\[CrossRef\]](#)
28. Martinez-Abadías N, Heuze Y, Wang Y, Jabs EW, Aldridge K, Richtsmeier JT. FGF/FGFR signaling coordinates skull development by modulating magnitude of morphological integration: evidence from Apert syndrome mouse models. *PLoS One* 2011;6(10):e26425. [\[CrossRef\]](#)
29. Sarah F. Slaney MO, Jane A. Hurst, Gillian M. Morriss-Kay, Christine M. Hall, Michael D. Poole, Andrew O. M. Wilkie. 1996 Slaney, Differential Effects of FGFR2 Mutations on Syndactyly and Cleft Palate in Apert Syndrome. *Am J Hum Genet* 58:923-932, 1996.
30. Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, Korf BR, Lipson MH, Grix AW, et al. Genetic heterogeneity of Saethre-Chatzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Genet* 1998;62(6):1370-80. [\[CrossRef\]](#)
31. Justice CM, Yagnik G, Kim Y, Peter I, Jabs EW, Erazo M, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for nonsyndromic sagittal craniosynostosis near BMP2 and within BBS9. *Nat Genet* 2012;44(12):1360-4. [\[CrossRef\]](#)
32. Twigg SR, Vorgia E, McGowan SJ, Peraki I, Fenwick AL, Sharma VP, et al. Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis. *Nat Genet* 2013;45(3):308-13. [\[CrossRef\]](#)
33. Sharma VP, Fenwick AL, Brockop MS, McGowan SJ, Goos JA, Hoogeboom AJ, et al. Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat Genet* 2013;45(3):304-7. [\[CrossRef\]](#)
34. Lee E, Le T, Zhu Y, Elakis G, Turner A, Lo W, et al. A craniosynostosis massively parallel sequencing panel study in 309 Australian and New Zealand patients: Findings and recommendations. *Genetics In Medicine*, 2017.