

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**FETAL DÖNEMDE KONTRAKTÜRLER İLE
SEYREDEN SENDROMLARIN MOLEKÜLER
ETİYOPATOGENEZİNİN YENİ NESİL DİZİLEME
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Gözde Tutku TURGUT
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Gözde Yeşil SAYIN

İSTANBUL
2022

TEZ ONAYI

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, çalışma dahilinde bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi ve bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Gözde Tutku TURGUT

İTHAF

Darişşafaka Aileme...

TEŞEKKÜR

Araştırmacı kimliği kazanmam yolunda beni her zaman destekleyen, eğitimim süresince bitmek bilmez sorularıma her zaman sabırla cevap veren ve tezimin her aşamasını özenle takip eden sayın hocalarım *Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner, Prof. Dr. Birsen Karaman ve Prof. Dr. Seher Başaran'a*,

Uzmanlık eğitimimin başladığı günden itibaren mesleki yönde beni yetiştiren ve koşulsuz destekleyen, hekimliğini ve akademik kimliğini her zaman örnek alacak olduğum hocam ve ağabeyim sayın *Uzm. Dr. Umut Altunoğlu'na*,

Her zaman yanımda olduklarını hissettiren, tezime olan katkılarının yanı sıra yıllar içerisinde birçok şey öğrendiğim ve birlikte çalışmayı çok özleyeceğim sevgili arkadaşlarım *Yasemin Şengül, Uzm. Dr. Leyli Şentürk, Uzm. Dr. Tuğba Kalaycı ve Doç. Dr. Yeliz Güven'e*,

Tez çalışmam boyunca yardımını esirgemeyen ve tezimi büyük bir özveri ile okuyan danışmanım sayın *Doç. Dr. Gözde Yeşil Sayın'a*,

Eğitimim süresince deneyimlerinden yararlandığım ve tez çalışmam boyunca yardımları için minnettar olduğum sayın *Dr. Çağrı Güleç ve Dr. Güven Toksoy'a*,

İnşa ettiği ekol altında klinik eğitim alma şansına ve meslektaş olma onuruna eriştiğim sayın hocam *Prof. Dr. Hülya Kayserili'ye*,

Tezimi inceliklerle değerlendirilen, önerileri ve katkılarıyla çalışmama değer katan sayın hocam *Prof. Dr. Beyhan Tüysüz'e*,

Dosya araştırmaları sırasında yardımlarını unutmayacağım sevgili *Cemal Koç'a* ve samimi desteklerini hissettiğim tüm laboratuvar ve klinik çalışanlarına,

Son olarak, beni bu günlere getiren, fedakârlığı ve her konudaki desteği ile hayatım boyunca beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili annem Asuman Turgut'a ve bütün aileme,

Sonsuz teşekkürlerimle,
Dr. Gözde Tutku Turgut, 2022

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37765.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
ETİK BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
TABLOLAR LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xv
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Tarihçe	6
2.2. Musküler Sistem Embriyolojisi ve Kas Gelişiminde <i>In-Utero</i> Motor Aktivitenin Rolü	7
2.2.1. Somitogenezis ve Kas Sistemi Elemanlarının Embriyolojik Gelişimi	7
2.2.2. Somit Farklılaşması ve Miyogenezisin Moleküler Mekanizması.....	8
2.2.3. <i>In-Utero</i> Motor Aktivitenin Başlangıcı	9
2.2.4. <i>In-Utero</i> Fetal Hareket Kronolojisi.....	11
2.2.5. Fetal Hareketin Kas-İskelet, Solunum ve Gastrointestinal Sistem Gelişimi ile Karşılıklı Etkileşimi	12
2.3. Çoklu Konjenital Kontraktürler.....	13
2.3.1. Tanım	13
2.3.2. Epidemiyoloji.....	13
2.4. Çoklu Konjenital Kontraktürlerin Sınıflandırılması.....	14
2.4.1. Etiyolojik Sınıflama	14
2.4.1.1. İntrinsik faktörler (Fetal disfonksiyon)	15
2.4.1.1.1. Miyopatik süreçler	15

2.4.1.1.2.	Nöropatik süreçler	17
2.4.1.1.3.	Nöromusküler son plak hastalıkları	18
2.4.1.1.4.	Metabolik hastalıklar	19
2.4.1.1.5.	Bağ dokusu hastalıkları ve iskelet displazileri	19
2.4.1.2.	Ekstrinsik faktörler	21
2.4.1.2.1.	Uterin kaviteyi daraltan durumlar	21
2.4.1.3.	Çevresel faktörler	22
2.4.1.3.1.	Maternal hastalıklar	22
2.4.1.3.2.	Maternal maruziyet.....	22
2.4.1.3.3.	İntrauterin vasküler yetersizlik	23
2.4.2.	Klinik Sınıflama.....	23
2.4.3.	Genetik Sınıflama	26
2.4.4.	Fonksiyonel Sınıflama	27
2.5.	Artrogripozis Fenotiplerinde Prenatal Değerlendirme	28
2.5.1.	Aile öyküsü ve maternal risk faktörlerinin sorgulanması	28
2.5.2.	Prenatal ultrasonografinin artrogripozis fenotiplerini tanımadaki rolü	29
2.5.2.1.	Letalitenin belirlenmesi.....	34
2.5.2.2.	Antenatal US bulguları ve ayırıcı tanı.....	34
2.5.2.2.1.	Primer ekstremitte tutulumu ile seyreden formlar	35
2.5.2.2.2.	Letal formlar	36
2.5.2.2.3.	Bilişsel gerilik ile seyreden fenotipler	36
2.5.3.	Fetal Manyetik Rezonans Görüntüleme (Fetal MRG).....	48
2.5.4.	Prenatal İnvazif Tanı ve Genetik Danışma	49
2.6.	Fetusun Postmortem Değerlendirilmesi	50
2.6.1.	Detaylı aile öyküsü, pre/perinatal dönemin irdelenmesi.....	50
2.6.2.	Postmortem klinik değerlendirme	51
2.6.2.1.	Antropometrik ölçümler	52

2.6.2.2.	Kraniyal ve fasiyal dismorfik değerlendirme.....	52
2.6.2.3.	Gövde ve ekstremitelerin değerlendirilmesi	53
2.6.2.4.	Kordon ve plasentanin değerlendirilmesi.....	54
2.6.2.5.	Fotoğraflama	54
2.6.3.	Radyolojik değerlendirme.....	54
2.6.4.	Postmortem fetal DNA eldesi	55
2.6.5.	Fetal otopsi.....	55
2.7.	MCC ile Seyreden Fenotiplerde Tanıya Yönelik Sistemik Yaklaşım	58
2.7.1.	MCC fenotiplerinin ayırıcı tanısında yardımcı klinik muayene bulguları..	58
2.7.2.	MCC fenotiplerinin ayırıcı tanısında kullanılan paraklinik yöntemler.....	62
2.7.2.1.	Biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi	62
2.7.2.2.	Elektrofizyolojik bulguların değerlendirilmesi	63
2.7.2.3.	Histopatolojik bulguların değerlendirilmesi	64
2.7.2.3.1.	Kas biyopsisi: immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel inceleme	64
2.7.2.3.2.	Periferik yayma incelemesi	64
2.7.2.4.	Miyogörüntüleme – kas MRG	65
2.7.3.	MCC ile seyreden fenotiplerin genetik etiyopatogenezinin araştırılmasında kullanılan yöntemler	66
2.7.3.1.	Sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemler.....	66
2.7.3.2.	Moleküler analiz yöntemleri	69
2.8.	MCC Genetik Etiyopatogenezinin Aydınlatılmasında YND Teknolojileri ile Yürütülen Güncel Çalışmalar	73
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	75
3.1.	Klinik Değerlendirmeler	75
3.2.	Moleküler Yöntemler	75
3.2.1.	DNA izolasyonu	75
3.2.2.	DNA kalitesinin değerlendirilmesi	76
3.2.3.	Tüm Ekzom Dizileme	76

3.2.3.1. Islak laboratuvar çalışmaları	77
3.2.3.2. Ekzom verilerinin biyoinformatik analizi	82
3.2.3.3. Varyantların sınıflandırılması	83
3.2.3.4. Varyantların adlandırılması.....	86
3.2.4. YND ile Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme ile Doğrulanması.....	86
3.2.4.1. Primerlerin tasarlanması.....	86
3.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	88
3.2.4.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması	89
3.2.4.3.1. Spin kolon yöntemi ile saflaştırma	89
3.2.4.3.2. Enzimatik yöntem ile saflaştırma	89
3.2.4.4. Dizi PZR reaksiyonu	90
3.2.4.5. Dizi PZR reaksiyonu ürünlerinin saflaştırılması.....	90
3.2.4.6. Elektroforez cihazına yükleme.....	90
3.2.4.7. Dizileme sonuçlarının değerlendirilmesi	90
3.2.5. Periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Kantitatif RT-PZR analizleri	91
3.2.5.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	91
3.2.5.2. cDNA'ların polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmesi	92
3.2.5.3. Gen ifadelerinin kantitatif RT-PZR ile incelenmesi	92
3.2.6. Protein domain yapılarının şematik gösterimi	92
3.2.7. Protein modelleme	93
4. BULGULAR.....	94
4.1. Demografik Veriler.....	94
4.2. Antenatal US Bulguları	94
4.3. İnvazif Girişimler	97
4.4. Postmortem Fetal Değerlendirme ve Fetal Otopsi	97
4.5. Moleküler Bulgular.....	99

4.6. Olgular	102
4.6.1. Aile MCC #1.....	102
4.6.2. Aile MCC #2.....	107
4.6.3. Aile MCC #3.....	111
4.6.4. Aile MCC #4.....	115
4.6.5. Aile MCC #5.....	117
4.6.6. Aile MCC #6.....	124
4.6.7. Aile MCC #7.....	131
4.6.8. Aile MCC #8.....	138
4.6.9. Aile MCC #9.....	141
4.6.10. Aile MCC #10.....	146
4.6.11. Aile MCC #11.....	148
5. TARTIŞMA	157
6. SONUÇLAR	192
KAYNAKLAR	195
EKLER.....	217
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Miyopatik kökenli artrogripozise neden olan hastalıklar, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri	16
Tablo 2-2: Nöropatik kökenli artrogripozise neden olan hastalıklar, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri	17
Tablo 2-3: MCC ile seyredabilen NMK hastalıkları, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri	18
Tablo 2-4: MCC ile seyredabilen metabolik hastalıklar, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri.....	19
Tablo 2-5: MCC ile seyreden bağ doku hastalıkları, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri	20
Tablo 2-6: MCC ile seyreden iskelet displazileri, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri	21
Tablo 2-7: Sıklıkla sadece üst veya alt ekstremitte tutulumu ile seyreden artrogripozis formları	24
Tablo 2-8: Distal artrogripozis sendromlarının Hall ve Bamshad sınıflaması, antitelerin genel özellikleri ve ilişkili genler.....	25
Tablo 2-9: Çoklu konjenital kontraktür fenotiplerinde izlenebilecek prenatal US bulguları...	31
Tablo 2-10: Sık görülen MCC fenotiplerinde antenatal US bulguları	37
Tablo 2-11: Çoklu konjenital kontraktür fenotiplerinde olası fetal MRG bulguları	48
Tablo 2-12: MCC bulguları olan gebelik ürününe yaklaşım kapsamında sorgulanması gereken durumlar	51
Tablo 2-13: Kontraktürler ile seyreden bir grup antitenin kardinal histopatolojik bulguları ...	56
Tablo 2-14: Kas histopatolojisi bulgularına göre olası ilişkili genler	58
Tablo 2-15: MCC bulguları olan olgularda fizik muayene ile saptanabilecek anomaliler ve ayırıcı tanı.....	59
Tablo 2-16: MCC bulguları olan olgularda saptanan sistemik anomaliler ve ayırıcı tanı	61
Tablo 2-17: Konjenital kontraktürler ile seyredabilen kromozom anomalileri.....	67
Tablo 2-18: Dizileme tekniklerinin karşılaştırılması	71
Tablo 2-19: Yeni Nesil Dizileme platformlarının genel özellikleri	72
Tablo 3-1: Proje kapsamında gerçekleştirilen TED çalışmalarının özellikleri	76
Tablo 3-2: Hedef gDNA bölgelerinin çoğaltılması amacıyla hazırlanan karışım.....	77
Tablo 3-3: Hedef bölgelerin amplifikasyonu için termal döngü programı	78
Tablo 3-4: Amplikonların kesimi için kullanılan termal döngü programı	78
Tablo 3-5: Barkod – adaptör karışımında kullanılan malzemeler ve hacimleri.....	79

Tablo 3-6: Barkod – adaptör ligasyon karışımı bileşenleri ve hacimleri	79
Tablo 3-7: Ligasyon aşamasında uygulanan termal döngü programı	80
Tablo 3-8: Kütüphane amplifikasyonu için uygulanan PZR protokolü	80
Tablo 3-9: Varyant Puanlama Tablosu.....	83
Tablo 3-10: Patojenik olduğu öne sürülen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler	84
Tablo 3-11: Zararsız olduğu öne sürülen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler	85
Tablo 3-12: Çalışmamız kapsamında tasarlanan primer çiftleri, ampikon boyları ve Tm değerleri.....	87
Tablo 3-13: Çalışmamız kapsamında tasarlanan allele özgü primer çiftleri, ampikon boyları ve Tm değerleri	88
Tablo 3-14: PZR döngüsel koşulları	88
Tablo 3-15: cDNA sentez protokolü	91
Tablo 3-16: c.USP14 için tasarlanan primer çiftleri ve beklenen ürün boyları.....	92
Tablo 4-1: Çalışma grubumuzda saptanan patolojik US bulgularının dağılımı	95
Tablo 4-2: Çalışma grubumuzda saptanan patolojik US bulguları	96
Tablo 4-3: Prenatal invazif girişimlerin uygulanan yönteme göre dağılımı	97
Tablo 4-4: Postmortem fetal muayenede saptanan muskuloskeletal bulgular	98
Tablo 4-5: TED analizi ile saptanan varyantlar ve ilişkili fenotipler	100
Tablo 4-6: Saptanan varyantların primer etyolojik açıdan sınıflandırılması.....	102
Tablo 4-7: Saptanan varyantların genel etyolojiye göre sınıflandırılması	102
Tablo 4-8: MCC #1 ailesinde saptanan HSPG2 varyantına ait bilgiler	106
Tablo 4-9: MCC #2 ailesinde saptanan COG6 varyantına ait bilgiler	111
Tablo 4-10: MCC #3 ailesinde saptanan DOK7 varyantına ait bilgiler	115
Tablo 4-11: MCC #5 ailesinde saptanan RAPSN varyantlarına ait bilgiler.....	123
Tablo 4-12: MCC #6 ailesinde saptanan KIAA1109 varyantına ait bilgiler.....	129
Tablo 4-13: MCC #6 ailesinde saptanan USH2A varyantına ait bilgiler.....	131
Tablo 4-14: MCC #7 ailesinde saptanan NEB ve DNAH9 varyantlarına ait bilgiler	134
Tablo 4-15: MCC #8 ailesinde saptanan NEB varyantına ait bilgiler.....	141
Tablo 4-16: MCC #9 ailesinde saptanan PSAT1 ve VPS13B varyantlarına ait bilgiler.....	145
Tablo 4-17: MCC #11 ailesinde etkilenmiş olguların karşılaştırmalı prenatal US verileri ...	150
Tablo 4-18: MCC #11 ailesinde saptanan USP14 varyantlarına ait bilgiler	155
Tablo 5-1: Multipl pterijyum ile seyreden sendromlar	171

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Edebiyat, sanat tarihi ve tıbbi literatürde çoklu konjenital kontraktür tablosuna yönelik ilk kaynaklar	7
Şekil 2-2: Somitlerin gelişim evreleri	8
Şekil 2-3: Somit farklılaşmasının moleküler regülasyonu	9
Şekil 2-4: Civeiv embriyosunda 48 saat kürar infüzyonunu (0.1mg/sa) takiben gelişen kas-iskelet fenotipi	10
Şekil 2-5: Gestasyon haftasına göre fetal hareket kronolojisi	12
Şekil 2-6: Çoklu konjenital kontraktürlerin etiyolojik sınıflandırılması	15
Şekil 2-7: Çoklu Konjenital Kontraktürlerin sonografik tanı algoritması	33
Şekil 4-1: MCC #1 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	103
Şekil 4-2: MCC #1 – V:2'nin klinik ve radyolojik muayene bulguları	104
Şekil 4-3: MCC #1 ailesine ait moleküler analiz sonuçları	105
Şekil 4-4: HSPG2 tarafından kodlanan perlekan proteininin domainleri	106
Şekil 4-5: p.(T4118M) değişiminin perlekan proteini üzerindeki tahmini etkisi	106
Şekil 4-6: MCC #2 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	107
Şekil 4-7: MCC #2 – V:2'ye ait ikinci trimester US görüntüleri	108
Şekil 4-8: MCC #2 – V:2'nin klinik muayene bulguları	109
Şekil 4-9: MCC #2 ailesine ait moleküler analiz sonuçları	110
Şekil 4-10: COG6 proteinine ait domainler	110
Şekil 4-11: MCC #3 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	112
Şekil 4-12: MCC #3 – IV:2'nin klinik ve radyolojik muayene bulguları	113
Şekil 4-13: MCC #3 ailesine ait moleküler analiz sonuçları	114
Şekil 4-14: DOK7 proteinine ait domainler	114
Şekil 4-15: MCC #4 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	116
Şekil 4-16: MCC #4 – III:3'e ait klinik ve radyolojik muayene bulguları	117
Şekil 4-17: MCC #5 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	118
Şekil 4-18: MCC #5 – IV:2 ve IV:3'e ait fizik muayene bulguları	120
Şekil 4-19: MCC #5 ailesine ait moleküler analiz sonuçları	121
Şekil 4-20: MCC #5 – IV:2'ye ait allel-spesifik PZR sonuçları	122
Şekil 4-21: RAPSYN proteinine ait domainler	122
Şekil 4-22: p.(V45M) değişiminin RAPSYN proteini üzerindeki tahmini etkisi	123
Şekil 4-23: p.(V165M) değişiminin RAPSYN proteini üzerindeki tahmini etkisi	124

Şekil 4-24: MCC #6 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	125
Şekil 4-25: MCC #6 – IV:4’e ait ikinci trimester US görüntüleri.....	126
Şekil 4-26: MCC #6 – IV:3 ve IV:4’e ait fizik muayene bulguları	127
Şekil 4-27: Aile MCC #6’ya ait moleküler analiz sonuçları	128
Şekil 4-28: KIAA1109 proteinine ait domainler	129
Şekil 4-29: p.(A4245T) değişiminin KIAA1109 proteini üzerindeki tahmini etkisi	129
Şekil 4-30: MCC #6 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 2	130
Şekil 4-31: MCC #7 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	132
Şekil 4-32: MCC #7 – III:2’ye ait fizik muayene bulguları.....	133
Şekil 4-33: Nebulin proteinine ait domainler	134
Şekil 4-34: DNAH9 proteinine ait domainler	134
Şekil 4-35: MCC #7 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 1	135
Şekil 4-36: MCC #7 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 2	136
Şekil 4-37: p.(A4971T) değişiminin nebulin proteini üzerindeki tahmini etkisi	137
Şekil 4-38: MCC #8 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	138
Şekil 4-39: MCC #8 – V:5’e ait fizik muayene bulguları.....	139
Şekil 4-40: MCC #8 ailesine ait moleküler analiz sonuçları.....	140
Şekil 4-41: c.22041_22045delAGAAA varyantının nebulin proteini üzerindeki yerleşimi..	141
Şekil 4-42: MCC #9 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	142
Şekil 4-43: MCC #9 – IV:1’e ait fizik muayene bulguları	143
Şekil 4-44: MCC #9 ailesine ait moleküler analiz sonuçları.....	144
Şekil 4-45: Fosfoserin aminotransferaz proteininin domain yapısı	145
Şekil 4-46: VPS13B proteinine ait domainler	145
Şekil 4-47: p.(S247T) değişiminin PSAT1 proteini üzerindeki tahmini etkisi	146
Şekil 4-48: MCC #10 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	147
Şekil 4-49: MCC #10 – IV:3’e ait klinik ve radyolojik muayene bulguları	148
Şekil 4-50: MCC #11 ailesine ait aile ağacı görüntüsü	149
Şekil 4-51: MCC #11 – VI:10’a ait ikinci trimester US görüntüleri	150
Şekil 4-52: MCC #11 – VI:3, VI:4 ve VI:10’a ait klinik muayene bulguları	152
Şekil 4-53: MCC #11 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 1.....	153
Şekil 4-54: MCC #11 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 2.....	154
Şekil 4-55: USP14 proteinine ait domainler	155
Şekil 4-56: Kontrol ve taşıyıcı bireyde USP14 mRNA ifade düzeyinin analizi	156

Şekil 5-1: MCC ilişkili genlerin kodladığı bir grup proteinin nöromusküler kavşak ve kas lifi üzerindeki yerleşimleri	161
Şekil 5-2: Serin biyosentez yolağı.....	184



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

3C: Kraniyoserebellokardiyak displazi (Ritscher–Schinzel sendromu)

5,10-MTHF: 5,10-Metilentetrahidrofolat

aa: Aminoasit

AAV: Adeno-ilişkili virüs

AchR: Asetilkolin reseptörü

ACMG: *The American College of Medical Genetics and Genomics*

ACS: Akrokallozal sendrom

AGS: Aicardi–Goutières sendromu

AKS: Alkuraya-Kucinskas sendromu

AMC: Artrogripozis multipleks konjenita

AMV: Amniyotik sıvı indeksi

AP: Anteroposterior

ARC: Artrogripozis-renal disfonksiyon ve kolestaz sendromu

ASD: Atriyal septal defekt

BA: *Benign alone*

BAT: Büyük arter transpozisyonu

BGG: Büyüme gelişme geriliği

BOR: Brankiyootorenal sendrom

BP: *Benign supporting*

BPES: Blefarofimozis–pitozis–epikantus inversus

BS: *Benign strong*

CCA: Korpus kallozum agenezisi

CCD: Santral kor hastalığı

CCH: Korpus kallozum hipoplazisi

CDG: Konjenital glikozilasyon defekti

cDNA: Komplementer DNA

CGH: Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon

CK: Kreatin fosfokinaz

CMA: Kromozomal mikroyarray

CMD: Konjenital musküler distrofi

CNM: Sentronükleer miyopati

CNV: Kopya sayısı değışikliğı

COD-MD: Serebrooküler displazi – musküler distrofi sendromu

COFS: Serebrookülofasiyoskeletal sendrom (Pena-Shokeir tip II)

COG kompleksi: Korunmuş oligomerik Golgi kompleksi

D: *Damaging/Deleterious*

DA: Distal artrogripozis

DC: *Disease causing*

DDSH: Dissegmental displazi, Silverman-Handmaker tipi

DIP: Distal interfalangeal

DM1: Myotonik distrofi 1

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dNTP: Deoksinükleotid

DORV: Çift çıkışlı sağ ventrikül

DUB: Deubikitine edici enzim

DWM: Dandy-Walker malformasyonu

EEG: Elektroensefalografi

EM: Elektron mikroskopisi

EMG: Elektromiyografi

ER: Endoplazmik retikulum

ExAC: *Exome Aggregation Consortium*

FADS: Fetal akinezi deformasyon sekansı

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

FSS: Freeman–Sheldon sendromu

GGG: Global gelişme geriliği

GH: Gebelik haftası

GSD: Glikojen depo hastalığı

H&E: Hematoksilen & Eozin

HARD: Hidrosefali – agiri – retinal displazi

HGMD: *Human Gene Mutation Database*

HSF: *Human Splicing Finder*

IGV: *Integrative Genomics Viewer*

ISUOG: *International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*

IUGG: Intrauterin gelişme geriliği

IUMF: *In utero mort fetalis*

KKH: Konjenital kalp hastalığı

KMP: Kardiyomiyopati

KMS: Konjenital myastenik sendrom

KMS: Konjenital myastenik sendrom

KPK: Koroid pleksus kisti

kDA: Kilodalton

kV: Kilovolt

LCCS: Letal konjenital kontraktür sendromu

LGMD: Limb-Girdle Musküler Distrofi

LMPS: Letal multipl pterijiyum sendromu

MAF: Minimum allel frekansı

MCC: Çoklu konjenital kontraktürler

MCM: Mega sisterna magna

MCP: Metakarpofalangeal

MEB: Muscle-eye-brain hastalığı

MKA: Multipl konjenital anomali

MLPA: *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

mRNA: *Messenger RNA*

MT: MutationTaster

MWS: Marden Walker sendromu

NLS: Neu-Laxova sendromu

NMD: *Nonsense mediated decay*

NMDA: N-metil-D-aspartat

NMK: Nöromusküler kavşak

NTD: Nöral tüp defekti

OD: Otozomal dominant

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

OR: Otozomal resesif

PAS: Periodik asit Schiff

PDA: Patent duktus arteriyozus

PEHO: Progresif ensefalopati – ödem – hipsiaritmi – optik atrofi sendromu

PERK: Protein kinaz R-benzeri ER kinaz

PEV: Pes ekinovarus

PHGDH: 3-fosfoglisarat dehidrojenaz

PIP: Proksimal interfalangeal

pLI: *the probability of being loss-of-function intolerant*

PLVCS: Persistan sol vena kava superior

PM: *Pathogenic moderate*

PP: *Pathogenic supporting*

PR: Psödootozomal resesif

PS: *Pathogenic strong*

PSAT: Fosfoferin aminotransferaz

PSD: Primer siliyer diskinezi

PSPH: Fosfoferin fosfataz

PVS: *Pathogenic very strong*

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

RT-qPZR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SJS: Schwartz-Jampel sendromu

SMA: Spinal musküler atrofi

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

SSS: Santral sinir sistemi

T: *Tolerated*

TCD: Transvers serebellar ap

TED: Tüm ekzom dizileme

TGD: Tüm genom dizileme

THF: Tetrahidrofolat

TUA: Tek umbilikal arter

U/L: st segment/alt segment

UCSC: *The University of California Santa Cruz*

UPD: Uniparental dizomi

UPS: Ubikitin-Proteazom sistemi

US: Ultrasonografi

VM: Ventrikülomegali

VSD: Ventriküler septal defekt

VUS: nemli bilinmeyen varyant

WWS: Walker-Warburg sendromu

XL: X'e bağlı kalıtım

YDD: Yarık damak dudak

YND: Yeni nesil dizileme

ÖZET

Fetal Dönemde Kontraktürler ile Seyreden Sendromların Moleküler Etiyopatogenezinin Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri ile Araştırılması

Çoklu konjenital kontraktürler (*multiple congenital contractures*, MCC); diğer adıyla Artrogripozis multipleks konjenita, iki veya daha fazla vücut bölgesinde bulunan konjenital kontraktürleri niteleyen fenotipik bir tanımlamadır. Tüm ekzom dizileme (TED), bu tip genetik ve fenotipik heterojenite gösteren hastalık gruplarının moleküler etiyojisinin aydınlatılmasında etkin bir yaklaşım haline gelmiştir. Araştırmamızda, letal MCC spektrumunda değerlendirilen olgularda tüm ekzom dizileme (TED) ile moleküler etiyojinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamıza 11 aileden 15 etkilenmiş fetus dahil edildi. Array-CGH analizi normal sonuçlanmış 11 indeks olguda TED analizi yapıldı. Bütün varyantlar Sanger sekanslama ile doğrulandıktan sonra ailevi segregasyon analizleri gerçekleştirildi. Sekiz ailede *COG6*, *NEB*, *RAPSN*, *KIAA1109*, *DOK7*, *HSPG2* ve *PSAT1* genlerinde bilinen veya *novel* nitelikte patojenik/olası patojenik varyantlar saptandı. Etiyopatogenezin aydınlatıldığı üç olguda biallelik *VPS13B*, *DNAH9* ve *USH2A* değişimlerinin saptanması ile olguların ikinci bir tek gen hastalığından etkilendiği gösterildi. Ayrıca, aynı aileden üç benzer etkilenmiş fetusta *USP14* geninde çerçeve kaymasına neden olan homozigot bir varyant saptandı. Olgulardaki fenotipin literatürdeki *Usp14*-mutant fare modelleri ile benzerliği ve çalışmamız kapsamında yapılan RT-qPCR deneyleri, saptadığımız varyantın yeni bir MCC fenotipi ile ilişkisini güçlü bir şekilde destekledi. Böylelikle TED analizi ile kohortun %81,8'inde moleküler etiyoji belirlenmiş oldu.

Çalışmamız, tamamı fetal olgulardan oluşan ilk MCC kohort çalışmasıdır. Elde edilen veriler ile; letal MCC fenotiplerinde klinik ve moleküler spektrum genişletilmiş, genotip-fenotip korelasyonuna katkıda bulunulmuş ve *USP14*-ilişkili ilk insan fenotipi tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çoklu konjenital kontraktürler, prenatal tanı, postmortem muayene

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37765

ABSTRACT

Investigation of Molecular Etiopathogenesis of Syndromes with Contractures in Fetal Period by Next Generation Sequencing Methods

Multiple congenital contractures (MCC), alternatively referred to as arthrogryposis multiplex congenita, is a phenotypic descriptor implying congenital contractures in two or more body areas. Whole exome sequencing (WES) provides an effective approach for elucidating the molecular basis, considering the presence of genetic and phenotypic heterogeneity. We aimed to identify the molecular etiology in fetuses within the lethal MCC spectrum, using WES.

15 patients from 11 families displaying MCC were enrolled. WES analysis was performed in 11 index cases that had normal array-CGH results. Sanger sequencing was performed for validation and segregation of the variants. Eight families were shown to harbor known or novel candidate variants in *COG6*, *NEB*, *RAPSN*, *KIAA1109*, *DOK7*, *HSPG2*, and *PSAT1*. Three patients manifested with blended phenotypes, harboring additional biallelic variants in *VPS13B*, *DNAH9*, and *USH2A*. Moreover, we identified a frameshift variant in *USP14* in three similarly affected fetuses. The resemblance of the fetal findings to the previously reported *Uspl4*^{-/-} mouse models and RT-qPCR performed in our study supported that the variant likely led to a novel human MCC phenotype. Overall, molecular etiology was determined in 81.8% of the cohort using WES analysis.

This is the first MCC cohort study conducted entirely on fetuses. Our results provide new insights into the clinical and molecular spectrum of lethal MCC phenotypes, expand the genotype-phenotype correlations, and present the first human phenotype that appears to be attributable to a truncating variant in *USP14*.

Key Words: Multiple congenital contractures, prenatal diagnosis, postmortem examination

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project ID: 37765

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Artrogripozis multipleks konjenita (AMC), diğer adıyla çoklu konjenital kontraktürler (*multiple congenital contractures*, MCC); intrauterin başlangıçlı, iki veya daha fazla eklemden ilerleyici olmayan hareket kısıtlılığı ile karakterizedir. Sıklığı yaklaşık 3000 ila 5000 canlı doğumda 1 olarak bildirilen bu klinik tablonun, intrauterin insidansının gözlemsel olarak yüksek olduğu bildirilmekte ve bu fark MCC bulgularının eşlik ettiği bir grup sendromik antitenin letal seyretmesi ile açıklanmaktadır (1, 2).

Bütün MCC formları, kaskadı başlatan faktörden bağımsız olarak fetal hareket azlığına (fetal akinezi) sekonder ortaya çıkmaktadır. Fetusta eklemlerin gelişimi yaklaşık 5,5 haftada başlar, 7. haftaya kadar eklem boşlukları oluşur ve 8. haftadan itibaren hareket mümkün hale gelir (3). Bu haftadan itibaren embriyolojik gelişimin devamı fetal hareketlerin varlığı ile sürdürülür. Çoğu MCC formunda embriyogenez sırasında eklem gelişimi normaldir. Sürecin herhangi bir anında gelişen fetal immobilizasyon, morfolojik ve fonksiyonel olarak normal olan eklemlerin çevresinde bağ doku birikimi ve tendon elastisitesi kaybına neden olarak, hareket kabiliyetinin daha da sınırlandırılmasına yol açar. Bu süreç, literatürde “fetal akinezi deformasyon sekansı” olarak adlandırılan, konjenital kontraktürlerin de dahil olduğu bir dizi deformasyon ile sonuçlanmaktadır (4, 5). Kontraktürlerin şiddeti, fetal akinezinin başlangıç zamanı ile ilişkilidir, yani fetal immobilité ne kadar erken başlar ve ne kadar uzun süre devam ederse kontraktürlerin o kadar şiddetli olması beklenmektedir. Nörojenik faktörler (motor nöron hastalıkları, periferik sinir tutulumu, nöromusküler kas hastalıkları vb.), miyojenik faktörler (musküler distrofiler, mitokondriyal hastalıklar), eklem tutulumu ile seyreden iskelet displazileri (diastrofik displazi vb.), intrauterin hacmi daraltan durumlar (uterusun anatomik anomalileri, uterin tümörler, çoğul gebelikler, vb.), maternal hastalıklar (myastenia gravis, myotonik distrofi, diabetes mellitus, intrauterin viral enfeksiyonlar) ve ilaç kullanımı (antiepileptik ilaçlar vb.) gibi etmenler fetal akineziye neden olarak intrauterin başlangıçlı kontraktürlerin etiyolojisinde yer almaktadır (6-8).

Artrogripozis formlarının genetik etiyopatogenezinde; kromozom anomalileri, submikroskobik delesyon/duplikasyon sendromları ve mitokondriyal hastalıkların yanı sıra, otozomal dominant (OD), otozomal resesif (OR) veya X'e bağlı (XL) kalıtım paterni gösteren 400'den fazla tek gen hastalığının ilişkisi gösterilmiştir (7). Bununla birlikte; günümüzde kromozom analizi, kromozomal mikroyarray (CMA) ve tüm ekzom dizileme (TED) yöntemleri kombine kullanıldığında dahi olguların önemli bir kısmında genetik

etioloji halen aydınlatılamamaktadır (9-11). Bu durum, artrogripozis ile seyreden; ancak henüz ilişkisi gösterilememiş aday genlerin varlığına işaret etmektedir. MCC fenotipi ile ilişkili olduğu bilinen gen sayısının fazla olması ve henüz tanımlanmamış aday genlerin varlığı göz önüne alındığında, tanı sürecinde TED uygulamalarının en akılcı yaklaşım olacağı ve ilişkili yeni genlerin tanımlanmasına da önemli katkı sağlayacağı bildirilmektedir (11, 12).

Son yıllarda çoklu eklem kontraktürleri olan olgularda moleküler çalışmalar yoğunlaşmış ve özellikle TED teknolojilerinin kullanımı aday genlerin genotip-fenotip korelasyonuna belirgin katkı sağlamıştır (9, 13, 14). 2019 yılı itibarıyla MCC kliniği ile ilişkilendirilen 402 adet genin 82'si son üç yıl içerisinde yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri kullanılarak tanımlanmıştır (15). TED uygulamaları ile çoklu eklem kontraktürlerindeki tanı oranları %47 ila %73 arasında bildirilmiş ve literatürde benzer çalışmaların artış göstermesine paralel olarak ilişkili gen sayısı ve tanı oranları belirgin olarak yükselmiştir (9, 13, 14). 2021 yılında yayınlanan çok merkezli bir MCC kohortunda tanı yüzdesi %52,7 olarak saptanmış olup kesin tanı alan olguların %21'inde ilişkili genlerin son altı yıl içerisinde tanımlandığı vurgulanmıştır (9). Bu çalışmada, olgularda öncelikle klinik ekzom dizileme (klinik etkisi bilinen genlerin analizi) gerçekleştirilmiş ve tanı konulamayan olgular için TED analizi planlanmıştır. Bu iki yaklaşımın tanıya yönelik başarı oranlarında anlamlı fark saptanması nedeniyle, literatürde bu grupta TED analizinin tercih edilmesi önerilmektedir (9, 12).

Büyük kohortlarda yapılan araştırmalarda, olgu grubunun büyük bir kısmını postnatal olguların oluşturduğu dikkat çekmektedir (9, 13, 14). Çoklu eklem kontraktürlerine sahip fetusların 24. gebelik haftasına (GH) kadar sadece %25'inin rutin ultrasonografi (US) ile tanınabildiği bildirilmektedir (16). US'nin sınırlı etkinliği göz önüne alındığında ve genetik etiolojinin belirlenmesinin prenatal genetik danışma sürecine katkısı düşünüldüğünde, fetal kohortlarda yürütülen çalışmaların önemi anlaşılmaktadır. Fetal olgularda araştırma yürüten merkezlerin sayıca az olması ve literatürde bu yöndeki çalışmaların sınırlı olması nedeniyle, özellikle letal seyreden antitelerin moleküler etiopatogenezinin aydınlatılmasına yönelik araştırmaların bilimsel katkısının yüksek olması beklenmektedir.

Kontraktürler ile seyreden sendromların genetik ve fenotipik heterojenitesi kesin tanıyı güçleştirmekte; ancak, moleküler etiopatogenezin aydınlatılmasında TED analizlerinin özellikle ekzonik mutasyonların saptanmasındaki önemli etkinliği bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında kromozom anomalileri ve submikroskopik delesyon/duplikasyon sendromları dışlanmış, prenatal US ve postmortem fizik muayene ile çoklu eklem kontraktürleri saptanan

fetal olgularda moleküler genetik etiyolojinin TED analizi ile araştırılması ve nadir fenotiplerin genotip-fenotip ilişkisine katkı sağlanması amaçlanmıştır. Kesin tanıya ulaşılabilen olgularda özgün genetik danışma verilebilecek ve hastalığa özgü tedavi seçenekleri belirlenebilecektir. Ayrıca elde edilecek bilimsel veriler Türkiye’den prenatal dönemde tanı alan ilk seri çalışması olacağından literatüre önemli bir katkı sağlaması beklenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Çoklu konjenital kontraktürler ile seyreden antitelere ilişkin klinik bulgular, tıbbi literatürde ilk kez 1841 yılında, bir anatomist olan Adolph Wilhelm Otto tarafından skolyozu ve dört ekstremitede kontraktürleri olan 7-8 aylık bir dişi fetusta tanımlanmıştır (17). Yıllar içerisinde, benzer bulguları olan olguları tanımlamak için literatürde çeşitli isimlendirmeler kullanılmıştır. Otto, fetal olguyu “Konjenital myodistrofi” olarak isimlendirmiş; 1898 yılında Schantz “Multipl konjenital kontraktürler” terimini kullanmıştır (6). Yunanca kökenli “Artrogripozis” (“*arthron*” – eklem, “*gryposis*” – eğrilik; “eğri ve kanca eklemler”) terimi ilk kez 1905 yılında Rosenkranz tarafından, “Artrogripozis multipleks konjenita” terimi ise ilk kez 1923 yılında bir ortopedist olan Dr. Walter G. Stern tarafından kullanılmıştır (6). Sheldon, 1932 yılında, çoklu eklem kontraktürleri olan bir çocuk olguyu tarif etmek amacıyla “Amyoplazi konjenita” tabirini literatüre katmıştır (18). Günümüzde “Multipl konjenital kontraktürler” (MCC) ve Artrogripozis Multipleks Konjenita (AMC) ifadeleri literatürde sıklıkla ve eşit oranlarda kullanılmaktadır.

MCC’ye dair ilk bilimsel veriler, 1930-1950 yılları arasında özellikle ortopedik derlemelerde karşımıza çıkmaktadır. 1950-1960 yılları arasında ise bu tablonun çeşitli sendromik antitelere eşlik ettiğine dair literatür verileri ortaya konmuş, ilerleyen dekadlarda etiopatogeneze yönelik araştırmalar yoğunlaşmıştır (19-21). Daha sonra Judith Hall, MCC bulguları olan olgularda klinik muayene, genetik değerlendirme ve tanı algoritmalarını tanımlamıştır (22, 23).

Öte yandan, edebi literatürde MCC tablosuna dair kaynaklar 12. yüzyıla (1156) dayanmaktadır. Bir rahip olan Thomas of Monmouth tarafından yazılmış Latince bir metinde MCC bulguları tanımlanan bir olgudan bahsedilmiştir (24). *The life and Miracles of St. William of Norwich* isimli bu eserde, doğumdan itibaren el ve ayaklarında kontraktürleri ve tortikollisi olan sekiz yaşında bir kız çocuğu betimlenmiştir. Metinde tanımlanan “çocuğun yemek yiyebilmesi için oturması gerektiği” ibaresinin ekstansiyon/fleksiyon deformiteleri veya MCC dahilinde sık gözlenen eklem dislokasyonlarına; olgunun “güçsüz” (*weak*) olduğu ifadesinin hipotoni varlığına ve miyopatik etiyolojiye işaret ediyor olabileceği düşünülmektedir. Sanat tarihine göz gezdirildiğinde, 1642 yılında Jusepe de Ribera’nın MCC bulguları olan bir çocuğu tasvir ettiği “*The clubfoot*” isimli eseri konuya ilişkin en eski somut kaynaklardan biridir (25). Resmedilmiş olgunun kontraktür paterni (dirsek ekstansiyonu, el

postürü, pes ekinovarus (PEV)) ve glabellar nevus flammeus varlığı, olgunun Amyoplazi tablosu ile uyumlu olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Edebiyat, sanat tarihi ve tıbbi literatürde çoklu konjenital kontraktür tablosuna yönelik ilk kaynaklar

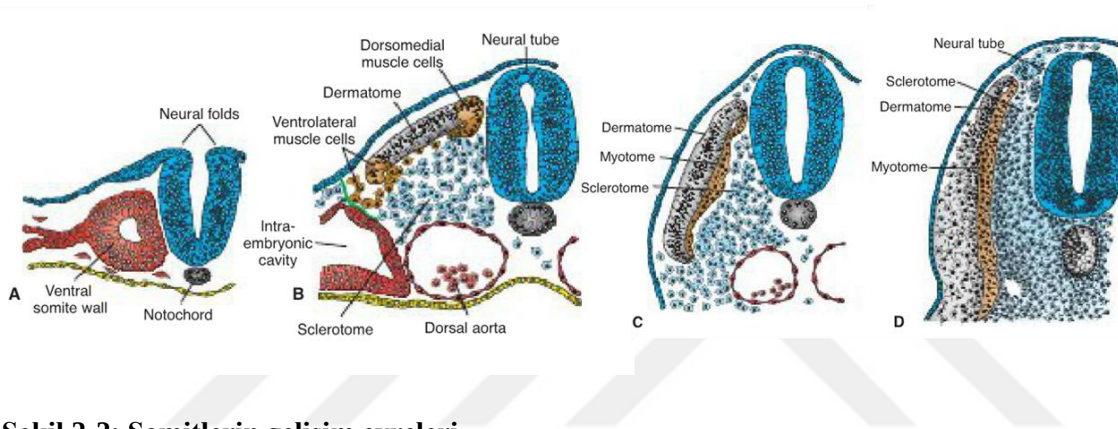
(A) 1156 yılında Thomas of Monmouth tarafından kaleme alınan “*The Life and Miracles of St. William of Norwich*” adlı kitabın 2015 baskısı, (B) Jusepe de Ribera’nın 1642 yılında çizdiği ve günümüzde Louvre müzesinde sergilenen *The Clubfoot* isimli yağlı boya çalışması, (C) A.W. Otto’nun “*Monstrorum sexcentorum descriptio anatomica*” (1861) kitabında yer alan, tıbbi literatürdeki ilk artrogripozis illüstrasyonu (26).

2.2. Musküler Sistem Embriyolojisi ve Kas Gelişiminde *In-Utero* Motor Aktivitenin Rolü

2.2.1. Somitogenezis ve Kas Sistemi Elemanlarının Embriyolojik Gelişimi

Fertilizasyonun yaklaşık 17. gününde, başlangıçta orta hattın her iki yanında gevşek ve ince bir doku tabakası oluşturan mezodermal germ tabakası hücreleri, nöral tüpün iki yanında proliferasyon olarak daha kalın bir yapı olan paraaksiyel mezoderm plağını oluşturur. Bu plak, 3. haftanın başından 5. haftanın sonuna kadar toplam 42-44 çift somit oluşturacak şekilde, kraniyalden kaudale doğru hücre bloklarına farklılaşmaya başlar. Dördüncü haftanın başında somitlerin ventral ve medialindeki hücreler, daha sonra vertebra ve kostaları oluşturacak olan sklerotom tabakasını; dorsaldeki epitelyal hücre topluluğu ise iskelet kası prokürsörlerini içeren dermatomiyotom tabakasını oluşturur (Şekil 2-2). Ventrolateral hücrelerin bir kısmı

lateral plak mezodermine ilerleyerek abdominal duvar ve iskelet kaslarını oluştururken, diğer miyotom hücreleri sırt, omuz kavşağı ve interkostal kasları oluşturmak üzere kalıcı lokalizasyonlarına doğru hareket eder. Farklılaşma sırasında, miyoblast adı verilen bu öncül hücreler uzayarak iğ şeklini alır ve birbirleriyle kaynaşarak uzun ve çok çekirdekli kas liflerini oluştururlar. Üçüncü ayın sonunda iskelet kasları için tipik olan çapraz çizgilenmeler gözlenmeye başlar (27). Her bir somitin anterior ve posterior sınırındaki sklerotom hücrelerinden ise tendon progenitor hücreleri gelişir. Tendon gelişimi de bir transkripsiyon faktörü olan SCX (Scleraxis) tarafından düzenlenir (28).



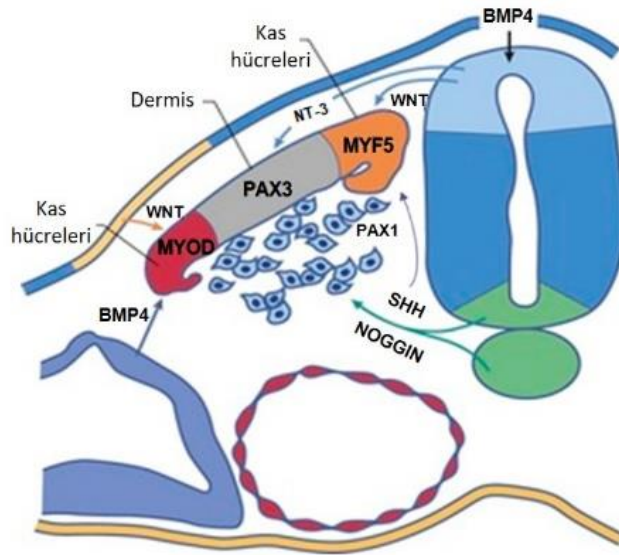
Şekil 2-2: Somitlerin gelişim evreleri

(A) Epitelize mezoderm hücreleri lümen çevresinde hizalanır. (B) Epitel karakterini kaybeden ventral ve medial somit hücrelerinin bir kısmı notokord ve nöral tüpün çevresine, bir kısmı lateral plak mezodermine ilerleyerek birlikte sklerotom yapısını oluşturur. Dorsomedial ve ventrolateral hücrelerden ise kas hücre prekürsörlerini geliştir. (C) Dersatom ve ilişkili kas hücreleri dermomiyotomu oluşturur. (D) Dersatomiyotom farklılaşması: miyotom hücreleri kas dokusuna, dersatom hücreleri dermise farklılaşır. (*Langman's Medical Embryology, 2018 baskısından alıntılanmıştır (27)*).

2.2.2. Somit Farklılaşması ve Miyogenezisin Moleküler Mekanizması

Somit farklılaşması aracılığıyla kas gelişimini düzenleyen genler, koordinasyon gerektiren kompleks bir süreci yönetir. Notokord ve nöral tüp tabanından salınan SHH (*Sonic Hedgehog*) ve NOG (*Noggin*), somitlerin ventral yüzünden sklerotomu oluşturur. Oluşan sklerotom hücreleri, kondrogenezis ve vertebra oluşumu için gerekli olan *PAX1* (*Paired Box 1*) ekspresyonunda görev alır. Ektoderm hücreleri kökenli *BMP4* (*Bone-Morphogenetic Protein 4*), dorsal nöral tüpten WNT proteinlerinin üretimini indükler. WNT proteinleri ve notokorddan eksprese edilen düşük konsantrasyonlarda SHH proteinleri, *PAX3* aktivasyonu

ile somitin vücut duvarı ve abdominal kaslarının kökenini oluşturan dermomiyotom bölgesinin işaretlenmesini sağlar. Daha sonra bu bölge, dorsal nöral tüpten salınan NT3 (Nörotropin 3) ile dermise farklılaşacaktır. WNT proteinleri, SHH proteinleri ile birlikte somitin dorsomedialinden *MYF5* ekspresyonunu; kısa süre sonra da BMP4 proteinleri ile birlikte ise somitin ventrolateralinden bir başka kas prekürsör hücre grubunu oluşturacak olan *MyoD* ekspresyonunu indükler. Hem *MyoD* hem de *MYF5*, miyojenik düzenleyici faktörler (“MRF’ler”) ailesinin birer üyesi olup kas gelişimi sürecinde kritik öneme sahip transkripsiyon faktörleridir (Şekil 2-3) (27). İlginç bir nokta, *MyoD* veya *MYF5* genlerinin birbirlerini kompanse etme yeteneğine sahip olmasıdır. Bu iki genden birinin işlevsel olması normal iskelet kası gelişimi için yeterliyken, iki genin de *knockout* edildiği fare modellerinde hiç kas gelişimi olmadığı ve perinatal dönemde öldükleri gözlenmiştir (29).



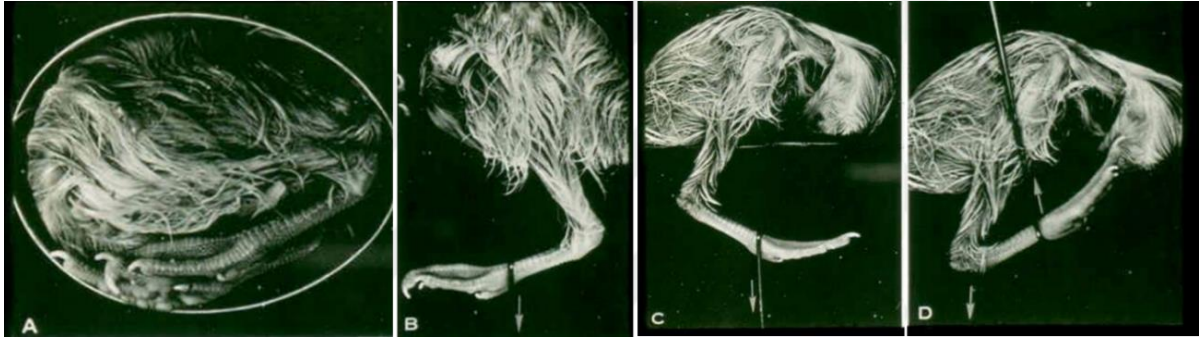
Şekil 2-3: Somit farklılaşmasının moleküler regülasyonu

Langman's Medical Embryology, 2018 baskısından modifiye edilmiştir (27).

2.2.3. In-Utero Motor Aktivitenin Başlangıcı

Eklemlerin normal gelişimi fertilizasyondan sonra yaklaşık 5.5 haftada başlar, 7. haftaya kadar eklem boşlukları oluşur ve 8. haftadan itibaren hareket mümkün hale gelir (3). Fetal dönemde ekstremitte hareketleri ve kas kasılmasının, eklemlerin normal gelişimi için kritik rolü olabileceği ilk olarak 1901 yılında; çoklu eklem kontraktürlerinin

etiopatogenezinde temel faktörün “fetal hareket azlığı” olabileceği 1920’li yıllardan itibaren öne sürülmüştür (30). İlerleyen yıllarda bu hipotezi doğrulamaya yönelik indüklenmiş model organizma deneyleri yapılmıştır. 1962 yılında Drachman ve Coloumbre, civciv embriyolarında spinal kordun çıkarılması veya nöromusküler ajanlar ile muamele sonrası konjenital eklem kontraktürleri gelişimini, 1983 yılında Moessinger ve ark. paralize edilen sıçan fetuslarında çoklu eklem kontraktürleri, intrauterin büyüme gelişme geriliği (IUGG), mikrognati, polihidramniyos ve pulmoner hipoplazi bulgularının ortaya çıktığını göstermiştir (19, 20) (Şekil 2-4). Hayvan modellerinde saptanan bu bulguların 1974 yılında Pena ve Shokeir tarafından insanda tanımlanmış, OR kalıtılan letal seyirli Pena Shokeir I fenotipi ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (31).



Şekil 2-4: Civciv embriyosunda 48 saat kürar infüzyonunu (0.1mg/sa) takiben gelişen kas-iskelet fenotipi

(A) Deneğin yumurta içindeki görüntüsü, (B-C) Sırasıyla sol ve sağ diz eklemindeki maksimum ekstansiyon kapasitesi, (D) Sağ diz eklemindeki maksimum fleksiyon kapasitesi izlenmektedir. (Drachman ve Coloumbre, 1962 çalışmasından alıntılanmıştır (19)).

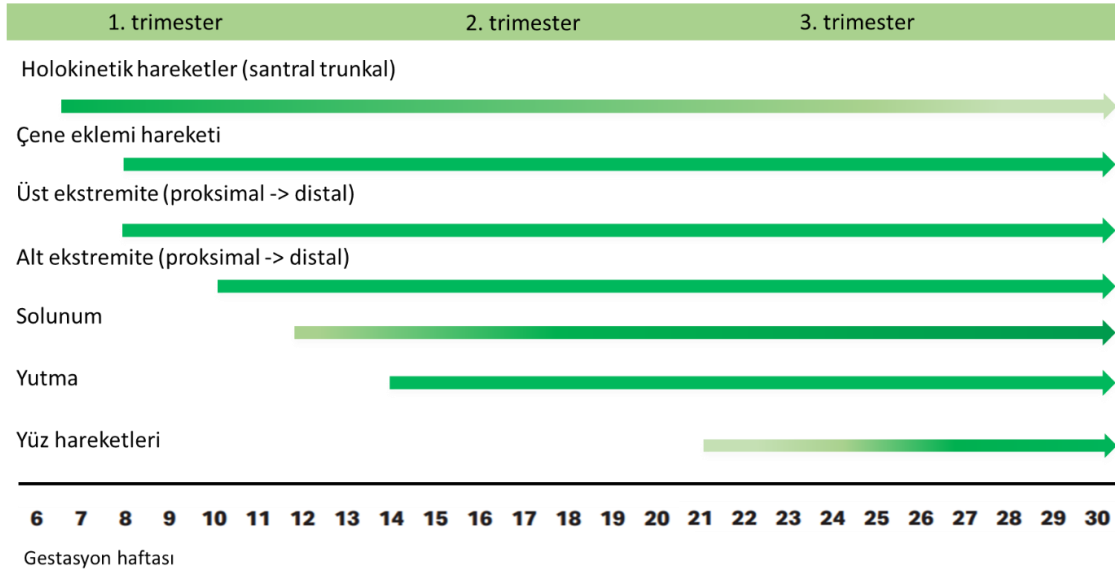
Normal motor aktivite, geç embriyonik dönemde başlamaktadır. İlk trimester; nöron proliferasyonu, nöronal migrasyon ve kas dokusunun gelişimini içeren, progresif motor gelişim açısından kritik bir dönemdir. Beyne ait majör yapılar bu süreçte gelişir ve spontan fetal aktivite bu dönemde normal sinir sistemi gelişiminin önemli bir göstergesidir (1). İlk fetal hareket aktivitesinin, omurilik ve beyin sapındaki “merkezi örüntü ağları” (*central pattern networks*) tarafından, miyotom kökenli immatür kas liflerinden gelen geri bildirimlerin aracılığı ile üretildiği düşünülmektedir (1, 32).

Beynin supraspinal kısımlarının gelişmesi ile spesifik hareketler başlar. Bu nedenle, 10 haftayı aşan fetal akinezi, erken başlangıçlı merkezi veya periferik nöromusküler yapıların gelişim defektine ve/veya işlev bozukluğuna işaret etmektedir (33).

2.2.4. *In-Utero* Fetal Hareket Kronolojisi

Embriyonik dönemde başlayan immobilité, ekstremitelerin normal gelişimini bozarak pterijiyum oluşumu ve eklem fiksasyonuna neden olurken; fetal başlangıçlı immobilité, eklem kontraktürleri ve sekonder deformasyonlara yol açar (34). Fetal dönemde 3 haftadan uzun süren immobilizasyonun eklem kontraktürlerine neden olması beklenmektedir. Kontraktürlerin şiddeti, hareketsizliğin başlama zamanı ve süresi ile ilişkilidir (20).

En erken hareket kalıpları başın ve gövdenin basit ve stereotipik yana eğilme hareketleri olup fertilizasyondan sonra 7. haftada fark edilebilir. Hareket, kraniyokaudal yönde ve proksimalden distale doğru başlar: önce omuz ve kalça, ardından üst ekstremité, sonrasında alt ekstremité hareketleri ortaya çıkar. 7-9. haftalar arasında ekstremitelerin basit hareketleri gözlemlenebilir. İzole kol hareketleri 8-9. haftadan itibaren, bacak hareketleri ise genellikle yaklaşık 10. haftadan itibaren ortaya çıkar, dört ekstremitéde de proksimal hareketleri takiben distal el ve ayak hareketleri gelişir. Ekstremité hareketleri, her bir ekstremitenin 11. haftaya kadar ekstansiyon, fleksiyon, rotasyon, abdüksiyon ve addüksiyonunu içerir. Çene eklem hareketleri 7-9. haftada başlar. Fetal emme ve yutma erken ikinci trimesterde gelişir. Solunum hareketleri 12-14 hafta civarında başlar ve 20. haftada düzenli hale gelir. Yüz hareketleri ikinci trimesterin sonlarında görünür hale gelir, üçüncü trimesterde hareket aralıklarının sıklaşması ile belirginleşir (1). Gestasyonel yaşa göre fetal hareket kronolojisi Şekil 2-5'de şematize edilmiştir.



Şekil 2-5: Gestasyon haftasına göre fetal hareket kronolojisi

Açık renk fetal aktivitenin başlangıcını veya azaldığını göstermektedir. (Filges&Hall, 2013 çalışmasından uyarlanmıştır)(1).

2.2.5. Fetal Hareketin Kas-İskelet, Solunum ve Gastrointestinal Sistem Gelişimi ile Karşılıklı Etkileşimi

Kas gelişimi, eklem boşluğu formasyonu ve kemik oluşumu; ekstremiteler hareketinin başlangıcı ve sürekliliği açısından birbirine bağımlı kompleks gelişim süreçleridir. Bu karşılıklı etkileşim mekanizmaları, model organizma çalışmaları ve çeşitli *in vivo/in vitro* deneylerle aydınlatılmıştır. Kahn ve ark. (2009), ekstremiteler kaslarının gelişimi bloke edilerek oluşturulmuş çeşitli hayvan modellerinde, olası eklem bölgelerindeki hücrelerin eklem belirteçlerini eksprese etmek yerine kondrojenik belirteçleri eksprese ettiğini; sonucunda normal eklem farklılaşmasının kesintiye uğradığını göstermiştir (35). Bu fonksiyonel çalışma ile kas kasılmasının, eklem progenitör hücrelerinin korunmasında ve doğru eklem kaviteleşiminin gelişimindeki kritik önemi ispatlanmıştır. Nowlan ve ark. (2010), kas gelişimi bloke edilmiş mutant fare modellerini kullanarak prenatal kas kasılmalarının kemik gelişimi üzerindeki etkisini araştırmış ve azalmış kas fenotipinin ossifikasyon merkezlerine etki ederek kemik oluşumunda dramatik azalma olduğunu göstermiştir (36). Kas gelişimi ve innervasyon süreçlerinin, akciğer ve gastrointestinal olgunlaşmaya izin veren fetal solunum ve/veya yutma mekanizmalarını da kontrol ettiği düşünülmekle birlikte literatürde bu mekanizmaları aydınlatacak ayrıntılı model çalışmaları henüz yeterli değildir. Baguma-Nibasheka ve ark.

(2012), akciğer gelişimi ve hastalıkları ile ilişkili bir dizi molekülün işlevinin incelenmesine yönelik *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile başta interkostal kaslar ve diyafram olmak üzere solunum kasları tarafından yürütülen fetal solunum hareketlerini incelemiştir. Diyafram ve interkostal kasların dahil edildiği kas gruplarının gelişimi bloke edilmiş; buna bağlı fetal solunum hareketleri kökenli mekanik uyarıların yok olmasıyla tip 1 ve tip 2 pnömositler farklılaşma sürecini tamamlayamamış ve nihai sonuç olarak akciğer hipoplazisi geliştiği gösterilmiştir (37).

2.3. Çoklu Konjenital Kontraktürler

2.3.1. Tanım

Artrogripozis Multipleks Konjenita (AMC), diğer adıyla çoklu konjenital kontraktürler (MCC); en az iki farklı vücut bölgesinde non-progresif konjenital hareket kısıtlılığı ile karakterize olan ve birçok farklı sendromun yol açtığı ortak klinik tabloyu nitelerek için kullanılan bir terimdir. Etimolojik olarak Yunanca kökenli olan “artrogripozis” kelimesi, “kvrık/eğri eklem” (*arthron- eklem ve gryposis- eğri, kıvrık, çengel şeklinde*) anlamına gelmektedir.

2.3.2. Epidemiyoloji

Artrogripozis sıklığı çok sayıda epidemiyolojik çalışma kapsamında araştırılmış ve oldukça farklı veriler elde edilmiştir. Bu popölasyon çalışmaları, çok çeşitli spesifik ve farklı etiyolojik antiteyi içermekte olup literatürde tahmini prevalans değerlerinin değışkenlik göstermesinin, kabul edilen “artrogripozis” tanımına ve çalışmanın türüne bağlı olduğu düşünülebilir. Laitinen ve Hirvensalo; 1966 yılında, Helsinki’de tek merkezli ve olası OR letal sendromdan etkilenmiş kardeş olguların da dahil edildiği küçük bir seride (11 etkilenmiş olgu) prevalansı 3.337’de 1 olarak bildirmiş, ilerleyen yıllarda bu değer birçok yayında referans olarak kullanılmıştır (38). 1976 yılında Edinburgh’da 66 sporadik olgu ile yapılan araştırmada toplum prevalansı 56.000’de 1 bildirilmiş olmakla birlikte, çalışma kohortu şehirdeki yenidoğan kayıtlarına dayanmakta olup verilerin nasıl elde edildiği net olarak ifade edilmemiştir (39). Silberstein ve Kakulas, 1980 ve 1993 yılları arasında Batı Avustralya’da AMC için 12.000’de 1, Darin ve ark. 1979 ve 1994 yılları arasında Batı İsveç’te doğan bir kohortta prevalansı 5.100’de 1 olarak bildirmiştir (40, 41). Öte yandan, Laitinen ve Hirvensalo’nun yukarıda bahsi geçen çalışmasında letal fenotipler için toplum sıklığını 1/37.000 olarak bildirilmiş; 1979-1992 yılları arasında canlı doğan ve postnatal ilk ay içerisinde eks olan olgular, ölü doğumlar, tıbbi tahliye edilen olguların dahil edildiği başka bir Fin kohortunda ise letal konjenital kontraktür sendromlarının toplam prevalansı yaklaşık 1/19.000

olarak hesaplanmıştır (42). Bu çalışmada letal seyreden artrogripozis vakaları için toplum sıklığının, benzer kohortlarda gerçekleştirilen önceki çalışmalara göre daha yüksek saptanması, gelişen teknolojiler ile olguların prenatal dönemde tanınabilme oranlarının artışı ile ilişkilendirilmiştir. Yine Finlandiya'da yapılan başka bir toplum araştırmasında, toplam MCC prevalansı 4.601'de 1 ve letal alt grup için 6.985'te 1 olarak bildirilmiş; 1 yıl veya daha uzun süre hayatta kalan olgular için prevalans 15.400'de 1 olarak hesaplanmıştır (43). En yeni kapsamlı epidemiyolojik araştırma 2010 yılında Lowry ve ark. tarafından, 1997-2007 yılları arasında Kanada'da yürütülmüş olup prevalans 1:4300 olarak bildirilmiştir (44).

Bu epidemiyolojik araştırmalar birlikte değerlendirildiğinde; 2'si Finlandiya'dan (38, 43) biri İsveç'ten (41) ve biri Kanada'dan (44) olmak üzere 4 ayrı çalışmada çoklu konjenital kontraktürler için bildirilen 3.300'de 1 ile 5.100'de 1 arasında değişen prevalans verileri birbirini desteklemektedir.

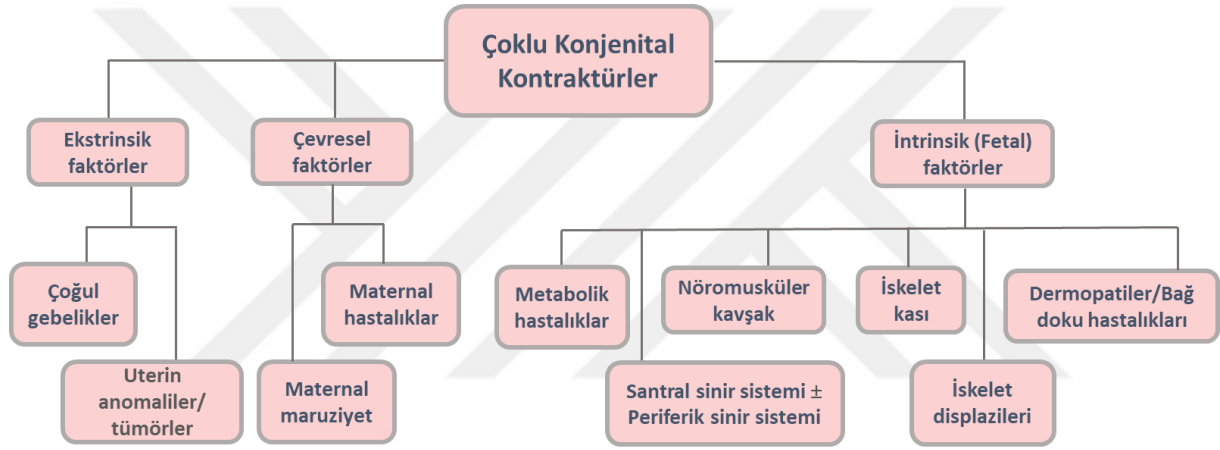
2.4. Çoklu Konjenital Kontraktürlerin Sınıflandırılması

MCC; gros ve submikroskobik kromozom anomalileri, mitokondriyal hastalıklar ve 400'den fazla tek gen hastalığı dahilinde prezante olabilen bir klinik tablodur. Bu kadar geniş ve heterojen bir grubun, tek bir sınıflandırma sistemi ile gruplandırılabilmesi olası değildir. Bu nedenle; hem klinik pratikte doğru tanıya ulaşabilmek, hem genetik yolların aydınlatılması amacıyla yapılan çalışmaları kolaylaştırabilmek, hem de hastalığa özgü tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi adına çeşitli sınıflandırma stratejileri geliştirilmiştir (10, 45-47). Bu bölümde MCC grubunun etiyolojik, klinik, genetik ve fonksiyonel sınıflaması detaylandırılacaktır.

2.4.1. Etiyolojik Sınıflama

Artrogripozis ile sonuçlanan bütün durum ve antitelerin ortak noktası, altta yatan faktörden bağımsız olarak tamamının fetal hareket azlığına (fetal akinezi) sekonder ortaya çıkmasıdır. Bu nedenle en eski sınıflandırma yaklaşımı, fetal hareketin azalması ile sonuçlanan etiyolojik etmenler baz alınarak oluşturulmuştur. Geleneksel etiyolojik sınıflama; yapısal ve fonksiyonel sinir sistemi anomalileri dahil olmak üzere nöropatik faktörleri, nöromüsküler kavşak hastalıklarını, kasın yapısal ve fonksiyonel anomalilerinin yanı sıra kas tutulumu ile seyreden metabolik/mitokondriyal hastalıkları da içeren miyopatik faktörleri, iskelet displazileri ve diğer bağ dokusu hastalıklarını içermektedir (48). Ancak bu yaklaşım; maternal enfeksiyonları (Zikavirus vb.), annenin vasküler ve sinir sistemini etkileyen ilaç veya bağımlılık yapıcı ajanları kullanmasını, myastenia gravis gibi maternal immün sistem reaksiyonlarını, fetal hareket alanını veya kabiliyetini azaltan (uterus anomalileri,

oligohidramniyos vb.) maternal faktörleri içermemektedir. Bu nedenle, daha yeni bir yaklaşım, mevcut tabloyu öncelikle intrinsik (fetal faktörler), ekstrinsik (ekstrafetal faktörler) ve çevresel faktörler olarak üçe ayırmak; ardından doku tutulumuna göre sınıflamak olmuştur (10). Ancak bu yaklaşımın da bir dezavantajı, fetal akineziye yol açan temel faktörün her zaman belirlenememesi ve bazen her iki kategoride yer alan nedenlerin etiolojide birlikte yer alabilmesidir. Bununla birlikte bu revize sistem, altta yatan mekanizmanın daha erken tanımlanmasını ve moleküler analizlere algoritma oluşturabilmesi nedeniyle klinik pratikte kullanılmaya uygundur. Çoklu konjenital kontraktürlerin etiolojik sınıflandırılması Şekil 2-6'da gösterilmiştir.



Şekil 2-6: Çoklu konjenital kontraktürlerin etiolojik sınıflandırılması

Niles ve ark. (2019) çalışmasından modifiye edilmiştir (2).

2.4.1.1. İntrinsik faktörler (Fetal disfonksiyon)

Miyopatik ve nöropatik süreçler, nöromusküler son plak anomalileri, bağ dokusu hastalıkları ve kontraktürler ile seyreden kondrodisplaziler bu grupta değerlendirilmektedir.

2.4.1.1.1. Miyopatik süreçler

Kas gelişimi sürecinde ortaya çıkan yapısal ve/veya fonksiyonel anomaliler fetal hareketin azalmasına yol açmakta; bu nedenle birçok miyopatik defekt konjenital kontraktürler ile sonuçlanmaktadır. Hızlı kasılan kasların (*fast-twitch muscles*) tutulumu birçok distal artrogripozis (DA) alt tipine eşlik etmektedir (49). Şiddetli miyopatik ve distrofik süreçlerin de (nemalin miyopatisi, santral kor miyopatisi, *reducing* cisim miyopatisi gibi)

yenidoğan döneminde MCC ile sonuçlanabildiği bilinmektedir. Konjenital müsküler distrofiler, konjenital miyopatiler, intrauterin miyozitis ve normal fonksiyon için gerekli enerjinin sağlanamadığı mitokondriyal sitopatiler artrogripozis kliniği ile prezente olabilen kas hastalıklarına örnek olarak verilebilir. Miyopatik kökenli MCC tablosuna neden olduğu bilinen bir grup hastalık, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri Tablo 2-1’de özetlenmiştir.

Özellikle miyopatik etiyolojiye sekonder gelişen artrogripozis tiplerinde, olguların cerrahi ve anestezi ile malign hipertermiye daha yatkın olduğu düşünülmektedir (50-52). Bu nedenle ameliyat öncesinde, bu yöndeki olası komplikasyonlar açısından önlem alınması uygun bir yaklaşım olacaktır.

Erken intrauterin dönemde başlayan kas fonksiyon kaybının kas biyopsisinde nöropatik kökenli hastalıkları taklit edebileceği klinik pratikte akılda tutulmalıdır. Bununla birlikte, artrogripozis bulgularıyla seyreden alfa-distroglikanopatiler veya *BICD2*-opatiler gibi birçok grup hastalıkta hem miyopatik hem nöropatik süreçlerde defekt gözlenmektedir. Bu durum benzer antitelerin etiyolojik sınıflandırmasını güçleştirmektedir (53, 54). Ayrıca, bir grup metabolik hastalık intrauterin dönemde miyopatik etiyolojiye sekonder gelişen kontraktürler ile prezante olabilmektedir. Bu hastalıklar, doğrudan fetal hareketi etkileyerek kontraktürler ile sonuçlanabilen metabolik fenotipler ile birlikte “2.4.1.1.4. Metabolik hastalıklar” alt başlığında tartışılacaktır.

Tablo 2-1: Miyopatik kökenli artrogripozise neden olan hastalıklar, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri

Miyopatik kökenli MCC fenotipleri	Gen sembolü	Kalıtım
Konjenital Miyopatiler		
Nemalin miyopati	<i>NEB, ACTA, KLHL40, KLHL41, TNNT1, LMOD3</i>	OR
Santral kor hastalığı (CCD) – konjenital başlangıçlı form	<i>RYR1</i>	OR, OD
<i>Reducing</i> cisim miyopatisi	<i>FHL1</i>	XL
Sentronükleer miyopatiler	<i>MTM1, ZAK, BIN1, DNM2</i>	OR, OD, XL
Konjenital Musküler Distrofiler (CMD)		
Distroglikanopatiler ▪ Walker-Warburg sendromu (WWS) ▪ Muscle-Eye-Brain hastalığı (MEB) ▪ Hidrosefali, Agiri ve Retinal displazi (HARD) ▪ Serebroküler displazi-Musküler distrofi sendromu (COD-MD) ▪ Musküler Distrofi-Distroflikanopatiler, tip C vb.	<i>FKRP, FCMD, POMT1, POMT2, FKTN, POMGNT1, LARGE, DAG1</i>	OR

Emery-Dreifuss Musküler Distrofi 2 (LGMD 1B)	LMNA	OD
Ullrich konjenital musküler distrofi	COL6A3, COL6A1, COL6A2	OR, OD
Konjenital Myotonik Distrofi 1 (DM1)	DMPK	OD

OR, Otozomal resesif; XL, X'e bağlı; OD, Otozomal dominant

2.4.1.1.2. Nöropatik süreçler

Fetal akinezinin en yaygın nedenlerinden biri santral ve/veya periferik sinir sistemi patolojileridir. Sinir hücrelerinin gelişiminde, migrasyonunda, matürasyonunda veya miyelinizasyondaki yetersizlikler, *in utero* hareketlerde azalmaya ve/veya hipotoniye yol açarak kontraktürler ile sonuçlanabilir (55). Bu nedenle birçok konjenital nöropati alt tipi, dismiyelinizan hastalıklar, santral sinir sisteminin (SSS) yapısal anomalileri (migrasyon kusurları, nöral tüp defektleri, serebellar anomaliler vb.) klinikte konjenital kontraktürler ile prezante olabilir. Medulla spinalis ön boynuz hücrelerinin oluşumu ve maturasyonunu etkileyen spinal kord defektleri bu grubun büyük bir kısmını oluşturmaktadır (56). Ülkemizde en sık OR nöromusküler hastalık olarak karşımıza çıkan Spinal Musküler Atrofi (SMA) tablosunun da nadiren konjenital kontraktürler ile prezante olabileceği unutulmamalıdır. Özellikle perinatal letal SMA 0 alt tipi bu grup içinde en önemli form olup 2016'da yapılan bir çalışmada 16 SMA 0 olgusunun 15'inde fetal akineziye sekonder kontraktürlerin saptandığı bildirilmiştir (57).

Nöral tüp defektleri, serebro-okulo-fasiyal sendrom (COFS) ve Marden-Walker sendromu (MWS) gibi hastalıklar nöropatik kökenli artrogripozis tablosuna örnek olarak verilebilir. Benzer etiyolojik kökene sahip diğer bazı hastalıklar Tablo 2-2'de belirtilmiştir.

Tablo 2-2: Nöropatik kökenli artrogripozise neden olan hastalıklar, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri

Nöropatik kökenli artrogripozise neden olan bazı hastalıklar	Gen sembolü	Kalıtım
Motor nöron gelişim/devamlılık defektleri		
Spinal musküler atrofi (SMA)	SMN1	OR
Letal konjenital kontraktür sendromu tip 1,2,3	GLE1, ERBB3, PIP5K1C	OR
X'e bağlı SMA	UBE1	XL
Serebro-okulo-fasiyal-skeletal (COFS; Pena-Shokeir II) sendrom	ERCC6, ERCC2, ERCC5, ERCC1	OR
Periferik sinir sistemi defektleri		
Konjenital hipomiyelinizan nöropatiler	EGR2, MPZ	OD, OR
SSS Yapısal Anomalileri ile seyreden fenotipler		
Nöral tüp defektleri (NTD'ler)		Multifaktöryel

Marden-Walker sendromu (MWS)	<i>PIEZO2</i> , bilinmeyen genler	OD
Progresif ensefalopati, ödem, hipsiaritmi, optik atrofi sendromu (PEHO)	<i>ZNHIT3</i>	OR
Pettigrew Sendromu	<i>AP1S2</i>	XL
Miller-Dieker sendromu	<i>LIS1</i>	OD
Fowler sendromu	<i>FLVCR2</i>	OR
Aase-Smith sendromu tip 1		OD

OR, Otozomal resesif; XL, X'e bağlı; OD, Otozomal dominant; SSS, Santral sinir sistemi

2.4.1.1.3. Nöromusküler son plak hastalıkları

Artrogripozis etiyolojisinde yer alan bir diğer grup, sinaptopatiler olarak da adlandırılan nöromusküler kavşak (NMK) hastalıklarıdır. Asetilkolin reseptör (AChR) alt birimlerini kodlayan, reseptörü stabilize eden ve sinaptik kontrolde görev alan genlerdeki patojenik varyantlar iyi bilinen fetal akinezi fenotipleri (Escobar sendromu, letal multipl pterijiyum sendromu) ve konjenital miyastenik sendroma neden olmaktadır (58, 59). Bu sendromlarda gözlenen *web*/pterijiyumların doğumda mevcut olması için bir eklemde ilk trimesterden itibaren neredeyse tamamen hareketsiz olması gerekmektedir. Bununla birlikte, normal ekstremit ve eklem gelişimi hareket gerektirdiğinden, *web* oluşumu ile sonuçlanan *in utero* sürekli hareket eksikliği, eklemlerin oluşumundan sonra, yani en az 8. haftada başlıyor gibi görünmektedir. Bir başka deyişle *web*lerin varlığı, *in utero* hareketlerdeki azalmanın ilk meydana geldiği zamanın tayini açısından yararlı bir ipucu olabilir. Bazı pterijiyum sendromları, fizik tedavi ile birlikte asetilkolin tedavisine (motor son plak fonksiyonunu artırarak) yanıt veriyor gibi görünmektedir. Fetal nörotransmitter reseptör alt birimlerine karşı maternal antikör oluşması da konjenital kontraktürler ile sonuçlanmakta olup bu durum “2.4.1.3.1. Maternal hastalıklar” alt başlığında tartışılacaktır. MCC ile seyredabilen bazı NMK hastalıkları Tablo 2-3’te belirtilmiştir.

Tablo 2-3: MCC ile seyredabilen NMK hastalıkları, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri

NMK patolojisine sekonder gelişen MCC fenotipleri	Gen sembolü	Kalıtım
Multipl pterijiyum sendromu, Letal formlar (LMPS)	<i>CHRNA1, CHRND, DOK7, TPM2, RPK4</i>	OR
Non-letal multipl pterijiyum sendromu/FADS	<i>CHRNA1, CHRND, CHRNB1, RAPS, DOK7, TPM2, SYNE1</i>	OR, XL, OD
Konjenital Miyastenik sendromlar (KMS)	<i>RAPS, CHRNB1, CHRNE, MUSK, CHAT, DOK7</i>	OR
Alkuraya-Kucinkas sendromu (AKS)	<i>KIAA1109</i>	OR

NMK, Nöromusküler kavşak; OR, Otozomal resesif; XL, X'e bağlı; OD, Otozomal dominant

2.4.1.1.4. Metabolik hastalıklar

Bazı metabolik hastalıklar intrauterin dönemde başlayan kontraktürler ile prezante olmaktadır. Bu grup hastalıklarda kontraktür gelişiminin altta yatan nedeni primer kas tutulumu olabileceği gibi, doğrudan fetal hareketin azalmasına sekonder de olabilir. Ülkemiz gibi akraba evliliğinin yoğun olduğu toplumlarda bu resesif antiteler literatür verilerine kıyasla çok daha sık karşımıza çıkmakta; bu nedenle klinik pratikte bu hastalıkları tanıyabilmek oldukça önem arz etmektedir. MCC ile seyredabilen bazı metabolik hastalıklar Tablo 2-4'te gösterilmiştir. Maternal metabolik asidozun fetal kas-iskelet sistemi üzerine etkileri “2.4.1.3. Çevresel faktörler” bölümünde değerlendirilmiştir.

Tablo 2-4: MCC ile seyredabilen metabolik hastalıklar, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri

MCC ile Seyredabilen Metabolik Hastalıklar	Gen sembolü	Kalıtım
Adenilosüksinat liyaz eksikliği	<i>ADSL</i>	OR
Artrogripozis-renal disfonksiyon-kolestaz sendromu (ARC, Nezelof sendromu)	<i>VPS33B, VIPAR</i>	OR
Konjenital glikozilasyon defektleri (CDG'ler)	<i>PMM2, FUT8, ALG1, ALG3, COG6, COG8, DPM1, DPM2, DPAGT1</i> vb.	OR
Gaucher hastalığı – perinatal letal form	<i>GBA</i>	OR
Glikojen depo hastalığı tip IV (GSD tip IV)	<i>GBE1</i>	OR
Juvenil hyalin fibromatozis (Puretic-Murray sendromu)	<i>CMG2, ANTXR2</i>	OR
Fosfofruktokinaz eksikliği (GSD tip VII)	<i>PFKM</i>	OR
Zellweger sendromu	<i>PEX</i> genleri	OR

OR, Otozomal resesif

2.4.1.1.5. Bağ dokusu hastalıkları ve iskelet displazileri

Tendonlar, kemikler, eklemler, eklem kapsülü ve sinoviyal sıvı, fetal hareketi kısıtlayacak şekilde gelişerek konjenital kontraktürlere neden olabilir. Neu-Laxova sendromu ve restriktif dermopatiler gibi deri tutulumuna bağlı hareket kısıtlılıkları bu grupta yer almaktadır. Eklem hipermobilitesi (infantil Marfan sendromunda olduğu gibi) ve sık kırık öyküsü (Bruck sendromunda ve şiddetli osteogenezis imperfektada olduğu gibi) de altta yatan bir bağ dokusu hastalığını düşündüren ek bulgulardır. Yakın zamanda, gebeliğin 2. trimesterinden itibaren yaygın kontraktür bulguları ile izlenen iki kardeşin, postnatal klinik değerlendirmesinde bazı eklemlerinde kontraktürler (diz, dirsek, kalça, el bilekleri, metakarpofalangeal ve proksimal interfalangeal eklemler), el parmaklarında perdelenme, bazı

eklemlerinde hipermobilité (distal interfalangeal eklemler, ayak bilekleri ve ayak parmakları), fırlak topuklar ve pes planus saptanmıştır. Eşlik eden makrosefali, proptozis, pitozis ve midfasiyal hipoplazi gibi fasiyal dismorfik bulgular ve yüksek derece miyopi olduğu bildirilmiştir. TED analizi ile olgularda kollajen oluşumu ve stabilizasyonunda görevli bir gen olan *P4HA1*'de birleşik heterozigot bir değişim saptanmış ve bu antite, kontraktürler ile seyreden yeni bir bağ doku hastalığı olarak literatürde yerini almıştır (60).

Kondrodisplazilerin büyük bir kısmı, anormal kemik veya kırıldak oluşumuna sekonder eklem hareketinin kısıtlanması ile ilişkilidir. Hareket kısıtlılığının temel nedeni anormal kemik yapısı olduğu için, bu grup hastalık mobilizasyon tedavisine genellikle dirençlidir. Tendon gelişimindeki anomaliler veya normal gelişen tendonun kemikte uygun yere yapışmaması, trismus-psödokamptodaktili sendromunda olduğu gibi eklem hareket açıklığının sınırlandırılmasına ve eklem hareketinde belirgin azalmaya neden olabilir. Kemik füzyonu ile seyreden bazı antiteler (simfalanjizm, koalisyonlar vb.), kliniğe konjenital kontraktür olarak yansıyabilir. Bu grup, fizik tedaviye yanıt vermez; hatta fizik tedavi kaynaklı doku hasarı, diastrofik displazide olduğu gibi füzyona veya daha fazla hareket kısıtlamasına neden olabilir (7). MCC ile seyreden bazı bağ doku hastalıkları ve iskelet displazileri sırasıyla Tablo 2-5 ve Tablo 2-6'da gösterilmiştir.

Tablo 2-5: MCC ile seyreden bağ doku hastalıkları, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri

MCC ile seyredebilen bağ doku hastalıkları	Gen sembolü	Kalıtım
Neu-Laxova sendromu	<i>PHGDH, PSAT1</i>	OR
Restriktif Dermopati	<i>ZMPSTE24, LMNA</i>	OR
Marfan sendromu, ağır neonatal form	<i>FBN1</i>	OD
Ehlers-Danlos sendromu VIIA	<i>COL1A1</i>	OD
Ehlers-Danlos sendromu, muskulokontraktürel tip 1	<i>CHST14</i>	OR
<i>P4HA1</i> -ilişkili konjenital bağ doku hastalığı	<i>P4HA1</i>	OR

OR, Otozomal resesif; OD, Otozomal dominant

Tablo 2-6: MCC ile seyreden iskelet displazileri, ilişkili olduğu genler ve kalıtım paternleri

MCC ile seyredebilen iskelet displazileri	Gen sembolü	Kalıtım
Langer Mezomelik Displazi	<i>SHOX, SHOXY</i>	PR
Bruck sendromu	<i>PLOD2, FKBP10</i>	OR
Osteogenezis İmperfekta Tip II	<i>COL1A2, COL1A1</i>	OD
Spondiloepifizyal Displazi Konjenita	<i>COL2A1</i>	OD
Kniest Displazi	<i>COL2A1</i>	OD
Kampomelik Displazi	<i>SOX9</i>	OD
Kondrodisplazi Punktata, Rizomelik	<i>PEX7</i>	OR
Conradi-Hünemann-Happle Sendromu	<i>EBP</i>	XD
Parastremmatik Displazi	<i>TRPV4</i>	OD
Metatropik Displazi	<i>TRPV4</i>	OD
Diastrofik Displazi	<i>SLC26A2</i>	OR
Geleofizik Displazi	<i>ADAMTSL2, FBN1, LTBP3</i>	OR, OD
Dissegmental Displazi	<i>HSPG2</i>	OR
Schwartz-Jampel/Stuve-Wiedemann sendromu	<i>HSPG2, LIFR</i>	OR
Saul-Wilson sendromu	<i>COG4</i>	OD
Mikrosefali-Mikromeli sendromu	<i>DONSON</i>	OR
Al-Awadi-Raas-Rothschild sendromu	<i>WNT7A</i>	OR
Larsen sendromu	<i>FLNB</i>	OD
Roberts sendromu	<i>ESCO2</i>	OR
Dyggve-Melchior-Clausen Displazi	<i>DYM</i>	OR
Genitopatellar sendrom	<i>KAT6B</i>	OD

PR, Psödootozomal resesif; OR, Otozomal resesif; OD, Otozomal dominant; XD, X'e bağlı dominant

2.4.1.2. Ekstrinsik faktörler

İntrauterin kavite hacmini daraltan dış etmenler bu grupta yer alır.

2.4.1.2.1. Uterin kaviteyi daraltan durumlar

Bir nedenle uterus boşluğunun daralması, genellikle hamileliğin ikinci yarısında fetal hareketi kısıtlayarak konjenital kontraktürlere yol açabilir. Bu durum, uterusun yapısal anomalilerine (bikornuat uterus vd), çoğul gebeliklere, amniyotik bantların varlığına, oligohidramniyosa ve fibroid gibi uterin tümörlere bağlı gelişebilir. Uterin kavitenin daralmasına bağlı gelişen konjenital kontraktürler genellikle fizik tedaviye erken yanıt verirler ve bu grupta eklem fonksiyonunun ilk birkaç yıl içinde normale dönmesi beklenir (2).

2.4.1.3. Çevresel faktörler

Fetusu etkileyen maternal hastalıklar, fetusun çeşitli ilaçlara veya bağımlılık yapıcı ajanlara maruz kalması ve plasental vasküler yetersizlik durumları çevresel faktörler başlığında incelenmektedir.

2.4.1.3.1. Maternal hastalıklar

Multipl skleroz, diabetes mellitus, myastenia gravis, miyotonik distrofi dahil olmak üzere pek çok maternal hastalık, fetal akinezi ve artrogripozis ile ilişkilendirilmiştir (61-64). Anne adayında, fetusun paternal kökenli nörotransmitter reseptör alt birimlerine karşı antikor oluşması durumunda da fetusta konjenital kontraktürler gelişebilir. Burada temel mekanizma, nöromusküler son plağa karşı gelişen bu antikorların plasentayı geçerek fetal son plak fonksiyonunu doğrudan etkilemesidir. Gebelik sırasında kortikosteroid tedavisi ile önlenebilen bu tablo, gereksinim halinde maternal antikorlara yönelik spesifik testler ile tanınabilir (65). Kızamık, kızamıkçık, Cocksackievirus, Akabanevirus, *Equine* ensefalit, Rift vadisi humması gibi çeşitli viral enfeksiyonların multipl konjenital kontraktürler dahil olmak üzere multisistemik fetal etkileri olduğu bilinmektedir (66). 2015 yılında, hızlı bir ivmeyle yayılan ve kısa sürede pandemi haline gelen Zikavirus enfeksiyonlarının da fetal akinezi deformasyon sekansı ile ilişkisi gösterilmiştir (67). 2019'un son aylarından beri bütün dünyanın temel gündemi olan COVID-19'un, maternal enfeksiyonu takiben olası bir MCC fenotipi ilişkisine dair literatür taraması yapıldığında, sadece bir yenidoğanda PEV deformitesi bildirildiği görülmüştür (68). Rutin US izleminde PEV, kalça dislokasyonu veya *clenched hands* gibi herhangi bir kontraktürün görülme riskinin yaklaşık 200 gebelikte 1 olması, bu durumun tesadüfi bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Genel olarak bu grup hastalıklarda, nöromusküler son plağa karşı gelişen maternal antikorlar dışında, fetal akineziye yol açan mekanizmalar net olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca maternal asidozun (veya maternal asidoza neden olan maternal hastalıkların) gelişmekte olan fetal sinir sistemi üzerinde olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir (69). Bu nedenle, maternal metabolik imbalansların önlenmesi/tedavi edilmesi kontraktür gelişiminin önlenmesi yönünde de önem teşkil etmektedir.

2.4.1.3.2. Maternal maruziyet

Gebelik sırasında çeşitli ilaçların kullanımı ve bir takım çevresel faktörlere maruziyet, yenidoğanda çoklu konjenital kontraktürler ile ilişkilendirilmiştir (66). Plasentayı geçen kas gevşeticiler (metokarbamol vb.), medikal abortus indüksiyonunda kullanılan mizoprostol, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, ergot, penisilamin, çeşitli antiepileptikler

(fenobarbital, fenitoin vb.), aşırı alkol ve kokain gibi bağımlılık yapıcı ajanların kullanımı çoklu konjenital kontraktürlerle ilişkilendirilmiştir (7). İlk trimesterde yüksek ateşe neden olan maternal enfeksiyonlar ve maternal hipertermi tablosunun yanı sıra annenin uzun süreli ısıya maruz kalması (sıcak banyolar, jakuziler veya sıcak küvetler) da SSS anomalilerine sekonder kontraktür gelişimine neden olabilir. Motorlu taşıt kazaları, başarısız tıbbi terminasyon girişimleri ve hatta erken haftada yapılan amniyosentez veya koryon villus örnekleme gibi gebelik sırasındaki travmatik olayların konjenital kontraktürler için küçük de olsa bir risk teşkil ettiği akılda tutulmalıdır (69). Bu nedenle, kontraktür etiyojisi araştırılırken gebelik öyküsünün olabildiğince detaylı sorgulanması gerekmektedir.

2.4.1.3.3. İntrauterin vasküler yetersizlik

Plasental kan akımı; fetusta sinir, kas ve kemik dokularının büyümesini ve fonksiyon kazanmasını sağlar. Vasküler beslenme kesildiğinde veya azaldığında, gelişmekte olan bu yapılar hızlıca hasar görür ve SSS olgunlaşması için kritik gelişim basamakları aksayabilir. Geçici fonksiyonel nöron veya kas kaybı bile, hafif eklem kontraktürlerinin gelişmesi için yeterli bir fetal akinezi hâli ile sonuçlanabilir. Artrogripozis formlarının 1/3'ünü oluşturan ve sporadik bir antite olan Amyoplazinin etiyojisinde temel faktörün *in utero* vasküler yetmezlik olduğu düşünülmektedir (70). Monozigotik ikizlerin %70'i tek bir plasentayı paylaştığından, monozigotik ikizlik durumu da plasental vasküler yetmezliğe yol açabilir (71). Erken gebelik sırasında ya da başarısız gebelik sonlandırma girişimlerinde gelişen ciddi kanamaları takiben MCC bulguları saptanan fetal olguların varlığı, son adet döneminden sonraki 8 ila 14 haftalık periyodun fetus için özellikle hassas bir dönem olduğunu göstermektedir.

2.4.2. Klinik Sınıflama

Bir diğer yaklaşım olguların öncelikle klinik olarak sınıflandırılmasına dayanmaktadır. Günümüzde MCC ilişkili birçok genin bulunması ve aynı ailede aynı mutasyona sahip bireylerin klinik sınıflamada birden fazla gruba dahil olduğunun gözlenmesi ile bu antitelerin değerlendirilmesinde farklı klinik sınıflama sistemleri oluşturulmuştur (45).

Klinik sınıflama 1: Fizik muayene sırasında artrogripozis tiplerini tutulum alanına göre üç gruba ayırmak tanı açısından uygulanabilirliği kolay ve faydalı bir yaklaşımdır:

Grup 1 (izole MCC/primer ekstremitte tutulumu): En yaygın artrogripozis formu olan Amyoplazi, Bruck sendromu, Distal artrogripozis tip 1A (DA1A), Langer Mezmelik Displazi (LMD) ve Poland sekansı bu grupta yer almaktadır. Ayrıca bazı hastalıklarda

artrogripozis bulguları sıklıkla üst veya alt ekstremiteye sınırlı olabilir. Bu antitelerin bir kısmı Tablo 2-7’de özetlenmiştir.

Tablo 2-7: Sıklıkla sadece üst veya alt ekstremitte tutulumu ile seyreden artrogripozis formları

Üst ekstremiteler		
Lin-Gettig sendromu	<i>KAT6B?</i>	OD
Amyoplazi – izole üst ekstremitte	Sporadik	
Antekubital pterijiyum sendromu (Shin Shun)		OD
Guadalajara kamptodaktili III		OD ?
Hunter-MacDonald sendromu		OD
Liebenberg sendromu	<i>PITX1</i>	OD
Kılıç kamptodaktili (pitozis, oftalmopleji, skolyoz)		OR
Prader-Willi Habitus, Osteopeni, Kamptodaktili (Urban-Rogers-Meyer sendromu)		OR? XL?
Alt ekstremiteler		
Amyoplazi – izole alt ekstremitte	Sporadik	
Fuhrmann sendromu	<i>WNT7A</i>	OR
Genitopatellar sendrom	<i>KAT6B</i>	OD
Kuskokwim sendromu (Bruck sendromu tip 1)	<i>FKBP10</i>	OR
Distal herediter motor nöronopati 8 (Fleury tipi)	<i>TRPV4</i>	OD
Meningomyelosel/spina bifida/spinal disrafizm	Multifaktöriyel	
Erken haftada invazif girişim (AS/CVS)	İyatrojenik	

OR, Otozomal resesif; XL, X’e bağlı; OD, Otozomal dominant; AS, Amniyosentez; CVS; Koriyon villus örnekleme

Grup 2 (MCC ve ek sistem tutulumu): Bu geniş grup, bazı DA alt tiplerini (Freeman-Sheldon sendromu (DA2A), Sheldon-Hall sendromu (DA2B), Gordon sendromu (DA3), DA4, DA5, DA6, DA7), pterijiyum sendromlarını (popliteal pterijiyum sendromu, multipl pterijiyum sendromu, Escobar sendromu), Schwartz-Jampel sendromu ve Moebius sendromu gibi antiteleri içermektedir.

Grup 3 (MCC ve SSS disfonksiyonu ve/veya bilişsel gerilik ve/veya letalite): En geniş tanı grubudur. Grup 3 dahilinde iyi bilinen bazı hastalıklar alfa-distroglikanopatiler, Bartsocas-Papas sendromu, Bohring Opitz sendromu, kampomelik displazi, letal konjenital kontraktür sendromları (LCCS), Pena-Shokeir tip 1 fenotipi olarak sıralanabilir.

Klinik sınıflama 2: Bir başka bir klinik sınıflama, antiteleri kardinal özelliklerine göre ayırmaya dayanmaktadır. Bu yaklaşıma göre, genel olarak MCC olgularının %50'den fazlasını DA alttipleri ve amyoplazi grubu oluşturduğu için, ilk iki kategorinin bu iki grubu içermesi; 3. kategorinin ise “diğer antiteler” başlığında incelenmesi önerilmiştir.

- 1. Kategori (Amyoplazi grubu):** Olguların 1/3'ini oluşturan, en yaygın MCC formudur.
- 2. Kategori (Distal Artrogripozisler):** Majör olarak ekstremitelerin distal segmentlerinin tutulduğu bir grup hastalık olup ellerde kampto/psödökamptodaktili, el bileklerinde ulnar deviasyon, silik interfalangeal fleksiyon çizgileri ve ayak deformiteleri (PEV, pes kalkaneovalgus, vertikal talus ve/veya metatarsus varus) ile karakterizedir. Büyük eklem tutulumu çeşitli alt gruplara eşlik edebilir; ancak ek viseral anomali ve bilişsel tutulum sık beklenmemektedir. DA grubu 1982 yılında Hall tarafından sınıflandırılmış; 1996 yılında Bamshad tarafından revize edilmiştir (72, 73). Hall ve Bamshad sınıflamaları Tablo 2-8'de detaylandırılmıştır.
- 3. Kategori (Diğer antiteler):** Bu grup 7 alt grup altında incelenmektedir: Pterijiyum sendromları, X'e bağlı kalıtılan hastalıklar, maternal hastalıklar, teratojen maruziyeti, bilişsel gerilik ile seyreden fenotipler, fetal akinezi sekansı, letal antiteler.

Tablo 2-8: Distal artrogripozis sendromlarının Hall ve Bamshad sınıflaması, antitelerin genel özellikleri ve ilişkili genler

Hall	Distal artrogripozis alt tipi	Bamshad	Gen
I	Distal (simpleks, OD), dijitotarsal dismorfizm dahil	1A	TPM2, MYBPC1, TNN12, MYH3
IIA	Gordon sendromu (boy kısalığı ± yarık damak – OD)	3	PIEZO2
IIB	Okülmotor ve elektoretinal anomaliler ile seyreden artrogripozis, oftalmopleji/pitozis/strabismus; bir ailede retinal pigment değişiklikleri, MR ve olası DWM	5	ECEL1-OR PIEZO2-OD
IIC	Yarık damak, trismus – OD (*Gordon sendromu ile aynı antite olabilir)		
IID	Skolyoz (Goodman sendromu bu grupta değerlendirilebilir)	4	
IIE	Trismus ve el anomalisi ~ Amyoplazi spektrumu		
	Boy kısalığı, skolyoz, segmental amyoplazi	1C	MYL11-OD,OR
	Freeman–Sheldon sendromu	2A	MYH3
	Sheldon-Hall sendromu (Moore-Weaver sendromu dahil)	2B	TNNT3, TNN12, MYH3, TPM2
	Sheldon-Hall benzeri fenotip	2C	
	Sağırılık-kamptodaktili sendromu	6	FGFR3

Trismus-Psödokamptodaktili sendromu (Beal's sendromu, Kentucky Dutch Sendromu)	7	MYH8
OD Multipl pterijyum sendromu	8	
Kontraktürel araknodaktili	9	FBN2
Plantar fleksiyon kontraktürleri ile seyreden form	10	
Ehlers-Danlos sendromu, muskulokontraktürel tip 1 (Dundar-Sonoda sendromu)		CHST14
Diş yokluğu ve dismorfizm (Sheldon-Hall ile aynı olabilir)		
MR ve karakteristik fasiyal dismorfizm ile seyreden distal artrogripozis (Chitayat ve ark. 1990; MR, hipopituiterizm – OR)		
X'e bağlı distal artrogripozis		
Shalev (MacMillan) sendromu (özellikle üst ekstremité tutulumu, pitozis – OR)		

OD, otozomal dominant; OR, otozomal resesif; MR, mental retardasyon; DWM, Dandy-Walker malformasyonu

Emery and Rimoin's principle and practice of medical genetics (161. bölüm)'den modifiye edilmiştir (74).

2.4.3. Genetik Sınıflama

Bir diğer sınıflama yaklaşımı, başlangıçta genetik nedenleri genetik dışı faktörlerden ayırmaktır (uterus yapısı, maternal ilaç metabolizması veya maternal metabolik nedenlerin genetik kökeni olsa bile) (10). Bu yaklaşım, ebeveyn analizlerini içeren trio-ekzom/genom çalışmalarında OD kalıtılan birçok antitenin (genellikle *de novo* ve ileri baba yaşı ile ilişkili) ve özellikle ebeveynler arasında akrabalık varlığında OR kalıtılan birçok hastalığın tanımlanmasında oldukça verimli olmuştur. MCC ile ilişkili genlerin her geçen gün artması ile bu genleri işlevlerine göre gruplama gereksinimi doğmuş, bu yönde yeni tanımlanan genlerin fonksiyonel kategori ve yollara göre sınıflaması amacıyla Gen Ontolojisi sıklıkla kullanılır hale gelmiştir (75). Gen Ontoloji analizi; biyolojik süreçlerin, moleküler fonksiyonun ve hücresel bileşenlerin tanımlanmasını içerir. Şimdiye kadar MCC ile ilişkili olduğu bildirilen 402 gen, genetik sınıflama ile 19 gruba ayrılmıştır (15). Bu yaklaşımın, normal fetal hareketi anlamaya yardımcı olması ve ilerleyen dönemde potansiyel olarak tedaviye yön verebilecek yolları ortaya çıkarması beklenmektedir. Bununla birlikte, genlerin çoğu zaman birden fazla işlevinin olması ve farklı dokularda farklı düzeylerde eksprese edilebilmeleri nedeniyle gen bazındaki değişimlerin kompleks ve interaktif etkileri yeni yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Bu durum; bazı genlerin farklı fonksiyonu olan farklı *domain*lere sahip olması ve dolayısıyla aynı gendeki farklı mutasyonların çok farklı klinik fenotiplere yol açabilmesi nedeniyle klinik pratiği zaman zaman zorlaştırmaktadır. Bunun yanında, aynı patojenik değişimin, olası biyokimyasal yollarda rol alan modifiye edici genlere bağlı olarak, farklı aile bireylerinde çok farklı fenotiplere neden olabildiği de bilinmektedir. Örneğin, *PIEZO2* genindeki

c.8056C>T (p.(Arg2686Cys)) değişimi, hem Gordon sendromu hem de DA5 fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bu varyantın bitişik nükleotidinde bildirilmiş c.8057G>A değişiminin, aynı arginin rezidüsünü bu kez histidin aminoasitine dönüştürerek (p.(Arg2686His)) Marden Walker sendromuna yol açtığı da gösterilmiştir (76). Bunların dışında, MCC ilişkili bir gende hastalık ilişkili bir varyant, bir ailede dominant paternde kalıtılarak fenotipe neden olurken, aynı gendeki farklı bir patojenik varyant, başka bir ailede ancak homozigot formda bulunduğunda hastalık kliniği ile prezante olabilmektedir. 2021 yılında yayınlanan biallelik *FBN2* ilişkili konjenital kontraktürel araknodaktili, bu duruma demonstratif bir örnektir. Normalde, hastalık OD kalıtım ile ilişkilendirilmişken, bu çalışmadaki etkilenmiş olguda birleşik heterozigot formda iki varyant saptanmış; taşıyıcı ebeveynlerin ise sağlıklı olduğu bildirilmiştir (77). Bahsi geçen bu kompleks ilişkilerin yanı sıra, günümüzde MCC genetik etiyopatogenezinde rol aldığı bilinen toplam 402 genin 82 tanesi son 3 yıl içerisinde klinik ile ilişkilendirilmiştir. İşte bütün bu faktörler, günümüzde gen tabanlı sistematik bir sınıflamanın oluşturulmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle, Gen Ontolojisi heyecan verici bir yaklaşım olmasına rağmen, hastalığa spesifik tedavilerin geliştirilebilmesi için öncelikle ilişkili yolaklar ve bu yolakların kontrolünde görevli elemanların, yeni bilimsel veriler ile daha fazla aydınlatılması gerekmektedir (78). Atlanmaması gereken bir diğer husus, önemli bir gen veya kontrol bölgesi içeren kromozomal bölgelerin delesyonu veya duplikasyonunun da fetal hareketi etkileyebileceğidir. Bu nedenle, özellikle MCC, bilişsel geriliği ve majör veya minör konjenital anomalileri olan bireylerde kromozom ve array analizleri atlanmamalıdır.

2.4.4. Fonksiyonel Sınıflama

Ortopedistler ve rehabilitasyon uzmanları; eklem hareket açıklıkları, kontraktürlerin lokalizasyonu/şiddeti ve tutulan vücut segmentleri gibi klinik verilerin ve motor fonksiyonların değerlendirilebileceği fonksiyonel sınıflamalara ihtiyaç duymaktadır. Bu yaklaşımda amaç, klinik pratikte etkilenmiş olguların öz bakımlarını sürdürebilmeleri yönünde doğru tedavi yaklaşımının belirlenmesi, tedavinin etkinliğinin değerlendirilebilmesi ve uzun süreli izlem verilerini elde etmektir. Bu yönde yıllar içerisinde birbirinden farklı çeşitli sınıflama stratejileri önerilmiştir. Mennen, 2004 yılında MCC olgularında “disc-o-gram” isimli bir değerlendirme skalası geliştirmiş; dokuz eklem bölgesindeki eklem açıklıklarının derecesi (ROM) ve tutulan vücut segmentini göz önünde bulundurarak oluşturduğu nomogramda işaretleyip klinik izlemleri de aynı nomogram üzerine kayıt ederek terapi etkinliğini değerlendirmiştir (46). 2005 yılında Aroojis ve ark., MCC olgularını öncelikle

klirik bulguları ve ambulasyon durumlarına göre beş gruba ayırmış ve bu grupların hastaların ortopedik izleminde pratik bir metod olarak kullanılabileceğini önermiştir (47). Günümüzde evrensel olarak kabul görmüş ve rutin pratikte kullanılan bir fonksiyonel sınıflama henüz bulunmamaktadır.

2.5. Artrogripozis Fenotiplerinde Prenatal Değerlendirme

Çoklu konjenital kontraktürlerin prenatal tespiti ve etiolojinin belirlenebilmesi; başarılı bir gebelik yönetimi, ailelere hastalığın prognozu, spesifik duruma özgü önerilen doğum şekli, doğum sonrası tedavi seçenekleri, tekrarlama riski ve olası üreme seçeneklerini kapsayan kapsamlı genetik danışma verilmesinde kritik öneme sahiptir. Bu yönde optimum başarı sağlanabilmesi; doğru ve detaylı aile öyküsü alınması, uygun prenatal görüntüleme yöntemlerinin etkin kullanılması ve farklı tıp disiplinleri arası sıkı bir iş birliğinin kurulabilmesine bağlıdır.

Günümüzde fetal US gebelik boyunca rutin olarak uygulanmaktadır. Standart US'nin yanında günümüzde 3D-4D US gibi gelişen teknolojiler ile fetal manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi tamamlayıcı görüntüleme yöntemlerinin sistematik kullanılması ve tanısal genetik testlerin yaygınlaşması prenatal tanı başarısını her geçen gün artırmaktadır (79). Bu gelişmelerin yaygınlaşması ile ailelerin mevcut ve sonraki gebeliklerine yönelik genetik danışmanın özgünlüğü artacak ve ailelerin gebeliğin süreci ile ilgili karar verebilmeleri kolaylaşacaktır.

2.5.1. Aile öyküsü ve maternal risk faktörlerinin sorgulanması

Çoklu konjenital kontraktürlerin fark edildiği ilk ultrasonografik incelemeyi takiben etiolojide yer alabilecek faktörlerin değerlendirilebilmesi amacıyla detaylı aile öyküsü, maternal hastalıklar ve teratojen maruziyetlerini sorgulamak önemlidir. Kötü obstetrik öykü varlığı ve ailede konjenital kontraktür, malign hipertermi, kardiyomiyopati, nörolojik veya nöromusküler hastalıklar, motor veya bilişsel geriliği olan bireylerin varlığı sorgulanmalıdır. Çoklu konjenital kontraktürler açısından pozitif aile öyküsü veya majör risk faktörü tespit edildiği durumda fetal hareketin, ekstremiteler bulgularının ve akciğer gelişiminin değerlendirilmesi amacıyla US sıklığını artırmak gerekmektedir. Bu olgularda polihidramniyos ve fetal akinezi ve/veya eklem kontraktürlerinin başlangıç zamanının tayin edilebilmesi için her bir ekstremiteler hareketinin 14, 16, 18, 20 ve 22. haftalarda değerlendirilmesi önerilmektedir (7).

2.5.2. Prenatal ultrasonografinin artrogripozis fenotiplerini tanımadaki rolü

1980'li yıllarda obstetri pratiğinde kullanılmaya başlanmış olan US, 1990'dan beri bütün gebeliklerde rutin olarak uygulanmaktadır (80). Yüksek çözünürlüklü US, ilk trimesterde uzun kemik segmentlerinin sayısı, femur uzunluğunun ölçümü ve ellerin/ayakların konumunun değerlendirilmesi ile ekstremitte defektlerinin büyük bir kısmının saptanmasına olanak tanır. Fetal hareket kalıplarının intrauterin dönemin ilk haftalarında başlaması, fetal akinezi deformasyon sekansı ilişkili tabloların bir bölümünün prenatal tanısına olanak sağlamaktadır. Ancak, literatürde olguların sadece %25'inin 24. GH'den önce, %26 ila %66,7'sinin gebelik süresince herhangi bir dönemde tanı alabildiği; tanı başarısının US'yi gerçekleştiren uzmana ve cihazın çözünürlüğüne bağlı değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir (16, 75).

Uluslararası Obstetrik ve Jinekolojik Ultrasonografi Derneği (*International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, ISUOG)'nin 11–14. GH US taraması güncel kılavuzunda ense kalınlığı, yüz profili, ekstremitelerin üç segmenti ve majör organ anomalilerinin değerlendirilmesi yer almaktadır (81). Öte yandan, bu kılavuzda fetal kontraktürlerin ve anormal fetal hareketlerin güvenilir bir şekilde saptanmasına yönelik standart bir protokol bulunmamaktadır. Fetal hareketler (genel hareketler ve ekstremitte hareketleri), US ile 8. hafta gibi erken bir dönemde gözlemlenebilir. İlk trimester değerlendirmesinde, bu antiteler açısından şüphe uyandırabilecek iki diğer önemli ek bulgu NT artışı ve kistik higromadır. Filges ve Hall (2013), ilk trimester US'sinde kontraktürlerin tanınabilirliğini artırmaya yönelik yeni yaklaşımlar önermiştir (1). Bu stratejik izlem planı şöyle özetlenebilir:

- Rutin US izleminde PEV, kalça eklem dislokasyonu veya *clenched hands* gibi herhangi bir kontraktürün görülme riskinin yaklaşık 200 gebelikte 1 olduğu göz önüne alındığında, indekste izole bir kontraktür gözlenmesi halinde bütün eklemlerin ve ekstremitelerin muhakkak kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerekir.
- Etkilenen eklemlerin sayısı, kontraktürlerin postürü (fleksiyon/ekstansiyon) ve eklemlerde dislokasyon olup olmadığı detaylıca belgelenmelidir.
- Başta SSS ve pulmoner hipoplazi olmak üzere bütün sistemlerin değerlendirilmesi, hidropik belirtiler ve pterijiyum varlığı açısından fetal bulguların özellikle incelenmesi önemlidir.

Bu bulguların tamamı erken gebelikte olumsuz prognoza işaret eder. Benzer şekilde, US'de bu anomalilerden herhangi birinin izlenmesi, olası kontraktür varlığı açısından uyarıcı olmalıdır. Mevcut veriler, prenatal dönemde saptanabilecek anomalilerin en az %45'inin (letal antitelerin %100'ünün) ilk trimester taramasında yakalanabileceğini göstermektedir (82, 83). Dicke, Piper ve Goldfarb (2015), 3. düzey bir merkeze başvuran; polidaktili, anormal el pozisyonu (*clenched hands* veya kamptodaktili, 110 vaka), ekstremitte redüksiyon defektleri ve artrogripozis (36 vaka) dahil olmak üzere izole veya kompleks fetal ekstremitte anomalileri olan olguların tespitinde US kullanımı hakkında retrospektif bir inceleme yayınlamıştır (84). Bu çalışmada, fetal görüntülemenin yetkin uzmanlar tarafından yapıldığında artrogripozis tanılı 36 vakanın %90'ından fazlasının intrauterin dönemde tespit edilebildiği; anormal el pozisyonu veya artrogripozisi olan olguların yaklaşık %60'ının (84/146) 22. haftadan önce tanı aldığı bildirilmiştir. Ekstremitte anomalileri olan 36 fetusun dahil edildiği daha küçük bir seride (PEV, redüksiyon defekti, iskelet displazisi, sirenomeli, sindaktili, malpozisyon, ekstremitte displazisi) olguların %78'sinin prenatal US ile tanı alabildiği; bunların %64'ünün ilk trimesterde saptandığı ifade edilmiştir (85). Bununla birlikte, çok sayıda prenatal US çalışmasına rağmen, özellikle fetal hareketlerin rutin olarak incelenmemesi nedeniyle artrogripozis olgularının büyük bir kısmı, rutin obstetri kliniklerinde 24. GH'den önce saptanamamaktadır (16).

İkinci trimesterde eklem pozisyonları, pulmoner hipoplazi, kas dokusu, kemik büyümesi, majör organ anomalileri saptanabilmekte ve fetal hareketler daha detaylı değerlendirilebilmektedir (86). Annenin fetal hareketlerde azalma hissettiğini ifade etmesi veya US'de PEV gibi eklem bulgularının saptanması gibi şüpheli durumların varlığında, sonografi konusunda deneyimli bir uzman tarafından 45 dakikaya kadar her bir ekstremitede fetal hareketi incelemek gerekir. Aile öyküsü varlığında, fetal hareketlerin 14, 16, 18, 20 ve 22. haftalarda ve tekrar ikinci trimesterin ortalarında US ile değerlendirilmesi önerilmektedir. İskelet kası disfonksiyonu ile ilgili diğer olası bulgular; omuzlarda internal rotasyon ve addüksiyon, dirsek ve diz eklemlerinde fleksiyon veya ekstansiyon, el bileklerinde ulnar deviasyon, *clenched hands*, kalça ekleminde fleksiyon ve sıklıkla dislokasyon olarak sıralanabilir. Fetal harekette azalmanın dolaylı US bulguları; fetal akinezi deformasyon sekansı olarak da adlandırılan bir dizi anomaliyi kapsamaktadır. Bu bulgular, IUGG, yutma disfonksiyona bağlı polihidramniyos ve mide cebinin izlenememesi, hipertelorizm, mikro/retrognati ve düşük kulaklar gibi kraniyofasiyal anomaliler, kısa boyun, skolyoz ve kısa göbek kordonu olarak sayılabilir. Fetal hareketsizlik; kemik büyümesinin azalmasına,

hipoekojeniteye, hipomineralizasyona ve uzun kemiklerde fraktüre, malprezantasyona (makat geliş vb.) ve sezaryen doğum ihtiyacına yol açabilir (87). Bu tür belirtiler ve komplikasyonlar genellikle ikinci veya üçüncü trimesterin sonlarında ortaya çıkar ve artrogripozis için özgün değildir. Üçüncü trimesterde fetal hareketlerin izlenmesi, kardiyotokografi ve amniyotik sıvı miktarının ölçümü gibi dolaylı göstergelerle fetal biyofiziksel profilin değerlendirilmesi önerilir. Polihidramniyos ve fetal hidrops, ileri gebelik haftalarında kötü prognostik faktörlerdir. MCC fenotiplerinde 1.,2. ve 3. trimesterde izlenebilecek USG bulguları Tablo 2-9’da özetlenmiştir.

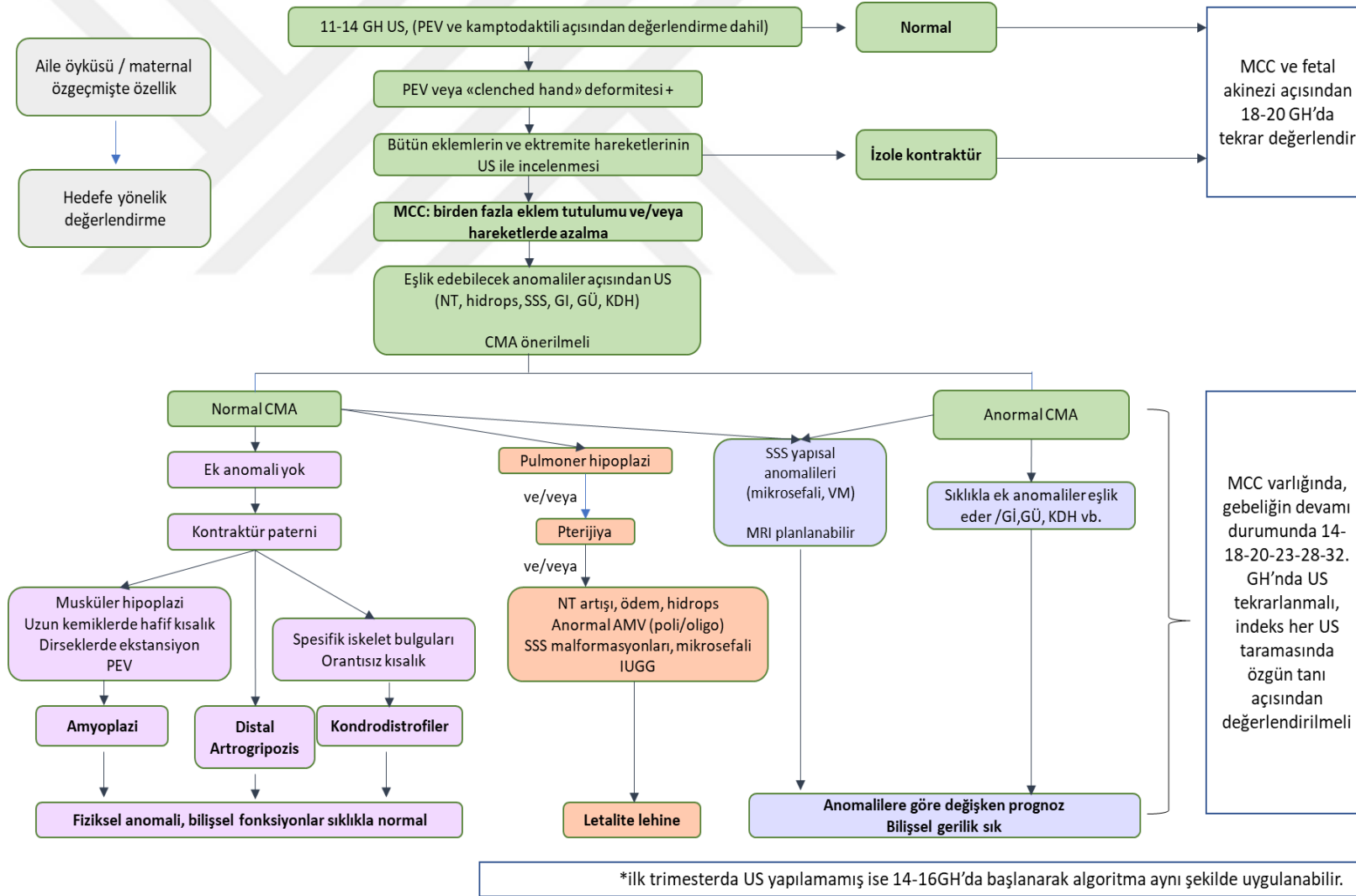
Tablo 2-9: Çoklu konjenital kontraktür fenotiplerinde izlenebilecek prenatal US bulguları

	Ultrasonografik bulgular	
	1. trimester	2.-3. trimester
Kas-iskelet	Fleksiyon/ekstansiyon anomalileri	Fleksiyon/ekstansiyon anomalileri Trunkal hiperekstansiyon Pterijiya, azalmış kas kütlesi Kemiklerde hipomineralizasyon, fraktürler Skolyoz <i>Clenched hands, Rocker bottom feet, PEV</i>
Santral sinir sistemi	Hidrosefali	VM, KK anomalileri Posterior fossa anomalileri Serebellar/vermiyan hipoplazi Sulkasyon/girasyonda gecikme Polimikrogiri, mikrosefali
Kraniyofasiyal		<i>Beak-like</i> burun, YDD, mikro/retrognati
Kardiyak		Kardiyomegali, perikardiyal efüzyon, TUA
Torakal		Dar toraks, pulmoner hipoplazi, plevral efüzyon İnce kotlar Konjenital diyafragma hernisi
Gastrointestinal/Genitoüriner		Mide cebinin izlenememesi Gastroşizis Hidronefroz
Diğer	NT artışı Kistik higroma Ödem, hidrops Fetal akinezi Kısa umbilikal kord	Kistik higroma, artmış ense pilisi, hidrops, ödem Poli/oligohidramniyos, yutmada azalma Fetal akinezi IUGG, malprezantasyon

PEV, Pes ekinovarus; VM, Ventrikülomegali; KK, korpus kallozum; YDD, Yarı damak-dudak; TUA, Tek umbilikal arter; NT, Nükal translüsensi; IUGG, intrauterin gelişme geriliği

Hamilelik sırasında fetal hareketlerin rutin değerlendirilmesine yönelik normatif veriler, standart bir izlem protokolü oluşturmak için genel olarak yetersizdir. 2018 yılında Tjon ve arkadaşları, fetal motor değerlendirmede; belirli hareket kalıplarının gözlemlenmesi, genel hareketlerin nitelik ve niceliği ve izole kol-bacak hareketleri olmak üzere üç parametrenin esas alınabileceğini önermiş; bu özelliklerin artrogripozis tablosunun *in utero* tespiti için önemini vurgulamıştır (88). Ayrıca yine aynı çalışmada, 20. gestasyon haftasındaki normal bir fetusta ardışık hareketler arasındaki maksimum duraklama 13 dakika olduğu için (89) US sırasında 13 dakika veya daha uzun süre ekstremita hareketi izlenemez ise gözlem süresinin iki katına çıkarılması ve zamana bağlı değişiklikleri tespit etmek için 2 haftalık aralıklarla US incelemesinin tekrarlanması önerilmiştir. Çoklu konjenital kontraktürlerin sonografik tanı algoritması Şekil 2-7’de özetlenmiştir.

Son olarak; fetal pozisyon, gestasyon haftası, amniyotik sıvı miktarı ve maternal obezite gibi faktörlerin sonografik görüntülemeyi etkileyebileceği ve bu grubun en sık alt tipi olan amyoplazinin prenatal dönemde tanı başarısının düşük olduğu akılda tutulmalıdır. Filges ve Hall (2013), 1990'dan itibaren amyoplazi ile doğan 107 olgunun kayıtlarını incelemiş; olguların %75'inden fazlasının postnatal tanı aldığını bildirmiştir (1). Prenatal US ile saptanan bulguların postnatal/postmortem klinik veya patolojik değerlendirme ile konfirme edilmesi ve detaylandırılması doğru tanı için esastır.



Şekil 2-7: Çoklu Konjenital Kontraktürlerin sonografik tanı algoritması

Filges & Hall, 2013 çalışmasından uyarlanmıştır (1).

2.5.2.1. Letalitenin belirlenmesi

Artrogripozis ilişkili fenotipler açısından, özellikle 12. GH’de yapılan US değerlendirmesinde fetal hareketsizliğin belirgin olması fenotipin sıklıkla letal olduğuna işaret etmektedir (43). Letal formlarda sıklıkla pterijiya ve erken başlangıçlı pulmoner hipoplazi (ve daha sonra torasik hipoplazi) tabloya eşlik etmektedir. Bu durum, US izleminde fetal solunum hareketlerinde azalma şeklinde de gözlenebilir (1). Ayrıca, ilk trimesterde saptanan ağır PEV ve ellerde, bileklerde, dirsek ve dizlerde şiddetli sabit fleksiyon deformitelerinin varlığı, letal formlar ile ilişkilendirilmiştir (90). Artmış ense kalınlığı gibi diğer sonografik belirteçler, özellikle ek bulguları olan fetusta bir sendromun komponenti olarak değerlendirilir ve letalite lehine yorumlanır (91). İlerleyen gebelik haftalarında “letal konjenital kontraktür sendromları” grubunda değerlendirilen bazı olguların, özellikle birinci ve erken ikinci trimesterde yapılan US görüntülemelerinde, bulgu olarak sadece ense kalınlığı artışı bildirilmiştir (90). Bu nedenle, 10-14. gebelik haftalarında ense kalınlığında artış saptanması, fetal karyotiplenmenin normal sonuçlanması durumunda, ayırıcı tanıda letal artrogripozis fenotipleri olasılığını da akla getirmelidir. Öte yandan, ilk trimesterde “kistik higroma” hem letal hem de non-letal AMC formlarında gözlenebilir (48). İntrauterin büyüme kısıtlılığı, kistik higroma, hidrops ve şiddetli oligo/polihidramniyos genellikle kötü prognostik faktörler olmakla birlikte altta yatan duruma özgü değildir. Ayrıca, bu bulgulara ikinci trimester sonlarına doğru gerileme de görülebilir. Bazı MCC formlarında, ilk trimesterin sonları ve ikinci trimesterin başlarında fetal US’de patolojik bulgu saptanamayabilir; bu nedenle özellikle aile öyküsü varlığında, erken gestasyon haftalarındaki normal sonografik bulgular dikkatlice yorumlanmalıdır.

2.5.2.2. Antenatal US bulguları ve ayırıcı tanı

Kontraktürlerle seyreden genetik kökenli olan veya olmayan çok sayıda antite olduğu göz önüne alındığında, bu grupta prenatal tanı ve prognostik süreci kestirebilmenin kolay olmadığı anlaşılabilmektedir. Ayırıcı tanıyı daraltabilecek bilişsel gerilik gibi bulguların prenatal dönemde değerlendirilememesi, hamilelik süresinin ve ilk sonografik patolojik bulgunun saptanma zamanının tanı koyabilmek için ayrılacak zamanı sınırlandırması gibi faktörler özgün tanı koyabilme sürecini daha da güçleştirmektedir. Bu nedenle Filges ve ark. (2019) hastalıkların sıklığını da göz önüne alarak prenatal dönemde klinik pratikte uygulanabilir tanısal algoritmalar önermiştir (16). Bu yaklaşım kapsamında olgular; primer ekstremitte tutulumu, letal formlar ve bilişsel tutulumun olası olduğu antiteler olarak üç grupta

değerlendirilmektedir. Sık görülen ve özgün bulgular ile tanınabilecek bir grup antite bu algoritmik yaklaşıma göre Tablo 2-10'da detaylandırılmıştır.

2.5.2.2.1. Primer ekstremite tutulumu ile seyreden formlar

Geç birinci veya erken ikinci trimester gibi erken gebelik haftalarında MCC saptanması durumunda, ayırıcı tanıda ilk düşünülmesi gereken antite tüm vakaların yaklaşık 1/3'ünü oluşturan Amyoplazi tablosudur (16). Amyoplazide, belirli gastrointestinal anomaliler ve olası ekstremite redüksiyon defektleri dışında ek sistemik tutulum beklenmemektedir. Amyoplazinin tipik US bulguları ve eşlik eden ek özellikleri Tablo 2-10'da özetlenmiştir. Distal eklemlerle sınırlı MCC varlığında ön planda DA grubu düşünülmelidir. Bu grupta yer alan en az 19 farklı alt tip mevcut olup bu antitelerde iki ayrı klinik sınıflama sistemi (Hall ve Bamshad) kullanılarak ayırıcı tanı daraltılabilir (Tablo 2-8).

DA fenotiplerinin moleküler etiyopatogenezinde kas yapısında veya işlevinde yer alan proteinleri kodlayan genler yer almaktadır; ancak bütün alt tiplerin moleküler temeli henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Yeni nesil teknolojilerin kullanımının artmasıyla bazı DA alt tiplerinin fenotipik ve moleküler olarak birbiri ile örtüşen bulgularının olduğunun saptanması, başlangıçta farklı antiteler olarak değerlendirilen bu hastalıkların bir kısmının mutasyonun değişken ekspresivite göstermesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (76).

DA formları sıklıkla OD kalıtlıdır (istisnai olarak bazı alt tiplerde X'e bağlı kalıtım gözlenmiştir). Bu nedenle prenatal MCC saptanması durumunda aile öyküsü ve ebeveynlerin klinik muayenesi bu grupta özellikle önem teşkil etmektedir. En yaygın DA formları ve prenatal US bulguları ile tanınabilecek olan alt tipler Tablo 2-10'da belirtilmiştir. Diğer DA formlarının bir kısmı US ile saptanamayacak ek anomaliler ile seyretmektedir (sensörinöral işitme kaybı, oftalmopleji vb.). MCC ile seyreden kondrodizplaziler de primer ekstremite tutulumu grubunda değerlendirilmektedir. Bu grupta spesifik iskelet anomalilerin özgün tanıya yönlendirebilmesi US'nin önemini daha da artırmaktadır. Örneğin; kampomelik displazide saptanan tübüler kemiklerde kısalık ve angülasyon, metatropik displazide kaudal uzantı, Larsen sendromunda izlenen eklem dislokasyonları gibi bulgular prenatal US ile tanınabilmektedir.

İnce, kısa, hipomineralize kemikler veya fraktürlerin özgün bulgular olmayabileceği; fetal akinezi tablosuna sekonder gelişebileceği akılda tutulmalıdır. Özgün bulgular varlığında klinik tanı moleküler analizler ile desteklenmelidir. Nöromusküler hastalıklar sıklıkla prenatal dönemde bulgu vermemekte, konjenital kontraktürlerden ziyade neonatal hipotoni ile prezante

olmaktadır. Bununla birlikte, literatürde spinal müsküler atrofi (SMA), konjenital miyastenik sendromlar, konjenital müsküler distrofiler ve miyopatiler gibi bir grup nöromüsküler hastalıkta fetal hareket azlığı sıklıkla bildirilmiştir. Fetal akinezi, bir spektrumda yer alan hastalıkların şiddetli formlarında ortaya çıkıyor gibi görünmektedir. Örneğin, monoallelilik mutasyonların geç başlangıçlı hastalığa neden olduğu genlerdeki biallelik varyantlar veya *SMN1* homozigot delesyonunda *SMN2*'nin tek kopya olması gibi belirli moleküler mekanizmalar sonucunda fetal akinezi tablosu daha çok karşımıza çıkmaktadır (57).

2.5.2.2.2. Letal formlar

Pre/perinatal letal seyreden antitelerin neredeyse tamamı gebeliğin ilk üç ayından itibaren US bulgusu vermektedir. Bu anlamda bir istisna olan SMA, intrauterin dönemde çok nadiren bulgu vermekte; US bulgusu olan grupta dahi izlem üçüncü trimestera kadar normal seyretmektedir. Letalite lehine yorumlanan US bulguları “2.5.2.1. *Letalitenin belirlenmesi*” başlığında irdelenmiştir. Pulmoner hipoplazi/torasik hipoplazi, pterijiyum, azalmış fetal solunum hareketleri, IUGG, kistik higroma, hidrops ve şiddetli oligo veya polihidramnios bu grupta beklenen genel US bulguları olup altta yatan duruma özgün değildirler. Letal seyreden bir grup antite ve bu antitelerde saptanabilecek US bulguları Tablo 2-10’da özetlenmiştir.

2.5.2.2.3. Bilişsel gerilik ile seyreden fenotipler

Fetal hareket azlığı varlığında *in-utero* nöromüsküler gelişimi engelleyebilecek SSS malformasyonları US ve MRG ile mutlaka araştırılmalıdır. Başta trizomi 18 ve mozaik trizomi 8 olmak üzere kromozom anomalileri ve bazı mikrodelsiyon sendromları konjenital kontraktürlere neden olur ve bu hastalıklar sıklıkla bilişsel gerilik ile seyreder. Fetal MCC saptanması durumunda ilk basamak testi olarak kromozomal mikroarray testi önerilmektedir (1). Bunların yanı sıra, YND teknolojileri ile her geçen gün artrogripozise neden olan yeni genler keşfedilmektedir. Bu nedenle karyotip ve array analizleri normal sonuçlanan olgularda MCC gen paneline alternatif olarak TED analizi de planlanabilir.

Tablo 2-10: Sık görülen MCC fenotiplerinde antenatal US bulguları

Ayırıcı Tanı	Prenatal başlangıç zamanı	Majör bulgular	AMV	Ek anomaliler	Kalıtım paterni	Prognoz	Bilişsel fonksiyonlar
Primer ekstremitte tutulumu ile seyreden antitelere US bulguları							
Amyoplazi En sık MCC formu (%30)	1. trimester/ erken 2. trimester	Belirgin kas hipoplazisi Simetrik ekstremitte tutulumu (izole üst/alt olabilir) Tipik postür: dirseklerde ekstansiyon, el bileklerinde fleksiyon-ulnar deviasyon, dizlerde fleksiyon/ekstansiyon, omuzlarda iç rotasyon, ağır PEV, kalçada dislokasyon	Sıklıkla N (~%10↓)	Karın duvarı defektleri Intestinal atrezi Ekstremitte redüksiyon defektleri	Sporadik	Fizyoterapiye yanıtı kontraktürler	N
Distal artrogripozis (DA) (~19 alt tip)	1. trimester	DA tip 1: <i>clenched</i> eller, PEV, ± kalça dislokasyonu, skolyoz Freeman–Sheldon sendromu (FSS): yüz hareketlerinde azalma, mikrostomi Sheldon-Hall sendromu: fasiyal kas tutulumu, mikrostomi [en sık alt tip] Gordon sendromu: ± yarı damak	N/↑	FSS: fetal dudak boyutlarında azalma* <i>*Vimercati ve ark. (92)</i>	Sıklıkla OD (OR ve XL formlar mevcut)	Değişken	Sıklıkla N
Kondrodizplaziler	Hastalığa bağlı değişken	Orantısız büyüme, spesifik iskelet anomalileri Örnek: Kampomelik displazi (KD), Dyggve-Melchior-Clausen, Diastrofik displazi (DD), Kniest displazi, Metatropik displazi (MD) vb.	N/↑	Hastalığa bağlı değişken KD: “sex reversal” DD: <i>hitchhiker</i> başparmaklar MD: kaudal uzantı	XL, OD, OR	Hastalığa spesifik komplikasyonlar	Genellikle N
Letal seyreden formlarda US bulguları							
Pena- Shokeir fenotipi	1. trimesterden itibaren	Ağır pulmoner hipoplazi, IUGG, kraniyofasiyal anomaliler, kısa umbilikal kord, kısa barsak	↑	Hidrops, ince kotlar, yarı damak	OR	Letal	Letal
COFS sendromu	1. trimesterden itibaren	SSS yapısal anomalileri (CCA, lizensefali, serebellar hipoplazi), mikroftalmi/katarakt, mikrosefali	↓/N/↑	Renal anomaliler, dismyelinizasyon, timik hiperplazi	OR	Letal	Letal

Ayrııcı Tanı	Prenatal başlangıç zamanı	Majör bulgular	AMV	Ek anomaliler	Kalıtım paterni	Prognoz	Bilişsel fonksiyonlar
Letal multipl pterijiyum sendromu (LMPS)	1. trimester/erken 2. trimester	Multipl pterijiyum, fleksiyon kontraktürleri, kistik higroma, hidrops, mikrognati, pulmoner hipoplazi, IUGG	↑	Eklem dislokasyonları, kardiyak hipoplazi, kuşkulu genitalya, konjenital kemik füzyonları	OR, XL?	Letal	Letal
Letal konjenital kontraktür sendromları (LCCS)	1. trimester	Jeneralize fleksiyon kontraktürleri, IUGG Tip1'de belirgin hidrops; ancak tip2 ve tip3'te ödem beklenmez.	↑	Tip I (Fin tipi): hidrops pulmoner hipoplazi Tip II (İsrail-Bedevi): distandü mesane	OR	Letal	Letal
Spinal musküler atrofi (SMA) -SMA tip 0/tip1 -X'e bağlı SMA	Geç	SMA tip 0 (Letal) tip olgularında ve nadiren SMA tip 1'de <i>in utero</i> kontraktürler görülebilir. X'e bağlı SMA'da kontraktürler ve konjenital fraktürler sıklıkla izlenir.	N	Ağır olgularda KKH (VSD/ASD)	OR	Neonatal letal	Letal
Bartsocas-Papas Sendromu	1. trimester/erken 2. trimester	Yaygın fleksiyon deformitesi, belirgin popliteal webler [ödem beklenmez]	↓/N/↑	YDD, fasiyal kleftler, sindaktili	OR	Çoğunlukla letal	Yaşayan olgularda N
Neu-Laxova sendromu	1. trimesterden itibaren	NT↑, belirgin proptozis, hidrops, ağır SSS anomalileri (CCA, lizensefali, serebellar hipoplazi, DWM), mikrosefali, IUGG	↑	Açık göz kapakları, kifozis, sindaktili, renal pelviyektazi	OR	Letal	Letal
Bilişsel gerilik ile seyredabilen bazı antitelerde US bulguları							
Kromozom anomalileri (Gros, submikroskobik, mozaik)	1. trimesterden itibaren	Tutulan kromozom segmentine bağlı değişken bulgular Artrogripozisle seyreden kromozomal anomaliler Tablo 2-17' de detaylandırılmıştır.	Değişken	Ek multisistemik yapısal anomaliler Trizomi 18: IUGG, mikrosefali Trizomi 8 mozaizmi: KKH, hidronefroz, dismorfizm	-	Değişken	Bilişsel gerilik sık

Ayırıcı Tanı	Prenatal başlangıç zamanı	Majör bulgular	AMV	Ek anomaliler	Kalıtım paterni	Prognoz	Bilişsel fonksiyonlar
Musküler distrofi /distroglukanopatiler	2., 3. trimester	Hidrocefali, lizensefali/polimikrogiri/pakigiri, serebellar hipoplazi, beyin sapı hipoplazisi, CCA, katarakt	↑/N	Meningoensefalosel, YDD, genital anomaliler, persistan hiperplastik primer vitreus	OR	Değişken	Beyin/göz tutulumunda bilişsel gerilik eşlik eder.
Konjenital myopatiler	<i>In-utero</i> başlayabilir, sıklıkla neonatal başlangıçlı	Azalmış yüz hareketleri, azalmış kas kütlesi, IUGG, pulmoner hipoplazi, PDA Örnek: Nemalin myopati, Santral kor hastalığı	Olası ↑	Nemalin myopati: addükte başparmaklar (1. metakarp kısalığı), mikropenis	Sıklıkla OR	Değişken	Değişken
Konjenital myotonik distrofi	2.,3. trimester	<i>Tent-shaped</i> ağız, azalmış solunum hareketleri, fetal makrosefali	↑	Kardiyak ileti bozuklukları, ± posterior horn'da hafif VM, hidronefroz	OD, trinükleotid tekrar hastalığı	Infantil mortalite %20	Bilişsel gerilik sık
SSS anomalilerine sekonder gelişen MCC	1.,2.,3. trimester (hastalığa bağlı başlangıç zamanı değişken)	Hastalığa bağlı değişken bulgular Örnek: Nöral tüp defektleri, Akrokallozal sendrom (ACS), Aicardi–Goutières sendromu (AGS), Ritscher–Schinzel sendromu (3C), Fowler-tipi hidranensefali	Değişken	Hastalığa bağlı değişken ACS: CCA, DWM, polidaktili AGS: intrakraniyal kalsifikasyon 3C: vermis hipoplazisi, DWM	Hastalığa bağlı değişken	Değişken	Bilişsel gerilik sık

PEV, Pes ekinovarus; N, Normal; DA, Distal artrogripozis; FSS, Freeman-Sheldon sendromu; XL, X'e bağlı; OD, Otozomal dominant; OR, Otozomal resesif; KD, Kampomelik displazi; DD, Diastrofik displazi; MD, Metatropik displazi; COFS, Serebro-okülo-fasiyo-skeletal sendrom; CCA, korpus kallozum agenezisi; DWM, Dandy-Walker malformasyonu; IUGG, İntrauterin gelişme geriliği; KKH, Konjenital kalp hastalığı; YDD, Yarı damak-dudak; PDA, Patent duktus arteriyozus; VM, Ventrikülomegali; ACS, Akrokallozal sendrom; AGS, Aicardi–Goutières sendromu; 3C, Ritscher–Schinzel sendromu

2.5.3. Fetal Manyetik Rezonans Görüntüleme (Fetal MRG)

Fetal manyetik rezonans görüntüleme (MRG), 1983'ten beri prenatal tanıda US'nin tamamlayıcısı olarak kullanılan bir görüntüleme yöntemidir (93). Gadolinyum kontrastsız MRG, ikinci ve üçüncü trimesterde iyi bir güvenlik profiline sahip olup hızlı görüntüleme sağlayan sekansların uygulamaya girmesiyle fetal hareketten kaynaklanan artefaktlar da en aza indirilmiştir. Artrogripozis olgularının etiolojisinde sıklıkla nörolojik patolojilerin olduğu göz önüne alındığında, ikinci veya üçüncü trimesterin sonlarında yapılan fetal MRG, SSS anomalilerin tanımlanmasında ve hipotoniye sekonder gelişebilecek pulmoner hipoplaziye yönelik akciğer hacimlerinin değerlendirilmesinde yararlı bir tanı aracıdır. Altı fetal akinezi olgusunun MRG incelemesinde; üç olguda US'ye ek olarak pulmoner hipoplazi, bir olguda daha sonra patolojik inceleme ile de doğrulanan bazal ganglia lezyonları izlenmiş ve fetal hipo/akinezi ve kas hipoplazisi bulgularının net bir şekilde değerlendirilebildiği gösterilmiştir (94). Eklem tutulumu ve atrofi-yağ doku replasmanı gibi kas-iskelet sistemi patolojileri ve fasiyal dismorfik özellikleri de tanıyabilmesi, MRG incelemesinin prenatal tanıda yerini almasını sağlamıştır (5). MCC fenotiplerinde MRG ile saptanabilecek bulgular Tablo 2-11'de detaylandırılmıştır.

Tablo 2-11: Çoklu konjenital kontraktür fenotiplerinde olası fetal MRG bulguları

Kas-iskelet sistemi	Fleksiyon/ekstansiyon anomalileri Kas atrofi Skolyoz, uzun kemiklerde kısalık <i>Rocker bottom feet</i> , pes ekinovarus
Santral sinir sistemi	Ventrikülomegali Kallozal anomaliler Pontoserebellar hipoplazi Kistik basal ganglia lezyonları Lisensefali, Polimikrogiri, Mikrosefali
Kraniyofasiyal	Mikroti, Yarı damak/dudak, Mikro/retrognati
Toraks	Pulmoner hipoplazi
Diğer	Kistik higroma Fetal akinezi Poli/oligohidramniyos Intrauterin büyüme-gelişme geriliği Yutma-diyafram hareketleri (*dinamik MR ile)

2.5.4. Prenatal İnvazif Tanı ve Genetik Danışma

Postnatal grupta dahi kesin tanıya ulaşmanın güç olduğu bu grupta prenatal sürecin yönetiminin oldukça kompleks olduğu aşîkârdır. Uygun genetik danışmanın verilebilmesi, detaylı ve sık aralıklarla yapılan US'nin başarısı ile korelasyon göstermektedir. Güncel literatürde, antenatal dönemde USG bulguları ile ayırıcı tanıda artrogripozis fenotipleri düşünülen bir olguda zaman kaybetmeden invazif yöntemlerle (amniyosentez, koryon villus örnekleme, kordosentez) kromozom anomalileri ve submikroskobik delesyon/duplikasyon sendromlarının dışlanması önerilmektedir. Çeşitli endikasyonlarda, gebelik haftasından bağımsız olarak, farklı doku örnekleri özellikle tercih sebebi olabilir. Örneğin fetal akinezinin sık bir bulgusu olan IUGG tabloya eşlik ediyorsa plasental mozaizm olasılığı nedeniyle CVS girişimi gebelik haftası ileri olsa dahi uygun yöntem olacaktır. Karyotip veya array analizinde herhangi bir patoloji saptanan olguda aileye hastalığa özgü genetik danışma verilmeli; bu testlerin normal sonuçlandığı olgularda ise TED analizi seçeneği sunulurak aileler test hakkında bilgilendirilmelidir. Güncel iki çalışmaya göre prenatal dönemde TED başarısı endikasyona bağılı olarak %3,2-15,4 arasında saptanmıştır (95, 96). Ancak, gebelik nedeniyle tanıda zaman kısıtlılığı, saptanabilecek olası varyantların klinik korelasyonunun net bir şekilde değerlendirilememesi gibi faktörler süreci daha da zorlaştırmaktadır. Göz ardı edilmemesi gereken bir durum da etiyolojide belirgin ekspresivite değişkenliği gösteren monoallelik varyantların varlığıdır. Bu nedenle OD kalıtılan hastalıkların hafif manifestasyonu durumunda ebeveynlerin daha önce tanı almamış olabileceği akılda tutulmalı ve bu bireylerin detaylı fizik muayenesi atlanmamalıdır. US izleminde akciğer hipoplazisi, hidrops, NT artışı gibi letalite lehine bulgular veya yapısal SSS anomalileri, hidrosefali gibi bilişsel fonksiyonlar açısından belirgin kötü prognostik faktörler saptanırsa, aileye gebeliğin devamı hakkında karar verebilmelerini kolaylaştırabilmek adına durum açık bir şekilde bildirilmelidir. Böyle bir senaryoda, aile gebeliğin terminasyonu lehine karar verme eğiliminde ise tanıya yönelik moleküler tetkikler postmortem planlanabilir. Bununla birlikte, aileler US'de normal serebral/serebellar anatomi varlığında dahi bilişsel geriliğin eşlik edebilme olasılığı hakkında bilgilendirilmeli ve ailelere gebeliğin devamı hakkında karar verebilmeleri için zaman tanınmalıdır. Array analizi normal sonuçlanan, ek sistemik anomalisi bulunmayan (spesifik gastrointestinal sistem/redüksiyon defektleri dışında) ve sıklıkla normal AMV ölçümü olan bir fetusta tipik kontraktür paterni (tübüler kemiklerde hafif kısalık, musküler hipoplazi, dirsek ekstansiyonu ve PEV) Amyoplaziyi düşündürmektedir. Özellikle gebeliğin devam kararı eğiliminde olan aileler açısından Amyoplazi ihtimalinin yüksek olması rahatlatıcı bir faktör olabilir. Kontraktürlerin bir

kondrodizplaziye sekonder geliştiği gözlenirse yine US'de letalite lehine bulgu varlığı (toraks çevresinin abdominal çevreye oranının $<0,618$ ve/veya femur uzunluğunun abdominal çevreye oranının $<0,16$ olması) araştırılmalı ve genetik danışma buna göre şekillendirilmelidir (97).

2.6. Fetusun Postmortem Değerlendirilmesi

MCC bulguları olan bir fetusun özgün tanısında en doğru yaklaşım, ultrasonografik incelemeye ek olarak; detaylı aile öyküsünün alınmasının ardından postmortem/postnatal klinik, radyolojik (x-ray, gerekli durumlarda fetal MRG, nadiren mikro-BT gibi yöntemler) ve histopatolojik bulgular ile moleküler analiz sonuçlarının birlikte değerlendirilmesidir. US'de letalite/ağır hastalık yönünde bulguların varlığında, ailenin genetik danışmayı takiben gebeliğin terminasyonu lehine karar vermesi durumunda; ebeveyn onamı ile postmortem fetal muayene (dış bakı muayenesi, fotoğraflama ve radyografi, otopsi), DNA ekstraksiyonu ve bankalama rutin olarak önerilmelidir. Ayrıca, bu fetuslarda prenatal invazif girişim olarak kardiyosentez veya kordosentez tercih edilmiş ise fetal kanda CK düzeyi ölçümünün klinik tanıya yardımcı olabileceği unutulmamalıdır (2).

Merkezimizde, antenatal dönemde saptanan etiyolojisi aydınlatılmış veya aydınlatılmamış konjenital anomaliler, maternal ve/veya fetal risk faktörleri (erken membran rüptürü, uteroplental yetmezlik) gibi herhangi bir nedenle tıbbi terminasyon ürünü bütün fetuslar, *in utero mort fetalis* (IUMF) olarak sonlanan gebelik ürünleri ve neonatal dönemde kaybedilen olgular postmortem klinik genetik muayeneye tabi tutulmaktadır. Bu yaklaşım ile fetal ekstremitelerin ve eklem kontraktürlerinin detaylı incelenmesi ve fizik muayene ile saptanabilecek ek konjenital anomaliler/sekonder malformasyonların saptanması amaçlanmaktadır.

2.6.1. Detaylı aile öyküsü, pre/perinatal dönemin irdelenmesi

Klinik genetik değerlendirme, detaylı aile öyküsünün sorgulanması ve en az üç kuşağı içeren aile ağacının çizilmesi ile başlar. MCC bulguları varlığında öyküde özellikle sorgulanması gereken durumlar Tablo 2-12'de özetlenmiştir. Fetal akinezi durumunda, anne adayında anti-asetilkolinesteraz antikor testleri ve konjenital miyotonik distrofi açısından genetik inceleme önerilebilir.

Tablo 2-12: MCC bulguları olan gebelik ürününe yaklaşım kapsamında sorgulanması gereken durumlar

Aile öyküsü
1. Ailede konjenital kontraktürleri olan bireyler 2. İntrafamilyal varyabilite olasılığı (Hafif etkilenmiş ebeveyn/kardeş) 3. Akrabalık/yakın yerleşim yerlerinden gelen ebeveynler 4. İleri anne/baba yaşı i. Maternal: bazı kromozom anomalileri ii. Paternal: OD tek gen hastalıkları 5. Obstetrik öykü (art arda etkilenmiş gebelik ürünleri varlığında fetal nörotransmitterlere karşı maternal antikolar dışlanmalı)
Gebelik Öyküsü
1. Azalmış fetal hareketler 2. Maternal hastalıklar (myotonik distrofi, myastenia gravis, multipl skleroz, diabetes mellitus) 3. Maternal infeksiyonlar (Rubella, Rubeola, Cocksackie, Entero, Akabane) 4. Maternal ateş/hipertermi öyküsü 5. Teratojen maruziyeti (alkol, kürar, metokarbamol, mizoprostol, fenitoin, bağımlılık yapıcı ajanlar, radyasyon) 6. AMV (poli/oligohidramniyos) 7. Uterin anomaliler (yapısal/tümöral) 8. Diğer maternal komplikasyonlar (ağır hipotansiyon, şiddetli hipoksi (CO zehirlenmesi vb.), düşük tehdidi öyküsü, başarısız gebeliği sonlandırma girişimleri, erken haftada amniyosentez öyküsü, abdominal travma)
Perinatal öykü
1. Malprezantasyon (Makat veya transvers geliş) 2. Neonatal fraktür varlığı 3. Plasental anomaliler, amniotik bant, kısa umbilikal kord, kordon dolanması 4. Prematürite 5. Çoğul gebelik varlığı

2.6.2. Postmortem klinik değerlendirme

Postmortem dış bakı muayenesi; postnatal klinik genetik muayene ile benzer şekilde saçlı deriden ayak tırnağına kadar tüm vücut değerlendirmesini kapsamaktadır.

2.6.2.1. Antropometrik ölçümler

Herhangi bir nedenle tıbbi terminasyon uygulanmış bütün fetusların postmortem fizik muayenesi antropometrik ölçümler ile başlar. Boy, tartı, baş çevresi, kulaç mesafesi (MCC ile seyredebilen iskelet displazisi şüpheli olgularda toraks çevresi, üst segment/alt segment oranı (U/L), parmak ve el boyu gibi ek parametreler) ölçülüp gebelik haftasına göre normal değerlerle karşılaştırılarak değerlendirilir.

2.6.2.2. Kraniyal ve fasiyal dismorfik değerlendirme

Letal artrogripozis formlarının bir kısmına fasiyal dismorfik bulgular eşlik eder; ancak antenatal dönemde iki boyutlu US, bu değişiklikleri saptama açısından yetersiz kalabilir. Bu durum, MCC fenotiplerinde özellikle özgün tanıya yönlendirebilen ve US ile gözlenmesi mümkün olmayan minör bulguların (*SEMA3A* varyantlarında posthelikal çizgilenme (98); Freeman-Sheldon sendromunda çenede H şeklinde gamzelenme (99); *IRF6* ilişkili popliteal pterijiyum sendromundaki alt dudak pitleri (100); *ECEL1* ilişkili DA tip 5'te gözlenen pretibial vertikal çizgilenme (101); Amyoplazi/Bohring-Opitz sendromunda frontal nevus flammeus (102) vb.) postmortem fizik muayene ile saptanabilecek olması, incelemenin önemini artırmaktadır. Fetal yüzün embriyolojik gelişim süreçleri göz önünde bulundurularak, incelemenin gebelik haftasına uygun değerlendirilmesi de önemli bir noktadır. Örneğin, erken fetal dönemde interkantalar mesafenin standart ölçümlere kıyasla daha geniş olması veya 20. GH'ye kadar kulakların dış kantustan çizilen transvers çizginin altında gözlenmesi normaldir. Epikantus, basık burun kökü, antevert burun delikleri sağlıklı fetuslarda da sık izlenebilen yüz bulgularıdır.

Fetal muayene kraniyal değerlendirme ile başlar. Kafatasının şekli ve kraniyal kemiklerin palpasyon ile mineralizasyonu, fontanellerin genişliği ve saçlı deri incelenir. Yonca yaprağı görünümü, kraniyal asimetri veya kapalı fontaneller gibi kraniyosinostoz bulguları varlığında hangi sutureların tutulduğu önemlidir. Örneğin, MCC bulgularına eşlik eden lamdoid/koronal sutureları tutan kraniyosinostoz Antley Bixler sendromunda, metopik suture tutulumu Bohring-Opitz ve C sendromunda, tüm sutureların etkilenmesi Lin-Gettig sendromunda izlenebilmektedir. MCC'ye eşlik eden geniş fontaneller otopalatodigital (OPD) sendromlar ve osteogenezis imperfekta (OI) gibi hipomineralizasyon ile giden iskelet displazilerine işaret edebilir.

Kraniyal değerlendirmeyi fasiyal dismorfik muayene izler. Genel itibarıyla MCC'ye eşlik eden kaba yüz görünümü, Gaucher sendromu ve fosfofruktokinaz eksikliği gibi metabolik hastalıklarda gözlenebilir; Noonan sendromunu andıran yüz görünümü King-Denborough

sendromunu akla getirebilir; hipertelorizm, basık burun kökü, kısa burun, antevort burun delikleri, mikrognati gibi yüz özellikleri kollajenopatilere yönlendirebilir. Göz bulguları da ayırıcı tanıyı daraltabilir. Örneğin; mikroftalmi ve katarakt varlığı Martsolf, COFS, WWS gibi sendromlarda; oküler kolobom Ritscher–Schinzel sendromunda; blefarofimozis Van den Ende–Gupta, Ohdo ve Marden-Walker sendromlarında; gözlerin açık olması Bartsocas-Papas, restriktif dermopati ve Neu-Laxova sendromlarında beklenen bulgular arasındadır. Benzer şekilde antenatal dönemde US ile izlenemeyecek olan koanal atrezi; Antley Bixler, Lenz-Majewski veya Schinzel-Giedion sendromunun komponenti olabilir. İnce burun yapısı oküloodontodijital sendromda, hafif çentikli burun kanatları Freeman–Sheldon sendromunda gözlenebilir. Temporomandibuler eklem füzyonu Oftalmomandibulomelik sendrom için değerli bir bulguyken mikrognati ve yüksek burun kökü fetal akinezi grubunun büyük bir kısmında gözlenmektedir. Perioral *webler* Bartsocas–Papas’da; mikrostomi Crisponi, Van den Ende–Gupta, Freeman–Sheldon, Schwartz–Jampel sendromu gibi birçok iyi bilinen MCC ilişkili sendrom dahilinde izlenebilir. Cilt gerginliğine sekonder ağzın “O” şeklinde açık postürde bulunması restriktif dermopati açısından önemli bir bulgudur. Bu grupta kulakların da detaylı değerlendirilmesi, boyutları-kıvrımları-pit ve *crease* varlığı açısından incelenmesi önemlidir. Büyük kulaklar Aase-Smith I, COFS, van den Ende-Gupta, BRESHEK sendromunda; superiorda katlantılı heliksleri olan *crumpled* kulaklar kontraktürel araknodaktilide, kalsifiye kıkırdaklar ise diastrofik displazide gözlenebilir. Dilin olmaması Hanhart, hipoplastik olması Moebius sendromuna eşlik edebilir. Bu nedenle dil ve YDD bulguları açısından oral kavite uvulaya kadar incelenmelidir.

2.6.2.3. Gövde ve ekstremitelerin değerlendirilmesi

Muayenede orantısız boy kısalığı şüphesi varlığında; kulaç, üst segment ve alt segment ölçümleri ve kulaç/boy, üst segment/alt segment oranları ölçülerek doğrulanmalıdır. Dar toraks açısından toraks çevresi ölçülmeli ve gestasyon haftasına göre değerlendirilmelidir. Kısa boyun, ense ödemi, ciltte anormal görünüm (hidropik bulgular, ince-gergin cilt gibi) ve kutanöz defektler (gamze/indentasyonlar), sakral uzantı/kuyruk (Teebi-Shaltout, Malpuech, bazı FADS fenotipleri, metatropik displazi), ekstremitelerin postürü ve eşlik eden eğrilik/açılanmalar, krepitasyon varlığı ve *spurlar*, eklem hareketleri, dislokasyonlar ve pterijiyum varlığı, el/ayaklarda konjenital malformasyonlar (redüksiyon defektleri, poli/sin/oligo/ektrodaktili), interfalangeal *webler*, tırnakların yapısı, falangeal fleksiyon ve el içi çizgileri (simian, silik el içi çizgileri) değerlendirilmelidir. El içi çizgileri yaklaşık 10-13. GH arasında oluşumunu tamamlar ve 14. GH’nın sonundan itibaren yetişkin bir bireyin eli ile

kıyaslanabilir. İnterfalangeal çizgilerin silik olması/olmaması intrauterin başlangıçlı kamptodaktiliye, pterijiyum varlığı immobilitenin erken fetal dönemde başladığına işaret eder. Kontraktürler, her eklem için anatomik hareket planlarına göre ve kontrlaterali ile birlikte değerlendirilmelidir. Örneğin, rahim içi hacmin azalmasına bağlı gelişen kontraktürler genellikle asimetrik iken primer nöromüsküler hastalıklar genellikle simetrik tutulum gösterir. Muayenenin son aşamasında dış genital yapı, anal açıklık, anüsün yerleşimi ve perine ek anomaliler açısından ayrıntılı değerlendirilmeli, cinsiyet gelişim bozukluklarında Prader ve Quigley skalası kullanılarak evreleme yapılmalıdır.

2.6.2.4. Kordon ve plasentanın değerlendirilmesi

Kord uzunluğu/çapı/insersiyon yeri (kısa umbilikal kord fetal akineziye işaret etmektedir), umbilikal damar sayısı ve ek bulgular (tromboz, hemoraji, kord kistleri, fibrin, nodül, kitle) değerlendirilmeli; plasentanın makroskopik incelenmesini takiben gerekli durumlarda plasental örnekleme yapılmalıdır.

2.6.2.5. Fotoğraflama

Klinik genetik pratiğinin her alanında olduğu gibi dış bakı muayenesini takiben (pre-otopsi) olguların fotoğraflanması önemlidir. Genetik muayene ile saptanan dismorfik bulgular, “*Elements of Morphology*” (103-107) terminolojisine uygun olacak şekilde ve sırasıyla tarif edildikten sonra fotoğraflama ile mutlaka belgelenmelidir.

Fotoğraflama standart olarak anatomik postürde ve vücuda paralel bir açı ile tüm vücut ön, yan ve arka planını, yüz ön ve sağ/sol profilini, ekstremiteleri, ellerin ve ayakların ventral ve dorsal yüzlerini ve dış genital-perine bölgesini içermeli, saptanan ek anomaliler özellikle fotoğraflanmalıdır. Yüzü fotoğraflamadan önce, kulak heliksleri sıklıkla eksternal meatusu örtme eğiliminde olduğu için aurikula pozisyonu kontrol edilmeli ve düzeltilmelidir.

2.6.3. Radyolojik değerlendirme

Merkezimizde etiyolojik nedenden bağımsız olarak tıbbi terminasyon uygulanmış bütün fetuslar, ölü doğum olarak sonlanan gebelik ürünleri veya eksitus olmuş yenidoğanların tamamına tüm vücut anteroposterior (AP) ve lateral grafisini içerecek şekilde radyolojik görüntüleme yapılmaktadır. Kontraktürlerin bir iskelet displazisine sekonder geliştiği düşünülüyorsa fetal iskelet mamografi ile değerlendirilebilir (108). Antenatal US’de SSS malformasyonu şüphesi varlığında veya maserasyon nedeniyle otopsinin yapılamayacağı durumlarda postmortem fetal MRG iyi bir alternatiftir. Fetal MRG ve otopsi bulgularının karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda, fetal MRG’nin otopside saptanamamış ek SSS

anomalilerini saptayabildiği ortaya konmuştur (109). Bu veriler göz önüne alındığında konvansiyonel otopsinin reddedilmesi durumunda postmortem total vücut MRG ile “sanal otopsi” yapılabilir; ancak bu yöntem erken dönemde ve özellikle kardiyak anomalilerin tespitinde yetersiz kalmaktadır. Küçük fetuslarda (<18 GH) beynin boyutları nedeniyle MRG başarısı daha düşük olduğu için son yıllarda mikro-BT gibi ek yöntemler denenmektedir (110). Bu yaklaşımlar ile başarılı sonuçlar elde edilmesinin yanı sıra yöntemin MRG’ye kıyasla daha ucuz olması, yakın gelecekte bu teknolojilerin kullanımının yaygınlaşabileceğini düşündürmektedir.

2.6.4. Postmortem fetal DNA eldesi

Antenatal invazif girişim yapılamamışsa, invazif yöntemler ile elde edilen DNA kalitesi standartlara göre düşük saptanmışsa veya ilişkili genin ekspresyonu alınan materyalde yetersizse; postmortem muayene sırasında steril şekilde, tercihen uyluğun medial yüzünden alınan cilt biyopsisi örneği DNA izolasyonu için kullanılabilir. Ayrıca, fonksiyonel analizlerin yapılabilmesi amacıyla farklı dokulardan DNA örneğine ek olarak RNA izolasyonu ve dondurulmak üzere hücre kültürü planlanabilir.

2.6.5. Fetal otopsi

Postmortem fizik muayene ve radyolojik görüntülemeleri takiben fetal dokuların histopatolojik değerlendirilmesi özgün tanı ve patofizyolojinin aydınlatılması için önemlidir. Patolojik US bulguları nedeniyle tahliye edilen ve fetal otopsi yapılan 132 olguluk bir seride, olguların %27'sinde post-otopsi klinik tanı ve buna bağlı olası gebelikler açısından tekrar riskinin değiştiği bildirilmiştir (111). Artrogripozis nedeniyle termine edilen veya abortus/IUMF olarak sonlanan gebelik ürünlerinde fetal otopsi; mümkün ise beyin, kas ve gözlerin (Muscle-eye-brain hastalığı vb.), omuriliğin, periferik sinirlerin (miyelinizasyon defektlerini değerlendirmek için) ve iskelet kaslarının histopatolojik incelemesini içermelidir (2). Beyin dokusu ve spinal kordda ince kesitler ile değerlendirmenin yapılabilmesi için alkol ve pikrik asit bazlı fiksatifler tavsiye edilmektedir (112). Fetal maserasyonun, beyin dokusunda otoliz nedeniyle otopsinin doğruluğunu engelleyebilecek bir faktör olduğu unutulmamalıdır. Farklı kas gruplarından kas örneklerinin elektron mikroskopisi (EM) ve özel boyalarla incelenmesi, *ragged red fiber* varlığının dışlanması ve kas dokusu yerinde fibröz bant oluşumu açısından değerlendirme önerilmektedir (113). Kas tutulumunun ağırlığı hakkında daha fazla izlenim edinmek amacıyla diyafram, psoas ve paravertebral kasların görünümü de incelenmelidir. Kas örneklemesinde, rutin hematoksilen ve eozin (H&E) boyamasına ek olarak, periyodik asit-Schiff (PAS), modifiye Gomori-trikrom, lipid ve

mitokondriyal enzimlere yönelik boyalar (NADH-TR, kombine COX/SDH) ile değerlendirme önerilmektedir (112). Kontraktürler ile seyreden bir grup antitenin kardinal histopatolojik bulguları literatür taramasını takiben derlenmiş ve Tablo 2-13'te sunulmuş; biyopsi verilerine göre olası ilişkili genler Tablo 2-14'te özetlenmiştir. Membran proteinlerinin (distrofinler, sarkoglikanlar, emerin ve lamin A/C gibi nükleer proteinler, α - ve β -distroglikanlar, merozin ve kollajen VI) ekspresyonunun immünohistokimyasal analizi, çeşitli müsküler distrofi formlarının tanısında yardımcı olabilir. Fetal diyafram kalınlık ve herniler açısından incelenmelidir. Otopsi onamı alınamayan ve/veya intrauterin fetal ölümü takiben şiddetli maserasyon olan vakalarda TED/TGD aracılığıyla gerçekleştirilen “moleküler otopsi”nin, etiyojolojiyi belirlemek için bir alternatif olabileceği akılda tutulmalıdır (2). Bu yönde ek olarak mümkünse fibroblast kültürü için steril deri biyopsisi, göbek kordonu örnekleme ve taze donmuş kas biyopsisi önerilebilir.

Tablo 2-13: Kontraktürler ile seyreden bir grup antitenin kardinal histopatolojik bulguları

Amyoplazi	İnkomplet kas fasikülleri, yağ replasmanı, perimisyumla çevrili fasiküller
LMPS	Kas kitlesinde azalma, belirgin heterojen görünüm, vakuoler dejenerasyon, değişken boyutlarda kas lifleri, interstisyel fibrozis, jeneralize veya yamalı miyotübüler görünüm, jeneralize hipotrofi
Restriktif Dermopati	Dermiste elastin yokluğu – parakeratozisle karışık hiperortokeratozis, keratin filamanların yokluğu, globüler keratohyalin granülleri, incelmış dermis, anormal kalınlıkta altı yağ dokusu, belirgin demarkasyon hattı
SMA	Ön boynuz hücre dejenerasyonu, motor nöronlarda hidropik dejenerasyon, medulla spinalis ventral köklerinde artmış glial demetler “prepatolojik evre”de konjenital fiber tipi disproporsiyon SMA tip 1: küçük yuvarlak şekilli atrofik tip 1 ve tip 2 lifler arasında normal veya hipertrofik tip 1 lifler SMA tip 3: Tip 1'e kıyasla daha fazla denervasyona bağlı grup atrofisi ve tip 1 lif hipertrofisi
Konjenital Miyotonik Distrofi tip 1	Erken dönemde fiber tipi disproporsiyon, internal nükleasyon artışı, sarkoplazmik kitleler, üst üste binen ring fibrillerin insidansında artış, miyopati (lif nekrozu, rejenerasyon ve fibrozis)
Nemalin Miyopati	Modifiye Gomori-trikrom boyası ile kırmızı-mor inklüzyonlar şeklinde görülen nemalin rodlar, EM'de yoğun cisimler, sıklıkla tip 1 lif atrofisi ve tip 1 lif hakimiyeti
✓ Kor-rod miyopati	Hem kor hem rodların birlikteliği
✓ Cap hastalığı	Kas liflerinde periferik yerleşimli, başlığa benzeyen ince filamanlar ve Z-çizgilerinin parçalarından oluşan Cap'ler

✓ <i>Zebra-body</i> miyopati	Küçük, çizgili ve filamentöz cisimler (Zebra cisimleri)
Sentronükleer (CNM)/ Miyotübüler Miyopati	Fiberlerde santral veya internal yerleşimli çekirdekler
✓ XR Miyotübüler miyopati	Santral çekirdek içeren, miyotüp benzeri çok sayıda kas lifi, tip 1 lif hakimiyeti, perinükleer liflerin santralinde glikojen ile artmış boyanma ve azalmış miyofibriler ATPaz reaksiyonu
✓ <i>DNM2</i> -ilişkili CNM	Perifere doğru radyal dağılım gösteren sarkoplazmik filamanlar, artmış santral ve internal çekirdek sayısı, tip 1 kas lifi hakimiyeti ve hipotrofi
✓ <i>BIN1</i> -ilişkili CNM	Bol miktarda santral çekirdek içeren yuvarlak atrofik tip 1 lifler, fibroadipoz endomisyal dokuda artış
Konjenital lif tipi uyumsuzluğu	Ortalama tip 1 lif çapının tip 2 liflerden en az %35-40 oranında daha küçük (hipotrofik) olması, sıklıkla tip 1 lif hakimiyeti
Kor miyopatiler	Azalmış mitokondriyal aktiviteyi yansıtan NADH (nikotinamid adenin dinükleotit) boyasında azalmış oksidatif enzim aktivitesi
✓ Santral kor hastalığı (CCD)	Azalmış oksidatif enzim aktivitesi olan iyi sınırlı alanlar, özellikle tip 1 kas lifleri boyunca uzanan santral korlar
✓ Multiminikor hastalığı	Santral korlardan daha küçük olan, tek bir lif içinde çok sayıda bulunan, tüm lif boyunca uzanmayan ve her iki lif tipinde de izlenebilen minikor adı verilen çoklu fokal alanlar
Miyozin Depo Miyopatisi	Tip 1 liflerde H&E ile soluk, Gomori-trikrom ile soluk yeşil ve oksidatif enzim aktivitesinin azalmış olduğu bölgeler olarak görülen hiyalin cisimler
CMD'ler	Distrofik bulgular mevcut iken ek anomalilerin yokluğu
✓ <i>Merosin-Deficient</i> CMD	Endoperimisyal fibrozis, masif lif nekrozu ve rejenerasyonu, belirgin inflamatuvar hücre infiltratları ve laminin- α 2 (merozin) için negatif immünohistokimyasal boyama
✓ α -dystroglikanopatiler	Kas lifi nekrozu-fibrozis ve ek distrofik özellikler, α -dystroglikan immünohistokimyasal boyanmasında azalma, β -dystroglikan ile normal boyanma ve laminin- α 2 (merozin) için azalmış boyanma
✓ Kollajen VI-ilişkili CMD	Değişken lif boyutları, nekroz, rejenerasyon, artmış perimisyal ve endomisyal bağ dokusu, intramüsküler yağ dokusunda artış, kollajen VI için immünohistokimyasal boyamada azalma
Pompe hastalığı	PAS-pozitif ve "lacework" paternde bulunan çoklu vakuoller, EM ile lizozomal vakuollerde ve sitoplazmada serbest halde glikojen artışı. *Periferik sinir biyopsisinde omurilik ön boynuz hücreleri ve beyin sapı çekirdeklerinde tutulum, Schwann hücrelerinde glikojen birikimi
Glikojen depo hastalığı tip IV (GSD IV)	Fibrozis, yağ replasmanı ve sarkoplazmik PAS-diyastaz pozitif inklüzyonlar ile uyumlu distrofik özellikler, EM'de poliglukoan cisimler
Yağ Asidi Oksidasyon Defektleri	Başlıca tip I liflerde olmak üzere lipid birikimi

Mitokondriyal Miyopatiler	Gomori trikrom ile subsarkolemmal mitokondri birikimi ile karakterize 'ragged red' lifler, SDH boyasında lif içinde anormal birikim gösteren 'ragged blue' lifler, COX boyasında soluk veya negatif boyanma, EM'de sayı ve boyutları normale göre artmış olan, krista yapıları bozulmuş ve inklüzyon içeren mitokondriler
----------------------------------	---

Tablo 2-14: Kas histopatolojisi bulgularına göre olası ilişkili genler

Kas biyopsi bulguları		İlişkili genler
Yapısal anomaliler	Nemalin cisimler	ACTA1, LMOD3, NEB, RYR1, TNNT3, TPM2
	Korlar, minikorlar, kor-benzeri cisimler	BICD2, DYNC1H1, RYR1, TPM2
	İnternal miyonükleuslar	BICD2, MUSK, TPM2, TTN
	Poliglukozan cisimler	GBE1
	Çerçevesiz/rimmed vakuoller	GBE1
	Ragged red fiberler	NALCN
Lif hakimiyeti	Tip 1	ECEL1, MYH3, PIEZO2, RYR1, TNNI2, TPM2, TRPV4, TTN, UBA1
	Tip 2	BICD2, MUSK, TNNT3
Lif atrofisi	Tip 2	ZC4H2, NALCN
Lif boyutlarında varyasyon		ACTA1, BICD2, ECEL1, GLE1, LMOD3, MUSK, MYH3, NALCN, PIEZO2, SYNE1, RYR1, TNNI2, TPM2, TRPV4, TTN
Nörogenik/angüler fiberler/atrofik-hipertrofik fiberler/lif-tipi gruplanması		BICD2, DYNC1H1, GLE1, TRPV4, UBA1

Dieterich ve ark., 2019 çalışmasından uyarlanmıştır (114).

2.7. MCC ile Seyreden Fenotiplerde Tanıya Yönelik Sistemik Yaklaşım

2.7.1. MCC fenotiplerinin ayırıcı tanısında yardımcı klinik muayene bulguları

Genetik heterojenite gösteren her hastalık/grubunda olduğu gibi, MCC olgularında da semiyolojik yaklaşım, ileri genetik tetkiklerden sonuç alınabilme olasılığını artıracaktır. Pivotal bulgu olarak isimlendirilen, minör ancak tanı koydurucu özelliği olabilen bulgular bu grupta oldukça nadir olmakla birlikte, nispeten sık görülebilen ve birden fazla antiteye eşlik edebilen birtakım anomaliler ayırıcı tanının daraltılmasında katkı sağlayabilir. Klinik yaklaşımda yol gösterebilecek fizik muayene ve sistemik bulgular, kapsamlı bir literatür araştırması yapılarak Tablo 2-15 ve Tablo 2-16'da derlenmiştir.

Tablo 2-15: MCC bulguları olan olgularda fizik muayene ile saptanabilecek anomaliler ve ayırıcı tanı

Kraniyosinostoz	Yarık dudak
Aarskog sendromu – nadir	Bartsocas–Papas sendromu
Addükte başparmak sendromu	Diastrofik displazi
Antley–Bixler sendromu (lambdoid-koronal)	Distal artrogripozis (Hall IIC)
Bohring–Opitz sendromu – trigonosefali	Ektodermal displazi
Trigonosefali (C) sendromu – metopik füzyon	Oral-kraniyal-dijital sendrom (Juberg–Hayward)
Dundar–Sonoda (sagittal, geniş ÖF %100)	Dil
Lin–Gettig (tüm süturlar)	Möbius sendromu – hipoplastik
Pfeiffer sendromu	Wieacker sendromu – musküler atrofi, dispraksi
Roberts sendromu	Hanhart sendromu – aglossi/hipoglossi
Kaba yüz	Trismus
Dandy–Walker, MR, bazal ganglia hastalığı (Pettigrew sendromu)	Aase–Smith I sendromu
Fryns sendromu	Amyoplazi – nadiren
Gaucher sendromu	Carney kompleks varyantı
Fosfofruktokinaz eksikliği	Crisponi sendromu
Pitozis	Distal artrogripozis IIE [Trismus ve el anomalisi]
Aarskog sendromu	Sheldon–Hall sendromu
Aase–Smith I sendromu	Freeman–Sheldon sendromu
Freeman–Sheldon sendromu	Trismus–Psödokamptodaktili sendromu
King–Denborough sendromu	Dental Bulgular
Escobar sendromu	Lenz–Majewski sendromu – mikrodonti
Marden–Walker sendromu	Aarskog sendromu – geniş ön kesiciler, natal diş
Bazı distal artrogripozis alt tipleri	Bohring–Opitz sendromu – geniş alveoler kemer
Konjenital myotonik distrofi	Otopalatodijital sendrom II – adonti
Korneal Bulanıklık/katarakt	Ehlers–Danlos VIII – periodontit
Kondrodisplazi punktata, rizomelik	Oküloodontodijital sendrom – enamel hipoplazisi, mikrodonti
COFS sendromu	Ohdo blefarofimozis sendromu – hipoplazi
Fryns sendromu	Azalmış yüz hareketleri
Martsof sendromu	Bartsocas–Papas sendromu – perioral webler
Mietens sendromu	Sheldon–Hall sendromu (BA2B)
Konjenital myotonik distrofi	Oftalmopleji – distal artrogripozis (Hall IIB, BA5)
Oftalmomandibulomelik displazi	Freeman–Sheldon sendromu
Fosfofruktokinaz eksikliği	Hanhart sendromu – Moebius sekansı birlikteliği
Walker–Warburg sendromu	King–Denborough sendromu

Nadir oküler bulgular	Azalmış yüz hareketleri (devam)
Ritscher–Schinzel – oküler kolobom	Maternal myastenia gravis / mizoprostol kullanımı
Oto-onikoperoneal – Retinal kolobom	Moebius sendromu – fasiyal dipleji
Bartsocas–Papas sendromu – ankiloblefaron	Escobar sendromu
Popliteal pterijiyum sendromu – ankiloblefaron	Multipl pterijiyum malign hipertermi
Waardenburg sendromu –heterokromik iris	Myelinopatiler/Miyopatiler
Weill–Marchesani – lens dislokasyonu	Konjenital miyotonik distrofi
Wieacker musküler atrofi – oküler dispraksi	Marden–Walker sendromu
Koanal atrezi	Schwartz–Jampel sendromu – <i>pursed lips</i>
Antley–Bixler sendromu	Shalev-tipi distal artrogripozis (Escobar varyantı?)
Lenz–Majewski sendromu	Stiff man/stiff baby – alert, gergin yüz
Schinzel–Giedion sendromu	Zellweger sendromu
Sağırılık	Addükte başparmaklar
Antley–Bixler – dış kulak yolu stenozu (%30)	Addükte başparmaklar sendromu
BRESHECK	Kontraktürel araknodaktili
Diastrofik displazi – ossiküler deformasyon	Dundar–Sonoda sendromu
Distal artrogripozis ve sağırılık (DA6)	Freeman–Sheldon sendromu
Kniest sendromu	Martsolf sendromu
Lin–Gettig – sensörinöral	MASA sendromu
Multipl pterijiyum sendromu, Escobar varyantı	Multipl pterijiyum sendromu – letal
Multipl sinostoz – ossiküler füzyon	Nemalin miyopati
Oküloaurikulovertebral spektrum	X'e bağlı artrogripozis tip 2
Ohdo blefarofimozis sendromu	X'e bağlı hidrocefali
Waardenburg–Klein sendromu	Kaudal uzantı
Oto-onikoperoneal sendrom	Ektodermal displazi ve kaudal uzantı
Otopalatodijital sendrom II – iletim tipi	Bisceglia tipi FADS
Ritscher–Schinzel sendromu	Teebi–Shaltout sendromu
Araknodaktili	Bülböz parmak uçları ve kaudal uzantı ile seyreden FADS (<i>Nayak ve ark, 2014</i>)(115)
Antley–Bixler sendromu	3MC (Malpuech sendromu)
Hanhart sendromu – aglossi/hipoglossi	Kemik füzyonları
Konjenital Marfan sendromu	Antley–Bixler – radiohumeral sinostoz, koalisyonlar
Konjenital kontraktürel araknodaktili	Koalisyonlar
Dundar–Sonoda sendromu	Diastrofik displazi
Ehlers–Danlos sendromu VIII	Hanhart sendromu – diz/dirsek
Larsen sendromu – uzun silindirik parmaklar	Ives mikrosefali-mikromeli sendromu – dirsekler
Marden–Walker sendromu	Lenz–Majewski sendromu
Marfan sendromu – ağır neonatal	Liebenberg sendromu

Araknodaktili (devam)	Kemik füzyonları (devam)
Aase-Smith I sendromu – kısa distal falankslar ve uzun parmaklar	Multipl sinostoz – Multipl füzyonlar
Van den Ende–Gupta sendromu	Oftalmomandibulomelik sendromu – TME füzyonu
Artropati	Pfeiffer sendromu – humeroradial sinostoz
Ehlers–Danlos VIB-2 ve tip VIII	Roberts sendromu – humeroradial sinostoz
Kamptodaktili, artropati, koksa vara, perikardit sendromu (CACP)	Simfalangizm formları
Pretibial gamzelenme	Mezomelik displazi
Hipofosfatazya, perinatal letal	Waardenburg–Klein sendromu – karpal füzyon
Kampomelik displazi	
X'e bağlı artrogripozis, tip 3	

Tablo 2-16: MCC bulguları olan olgularda saptanan sistemik anomaliler ve ayırıcı tanı

Hidrops	Gastrointestinal tutulum
Konjenital glikozilasyon defektleri (CDG'ler)	Aarskog sendromu – Hirschsprung (nadir)
Gaucher hastalığı – perinatal letal form	Al-Awadi sendromu – TÖF, anal atrezi
German sendromu	Amyoplazi – intestinal atrezi
Glikojen depo hastalığı tip IV	Bowen sendromu – omfalosel, umbilikal herni
Lizensefali sendromları	BRESHECK sendromu – Hirschsprung
Mitokondriyal hastalıklar	Bohring-Opitz sendromu – malrotasyon
Myelinopatiler/Miyopatiler	Distal artrogripozis (2E Hall) – intestinal atrezi
Ön boynuz hücre hastalığı ile seyreden letal artrogripozis	Eagle–Barrett sendromu (Prune Belly sendromu)
Neu-Laxova sendromu	Lin Gettig – intestinal atrezi, omfalosel, umbilikal pigmentasyon
Fosfofruktokinaz eksikliği	Fryns sendromu – omfalosel
Sotos-benzeri sendrom – ödem	FG sendromu – imperfore anüs
Malign Hipertermi	Miller–Dieker sendromu – duodenal atrezi
Santral kor hastalığı	Mitokondriyal hastalıklar – atreziler
King–Denborough sendromu	Shalev-tipi distal artrogripozis – umbilikal herni
Maternal hipertermi	VACTERL asosiyasyonu – TÖF, intestinal atrezi
Multipl pterijyum ve malign hipertermi	Tümörler
Artrogripozis, miyopatik formlar	Hunter–MacDonald sendromu – menenjiyom
Dismyelinizasyon	Proteus – hamartom, lipom, hemanjiyom
Addükte başparmak sendromu	Nörofibromatozis – optik gliom, menenjiyom
Aicardi sendromu	Sakral agenezi – presakral tümör

Dismyelinizasyon (devam)	Tümörler (devam)
Serebrokölifasiyoskeletal (COFS) sendrom	Schinzel–Giedion – sakrokoksigeal tümör
Fukutin mutasyonları (CMD’ler)	Tüberosklerozis – astrositom, rabdomyom vb.
Ives mikrosefali	Aase–Smith – nöroblastom
Lenz–Majewski sendromu	Hyalin fibromatosis sendromu – Multipl fibroma
Konjenital glikozilasyon defektleri	Gözdibi Bulguları
Walker–Warburg sendromu	Oto-onikoperoneal – Retinal kolobom
Larengal/Trakeal Anomaliler	Fukuyama CMD – optik atrofi
Akrokallozal sendrom – laringomalazi	PEHO sendromu – optik atrofi
Diastrofik displazi – trakeal kalsifikasyon/stenoz	Spastik parapleji (Goldblatt) – optik atrofi
Larsen sendromu – trakeomalazi	Walker–Warburg sendromu – retinal aplazi
Richieri–Costa/Pereira sendromu	CDG – pigmenter retinal anomali
Larinksin nöromusküler hastalığı	COFS sendromu – retinal pigmentasyon, optik sinir hipoplazisi
Uterin Anomaliler	Diyafram anomalileri/herniler
Akrorenal-mandibular sendrom	Fryns sendromu
Hand–foot–uterus sendromu	Rutledge sendromu [Smith–Lemli–Opitz (?)]
Şiddetli osteoporoz	Stiff man/stiff baby sendromu
Bruck sendromu	Renal tutulum
Osteogenesis imperfekta	Al-Awadi sendromu – renal agezi
Karaciğer tutulumu	Antley–Bixler – renal agenezi/displazi
ARC – kolestaz	ARC – renal disfonksiyon, nefrokalsinozis
CDG’ler	Fowler sendromu – glomerüler vaskülopati
Gaucher, infantil tip – HSM, hidrops	Genitopatellar sendrom – hidronefroz
Leprechaunism – fokal değişiklikler	Smith–Lemli–Opitz sendromu – renal agenezi

2.7.2. MCC fenotiplerinin ayırıcı tanısında kullanılan paraklinik yöntemler

2.7.2.1. Biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi

MCC etiopatogenezinde önemli bir yere sahip olan nöromusküler hastalık grubunda, serum kreatin kinaz (CK) düzeyleri uzun yıllardır tanısız biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (116). Günümüzde, prenatal dönemde kordosentez veya kardiyosentez materyalinde de CK düzeyi ölçümü pratikte yerini almıştır. Yüksek CK düzeyleri (>10 normal değer) nöromusküler bir patolojiye işaret eder ve özellikle kontraktürler ile seyreden müsküler distrofileri (*COL6A3*, *GMPPB*) konjenital miyopati/nöropati grubundan ayırt etmeye yardımcı olabilir (117, 118). İlginç bir şekilde, ön boynuz hücre hastalığı (*SMALED2*, *BICD2*) ve muskulokontraktürel tip Ehlers Danlos Sendromu (*CHST14*) tanılı bazı olgularda da yüksek

CK düzeyleri saptanmıştır (119, 120). Özellikle *TRPV4* ilişkili nöropatik MCC'de (distal hereditör motor nöronopati tip 8) ve yine kontraktürler ile seyreden *TTN*-ilişkili konjenital miyopatide ılımlı yüksek CK seviyeleri izlenebilir (121, 122). Distal artrogripozisi olan bazı hastalarda (DA tip 2B, *TNNI2*) da benzer şekilde hafif yüksek CK seviyeleri gözlenmiştir (123). CK seviyelerinin ölçümü, müsküler distrofiyi ayırt etmek için faydalı olsa da yorumlanması çok daha zor olan ılımlı yüksek CK düzeylerinin varlığı nadir görülen bir durum gibi görünmemektedir. Bununla birlikte, oldukça uygun maliyetli ve uygulanması kolay bir biyokimyasal test olduğu düşünüldüğünde CK düzeylerinin ölçümü tanısal sürecin bir parçası olarak kabul edilmektedir.

MCC fenotiplerinin ayırıcı tanısında en faydalı biyokimyasal parametre CK düzeyi ölçümü olmakla beraber klinik muayeneyi takiben ayırıcı tanıda spesifik bir grup hastalığın ön planda düşünüldüğü durumlarda hastalığa özgü ek tetkikler planlanabilir. Örneğin, neonatal kolestazı ve konjenital kontraktürleri olan bir olguda diğer kolestatik hastalıkların aksine GGT düzeylerinin normal veya düşük olması ARC sendromu lehine bir bulguyken, yine kontraktürlere eşlik eden Smith-Lemli-Opitz sendromu ile uyumlu bulguları olan bir olguda serum kolesterol ve 7-dehidrokolesterol değerleri önemlidir. Yakın zamanda *SLC6A9*-ilişkili glisin ensefalopatisinde normal serum glisin düzeyleri ve BOS örneğinde hafif artmış glisin profilinin tanısal olduğu ve benzer fenotipler ile ayırıcı tanıda kullanılabileceği önerilmiştir (124).

2.7.2.2. Elektrofizyolojik bulguların değerlendirilmesi

Elektromyografi (EMG) ve sinir ileti hızlarının ölçümü; ön boynuz hücre hastalıkları ve nöropatilerin, benzer klinik bulgular ile seyredebilen diğer hastalık gruplarından ayrılmasında yardımcı bir yöntemdir. Ayrıca, iskelet kası tutulumu durumunda elektrofizyolojik incelemeler ile miyopatik bir patern saptanabilir. EMG ölçümlerinin başarısı hem uzmanın deneyimine hem de hastanın yaşına bağlıdır. Çocuk ne kadar küçükse, test sırasında kooperasyonu ve buna bağlı EMG yorumu o kadar zor olacaktır (114). EMG'nin tanısal güvenilirliği MCC'nin miyopatik veya nörojenik kökenli olmasına bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir. Nörojenik formların (*BICD2*, *SMALED*, *TRPV4*) ve Amyoplazinin elektrofizyolojik tanısı %100'e varan bir başarı gösterirken, bu rakam miyopatik formlarda %36'lara düşmektedir (125). Ancak, işlemin invazif olması ve erken çocukluk döneminde maksimum verim alınamaması yöntemin dezavantajlarıdır. Bu nedenle Amyoplazi gibi klinik bulgular ile tanısı kolay olan ve kas hacimlerinin çok küçük olması nedeniyle EMG incelemelerinin güç olduğu hastalıklarda elektrofizyolojik değerlendirme yapılmayabilir.

Sonuç olarak EMG'nin, etiyolojide miyopatik veya nöropatik faktörlerin varlığı şüphesi durumunda, ikinci basamak bir test olarak kullanılmaya uygun bir test olduğu söylenebilir.

2.7.2.3. Histopatolojik bulguların değerlendirilmesi

2.7.2.3.1. Kas biyopsisi: immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel inceleme

Nöromusküler hastalıkları olan pediatrik kohortlarda kas biyopsisinin tanısal verimine yönelik çalışmaların tamamı küçük kohortlarda gerçekleştirilmiştir (114, 126, 127). Kas biyopsisi için temel endikasyonlar kas güçsüzlüğü, kaba motor becerilerde gerilik veya yüksek CK seviyeleridir. Ancak, genetik testlerin yaygın olmadığı dönemde yapılan çalışmalar, bu grupta kas biyopsisi ile tanı başarısı yüzdesinin yüksek olduğunu bildirmekle birlikte, olguların büyük bir kısmının Duchenne ve Becker musküler distrofiden etkilenmiş olduğunu göstermiştir. Bu nedenle klinik şüphe varlığında, kas biyopsisinden önce moleküler yöntemler ile bu antitelerin dışlanması uygun olacaktır. Literatürde distal artrogripozis bulguları olan olguların kas biyopsileri çoğunlukla normal veya non-spesifik sonuçlanmış olmakla birlikte histopatolojik incelemeler sayesinde kesin tanı alabilen olgular da mevcuttur. (128, 129). Bu vakaların tamamını MCC ile seyreden konjenital miyopatilerin oluşturduğu dikkat çekmektedir. Bu üç olguda olduğu gibi ultrastrüktürel incelemelerin bazı spesifik konjenital miyopati alt tiplerine (nemalin cisimleri, korlar, mini-korlar, kor benzeri cisimler vb.) yol gösterebildiği ve etiyolojide yer alan olası genlerin (*TPM2*, *MYH2*, *TNNT3*) sayısını önemli ölçüde azaltabildiği bilinmektedir. Ön boynuz hücreleri veya motor nöron tutulumu ile seyreden antitelerde de biyopsi bulguları tanıya yardımcı olabilir. Bu nedenle, MCC bulguları olan bir olguda konjenital miyopati, periferik nöropati veya motor nöron patolojisine dair klinik şüphe varlığında kas biyopsisi yol gösterici olabilirken, diğer MCC fenotiplerinde bu girişimin tanısal başarısı düşük gibi görünmektedir. MCC ile seyreden antitelerde kardinal biyopsi bulguları Tablo 2-13'de derlenmiştir.

2.7.2.3.2. Periferik yayma incelemesi

Periferik yayma incelemesi, bu olgularda rutin değerlendirmenin bir parçası olmamakla birlikte bazı özellikli durumlarda destekleyici bulgular sağlayabilir. Örneğin ARC sendromunda gri platelet sendromu benzeri büyük, soluk ve agranüler plateletlerin varlığı diyagnostik karakterdedir (130). Benzer şekilde, 2016 yılında tanımlanan Takenouchi-Kosaki sendromunda da makrotrombositler sıklıkla tabloya eşlik eder (131). Bir iskelet displazisi olan *LBR* ilişkili regresif spondilometafizyal displazide de fetal dönemde diz ve dirsek kontraktürleri gözlenebilir. *LBR* varyantları hem monoallelik hem biallelik formda Pelger-Huët anomalisine neden olabilmektedir. Bu nedenle, ayırıcı tanıda *LBR* ilişkili fenotiplerden

şüphelenilmesi durumunda moleküler testlerden önce periferik yayma incelemesi tarama amaçlı kullanılabilir (132).

2.7.2.4. Miyogörüntüleme – kas MRG

MRG; çizgili kasların şekil, hacim (hipotrofi, hipertrofi) ve yapısını görüntüleme yönünde mükemmel bir yumuşak doku kontrastı sağlamaktadır. Son yıllarda, kalıtsal veya metabolik nöromusküler hastalıkların değerlendirilmesinde giderek daha fazla kullanılan bir görüntüleme yöntemi haline gelmiştir. Çoklu planda görüntülemeye olanak sağlaması ve iyonizan radyasyon içermemesi nedeniyle özellikle pediatrik yaş grubunda oldukça avantaj sağlamaktadır (133).

Belirli MRG sekansları ile yağlı dejenerasyon gibi distrofik değişiklikler ve kas ödemi gibi inflamatuvar değişiklikler, BT'ye kıyasla daha yüksek bir duyarlılıkta gösterilebilmektedir (134). Kalıtsal kas hastalıklarında distrofinin derecesi, normal görünümünden tam yağlı dejenerasyona kadar değişen yağlı dejenerasyon oranı baz alınarak oluşturulmuş standart ölçeklere göre derecelendirilir (135). Bu ölçekler her bir kasın tutulum derecesinin hızlı bir şekilde değerlendirmesine olanak sağlamaktadır. Başlangıçta, alt ekstremiteler veya pelvis gibi belirli anatomik alanları değerlendirme amacıyla oluşturulmuş MRG protokolleri kullanılmaktayken, günümüzde, hemen hemen tüm ilgili çizgili kas gruplarının değerlendirilmesine olanak sağlayan tüm vücut görüntüleme protokolleri oluşturulmuştur. Tüm vücut MR görüntüleme protokolleri; kalıtsal nöromusküler hastalıklarda etkilenebilen yemek borusu, kalp ve intraabdominal visceral organların değerlendirilmesine de olanak sağlaması nedeniyle önemli bir teknik haline gelmiştir.

Genel olarak, belirli bir tutulum paterni gösteren kas hastalıklarının özgün MRG bulgularının tanıda kullanılabilmesi amacıyla çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir (133). 2005 yılında yapılan bir çalışmada *FKRP* ilişkili LGMD2I kesin tanı 6 olgu ve diğer OR LGMD alttipleri/distrofinopati tanı 14 olgu total vücut MRG yapılarak karşılaştırılmış; bütün LGMD2I vakalarında alt ekstremitte addüktörleri, arka uyluk ve baldır kaslarında belirgin sinyal değişiklikleri gösteren karakteristik bir musküler fenotip saptanmıştır. Ayrıca, incelenen LGMD2I olgularının klinik bulgularının değişken şiddette olması, MRG imajlarının da hastalığın evresine göre farklı tutulum paterni gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Pelvik düzeyde gluteus maksimus, gluteus medius kasından daha erken ve daha şiddetli tutulurken; uyluk seviyesinde en erken ve en şiddetli değişikliklerin addüktör magnus ve biceps femoris kasında olduğu gözlenmiştir (136). Konjenital miyopati grubu için de benzer algoritmalar geliştirilmiştir. Örneğin, *RYR1* varyantların neden olduğu santral kor hastalığında majör

tutulunun gluteus maksimus kasında olması, uyluk seviyesinde en şiddetli değişikliklerin medial (addüktör magnus) ve ön kompartman kaslarında (vastus lateralis, vastus intermedius) gözlenmesi, distalde gastroknemius lateral başı/soleus kaslarının şiddetli tutulumu ve addüktör longus, grasilis ve biceps femoris kaslarının korunması karakteristiktir (137). Bütün bu bulgular, *RYR1* fenotipini, *SEPN1*, *ACTA1*, *NEB* ve kollajen VI (*COL6A1*, *COL6A2* ve *COL6A3*) ilişkili diğer konjenital miyopatilerden ayırmaktadır.

2.7.3. MCC ile seyreden fenotiplerin genetik etiyopatogenezinin araştırılmasında kullanılan yöntemler

2.7.3.1. Sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemler

MCC, başta trizomi 8 mozaisizmi ve trizomi 18 olgularında olmak üzere birçok kromozom anomalisinde gözlenebilmektedir. Önemli bir gen veya kontrol bölgesini kapsayan submikroskobik delesyon veya duplikasyonlar da fetal hareketi etkileyerek benzer fenotipler ile sonuçlanabilmektedir. Mikroarray uygulamalarının yaygınlaşması ile çoklu konjenital kontraktürlerle ilişkili birçok yeni mikrodelesyon ve mikroduplikasyon sendromu literatürde yerini almıştır (138). Bu alterasyonların bir kısmı daha önce artrogripozis ile ilişkisi bilinen genleri kapsamakta; bir kısmı ise intrauterin dönemde normal SSS gelişimini engelleyerek fetal akineziye ve sekonder eklem kontraktürleri ile sonuçlanabilen hipotonisiteye neden olmaktadır. Atlanmaması gereken en önemli nokta, kontraktürleri olan bütün olgularda motor gelişim geriliğinin eşlik etmesi beklenmekle birlikte psikososyal ve bilişsel tutulum varlığının kromozom anomalileri lehine yorumlanması gerektiğidir. Bu nedenle, çoklu konjenital kontraktürlere eşlik eden bilişsel tutulum ve ek konjenital anomalileri olan her çocukta kromozom analizi ve array-CGH/mikroarray çalışması yapılmalı; periferik kan dokusunda array analizinin normal sonuçlanması durumunda mozaisizm olasılığı açısından fibroblast materyalinde de array-CGH analizi gereksinimi değerlendirilmelidir (7). Artrogripozis fenotipleri ile ilişkili olduğu bildirilmiş gros ve submikroskobik kromozom anomalileri ve bu anomalilere eşlik eden bulgular Tablo 2-17’de derlenmiştir.

Tablo 2-17: Konjenital kontraktürler ile seyredabilen kromozom anomalileri

Endikasyon	İlişkili kromozomal bölge/bölgeler	Referans
Konjenital diyafragma hernisi, dismorfizm, MCC, hipertrofik KMP	1q12-q23 delesyonu	(139)
Distal kontraktürler, bilişsel gerilik, dismorfizm, MKA	3p14.1p13 delesyonu	(140)
MCC, BPES, DWM, yarı damak	3q22.1-q25.2 delesyonu	(141)
Fetal hipotoni, distal artrogripozis, skolyoz, hiperekstans diz eklemi	3q27.3-q29 duplikasyonu, 14q31.3-q32.33 delesyonu	(142)
MCC, blefarofimozis, dismorfik kulaklar, MKA	5p14.1-p15.2 ve 5q14.3-q23.2 delesyonu	(143)
Distal artrogripozis, araknodaktili, yarı damak, kolobom, radioulnar sinostoz	5q23 delesyonu	(144)
MCC, kompleks KKH, sindaktili, elektrodaktili, aksesuar meme başı	Trizomi 6 mozaizmi	(145)
Overgrowth, bilişsel gerilik, Y-sindaktili, MCC, kutanöz gamzelenme	6q24.2q25.3 duplikasyonu	(146)
BOR fenotipi, distal artrogripozis, dismorfizm	8q13.2q13.3 delesyonu	(147)
MCC, dismorfizm, ekzoftalmos, bilişsel gerilik	9q34.3 delesyonu, 2p25.2-p25.3 duplikasyonu	(148)
Tipik dismorfizm, diyafragma hernisi, MCC	Trizomi 9 mozaizmi	(149)
MCC, VM, YDD, adrenal hipoplazi, hidronefroz	Tetrazomi 9p	(150)
Mikrosefali, iris kolobomu, MCC, GGG	10p15.3p15.2 delesyonu, 11q22.2q25 duplikasyonu	(151)
Distal artrogripozis, dismorfizm, metakarp subluksasyonu	12q13.13 delesyonu	(152)
MCC, VM, perikardiyal efüzyon, TUA, mikropenis	12q21.2-qter duplikasyonu, 4q35.1-qter delesyonu	(153)
Nöbetler, MCC, dismorfizm, BGG, MKA	16p13.3 duplikasyonu, 1p36.3 delesyonu	(154)
Distal artrogripozis, dismorfizm, serebellopontin sisternalarda genişleme	16p13.3 interstisyel duplikasyonu	(155)
MCC, dismorfizm, SSS malformasyonları (lizensefali, CCA, bant heterotopi)	17p13.3p13.2 delesyonu (Miller-Dieker sendromu)	(156)
Başparmak agenezisi, distal artrogripozis, KPK	48,XXY+18	(157)
Distal artrogripozis, omfalosel, anensefali	Trizomi 18	(158)

MCC, retinal displazi, preaksiyel polidaktili, dismorfizm, BGG	20q11.21–q12 delesyonu	(159)
Distal artrogripozis, hipotoni, VSD, bifid uvula	22q11.2 delesyonu	(160)
Amyoplazi konjenita, dismorfizm, glabellar nevus flammeus, polisindaktili	22q11.2 duplikasyonu	(161)
MCC, nöromotor gerilik, serebral atrofi, ince CC, okülomotor apraksi	Xq11.2 delesyonu	(162)
Distal artrogripozis, MCM, umbilikal kord kisti	Mozaik tetrazomi 10p	(163)
MCC, fetal hipokinezi, polihidramniyos, tek umbilikal arter, musküler hipoplazi	Mozaik izokromozom 20q	(164)
MCC, hipotoni, beslenme güçlüğü	Prader Willi sendromu (UPD15)	(165)

MCC, çoklu konjenital kontraktürler; KMP, kardiyomiyopati; MKA, çoklu konjenital anomali; BPES, blefarofimozis–pitozis–epikantus inversus; DWM, Dandy-Walker malformasyonu; KKH, konjenital kalp hastalığı; BOR, brankiyootorenal sendrom; VM, ventrikülomegali; YDD, yarı damak-dudak; GGG, global gelişme geriliği; BGG, büyüme gelişme geriliği; TUA, tek umbilikal arter; SSS, santral sinir sistemi; CCA, korpus kallozum agenezisi; KPK, koroid pleksus kisti; MCM, Mega sisterna magna, UPD, Uniparental dizomi

2.7.3.2. Moleküler analiz yöntemleri

Genetik hastalıkların moleküler patogenezinin aydınlatılmasında izlenecek algoritma, klinik muayene bulguları ile belirlenir. Klinik bulgular özgün bir tanıya yönlendirebiliyor ve ilişkili genlerde daha önce saptanmış mutasyonların çoğunluğunu nokta mutasyonları oluşturuyor ise ilk basamak test Sanger dizileme, daha önce saptanmış mutasyonların çoğunluğunu delesyon/duplikasyonlar oluşturuyor ise ilk test MLPA analizidir. Lokus heterojenitesi varlığında veya ilişkili genin ve ekzonlarının boyutunun pratik uygulamada Sanger dizi analizine uygun olmadığı durumlarda yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılarak panel test uygulaması akılcı olacaktır. Tanımlanmamış genlerin varlığının bilindiği sendromlarda ya da klinik değerlendirmeler sonrasında özgün bir tanıya gidilemeyen olgularda, fenotip-genotip ilişkisi açıklanmış tüm genleri içeren geniş paneller veya TED analizleri uygulanabilir.

Sanger dizileme tekniği; ilk kez 1970’lerde İngiliz kimyacı Frederick Sanger tarafından geliştirilmiş olup günümüzde halen sekans verilerinin validasyonunda ve varyantın tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (166). Bu yöntem nükleotide özgün zincir sonlandırıcı inhibitörlerin DNA’nın özgün sekansını tanımlaması esasına dayanmaktadır (167). DNA kalıbı (saflaştırılmış PZR ürünü), ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz, tek yönlü oligonükleotid primer ve dört çeşit deoksinnükleotid trifosfat (dNTP) ve her biri farklı bir dalga boyunda ve farklı renkte ışımaya yapan floresan boyalarla işaretlenmiş dideoksi nükleotid trifosfat (ddNTP) kullanılarak, yeni sentezlenen zincire floresan işaretli nükleotidlerin eklenmesiyle zincir uzaması gerçekleşir. Bu işlem devam ederken rastgele olarak bazı nükleotidler için dNTP yerine ddNTP ipliğe katılır. 3’ hidroksil grubu bulunmayan bu modifiye bazlar, bir sonraki dNTP’nin 5’ fosfatıyla fosfodiester bağı kuramaz ve zincir uzaması durur. DNA polimerizasyon reaksiyonlarına, düşük konsantrasyonlarda, sentezi 3’ uçtan durduran tek tip radyoaktif veya floresan işaretli ddNTP’ler eklendiğinde, tüm uzayan zincirlerin işaretli bazla biteceği diziler üretilmiş olur. Daha sonra, kapiller jel elektroforezinde uzunluklarına göre ayrılarak taşıdıkları floresan sinyallerine göre dizileme cihazının yazılımı ile matematiksel olarak değerlendirilerek “elektroferogram” adı verilen bir grafikte görüntülenir. Hastanın DNA dizisi, referans dizi ile karşılaştırılarak hastalık ilişkili olabilecek baz değişimleri tespit edilir. DNA dizileme teknolojisi; hastalık ilişkili DNA baz değişimlerinin belirlenmesi, topluma özgü gen polimorfizmlerinin saptanması, mikrobiyal hastalıklara neden olan mikroorganizmaların belirlenmesi ve adli tıpta uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyon (MLPA) tekniği; farklı boyda ürün veren çoklu PZR ve ligasyon esasına dayanan, genin bir kısmını ya da birkaç geni içeren kopya sayısı değişikliklerinin (delesyon/duplikasyonların) saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. DNA denatürasyonu, özgün problemlerin hedef DNA bölgelerine hibridizasyonu, iki parça halinde olan problemlerin birbiri ile ligasyonu ve PZR ile bu problemlerin çoğaltılması aşamalarından oluşur. Elde edilen ürünler kapiller elektroforez sistemi esaslı cihazlar aracılığıyla yürütülür ve bilgisayar yazılımları aracılığı ile değerlendirilir (Coffalyser, (168)). Çalışmanın esas koşullarından biri sağlıklı bireylere ait DNA örneklerinin referans olarak kullanılmasıdır. Referans örneğin pik boyutlarına göre azalma veya pikin olmaması delesyon, artış ise duplikasyon varlığına işaret eder.

Yeni nesil dizileme (YND) teknikleri: İnsan Genom Projesinin öncü olduğu büyük genomik projelerin gereksinimleriyle 2000’li yılların başlarında geliştirilen YND, 2011’li yıllara gelindiğinde genetik araştırma ve tanı protokollerinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Bu görece yeni teknolojiler; Sanger dizi analizinin limitasyonlarının (büyük ve çok ekzonlu genler, mozaikizm, lokus heterojenitesi gösteren hastalıklar, özgün tanının olmadığı durumlar, emek ve maliyet faktörleri vb.) aşılmasına ve çoklu hastanın eş zamanlı çalışılabilmesine olanak sağlamış; moleküler tanıda çağ atlatmıştır (169-171).

YND teknikleri; DNA’nın çeşitli yöntemler ile fragmente edilmesi ve 50-400 baz çifti (bç) uzunluğunda çoğaltılmış milyonlarca fragmanın yüksek hacimde paralel dizilenmesi esasına dayanır (172). Fragmanların sonlarına adaptör moleküller takılarak bir kütüphane oluşturulur. Fragmanlar, mikrobuncuk veya cam gibi yüzeylerde amplifiye edilerek aynı bölgede çok sayıda fragman oluşturulur ve genomdaki bir noktanın birden fazla kere okunduğu “çoklu okuma”lar gerçekleştirilir.

DNA fragmanlarının bakteriyel klonlanmasının yerine hücre barındırmayan sistem içinde kütüphanelerin hazırlanabilmesi, eş zamanlı milyonlarca kısa dizilemenin yapılabilmesi ve sekans çıktısının elektroforeze ihtiyaç duyulmaksızın tespit edilebilmesi YND teknolojileri ile mümkün hale gelmiş; bu sayede tüm genom ya da genomun belli bölgeleri birden fazla hasta için tek testte dizilenebilir hale gelmiştir. Ancak, elde edilen veri miktarının artışına paralel hata payı da yükselmektedir. Görece kısa okumaların düzeltilmesine yönelik okuma uzunluğu artırılmaya çalışıldığında maliyet yükselmekte ve çıktı azalmakta; ayrıca yüksek homoloji gösteren veya GC-zengin bölgelerde teknik zorluklar yaşanmaktadır (173, 174).

YND teknolojileri; tüm genom dizileme, tüm ekzom dizileme, transkriptom dizileme ve metilasyon çalışmaları gibi birçok alanda geniş uygulama seçeneklerine sahiptir. Tanısal amaçlı kullanılan dizileme tekniklerinin özellikleri Tablo 2-18’de karşılaştırılmıştır.

Tablo 2-18: Dizileme tekniklerinin karşılaştırılması

Özellik	Sanger sekanslama	YND Temelli Panel Dizileme	Tüm Ekzom Dizileme	Tüm Genom Dizileme
İlgilendiği genomik bölge	1 gen, hedef bölge, hedef ekzon vb.	Fenotip ile ilişkilendirilmiş gen grubu	~19.000 gen	Tüm genom
Altyapı	Standart protokol	Tanı laboratuvarları için uygun, altyapı gerekli	Altyapı ve biyo-informatik ekibi gerekli	Altyapı ve biyo-informatik ekibi gerekli
Fenotip ile ilişkisiz varyant bulma (yan bulgu)	Hayır	Panelin içeriğindeki genlerin kapsamına bağlı	Olası	Olası
Hedeflenen varyant tipleri ve fenotipler	Tek gen hastalıkları, tekrar dizisi artışları, gen içi delesyonlar	Genetik heterojenite gösteren hastalık grupları	Genetik ve klinik heterojenite gösteren antiteler, ön tanının olmadığı olgular	Ekzom dizilemenin yanında anlatımı olmayan genomik bölgeler

Günümüzde kullanılan görece yeni YND sistemlerinden bazıları Illumina, PacBio, Oxford Nanopore ve IonTorrent olup bu platformların genel özellikleri Tablo 2-19’da belirtilmiştir (173).

Ion Torrent, floresan veya parlaklık ölçümünü kullanmadığından ilk "ışık sonrası sıralama" teknolojisi olan, emülsiyon PZR ve iyon yarı iletken dizileme kullanan ikinci nesil bir platformdur (175, 176). İyon yarı iletken DNA dizileme metodu; DNA zinciri polimerizasyonu esnasında açığa çıkan hidrojen iyonlarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Cihazın optik bileşeni yoktur, çip ile arayüz oluşturmak için bir elektronik okuyucu pano, sinyal işleme için bir mikroişlemci ve çip üzerinde reaktiflerin akışını kontrol etmek için bir akışkan sisteminden oluşur. Okuma uzunluğu 200-400 bp’ye, çıktı miktarı 10Gb’ye, her turda okuma sayısı 4 milyona ve çıktı miktarı 1,5-2 Gb’ye yakın olabilmektedir (174).

Illumina platformu tarafından ikinci nesil dizileme olarak tanıtılan dönüştürülebilir dizileme teknolojisi, dönüştürülebilir nükleotid kullanılarak sentez yaklaşımı ile dizileme

yapmaktadır. Sentez ile dizileme metodunda, adaptörler ile sabitlenmiş dizilemeye hazırlanan DNA kütüphanesi denatüre edilir ve tek iplik halinde akış hücrelerine aşılır. Sonrasında köprü amplifikasyonu ile klonal DNA parçaları içeren kümeler oluşturulur. Dizilemeden önce kütüphane düzleştirme enzimi yardımı ile tek ipliğe ayrılır. Tek ipliğe ayrılmış kütüphane üzerine kesilebilir, birbirinden farklı floresan boya ve çıkarılabilir blok bulunan dört çeşit nükleotid (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) eklenerek ile sentez gerçekleşirken, nükleotide bağlı floresan grubu sinyalleri cihaz tarafından algılanır. Aynı bölgeye düşen DNA parçalarının birden fazla dizilenmesi ile tek bir bölge yüksek derinlikte okunabilir (177). Firmanın MiSeq cihazı ile daha az kapasitede ve kısa süreli dizilemeleri yapılırken, TED/TGD’de kullanılan HiSeq 2500 platformunda 6 günlük ıslak laboratuvar çalışması ile 1 TB gibi yüksek kapasiteli dizilemeler yapılabilmektedir. Illumina sistemlerinin yüksek verimli sekanslamaları ve sistem maliyetlerinin daha uygun olmalarına rağmen kısa okumalar yapması, platformun başlıca dezavantajını oluşturmaktadır (173).

PacBio [Single Molecule, Real-Time (SMRT)] dizileme sistemi DNA molekülünün PZR amplifikasyonundan bağımsız gerçek zamanlı dizilenmesini sağlayan bir platformdur. Kuyular içerisinde bağlanmış polimerazlar ile γ -fosfat floresan işaretlenmiş nükleotidler kullanılarak tek iplikli DNA molekülünden yeni bir zincir oluşur. Sentez esnasında her baza özgü bir floresan ışımaya gerçekleşerek gerçek zamanlı olarak DNA dizilenir. Ayrıca 4. nesil dizi analizi olarak adlandırılan Oxford Nanopore firmasının tek zincirli DNA molekülünün elektriksel algılanması teknolojisi de gerçek zamanlı dizileme yapan ultra hızlı görece yeni bir teknolojidir.

Tablo 2-19: Yeni Nesil Dizileme platformlarının genel özellikleri

Platform	Çıktı hacmi (Gb)	Okuma uzunluğu (bp)	Ek Bilgiler
<i>Illumina</i>			
MiniSeq	1.7–7.5	1×75–×150	Amplifikasyon metodu: Köprü PZR Sekanslama metodu: Sentez ile dizileme Baskın hata tipi: Baz değişimi Hata oranı: %0,2
MiSeq	0.3–15	1×36–2×300	
NextSeq	10–120	1×75–2×150	
HiSeq (2500)	10–1000	×50–×250	
NovaSeq 5000/6000	2000–6000	2×50–×150	

IonTorrent			
PGM	0.08–2	400’e kadar	Amplifikasyon metodu: Emülsiyon PZR Sekanslama metodu: Ion yarı-iletken mikrodevre ile dizileme Baskın hata tipi: Indel Hata oranı: %1
S5	0.6–15	400’e kadar	
Proton	10–15	200’e kadar	
Pacific BioSciences			
PacBio RSII	0.5–1	60 kb’a kadar	Sekanslama metodu: Tek molekül Baskın hata tipi: Indel Hata oranı: %15
Sequel	5–10	60 kb’a kadar	
Oxford Nanopore			
MinION	0.1–1	100 kb’a kadar	Sekanslama metodu: Tek molekül Baskın hata tipi: Indel Hata oranı: %15

Xuan ve ark. (2013) ve Besser ve ark. (2018) çalışmalarından modifiye edilmiştir (173, 178).

2.8. MCC Genetik Etiyopatogenezinin Aydınlatılmasında YND Teknolojileri ile Yürütülen Güncel Çalışmalar

TED yönteminin artrogripozis fenotiplerinde tarihsel bir önemi mevcuttur. Hastalık ilişkili gen tespiti amacıyla uygulanan ilk TED çalışması, 2009 yılında OD kalıtım paterni gösteren Freeman-Sheldon Sendromu tanılı birbirinden bağımsız 4 bireyde gerçekleştirilmiş ve analizler sonucunda bu antitenin genetik etiyopatogenezinde *MYH3* genindeki varyantların rol aldığı gösterilmiştir (179).

İlerleyen yıllarda da fetal akinezi grubunda benzer çalışmaların sürdürülmesi ilişkili yeni genlerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. 2016 yılında gen ontoloji analizinde artrogripozis ile ilişkilendirilmiş 320 adet gen mevcut iken aynı araştırmacıların 2019 yılında yayınladığı benzer çalışmada bu sayı 402'ye yükselmiştir (15, 75). 3 yıl içerisinde 82 yeni genin klinik ilişkisinin gösterilmiş olmasına karşın hala etiyopatogenezi aydınlatılamamış olguların varlığı bu grup üzerinde daha çok çalışma gereksinimi olduğunu vurgulamaktadır. Son ontolojik derlemenin akabinde, 2020 yılında *ATP1A2*, 2021 yılında *THOC2* ve 2022 yılında bu tez çalışması kapsamında saptanan *USP14* geni gibi 70'den fazla gen artrogripozis fenotipleri ile ilişkilendirilmiş veya güçlü kanıtlar ile aday gen statüsünde yerini almıştır (180-182).

Son 5 yıldır geniş MCC kohortlarında da ekzom çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 2016 yılında 48 aileden 52 etkilenmiş olguluk bir araştırmada kohortun %35'inde artrogripozis ile ilişkisi bilinen genlerde varyant saptanırken %6,2'sinde aday olabileceği düşünülen üç yeni gen tanımlanmış ve bu genlerden MYO9A günümüzde aday gen statüsünden çıkarak konjenital myastenik sendrom tip 24 (KMS24) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (183). Aynı çalışma grubunun bu araştırmanın devamı niteliğinde olan ikinci çalışması, ilk aşamada tanı alamayan olguların trio-analiz olacak şekilde dahil edildiği 89 ailede gerçekleştirilmiş, grubun %48'inde bilinen genlerde varyant saptanmış, aday genler de dahil edildiğinde ekzom analizinin tanı başarısı ikinci grupta %65,2, toplamda %73,5 olarak hesaplanmıştır (13).

2019 yılında 47 aileden 51 hastadan oluşan bir MCC kohortunda öncelikle Mendeliom analizi yapılmış ve olguların %41'ine tanı konmuştur. Tanısız olgularda yapılan TED analizi ile -%13'ü sistematik CNV (*copy number variation*) analizi ile olmak üzere- olguların %53'ünde moleküler tanıya ulaşılmıştır. Çalışmada YND yöntemleri birlikte değerlendirildiğinde tanısal etkinlik %73'e ulaşmıştır (12).

2020 yılında YND ile incelenen 190 olguluk bir MCC kohortunda tanı başarısının %42 olduğu ve olguların %32'sinde yakın zamanda klinik ilişkisi gösterilmiş genlerde varyant saptandığı belirtilmiştir (14).

Konuya ilişkin en güncel araştırma, 2020 yılının sonunda, 315 olgu ile bildirilen en büyük MCC kohortunda gerçekleştirilmiştir (9). Bu çalışmada ilk olarak, benzer etkilenmiş ≥ 2 olgunun olduğu ve/veya ebeveynler arasında akrabalık olan 15 ailede genetik haritalama ile lokus belirlenerek takiben ilgili gende Sanger dizi analizi ile olguların 7'sinde, TED analizi ile 8 olguda moleküler tanıya ulaşılmıştır. İkinci aşamada 210 olguya klinik ekzom dizileme yapılmış, olguların %32'sinde moleküler etiyopatogenez aydınlatılmıştır. Çözüme ulaşılamamış 142 olgunun 111'inde TED analizi gerçekleştirilerek %21,6'sına tanı konulmuş; 4 olguda ise klinik değerlendirmenin detaylandırılması ve kas biyopsisini takiben özgün tanıya ulaşılmıştır. 3. aşamada geri kalan 90 olguda direkt TED yöntemi uygulanmış ve bu grubun da %61'inde genetik köken aydınlatılmıştır. Çalışma bütünsel olarak ele alındığında kohorttaki tanı oranı %52,7'ye ulaşmıştır (166/315).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma grubumuzu; Mart 2013 – Haziran 2020 tarihleri arasında prenatal US'de artrogripozis bulguları saptanan, IUMF veya tıbbi tahliye ile kalp atımı kaybolan ve İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde postmortem değerlendirilen, bilgilendirilerek gönüllü onamları alınmış 11 aileden 15 fetal olgu oluşturmaktadır. Olgular, kromozom analizi ve array-CGH analizi ile ayırıcı tanıda yer alan kromozom anomalileri ve klinik ile uyumlu olabilecek submikroskobik delesyon/duplikasyon sendromları dışlandıktan sonra çalışmamıza dahil edilmiştir.

Tez kapsamında 11 aileden etkilenmiş birer olgu seçilerek TED yöntemi ile solo analiz gerçekleştirilmiş; beklenen kalıtım modeline ve yolak genlerine uygun biyoinformatik yaklaşımlarla genetik etiyoloji araştırılmıştır.

Bu çalışma, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 22.01.2021/30715 tarih ve sayısı ile onaylanmıştır.

3.1. Klinik Değerlendirmeler

Postmortem klinik muayenede artrogripozis bulguları olan 11'i indeks olgu olmak üzere 15 fetal olgunun Tıbbi Genetik Anabilim Dalına ait hasta dosya bilgileri geriye dönük olarak analiz edildi. Olguların demografik bilgileri, aile öyküsü, akrabalık derecesi, fetal US bulguları, gebelik sonlandırılma zamanı, postmortem muayenede saptanan klinik/radyolojik bulguları ve mevcut ise otopsi verileri kaydedildi. En az üç kuşağı içerecek şekilde aile ağaçları güncellendi, postmortem fotoğraf ve radyografiler arşivlendi ve daha önce yapılan genetik analiz (fetal karyotipleme, array-CGH, moleküler tetkikler) sonuçları incelenerek bilgisayar veritabanına aktarıldı.

3.2. Moleküler Yöntemler

3.2.1. DNA izolasyonu

2013-2020 yılları arasında prenatal invazif girişimler (CVS, AS, KS, kardiyosentez) veya postmortem fetal deriden izole edilen DNA manuel/solüsyon/manyetik boncuk bazlı sistemlere özgün kitler (*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche11667327001/Magnapure Large Volume KIT, Roche03730972001 ve EZ1 DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Qiagen 951054*) ile firma protokollerine uygun şekilde izole edildi ve -20°C'de saklandı.

Segregasyon amacıyla indeksin aile bireylerine ait DNA izolasyonları, steril 2 ml K₃EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon/manyetik boncuk bazlı sistemlere özgün kitler (*MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200,Cat.Op02001-48*) kullanılarak ürün protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2.2. DNA kalitesinin değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait genomik DNA örneklerinin konsantrasyonları (ng/μl) ve absorpsiyon ölçümleri (A_{260/280} ~ 1,80-1,89) spektrofotometre ile ölçülerek kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). PZR çalışmasında kullanılacak DNA miktarı reaksiyon başına 50-80 ng/μl olacak şekilde ayarlandı. DNA örnekleri, YND ve PZR işlemleri gerçekleştirilinceye kadar +4° C'de saklandı.

3.2.3. Tüm Ekzom Dizileme

TED analizi öncesinde teste alınacak olgu örneklerinde DNA yoğunluğu 1,6-2 ng/μl olacak şekilde mili Q (18MΩ) su ile gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme sonrası, her bir olgunun DNA örnekleri özgün kit kullanılarak (Qubit dsDNA HS Assay Kit) florometrik yöntemle (Qubit Fluorometre) tekrar ölçüldü ve final DNA yoğunluklarının TED için hedef aralıkta (1,6-2 ng/μl) olması sağlanana kadar gerekli işlemler tekrarlandı.

10 indeks olgudan elde edilen genomik DNA örnekleri, kalite kontrol aşamasını takiben yeni nesil dizileme işlemleri için uygun oldukları tespit edildikten sonra, tüm ekzom dizileme ıslak laboratuvar çalışmaları için hizmet alımı kapsamında DNA laboratuvarı genetik tanı merkezi firmasına gönderildi. Bir indeks olgunun TED analizi merkezimizde çalışıldı. Hizmet alımı şeklinde ve merkezimizde gerçekleştirilen ekzom dizileme işleminde süreçler ticari platformlarda büyük oranda benzerlik göstermekle birlikte aralarında birtakım farklılıklar vardır. Çalışma kapsamında merkezimiz ve DNA Lab firması tarafından gerçekleştirilen ekzom dizileme işleminin benzerlikleri ve farklılıkları Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Proje kapsamında gerçekleştirilen TED çalışmalarının özellikleri

Firma/ Kurum	Cihaz	Capture kiti	Genel hizala- ma	Duplikelerin dışlanması	İndeller için lokal hizalama	Varyant çağırma
DNA Lab	MGI DNBSEQ- G400	Twist Human Core Exome	BWA MEM	MarkDuplicates (Picard) -GATK	Haplotype Caller	HaplotypeCaller (GATK)
İTF	Ion S5XL	Ion AmpliSeq Exome Kit Ion 540 çip	TMAP	- (Amplikon temelli)	TMAP	Ion reporter v5.18

Hizmet alımı kapsamında DNA Laboratuvarları Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezinde yapılan ıslak laboratuvar çalışmaları kapsamında; dizileme öncesi kütüphane hazırlanması basamağında ekzom bölgesini hedef alan Twist Human Core Exome kiti kullanıldı. Dizileme işlemi DNBSEQ-G400 platformunda; haritalama, kalite analizleri BaseRecalibrator (GATK) programında gerçekleştirildi.

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik moleküler laboratuvarında gerçekleştirilen YND tabanlı TED çalışması kapsamında Ion AmpliSeq Exome Kit Ion 540 çip (60- 80M. reads) kullanılarak kütüphane hazırlandı. Dizileme işlemi Ion GeneStudio S5 platformunda yapılırken, haritalama, kalite analizleri Torrent Server suit™ programında, varyant belirleme, anotasyon ve filtreleme işlemleri ise Ion Reporter v5.18 programından yararlanılarak gerçekleştirildi. Merkezimizde yapılan TED analizlerinin iş akışı aşağıda detaylandırıldı.

3.2.3.1. Islak laboratuvar çalışmaları

Ion GeneStudio S5 platformunda YND tekniğiyle genomik DNA'yı dizilemek üzere, Ion AmpliSeq Exome RDY Kit 1×8™ (Cat. No. A35907) kullanılarak ekzom kütüphaneleri hazırlandı. Ion Xpress™ Barcode Adapters Kits™ (Cat. No. 4474517; 1-96 arası tüm adaptör seti) ile barkodlu kütüphaneler oluşturuldu ve bu kütüphaneler birleştirilerek tek bir Ion chip'e yüklendi.

İlk aşamada hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması planlandı. DNA parçalarının ekzonik gen bölgelerini hedefleyen primerler ile amplifikasyon gerçekleştirilmesi amacıyla, her örnek için Tablo 3-2'deki içeriklerden oluşan bir stok karışım hazırlandı.

Tablo 3-2: Hedef gDNA bölgelerinin çoğaltılması amacıyla hazırlanan karışım

İçerik	Miktar
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	14 µL
50–100 ng gDNA	≤ 56 µL
Nuclease-free su	70 µL'ye tamamlanır

Stok solüsyon vorteks ile karıştırılarak kısa süre santrifüj edildi. Örnek başına bu karışımdan 5 µL alınarak Ion AmpliSeq™ Exome RDY *plate* üzerinde bulunan tek bir yatay sıraya (12 kuyucuk) dağıtıldı. *Plate*, MicroAmp™ şeffaf yapışkan film (seal) ile sıkıca

kapatılarak kısa süreli santrifüj edildi. Bir sonraki aşamada Tablo 3-3’de gösterilen koşullar kullanılarak PZR çalışması gerçekleştirildi.

Tablo 3-3: Hedef bölgelerin amplifikasyonu için termal döngü programı

Basamak	Adım	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	Enzim aktivasyonu	99°C	2 dk
Döngü (10 döngü)	Denatürasyon için	99°C	15 sn
	Bağlanma ve Uzatma	60°C	16 dakika
Bekleme	-	10°C	-

Daha sonra hedefli çoğaltılan reaksiyonların birleştirilmesi aşamasına geçildi. Damlacıkları *plate* üzerindeki kuyuların dip tarafına toplamak amacıyla kısa süreli santrifüj işlemini takiben şeffaf yapışkan film çıkarıldı. Her bir örnek için 12 hedef amplifikasyon reaksiyonu, 1–5 ve 7–12. kuyularından sütunun 6. kuyucuğuna aktararak birleştirildi.

Bu işlemten sonra amplikonların kısmen kesilmesi adımına geçildi. Birleştirilmiş her bir hedef amplifikasyon reaksiyonuna 6 µL FuPa Reaktifi eklenerek toplam hacim yaklaşık 60 µL’ye tamamlandı. Böylece amplikonların primer, adaptör ve barkodlara bağlanmasını sağlamak için uçların kısa kesilmesi ve yapışkan uç (“*Sticky end*”) haline gelmesi sağlandı. *Plate*, MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatılmadan önce toplam hacmin yaklaşık yarısını alacak şekilde en az 5 kez pipetleyerek karıştırıldı ve vorteks işlemini takiben kısa süre santrifüj edildi. Termal döngü cihazı koşulları Tablo 3-4’te gösterilen koşullara ayarlanarak PCR cihazında enzimatik reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3-4: Amplikonların kesimi için kullanılan termal döngü programı

Sıcaklık	Zaman
50°C	20 dakika
55°C	20 dakika
60°C	20 dakika
10°C	Bekleme

Daha sonra adaptörlerin bağlanması ve barkodlama ve pürifikasyon işlemlerine geçildi. Seçilen her barkod ve her adaptör için dilüsyon oranı 1:4 olacak şekilde Ion P1 Adaptörü ve Ion Xpress™ Barkod X karışımı hazırlandı ve oluşturulan karışımdan ligasyon reaksiyonuna 6 µL eklendi. Barkod-adaptör karışımı için kullanılan malzemeler ve hacimleri Tablo 3-5'te belirtildi.

Tablo 3-5: Barkod – adaptör karışımında kullanılan malzemeler ve hacimleri

İçerik	Hacim
Ion P1 Adaptör	2 µL
Ion Xpress Barcode X	2 µL
Nuclease-free su	4 µL
Toplam	8 µL

Ligasyon amacıyla *plate* üzerinde içeriğin toplanması için kısa süre santrifüj sonrası üzerindeki yapışkan film çıkarıldı. Kesilmiş ampliconları içeren her bir kuyuya Tablo 3-6'da belirtilen bileşenler eklendikten sonra toplam hacmin yarısına ayarlanarak en az 5 kez pipetleyerek karıştırıldı.

Tablo 3-6: Barkod – adaptör ligasyon karışımı bileşenleri ve hacimleri

İçerik	Miktar
Switch Solution	12 µL
IonCode™ Barcode Adaptörleri veya seyretilmiş Ion Xpress™ Barcode Adapters mix (barkodlu kütüphaneler için)	6 µL
DNA Ligase	6 µL
Total miktar (kesilmiş ~ 60 µL amplicon dahil)	~ 84 µL

Plate yeni bir şeffaf yapışkan film ile kapatılıp vorteks işlemini takiben kısa süreli santrifüj edildi ve termal döngü cihazına yüklendi. Tablo 3-7'de belirtilen koşullarda PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3-7: Ligasyon aşamasında uygulanan termal döngü programı

Sıcaklık	Zaman
22°C	30 dakika
68°C	5 dakika
72°C	5 dakika
10°C	Bekleme

Barkodlanan ürünlerin saflaştırılması için her kütüphaneye 80 µL Agencourt™ AMPure™ XP reaktifi eklendi. Boncuk süspansiyonu ve DNA'nın iyice karışması amacıyla pipetaj uygulandı. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. *Plate*, bir DynaMag 96 mıknatıs rafa (*Cat. No. 12331D*) yerleştirildi ve çözelti şeffaflaşmaya kadar inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde pellete zarar vermeden süpernatant çekilerek atıldı. Kuyucuklara %70'lik etanolden 150 µL eklendi, boncukları yıkamak için *plate* mıknatıs raf içinde yan yana hareket ettirildi ve 5 dakika/çözelti temizlenene kadar inkübe edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. İkinci bir yıkama için bu adım tekrarlandı. Boncuklarda etanol kalıntılarını ortadan kaldırmak için mıknatıs rafta tutulan *plate*, oda sıcaklığında beş dakika boyunca hava ile kurutuldu.

Daha sonra kütüphanenin çoğaltılması ve pürifikasyonu işlemlerine geçildi. Bunun için Ion AmpliSeq™ kütüphanesini içeren *plate* mıknatıstan çıkarıldı, her bir boncuk pelletine 50 µl 1X Library Amp mix ve 2 µL 25X Library Amp primeri eklenerek pipetaj yapıldı. *Plate*, MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatılarak vorteks ve santrifüj işlemlerine tabi tutuldu. Daha sonra Tablo 3-8'de verilen koşullara göre PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3-8: Kütüphane amplifikasyonu için uygulanan PZR protokolü

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	98°C	2 dakika
5 döngü	98°C	15 saniye
	64°C	1 dakika
Bekleme	10°C	Bekleme

Daha sonra PZR ile çoğaltılan kütüphanenin pürifikasyonu aşamasına geçildi. Kuyuların altındaki içerikleri toplamak için kısa süreli santrifüj edilen *plate* üzerindeki kaplama bantı çıkarıldı. Boncukları dağıtmak için iyice vortekslenerek çözelti dikkatle pipetlendi. Taze hazırlanmış %70 etanolden 230 µL ile örnek başına 100 µL nükleaz içermeyen su ile birleştirildi. Pürifikasyonun ilk aşamasında 50 µL örnek içeren her bir kuyucuğa 25 µL (0.5X örnek hacmi miktarı) Agencourt™ AMPure XP reaktifi eklendi ve karışım pipetaj işlemini takiben 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. *Plate*, çözelti temizlenene kadar DynaMag™-96 mıknatıs rafa yerleştirildi. Her kuyucuktaki süpernatant yeni bir 96 yuvalı *plate* üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 60 µL (1.2X orijinal örnek hacmi miktarı) Agencourt™ AMPure XP reaktifi eklenerek pipetaj yapıldı. Oda ısısında beş dakika inkübe edilen *plate* çözelti berraklaşana kadar DynaMag 96 mıknatısta tutuldu. Amplikonların bağlı olduğu pellete dikkat edilerek çekilen süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Boncukların yıkanması için her bir kuyucuğa 150 µL %70 etanol eklendi ve *plate* mıknatıs raf içinde hareket ettirilerek çözeltinin berrak hale gelmesi sağlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi tekrarlandı. *Plate*, mıknatıs rafta tutularak boncukların 5 dakika süreyle oda sıcaklığında kuruması sağlandı. Daha sonra mıknatıslı raftan alınan *platein* üzerine 50 µL TE eklenerek en az beş kez olacak şekilde pipetaj yapıldı. *Plate*, şeffaf yapışkan bir film ile kaplandıktan sonra vorteks ve santrifüj işlemlerine tabi tutuldu ve oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübasyonu takiben mıknatıslı rafa yerleştirildi. Bu aşamada istenen amplikonları içeren süpernatantın alikuotu Qubit™ fluorometre ile kütüphane miktar tayini ve sulandırma faktörünün belirlenmesi için kullanıldı.

Fluorometre ile kütüphane miktarı tayini ve seyreltme faktörünün hesaplanması amacıyla çoğaltılmış her kütüphanenin 10 µL'si Qubit dsDNA HS test kiti (*Cat. No. Q32851* veya *Q32854*) ve Qubit™ 3.0 fluorometre (*Cat. No. Q33226*) analizi gerçekleştirildi. Qubit™ dsDNA HS tamponu, Qubit™ dsDNA HS reaktifi kullanılarak 1: 200 oranında seyreltildi. 190 µL seyreltilmiş Qubit dsDNA HS reaktifi ile 10 µL çoğaltılmış Ion AmpliSeq ekzom kütüphanesi birleştirildi. 2 dakika inkübasyon süresini takiben Qubit 3.0 fluorometre ile konsantrasyon ölçümü yapıldı. Hesaplanan kütüphane konsantrasyonuna bağlı olarak, yaklaşık ~ 22 ng/mL konsantrasyona ulaşacak şekilde seyreltme faktörü belirlendi.

Seyreltme işlemini takiben kütüphanelerin birleştirilmesi ve kalıp (*template*) hazırlama aşamasına geçildi. Thermo Fisher Scientific Ion Torrent YND platformunda taslak oluşturma işlemi emülsiyon bazlı klonal amplifikasyon (emPCR) metodu ile gerçekleştirilir. Platform bu

işlemi Ion OneTouch™ 2 System ya da “robotik library” hazırlığı da yapabilen Ion Chef™ Sistemi (Cat. No. 4484177) ile otomatik olarak sağlamaktadır.

İş akışı kapsamında ilk aşamada kalıp hazırlama ve dizileme cihazlarının kontrolünü sağlayan Torrent Suite™ yazılımında “*plan new run*” özelliği ile tüm işlemler, akış sayısı, kit türleri, barkodlar, numune bilgileri ve referans dosyaları gibi ayarlar girilerek dijital olarak ayarlandı. Bu şekilde örneklerin, çipler ve reaktiflerin Ion Chef™ cihazında kalıp hazırlanmasından Ion GeneStudio S5 üzerinde dizileme ve sonraki veri analizine kadar iş akışı boyunca takibi sağlandı. Kütüphaneler birleştirilmeden önce ayrı ayrı 100 pM’a getirildi, sonra eşit hacimlerde birleştirildi. Ion AmpliSeq™ Exome RDY kütüphane örnekleri nükleaz içermeyen su ile konsantrasyon 50–100 pMq olacak şekilde dilüe edildi ve cihaza yükleme yapmadan önce -20 reaktifleri oda sıcaklığına getirildi. Dilüe edilmiş kütüphane örnekleri Ion 540™ Chef Reagents kartuşunda bulunan library sample tube (barkodlu tüpler) içine eklendi. Pipet ucu rafları ve PZR plakası, reaktifler ve çözelti kartuşları, her biri 25 µL seyreltilmiş kütüphane içeren kütüphane tüpleri, kurtarma tüpleri ve zenginleştirme kartuşları, kalıp hazırlığı ve dizileme için kullanılacak çipler sırasıyla üretici talimatlarına uygun şekilde Ion Chef™ cihazına yüklendi. Program sonunda hazırlanan çipler Ion Chef™ cihazından alınarak dizileme cihazına yüklendi ve dizileme işlemi başlatıldı. İşlem sonucunda elde edilen veriler, IonReporterUploader eklentisi kullanılarak Torrent Suite™ yazılımı aracılığıyla Ion Reporter™ yazılımına otomatik olarak aktarıldı.

3.2.3.2. Ekzom verilerinin biyoinformatik analizi

Merkezimizde gerçekleştirilen TED verilerinin biyoinformatik analizleri için Ion reporter v5.12.2.0 programı kullanıldı. Hizmet alımı kapsamında YND işlemleri sonucunda elde edilen veriler ham data halinde (.fastq, .bam, .bai) temin edildi ve filtreleme yüzü ile excel formatında incelemeye alındı. Biyoinformatik analizlere başlamadan önce literatürde veri madenciliği yapılarak artrogripozis ile ilişkisi bildirilmiş veya olası ilişkili olduğu düşünülen 474 geni içeren bir liste oluşturuldu. İlk filtrelemede çalışmadaki 11 olgunun bu listede yer alan 474 gen açısından monoallelilik, biallelik ya da X kromozomuna bağlı kalıtımı dikkate alınarak ekzom verileri analiz edildi. UCSC’de bulunan yaygın tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) dışlanması (UCSC Genome Browser, 1000 Genom, vb), minör allel frekansı (MAF) <0.001 olarak belirlenmesi, varyant tipleri ve zigosite gibi parametreler değerlendirildi. Ayrıca varyantlar ‘*in-house data*’ olarak adlandırılan kurum içinde oluşturulmuş varyant verileri ile karşılaştırılarak sık görülen değişimlerin dışlanması sağlandı. Saptanan varyantlar; protein üzerindeki tahmini etkisi, ekspresyon paternleri, türler arası

korunmuşluk gibi veriler göz önünde bulundurularak yorumlandı; mutasyon tiplerine göre anlamsız, çerçeve kayması, kırılma hatası ve yanlış anlamlı olmak üzere öncelik sırasına göre değerlendirildi. Tespit edilen varyantların patojenitesi *The American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) kriterlerine göre sınıflandırıldı (184). İkinci filtrelemede, aday değişimler birbirinden bağımsız çeşitli *in silico* tahmin araçları (MutationTaster, Human Splicing Finder, SIFT, PROVEAN vb.) yardımıyla değerlendirildi ve Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Human Gene Mutation Database (HGMD), Ensembl, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Genecards, ClinVar, Varsome ve UCSC Genome gibi portal ve veritabanları kullanılarak incelendi. Bütün aday varyantların okuma derinliğinin en az 20X olmasına dikkat edildi ve ham okuma verileri Integrative Genomics Viewer (IGV) programı üzerinden değerlendirildi. Varyant sıklıkları için GnomAD (v2.1.1) ve Allele Frequency Aggregator (ALFA) veri tabanlarından yararlanıldı (185, 186). Daha önce klinik ilişkisi bilinmeyen genlerde heterozigot fonksiyon kaybı değişimlerine toleransın olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla pLI (*the probability of being loss-of-function intolerant*) skorları kullanıldı ve sınır değer $pLI \geq 0,9$ olarak kabul edildi (187). Fenotip ve kalıtım paterni ile uyumlu olduğu düşünülen varyantlar için Sanger dizi analizi ile konfirmasyon ve ailevi segregasyon çalışmaları planlandı.

3.2.3.3. Varyantların sınıflandırılması

Varyant sınıflandırılmasında ACMG'nin varyant değerlendirmelerinde kullandığı kategorizasyon dikkate alındı (184). ACMG standartlarına göre varyant etkilerinin belirlenmesinde kullanılan değerlendirme kriterleri Tablo 3-9, Tablo 3-10 ve Tablo 3-11'de belirtilmiştir (184).

Tablo 3-9: Varyant Puanlama Tablosu

Patojenik	1. 1 çok güçlü (PVS1) ve - ≥ 1 güçlü (PS1-PS4) veya - ≥ 2 orta (PM1-PM6) veya - 1 orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya - ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) 2. ≥ 2 güçlü (PS1-PS4) 3. 1 güçlü (PS1-PS4) ve - ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya - 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya - 1 orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)
------------------	---

Olası patojenik	1 çok güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya 1 güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya 1 güçlü (PS1-PS4) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5)
Önemi bilinmeyen	1. Kriterlerin hiçbirini karşılamayan veya 2. Zararsız veya patojenik özellikleri karşılayan kriterlerin tutarsızlığı
Olası zararsız	1. 1 güçlü (BS1-BS4) ve 1 destekleyici (BP1-BP7) veya 2. ≥ 2 destekleyici (BP1-BP7)
Zararsız	1. 1 tek başına (BA1) veya 2. ≥ 2 güçlü (BS1-BS4)

PVS, pathogenic very strong; PS, pathogenic strong; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting, BA, benign alone; BS, benign strong; BP, benign supporting

Tablo 3-10: Patojenik olduğu öne sürülen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler

Kanıt niteliği	Patojenite kriterleri
Çok güçlü	PSV1 Fonksiyon kaybının hastalık mekanizmasında yer aldığı bilinen genlerde lokalize <i>null</i> varyant varlığı (anlamsız mutasyon, çerçeve kayması, ± 1 veya 2 kırılma bölgesi, başlangıç kodonu, tek ya da çoklu ekzon delesyonları)
Güçlü	PS1 Nükleotid değişiminden bağımsız olarak daha önce bildirilmiş bir patojenik varyant ile aynı aminoasit değişimi PS2 Aile öyküsü olmayan hastada saptanan ve parental konfirmasyonu yapılmış olan <i>de novo</i> değişim PS3 Genin ya da gen ürününün olası zararlı etkisini destekleyen <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> fonksiyonel çalışmaların varlığı PS4 Etkilenmiş bireylerdeki varyant prevalansının kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olması

Orta	PM1 Mutasyonel <i>hotspot</i> noktada ve/veya kritik ve iyi bilinen fonksiyonel <i>domainde</i> lokalize zararsız olmayan değişim PM2 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu, Ekzom Dizileme Projesi gibi büyük çalışmalarda kontrol gruplarında bulunmaması veya homozigot frekansının çok düşük olması PM3 Resesif hastalıklarda patojenik bir varyantın trans allelde gösterilmesi PM4 Tekrarlamayan bölgelerdeki çerçeve içindeki delesyon/insersiyon ya da dur kodonu kaybının proteininin uzunluğunda değişimle sonuçlanması PM5 Yeni bir yanlış anlamlı değişimin, daha önce patojenik olduğu tanımlı amino asit rezidüsünde görülmesi PM6 <i>De novo</i> olduğu varsayılan fakat ailede segregasyon çalışması ile doğrulanmamış değişim
Destekleyici	PP1 Hastalığa neden olduğu bilinen bir gende lokalize varyantın birden fazla etkilenmiş aile üyesinde gösterilmesi PP2 Zararsız yanlış anlamlı varyasyonların düşük sıklıkta görüldüğü ve hastalık etiolojisinde yanlış anlamlı varyantların sık yer aldığı genlerde lokalize değişimler PP3 Gen ya da gen ürününde zararlı etkiye yol açabileceği (korunmuşluk, evrimsel, kırılma etkisi vb.) çeşitli istatistiksel hesaplamalar ile desteklenen varyantlar PP4 Hasta fenotipi ya da aile öyküsünün yüksek oranda tek bir genetik etiyojolojiye işaret etmesi durumu PP5 Laboratuvar ortamında bağımsız olarak patojenitesi kanıtlanmamış bir varyantın saygınlığı bulunan bir kaynak tarafından patojenik olarak rapor edilmiş olması

PSV, pathogenic very strong; PS, pathogenic strong; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting

Tablo 3-11: Zararsız olduğu öne sürülen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler

Kanıt niteliği	Zararsız değişim lehine olan kriterler
Tek başına yeterli	BA1 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu, Ekzom Dizileme Projesi gibi büyük çalışmalarda allel frekansının >%5 olması
Güçlü	BS1 Allel frekansının hastalığın görülme sıklığından yüksek olması BS2 Sağlıklı bir yetişkin bireyde, erken yaşta tam penetrans beklenen (resesifler için homozigot, dominant için heterozigot ve X'e bağı kalıtım için hemizigot) gözlenen değişimler BS3 <i>In vitro</i> veya <i>in vivo</i> fonksiyonel çalışmalar ile protein fonksiyonunda ya da kırılma etkisinde zararlı etkinin bulunmadığının gösterilmesi BS4 Değişimin ailedeki benzer etkilenmiş bireylerde segrege olmaması

Destekleyici	BP1 Hastalık mekanizmasında ekseriyetle trunke edici varyantların yer aldığı genlerde lokalize yanlış anlamlı varyantlar BP2 Tam penetrans gösteren dominant bir gen/hastalıkta, patojenik bir varyant ile trans konumda bulunması veya herhangi bir kalıtım paterni durumunda patojenik bir varyant ile cis konumda bulunduğunun gösterilmesi BP3 Fonksiyonu bilinmeyen tekrar bölgelerinde yer alan çerçeve içi delesyon veya insersiyonların varlığı BP4 Gen veya gen ürününde zararlı etkiye yol açmadığı (korunmuşluk, evrimsel, kırılma etkisi vb.) çeşitli istatistiksel hesaplamalar ile desteklenmiş olan varyantlar BP5 Hastalık için alternatif moleküler temeli saptanmış bir vakada bulunan varyant BP6 Laboratuvar ortamında bağımsız olarak kanıtlanmamış ancak saygınlığı bulunan bir kaynak tarafından varyantın zararsız olarak rapor edilmesi BP7 Kırılma hatasına yol açmayan ya da yeni kırılma bölgesi oluşturmayan ve yüksek korunmuş bölgede yer almayan sinonim değişimler
---------------------	---

BA, benign alone; BS, benign strong; BP, benign supporting

3.2.3.4. Varyantların adlandırılması

Çalışmamız kapsamında tespit edilen tüm varyantların genomik adlandırılması özellikle belirtilmedikçe hg19/GRCh37'ye göre yapılmıştır. Varyantların nomenklatüre uygunluğu mutalyzer 2.0.21 (<https://mutalyzer.nl>) veritabanından kontrol edilmiş, saptanan değişimler nükleotid ve protein adlandırılmalarına uygun olarak düzenlenmiştir.

3.2.4. YND ile Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme ile Doğrulanması

3.2.4.1. Primerlerin tasarlanması

Her aday varyant için gen-spesifik primerlerin tasarlanması sürecinde, seçilen bölgelerin NCBI veri tabanında varyantın tespit edildiği transkriptin NM kodu baz alınarak, saptanan varyantı da kapsayacak şekilde ortalama 500 bazlık gen dizisi seçilmiş; ardından manuel olarak optimum nitelikte (erime sıcaklığı birbirine yakın, uzunlukları 17-25 nükleotid arasında, A-T ve C-G nükleotid dağılımları eşite yakın dağılım gösteren ve kendisi veya birbiriyle *hairpin* yapısı kuramayacak şekilde) ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. Primerlerin, güncel dbSNP veritabanı kullanılarak tasarlanan bölgeye denk düşen SNP veya tekrar dizileri (SINE, LINE) içermediği teyit edilmiştir. Primer özgünlükleri; UCSC Genome Bioinformatics (188) veritabanına ait “*in silico PCR*” interaktif sistemi, NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ve IDT OligoAnalyzer™ Tool ile test edilmiştir. Çalışmamız kapsamında tasarlanan ve kullanılan primer çiftleri Tablo 3-12’de gösterilmiştir.

Tablo 3-12: Çalışmamız kapsamında tasarlanan primer çiftleri, ampikon boyları ve Tm değerleri

Aile no	Gen sembolü	NM kodu	Ekzon	Primer F/R	Fragman uzunluğu (bp)	TM (°C)
1	<i>HSPG2</i>	NM_005529.7	89-91	5' – CGA GAA TCC ATG CTA CCA CTC A –3' 5' – CTA GCT CCA CAT GGC TGT GGT –3'	851	63-61
2	<i>COG6</i>	NM_020751.3	19	5' – GCT AGG AGA TGT GGT TGT TAG TGT – 3' 5'– GCA ATA CTA GCT CAG GTC AAC ATG T – 3'	825	61-59
3	<i>DOK7</i>	NM_173660	2	5' – GAA CCA TGA CAG AAG ATG ACC GA –3' 5'– GAT TTT GGG CAA GCT GGC A –3'	280	66-64
4	<i>RYR1</i>	NM_000540.3	71	5' – GAG GTG TCG TCG GCA GTT –3' 5'– GAA GGC TCC CAG GGA CCT –3'	423	62-60
5	<i>RAPSN</i>	NM_005055.5	1	5' – GCT CCA GCT GTA CCA GTC CA–3' 5'– GCC TGA ATC TGA TGC CAA GA –3'	342	62-60
5	<i>RAPSN</i>	NM_005055.5	2	5' – GGT CTG AGC CTG CAG TGC A –3' 5'– TGA ATC CTG GCT CTG CCC T –3'	616	64-62
6	<i>KIAA1109</i>	NM_001384125.1	76	5' – GCT AAT GCT CAT TAG ATC CCT CT –3' 5'– CTG TAC CAA TTC ATG GTG GAG A –3'	627	60-58
6	<i>USH2A</i>	NM_206933.4	13	5' – GGA CTG TCT GTA ATG CTA AGA CA–3' 5'– GTC ACA AAT GGT CCC AGG T –3'	329	58-56
7	<i>NEB</i>	NM_001271208.2	5	5' – CAG TGT GCC ATT TCC TGC TT – 3' 5' – CAA ATC CAG CCA GCA TCC A – 3'	459	63-61
7	<i>NEB</i>	NM_001271208.2	88/96 /104	5' – GTC TGT GTA ATG TAC ATC TCA ATG T – 3' 5' – GAG CTC TTA CAT CAC TGG CA – 3'	538	56-54
7	<i>DNAH9</i>	NM_001372.4	20	5' – CAG CTG GTT GCT ACC TTA GAG A–3' 5' – CTG GTC CAT AGT GAA GCT CA –3'	540	59-57
7	<i>DNAH9</i>	NM_001372.4	21	5' – GGA GCT TCT AGG AAC TGA GTG GA –3' 5' – CTG AAG TAC AGA ACC TGC CAG A –3'	751	61-59
8	<i>NEB</i>	NM_001271208.2	148	5' – GCA GTG AGG GAC CAA GAA GCT –3' 5'– GAG TCC AGC CAG GCC TTC A –3'	531	64-62
9	<i>PSAT1</i>	NM_058179.4	6	5'– GAA CTG CTC CCT ACA CAG GAT–3' 5'– GCC TCA GCC TCC TTA GTA GCT–3'	577	60-58
9	<i>VPS13B</i>	NM_017890.4	23	5' – GCC AGC ACA CTT TCT AAC TCA ATC T –3' 5'– GAA GGC AAT AAA TGG CAT CAC T –3'	666	62-60
9	<i>FBN2</i>	NM_001999.4	52	5' – GGT CTC AAG CTC CTG ACC TCA –3' 5'– CTG GTG AAG AAG GTG CCA CT –3'	402	62-60
10	<i>PIEZO2</i>	NM_001378183.1	36	5' – GTC AGG AAG CTT GGT GTA GGT –3' 5'– CCA AGT GTC AGA AAT GAC CAA TTA–3'	354	60-58
11	<i>USP14</i>	NM_005151.4	4	5'-CTC CAG TCC TAG GCA GCA ACT A-3' 5'-GTC TTC AAG ACA TTC AGA TGC TAC T-3'	361	60-58

Ayrıca, ebeveynlere ait genomik DNA örneklerinin elde edilememesi durumunda varyantların birbirlerine göre konumlarının belirlenebilmesi amacıyla allel-spesifik primer çiftleri tasarlandı. Allele özgü primerler, 3' uçtaki son baz mutant allele komplementer olacak şekilde dizayn edildi (Tablo 3-13).

Tablo 3-13: Çalışmamız kapsamında tasarlanan allele özgü primer çiftleri, amplicon boyları ve Tm değerleri

Aile no	Primerin adı	Ekzon/ Dizi yönü	Primer F/R	Tm (°C)	Fragman uzunluğu (bp)
5	RAPSN-F1	Ekzon 1 F1	5' – GCT CCA GCT GTA CCA GTC CA-3'	62-60	1093
	RAPSN-Mut_R1		5'- CCC AGG CTG CAG CAC AT-3'		
	RAPSN-Mut_F2	Ekzon 2 R2	5' – ATG GGG CGC TTC CGCA-3'	66-64	1232
	RAPSN-R2		5'- TGA ATC CTG GCT CTG CCC T -3'		

3.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu için 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific), %0-10 DMSO (Biomatik Cooperation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2 – 0,5 µM ileri ve geri primerler (Sentebiolab), 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Hibridgen) ve 150-200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH₂O) ile son hacim 25 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge, DNA içermeyen negatif kontrol PZR ile birlikte olacak şekilde, Tablo 3-14'de verilen PZR döngüsel koşulları altında termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) çalışıldı.

Tablo 3-14: PZR döngüsel koşulları

Denatürasyon	94°C	5 dk	x1 döngü
Denatürasyon	94°C	30 sn	x10 döngü
Bağlanma	Primer Bağlanma ısısı	30 sn	
Uzama	72°C	45-90 sn	
Denatürasyon	94°C	30 sn	x25 döngü
Bağlanma	Primer Bağlanma ısısı	30 sn	
Uzama	72°C	45-90 sn	

Uzama	72°C	10 dk	x1 döngü
Bekleme	4°C	1 sa	x1 döngü
Duraklama	10°C	∞	x1 döngü

Amplifikasyon sonrasında çoğaltılan gen bölgelerinin, hedeflenen bölge olduğunun validasyonu ve deneyin kontamine olup olmadığını tespit etmek amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulandı: 5 µl PZR ürünü ile 1.5 µl *Gel Red* boyası karıştırılarak, 50 bç'lik merdiven markörü (*Sigma*) paralelinde 1X TBE tamponu içindeki %1,2'lik agaroz (*Sigma*) jelde, 160 Voltta 30 dakika yürütüldü ve beklenen baz çifti uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Bantlar ultraviyole ışık altında görüntülenerek kayıt edildi.

3.2.4.3. PZR ürünlerinin saflaştırılması

Tez kapsamında PZR ürünlerinin saflaştırılmasında spin kolon yöntemi ve enzimatik yöntem olmak üzere iki farklı yöntem kullanıldı.

3.2.4.3.1. Spin kolon yöntemi ile saflaştırma

Saflaştırma işlemi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi (*High Pure PZR Product Purification Kit, Roche 11732676001*). 50 µl PZR ürünü üzerine 250µl bağlanma tamponu eklenmesini takiben karışım oda ısısında filtreli tüp içerisine aktarıldı. 13000 rpm'de 60 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken solüsyon atıldı. Filtreli tüpe 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken solüsyon atıldı. Tüp üzerine 200 µl yıkama solüsyonu eklenerek 13000 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. Filtre steril 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılarak içerisine 50 µl Elüsyon tamponu eklendi ve 13000 rpm'de 60 sn santrifüj edildi. 1.5 ml'lik ependorf içindeki PZR ürününden 5 µl alınarak agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında bantlar kontrol edildi. Ürünler bir sonraki işleme kadar +4°C'de saklandı.

3.2.4.3.2. Enzimatik yöntem ile saflaştırma

Saflaştırma için Ekzonükleaz-I (*Lot:00716871-Thermo Scientific*) enzimi ve Rapid Alkalın Fosfataz (*04898141001-Roche*) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında 37°C'de 30 dakika, 85°C'de 15 dakika protokolü uygulandı. Saflaştırılmış ürünler bir sonraki işlem için +4°C'de saklandı.

3.2.4.4. Dizi PZR reaksiyonu

5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer (PZR için gerekli kimyasalları içermektedir), BigDye v3.1 (ddNTP ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), primer/primerler (tek veya çift yönlü), saflaştırılmış PZR ürünleri ve dH₂O ilavesiyle, final hacmi 10µl olacak şekilde *plate* (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate-N8010560) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde yüklendi. Protokol toplam 25 döngüde; 96°C’de 10 sn ile denatürasyon, 50°C’de 5 sn ile bağlanma ve 60°C’de 4 dk ile sonlanma basamaklarını içerecek şekilde ayarlandı ve *plate* termal döngü cihazına yerleştirildi. Dizi reaksiyonu tamamlandıktan sonra ürünler 4°C’ye gelen cihazdan alındı.

3.2.4.5. Dizi PZR reaksiyonu ürünlerinin saflaştırılması

Dizi PZR reaksiyonu ürünleri alkolle çöktürme yöntemi kullanılarak saflaştırıldı. BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden arındırılması için *plate* içerisine ürün başına 1’er µl 125 mM EDTA, %2’lik glikojen ve 3M sodyum asetat eklendi ve her bir kuyucuğa 25 µl %100 etanol ilave edildi. *Plate*, alüminyum koruyucu yapışkan bantla kapatılarak 15 dakika oda ısısında bekletildi. 3.810 rpm’de 60 dk santrifüj işlemini takiben koruyucu bant çıkarıldıktan sonra *plate* ters çevrilerek 1.100 rpm’de 30 sn kısa santrifüj yapıldı. Ardından her bir kuyucuğa 35 µl %70’lik soğuk etanol eklendi ve koruyucu bantla kapatılarak 3460 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. *Plate* üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve *plate* ters çevrilerek 1170 rpm’de 60 sn kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (*Highly Deionized Formamid*) eklendi. Örnekler, termal döngü cihazında 97 °C’de 5 dk denatüre edildikten sonra 2 dk soğuk blok üzerinde bekletildi.

3.2.4.6. Elektroforez cihazına yükleme

Saflaştırılan ampikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapillerli elektroforez cihazında (*Applied Biosystem*) gerçekleştirildi. *Plate* (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate-N8010560), kısa santifüjü takiben cihaza yerleştirilerek yürütme işlemine geçildi. Yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti *Z Dyeset* kullanıldı. Ön yürütme voltajı 15 kV, yürütme voltajı 13,4 kV, injeksiyon voltajı 1,6 kV, ön yürütme süresi 180 saniye, yürütme süresi 2.520 saniye, injeksiyon zamanı 8 saniye ve veri gecikmesi (*data delay*) 250 saniyeye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

3.2.4.7. Dizileme sonuçlarının değerlendirilmesi

Kapiller elektroforezden alınan ab1 dosyası, ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v3.0 (ABI) programlarında analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklenerek transkriptin ekzonik ve intronik

bölgeleri program içerisine tanıtıldı. Bu işlemden sonra Fasta formatına alınan olgu dizisinin hedef bölge üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu, saflaştırma kalitesi, görüntülenen pik kalitesi, dizilenen baz sayısı, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği kontrol edilerek değerlendirildi. Bu ölçütlerin optimum olmadığı örneklerde dizileme protokolü PZR aşamasından, ya da yeterli örnek mevcut ise saflaştırma işleminden itibaren tekrarlandı. Sonuçlar YND ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

3.2.5. Periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Kantitatif RT-PZR analizleri

Total RNA'dan, random heksamer primerleri (*BIORAD iScript*) ile sentezlenen komplementer DNA (cDNA) mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için kantitatif PZR analizleri yapılarak değerlendirildi.

3.2.5.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Heterozigot olduğu bilinen bireyler ve sağlıklı kontrol bireylerden 10'ar ml EDTA'lı kan örnekleri alındıktan sonra ilk 4 saat içerisinde Gey's tamponu (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃) ile hücre ayırma işlemi gerçekleştirildi. Oluşan pellet Trizol® Reagent (*Invitrogen*) içerisinde homojenize edildikten sonra üretici firmanın talimatlarına uygun olarak total RNA ekstrakte edildi. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop 1000 Spektrofotometre (*NanoDrop Technologies, Wilmington, DE*) ile ölçüldü. Total RNA'dan iScript™ cDNA Sentez Kiti (*Bio-Rad*) kullanılarak ilgili protokole uygun bir şekilde cDNA sentezi yapıldı (Tablo 3-15).

Tablo 3-15: cDNA sentez protokolü

BIORAD iScript™ cDNA Sentez Kiti	
Reaksiyon bileşenleri	Her bir örnek için
5X iScript Reaksiyon miksi	4 µl
iScript ters transkriptaz	1 µl
Nükleazsız su	x µl
RNA	x µl

3.2.5.2. cDNA'ların polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile belirlenmesi

Total RNA'dan sentezlenen cDNA ürünlerinin elde edilip edilmediğini kontrol etmek amacıyla β -aktin kontrol PZR'si gerçekleştirildi. Sentezlenen tüm cDNA'ların PZR'si yapılarak %2'lik agaroz jelde yürütüldü.

3.2.5.3. Gen ifadelerinin kantitatif RT-PZR ile incelenmesi

USP14 c.233_236delTTCC varyantına bağlı olarak mRNA ekspresyon düzeyinin nasıl etkilendiğini belirlemek amacıyla kantitatif gerçek zamanlı PZR (RT-qPZR) çalışması uygulandı. Kontrol bireye ait cDNA örneği benzer yaş ve cinsiyeti temsil edecek biçimde seçildi. Her bir reaksiyon için üçlü tekrar olacak şekilde, dört ayrı primer kombinasyonu ile amplifiye edildi. Normalizatör gen olarak *SMCHD1* gen bölgesi kullanıldı. Kullanılan primer dizileri Tablo 3-16'da belirtilmiştir. RT-qPZR için florasen molekül olarak SsoFast EvaGreen Supermix (*Biorad*) kullanıldı. Kontrol ve taşıyıcı cDNA'ları kullanılarak *SMCHD1* ve *USP14* amplifikasyon reaksiyonları *Biorad* cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3-16: c.USP14 için tasarlanan primer çiftleri ve beklenen ürün boyları

Kullanım Amacı	Primer adı	Hedef Ekzon	Tasarlanan primerler (F/R)	Fragman Uzunluğu (bp)
Dış gen kontrolü	c.SMCHD1-QF3-4F	3	5'-GAACGAATTGACTTCTTACCTCACT-3'	100
	c.SMCHD1-QF3-4R	3-4	5'-GCAAGAGCAAATGGCAAAGGATT-3'	
İç gen kontrolü	c.USP14-QF4F	2-3	5'-GAGGAACGCTAAAGGATGATGATT -3'	75
	c.USP14-QF4R	4	5'-CTGACCCCATCATTAGTAGAGTCAT-3'	
Yabanıl allel	c.USP14_QF4F	2-3	5'-GAGGAACGCTAAAGGATGATGATT-3'	100
	c.USP14-wild-R	4	5'-GAG GGT TCT TCT GGA AGA GCA-3'	
Delesyonlu allel	c.USP14_QF4F	2-3	5'-GAGGAACGCTAAAGGATGATGATT -3'	100
	c.USP14-delk-R	4	5'-GCTGAGGGTTCTTCTGAGCA-3'	

3.2.6. Protein domain yapılarının şematik gösterimi

Patojenik veya olası patojenik olarak değerlendirilen bütün varyantların lokalize olduğu genlere ait domain yapıları çeşitli protein veri tabanlarından elde edilen bilgiler doğrultusunda (Prosite, PFAM, SMART, InterPro vb.) şematize edildi. İlgili varyantlar bu şekiller üzerinde gösterildi.

3.2.7. Protein modelleme

Yanlış anlamlı varyantların proteinlerin üç boyutlu yapısına olan etkisinin *in-silico* tahmini için web tabanlı I-Tasser programı kullanıldı. Ensembl veritabanından elde edilen referans protein dizisi ile mutant dizi I-Tasser programı aracılığı ile PDB dosyalarına çevrildi (189). Normal ve mutant proteinlere ait PDB dosyaları PyMOL yazılımı ile görselleştirildi (190). Proteinin 3D görüntüsünde, değişime uğrayan aminoasitin kimyasal yapısı ve kurduğu hidrojen bağları görünür hale getirildi. Normal ve mutant yapı karşılaştırılarak değişimin tahmini fonksiyonel etkisi değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

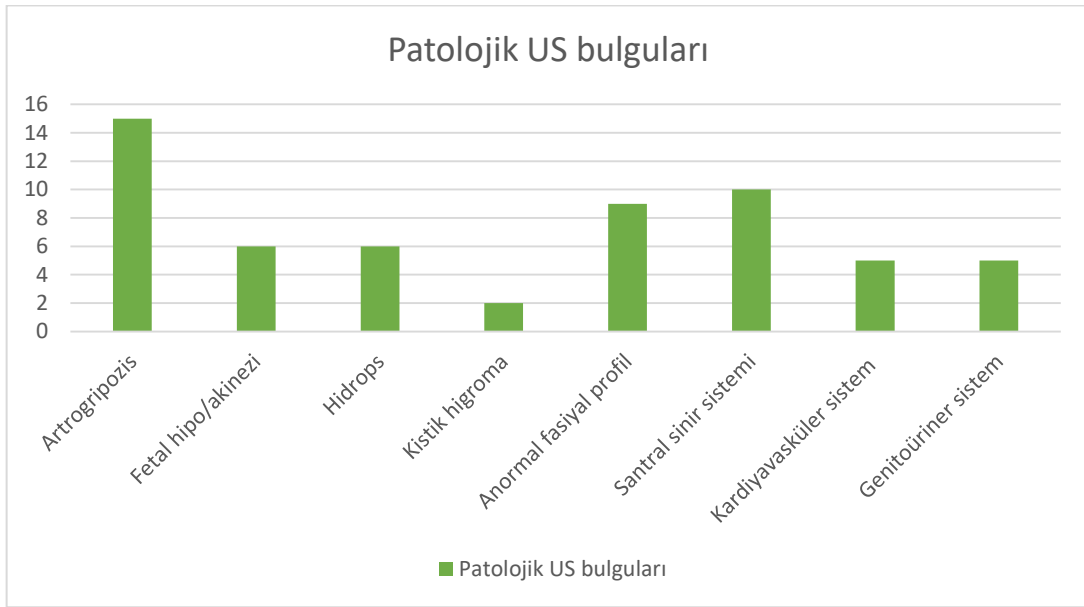
11 aileden 4'ünün en az iki benzer etkilenmiş gebelik ürünü öyküsü, bu ailelerin birinde ek olarak etkilenmiş kuzen öyküsü mevcuttu. Çalışmaya alınan olguların %40'ı dişi (6/15), %60'ı erkekti (9/15). Konsepsiyon sırasında ortalama anne yaşı 27,6 olarak hesaplandı.

Çalışma grubumuzda akraba evliliği oranı %72,7 (8/11) olup bunların %62,5'ini (5/8) birinci derece kuzen evliliği oluşturmaktaydı. Akraba evliliği bulunan ailelerin coğrafi bölgelere göre dağılımı incelendiğinde %50'si (4/8) Doğu Anadolu, %37,5'i (3/8) Karadeniz ve %12,5'i (1/8) İç Anadolu bölgesi idi. Akraba evliliği tariflenmeyen bir aile aynı yöredendi (%9).

4.2. Antenatal US Bulguları

Gebelik takipleri sırasında ilk sonografik patolojik bulgunun saptanma ortalaması 20. GH, fetal akinezi/artrogripozis bulgularının saptanma ortalaması ise 22. GH idi. En erken saptanan US bulgusu 11-14 GH'de NT artışı olup ilk trimesterde US yaptırmış sekiz olgunun beşinde (%62,5) mevcuttu.

Fetusların prenatal US bulguları değerlendirildiğinde, kontraktür oluşumunun temelinde yer alan fetal hareket azlığı olguların sadece 6'sında (%40) kaydedildi. MCC'ye eşlik eden ek sistem patolojileri değerlendirildiğinde, en sık tutulum santral sinir sisteminde (n=10, %66,6) izlendi. Bunu daha sonra sırasıyla 9 olguda anormal fasiyal profil/retromikrognati (%60), 6 olguda hidrops (%40), beşer olguda kardiyovasküler ve genitoüriner sistem patolojileri (%33,3), 2 olguda ise kistik higroma (%12,5) varlığı takip etmekteydi (Tablo 4-1). US ile saptanan sistemik anomaliler Tablo 4-2'de detaylandırılmıştır.

Tablo 4-1: Çalışma grubumuzda saptanan patolojik US bulgularının dağılımı

Tablo 4-2: Çalışma grubumuzda saptanan patolojik US bulguları

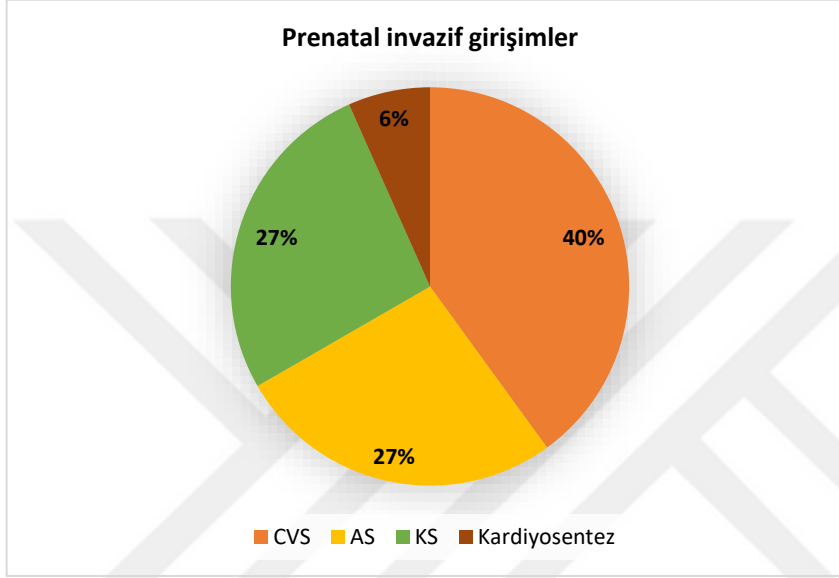
Aile/Olgu no US	MCC #1	MCC #2	MCC #3	MCC #4	MCC #5		MCC #6		MCC #7	MCC #8	MCC #9	MCC #10	MCC #11		
	V:2	V:2	IV:2	III:3	IV:2	IV:3	IV:3	IV:4	III:2	V:5	IV:1	IV:3	VI:3	VI:4	VI:10
11-14 GH, NT (mm)	7	4.5	-	-	4.9	5.6	-	6.3	1.1	-	1.1	-	2.5	-	-
İlk US bulgusu (GH)	12	12	26	24	20	20	17	21	21	15	21	29	23	18	21
US'de ilk kontraktür bulgusu (GH)	20	12	26	-	20	20	17	21	21	24	21	29	23	18	21
Fetal hipo/akinezi	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Hidrops	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Kistik higroma	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
AMV	N	N	P	P	P	P	N	N	P	O	O	P	P	P	P
IUGG	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Kortikal anomali	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Serebellar anomali	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Ventrikülomegali	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Z-shaped beyinsapı	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CC anomali	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
SSS tutulumu, diğer	-	-	MCM	-	-	-	-	-	-	Periventriküler ekojenite	Mikrosefali	-	-	-	-
Kuşkulu genitalya	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Retro/mikrognati	-	+	+	-	+		+	-	+	-	+	-	+	+	+
KKH	PLVCS	Sol aks deviasyonu	VSD	-	-	-	-	-	DORV, VSD, BAT	-	-	VSD (?)	-	-	-
Diğer	Kas atrofisi	-	-	-	-	-	Kas atrofisi	Katarakt	-	-	-	Kısa tübüler kemikler	-	-	-

GH, Gebelik haftası; N, Normal; P, Polihidramniyos; O, Oligohidramniyos; AMV, Amniyotik sıvı indeksi; IUGG, İntrauterin gelişme geriliği; CC, Korpus kallozum; MCM, Mega sisterna magna; KKH, Konjenital kalp hastalığı; PLVCS, Persistan sol vena kava superior; DORV, Çift çıkışlı sağ ventrikül; VSD, Ventriküler septal defekt; BAT, Büyük arter transpozisyonu

4.3. İnvazif Girişimler

Antenatal dönemde olguların tamamına invazif girişim yapıldı. Girişimlerin %40'ı (n=6) koryon villus biyopsisi (CVS), %26,6'sı (n=4) amniyosentez (AS), %26,6'sı (n=4) kordosentez (KS) ve %6,6'sı (n=1) kardiyosentez idi (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Prenatal invazif girişimlerin uygulanan yönteme göre dağılımı (n=15)



4.4. Postmortem Fetal Değerlendirme ve Fetal Otopsi

Olgu grubumuzda gebeliğin terminasyonu ve postmortem fetal değerlendirme ortalama 25. GH'de gerçekleştirildi. US'de saptanan malformasyonlara ek olarak üç olguda (%20) genital hipoplazi, üç olguda (%20) yarı damak, bir olguda (%6,6) femur fraktürü ve bir olguda (%6,6) tübüler kemiklerde hafif *bowing* saptandı. Prenatal US ile değerlendirilmesi mümkün olmayan tırnak hipoplazisi bir olguda (%6,6), dismorfik bulgular ise olguların tamamında (%100) mevcuttu. Postmortem fetal muayene sırasında kaydedilen muskuloskeletal anomaliler Tablo 4-4'de gösterildi.

Serimizdeki 15 olgudan 2'si (%13) fetal otopsi ile histopatolojik olarak değerlendirildi. Bir olguda otopsi incelemesi klinik tanı için yönlendirici özellikteydi. Bu olguda USG bulgusuna ek olarak timik hiperplazi, pulmoner hipoplazi ve nonspesifik myopati bulguları saptandı.

Tablo 4-4: Postmortem fetal muayenede saptanan muskuloskeletal bulgular

Aile/ Olgu no Muayene	MCC #1	MCC #2	MCC #3	MCC #4	MCC #5		MCC #6		MCC #7	MCC #8	MCC #9	MCC #10	MCC #11		
	V:2	V:2	IV:2	III:3	IV:2	IV:3	IV:3	IV:4	III:2	V:5	IV:1	IV:3	VI:3	VI:4	VI:10
GH	24	25 ⁺¹	33	26 ⁺²	22	21	22	22	25	26	31	31	27	20	21
Kontraktür paterni															
• Kalça	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
• Dirsek	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
• Diz	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
• El bileği	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• MCP/PIP/DIP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• PEV/vertikal talus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pterijiya	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Fraktür/luksasyon	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Skolyoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aberran/silik palmoplantar çizgilenme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ek radyolojik bulgular	Tübüler kemiklerde bowing		Tibial bowing, ince tübüler kemikler						İnce tübüler kemikler	Kısa tübüler kemikler					
Muskuloskeletal bulgular, diğer			Dar omuz kavşağı	El dor-solate-ralinde gamze			Kas atro-fisi		-		Kısıtlı omuz hareketleri	Dar omuz kavşağı			

GH, Gebelik haftası; MCP, metakarpofalangeal eklemler; PIP, Proksimal interfalangeal eklemler; DIP; distal interfalangeal eklemler; PEV, Pes ekinovarus

4.5. Moleküler Bulgular

Çalışmamızda 11 farklı gende (*HSPG2*, *COG6*, *DOK7*, *RAPSN*, *KIAA1109*, *NEB*, *PSAT1*, *DNAH9*, *VPS13B*, *USH2A*, *USP14*) hastalık ilişkili veya ilişkili olduğu düşünülen 15 adet varyant saptandı (Tablo 4-5). Bu varyantlardan 6'sı yanlış anlamlı, 5'i anlamsız, 4'ü ise küçük delesyon/insersiyon tipinde idi. Saptanan 15 varyantın 9'u ilk kez bu çalışmada tanımlanan *novel* nitelikte değişimlerdi. Bütün değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı ve tamamının aile çalışmaları ile kalıtım modeline uygun olarak segregе olduğu gösterildi. Literatürde, *DOK7* geninde saptanan 15 bazlık intronik delesyonun, mRNA düzeyinde intron 1 inklüzyonuna neden olduğu gösterilmişti. *KIAA1109* ve *PSAT1* genlerinde saptanan *novel* yanlış anlamlı değişimlerin ise ilgili ekzonların son bazında yer almaları nedeniyle kırılma fonksiyonunu bozması beklenmekte olup *in-silico* analiz araçları ile bu tahmin desteklenmiştir.

Tablo 4-5: TED analizi ile saptanan varyantlar ve ilişkili fenotipler

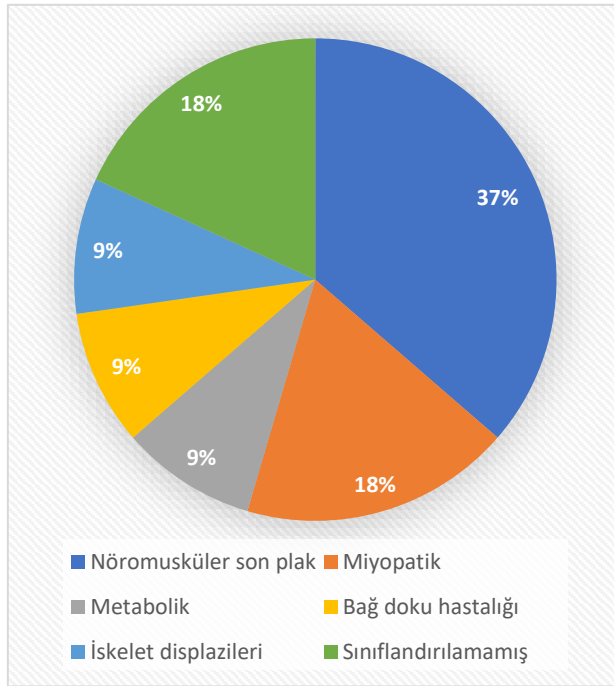
Aile no	Gen Transkript	Nükleotid	Lokasyon	Peptid	Peptid/ domain üzerindeki lokasyon	Varyant tipi	Türler arası korunmuşluk	Allel frekansı (gnomAD)	gnomAD Hom. sayısı	ACMG	İlişkili fenotip (OMIM no)
1	<i>HSPG2</i> NM_005529.7	c.12353C>T	Ekzon 89	p.(T4118M)	EGF-like 3 (domain V)	Yanlış anlamlı	6/7	0.0000557	-	VUS PM2, PP3	Schwartz-Jampel Sendromu (#255800)
2	<i>COG6</i> NM_020751.3	c.1884T>G	Ekzon 19	p.(Y628*)	COG6	Anlamsız	5/6	-	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	Konjenital glikozilasyon bozukluğu tip 2L (#614576)
3	<i>DOK7</i> NM_173660	c.54+14_54+28del	Intron 1	p.(Y19Vfs*23)	PH	Delesyon/ Kırılma	-	0.0001902	-	Hot VUS PP5	Fetal akinezi deformasyon sekansı 3 (#618389)
5	<i>RAPSN</i> NM_005055.5	c.133G>A	Ekzon 1	p.(V45M)	-	Yanlış anlamlı	7/7	0.0000324	-	Patojenik PP5, PM2, PP3	Fetal akinezi deformasyon sekansı 2 (#618388)
		c.493G>A	Ekzon 2	p.(V165M)	TPR4	Yanlış anlamlı	7/7	0.00003230	-	Olası patojenik PM1, PM5, PP3	
6	<i>KIAA1109</i> NM_001384125.1	c.12997G>A	Ekzon 76	p.(A4333T)	-	Yanlış anlamlı/ Kırılma	7/7	-	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	Alkuraya-Kucinskas sendromu (#617822)
	<i>USH2A</i> NM_206933.4	c.2610C>A	Ekzon 13	p.(C870*)	Laminin EGF-like-7	Anlamsız	7/7	0.0000119	-	Patojenik PVS1, PP5, PM2	Usher sendromu tip IIA (#276901)

7	NEB NM_001271208.2	c.169_183dup CTGGCACAGCCAG CA	Ekzon 5	p.(A61_S62 ins)	LCR	İnserasyon	-	0.000145	-	VUS PM2, PM4	Artrogripozis multipleks konjenita 6 (#619334) / OR Nemalin myopati 2 (#256030)
	NEB NM_001271208.2	c.14911G>A	Ekzon 96	p.(A4971T)	Nebulin 136	Yanlış anlamli	7/7	-	-	VUS PM2, BP4	
	DNAH9 NM_001372.4	c.4030C>T	Ekzon 20	p.(R1344*)	DHC-N2	Anlamsız	7/7	0.00000408	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	Primer siliyer diskinezi tip 40 (#618300)
	DNAH9 NM_001372.4	c.4719T>G	Ekzon 21	p.(Y1573*)	DHC-N2	Anlamsız	6/7	0.00000398	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	
8	NEB NM_001271208.2	c.22041_22045del AGAAA	Ekzon 148	p.(I7347fs*2)	Nebulin 153	Çerçeve kayması	-	-	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	Artrogripozis multipleks konjenita 6 (#619334)
9	PSAT1 NM_058179.4	c.740G>C	Ekzon 6	p.(S247T)	Aminotran V	Yanlış anlamli/ Kırılma	6/7	-	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	Neu-Laxova sendromu 2 (#616038)
	VPS13B NM_017890.4	c.3427C>T	Ekzon 23	p.(R1143*)	-	Anlamsız	7/7	0.00003983	-	Patojenik PVS1, PP5, PM2, PP3	Cohen sendromu (#216550)
11	USP14 NM_005151.4	c.233_236delTTCC	Ekzon 4	p.(L78Qfs*11)	Ubiquitin- like	Çerçeve kayması	-	-	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	Distal artrogripozis, SSS anomalileri, dismorfizm

*Evrimsel korunmuşluk değerlendirmesinde seçilen türler “şempanze, rhesus, fare, köpek, fil, tavuk, zebra balığı” olarak belirlenmiştir.

Çalışmamız kapsamında incelenen 11 indeks olgunun moleküler sonuçları primer etiyolojik açıdan sınıflandırıldığında; kohortun %37'sinin nöromusküler son plak, %18'inin miyopatik, %9'unun metabolik, %9'unun bağ doku hastalığı ve %9'unun iskelet displazisi kökenli MCC'den etkilenmiş olduğu saptanmış; kesin moleküler tanı konulamayan iki olgu ise (%18) sınıflandırılmamıştır (Tablo 4-6). Ancak, genlerin ikincil fonksiyonları da etiyolojik sınıflamaya dahil edildiğinde, kohortun %45'inde nöromusküler sinaptogenez, sinaptik transmisyon veya NMK gelişimi/fonksiyonunda görev alan genlerin saptanması dikkat çekmiştir (Tablo 4-7).

Tablo 4-6: Saptanan varyantların primer etiyolojik açıdan sınıflandırılması



Tablo 4-7: Saptanan varyantların genel etiyolojiye göre sınıflandırılması

Nöropatik	<i>KIAA1109*</i> , <i>USP14*</i>
Nöromusküler kavşak	<i>RAPSN</i> , <i>DOK7</i> , <i>KIAA1109</i> , <i>USP14</i> , <i>HSPG2*</i>
Miyopatik	<i>NEB</i>
Metabolik	<i>COG6</i> , <i>PSAT1*</i>
Bağ doku hastalığı	<i>PSAT1</i>
İskelet displazisi	<i>HSPG2</i>
Sınıflandırılmamış	MCC #4, MCC #10

(*): İkincil fizyolojik mekanizma ile

4.6. Olgular

4.6.1. Aile MCC #1

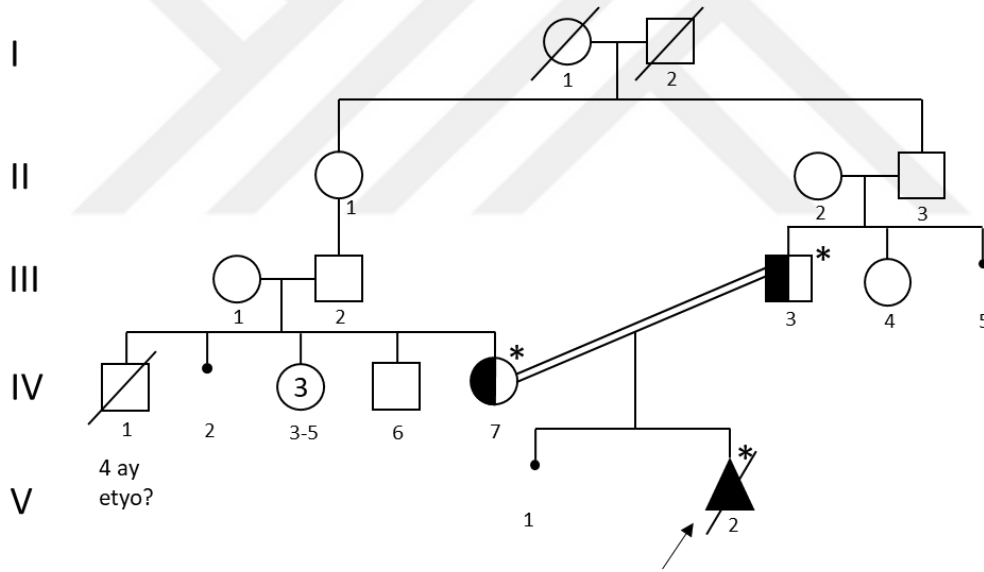
Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında 1,5° kuzen evliliği bulunan 32 yaşında sağlıklı anne ve 31 yaşında sağlıklı babanın 2. gebelik ürünü olan fetus, indeks olgu olarak çalışmamıza dahil edildi (G2 Ab1 TT1, MCC#1 – V:2). Ailenin ilk gebeliğinin 6. GH'da spontan abortus olarak sonlandığı

ifade edildi. Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi (Şekil 4-1). Anne adayı, ilk trimester US'de NT değerinin 7 mm ölçülmesi ve takiplerinde 20+1 GH'de kontraktürlerin saptanması üzerine merkezimize yönlendirildi.

22⁺ GH US'sinde persistan sol superior vena kava (PLSVC) ve bununla uyumlu olarak koroner sinüste hafif dilatasyon (2.26 mm) izlendi; ekstremitelerin distal segmentlerinde kas kitlesinde azalma, *clenched hands* ve bilateral PEV saptandı. İlk trimesterde NT artışı olan olgunun 22. GH'de AMV ölçümü ve NF kalınlığı gestasyon haftası ile uyumlu (2.5 mm) olarak değerlendirildi.

CVS ile fetal kromozom/array analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 24⁺ GH'de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.



Şekil 4-1: MCC #1 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Postmortem fizik muayene bulguları

24⁺² haftalık dişi fetusun boyu 29 cm (-1.15 SD), tartısı 570 g (-0.94 SD), baş çevresi 22 cm (-0.02 SD) ölçüldü. Aşağı çekik palpebral fissürler, belirgin burun kökü, *pinched nose*, uzun filtrum, küçük ağız ve aşağı çekik ağız komissürleri, ince dudaklar, çenede horizontal çizgilenme, hafif mikrognati, yumuşak damakta yarık ve bilateral düşük yerleşimli olan geriye dönük kulaklar saptandı. Dirseklerde 25-30° ekstansiyon kısıtlılığı, el bileklerinde

ulnar deviasyon, aberran el içi çizgileri, sağ elde trizomi 18 benzeri üst üste binmiş parmaklar, sol el DII-V'te kamptodaktili ve sol el DII'de ulnar deviasyon, dizlerde 50° ekstansiyon kısıtlılığı, ağır PEV ve kliteromegali ile uyumlu genital yapı izlendi. Kordon insersiyonuna yakın bölgede kistik yapı gözlemlendi (Şekil 4-2, A-D).

Grafide servikal vertebralar ve T5 düzeyine kadar olan torakal vertebralarda koronal kleftler ve platispondili izlendi. Bilateral radius, ulna ve femurlarda; sağ tibia ve fibulada hafif *bowing* mevcuttu (Şekil 4-2, E).



Şekil 4-2: MCC #1 – V:2'nin klinik ve radyolojik muayene bulguları

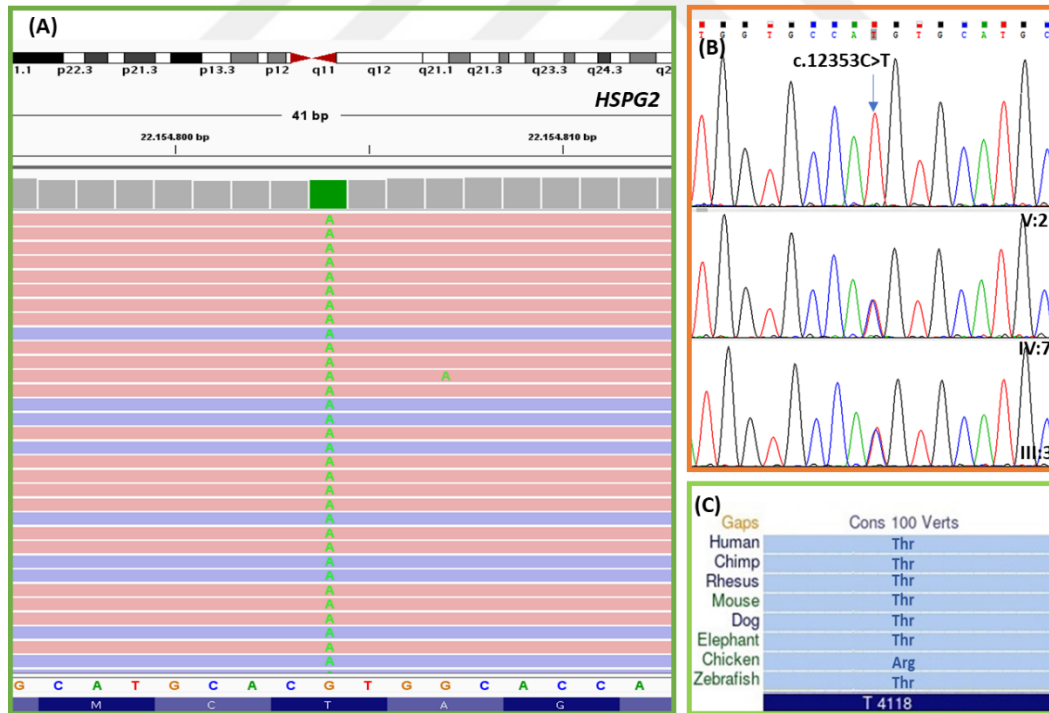
(A) 24⁺ haftalık fetusta dirsek ve dizlerde belirgin ekstansiyon kısıtlılığı, el bileklerinde ulnar deviasyon ve bilateral PEV bulgularını içeren çoklu konjenital kontraktürler, (B) Aşağı çekik palpebral fissürler, belirgin burun kökü, *pinched nose*, uzun filtrum, küçük ağız, ince dudaklar, aşağı çekik ağız komissürleri ve çenede horizontal çizgilenmeyi içeren fasiyal dismorfik bulgular, (C) Ellerde *clenched* postür, (D) Kliteromegali, (E) Servikal vertebralar ve T5 düzeyine kadar olan torakal vertebralarda koronal kleftler ve platispondili, bilateral radius, ulna ve femurlarda; sağ tibia ve fibulada hafif *bowing* izlenmektedir.

Fetal otopside karaciğer parankiminde PAS (-) homojen ve non-spesifik damlacıklar izlendi, Von Kossa (-) boyanma ile kalsiyum birikimi şüphesi dışlandı. US izleminde PLSVC ve koroner sinüste hafif dilatasyon saptanmış olan olguda otopside kardiyak anatomi normal olarak değerlendirildi.

Fasiyal dismorfizm ve mevcut iskelet bulguları ile ayırıcı tanıda ön planda Schwartz-Jampel sendromu düşünüldü.

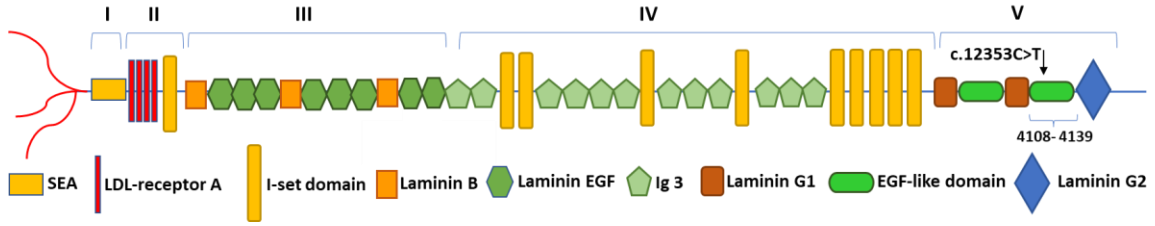
Moleküler Bulgular

İndeks olguda yapılan TED analizinde, *HSPG2* geni (1p36.12, *heparan sulfate proteoglycan 2*, NM_005529.7, NP_005520.4) ekzon 89'da homozigot c.12353C>T (p.(T4118M)) değişimi saptandı ve Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde yapılan incelemede, anne ve babanın c.12353C>T değişimini heterozigot formda taşıdığı belirlendi (Şekil 4-3). *HSPG2*, perlekan adlı bir bazal membran proteinini kodlamakta olup bu gende yer alan biallelik patojenik varyantlar Schwartz-Jampel sendromu (SJS, MIM#255800) ve dissegmental displazi (MIM#224410) fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir. Perlekan proteinine ait domainler ve MCC #1-V:2'de saptanan değişim Şekil 4-4'de şematize edilmiştir. Olguda gösterilen bu varyant daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş olup *in-silico* araçlar çoğunlukla “zarar verici” tahmini vermekte; ayrıca üç boyutlu protein modellemeleri ile yanlış anlamalı bu değişimin perlekan proteininin üç boyutlu yapısını değiştireceği öngörülmektedir (Tablo 4-8, Şekil 4-5).



Şekil 4-3: MCC #1 ailesine ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndeks olguda *HSPG2* geninde saptanan homozigot değişimin IGV görüntüsü izlenmektedir. (B) Sanger dizi analizi ile saptanan değişimin fetal olguda (V:2) homozigot; anne (IV:7) ve babada (III:3) heterozigot formda bulunduğu gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Thr rezidüsü, türler arasındaki evrimsel olarak korunmuştur.



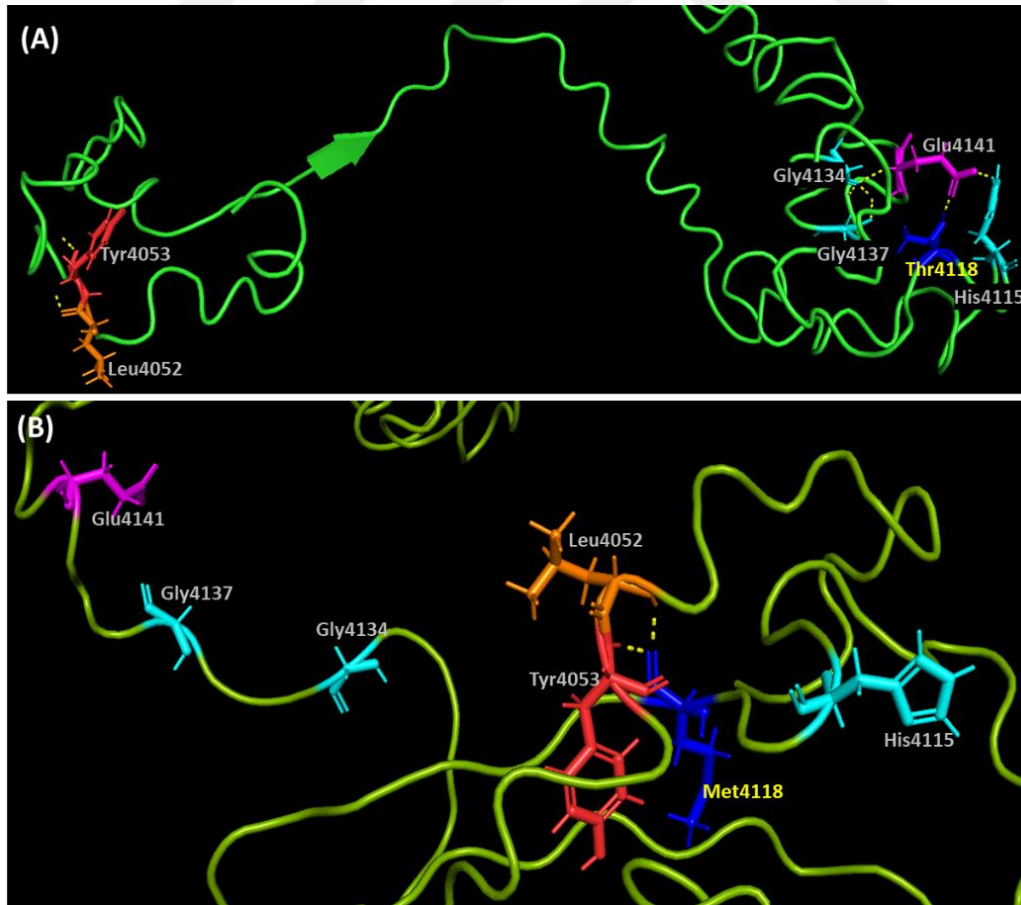
Şekil 4-4: HSPG2 tarafından kodlanan perlekan proteininin domainleri (191)

Olgumuzda saptanan varyantın ilişkili domain üzerindeki yerleşimi siyah ok ile belirtilmiştir.

Tablo 4-8: MCC #1 ailesinde saptanan *HSPG2* varyantına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico						Ref.
				MT	GERP ++	Polyphen II HDiv/HVar	MCAP	SIFT	Provean	
<i>HSPG2</i> NM_005529.7	c.12353C>T p.(T4118M)	200150908	VUS	DC [0.9]	4.41	D/D [0.99/0.96]	D [0.094]	D [0.013]	D [-2.51]	<i>Novel</i>

MT, MutationTaster; DC, Disease causing; D, Damaging/Deleterious



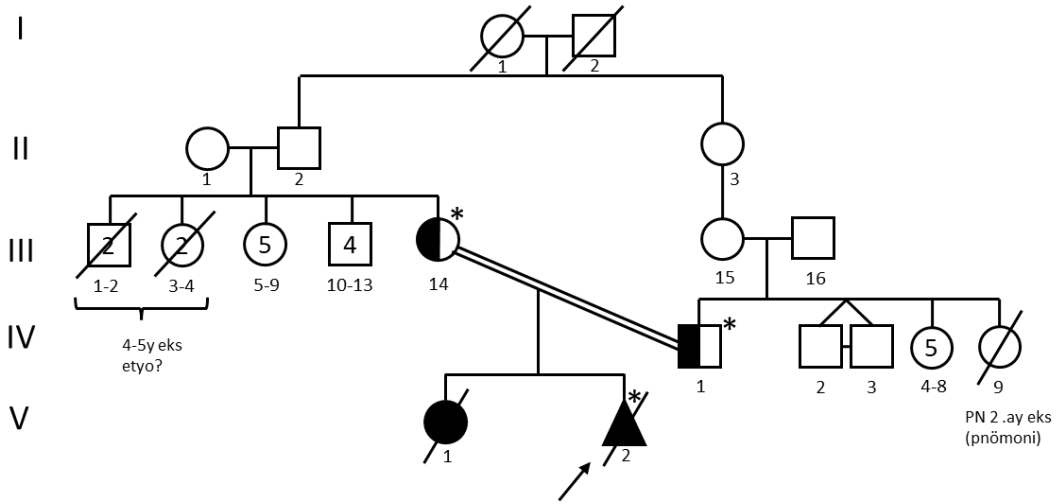
Şekil 4-5: p.(T4118M) değişiminin perlekan proteini üzerindeki tahmini etkisi

Normal proteinde (A) Thr4118, Glu4141 ile etkileşirken (B) mutant proteinde Thr4118 yerine geçen Met4118, Glu4141 ile bağlantısını koparıp Leu4052 ve Tyr4053 ile etkileşime geçmektedir. (Değişen amino asit sarı renk ile belirtilmiştir). Yabancıl tip modelde glisin ve histidin rezidüleriyle de etkileşim halinde bulunan Glu4141'in, mutant proteinde bu bağlarını kaybedeceği ve alfa heliks veya beta tabaka gibi ikincil yapıları etkilememekle birlikte üç boyutlu yapının değişeceği öngörülmektedir (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*).

4.6.2. Aile MCC #2

Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında 1,5° kuzen evliliği bulunan 21 yaşında sağlıklı anne ve 28 yaşında sağlıklı babanın 2. gebelik ürünü olan fetal olgu (G2 P1 TT1, MCC#2 – V:2). G1'e olan gebelik takibinde transpozisyon tipi çift çıkışlı sağ ventrikül (TT-DORV), hipoplastik korpus kallozum (CCH), ventrikülomegali (VM) ve PEV bulguları saptandığı, miadında doğan olgunun PN 1. haftada yenidoğan yoğun bakım ünitesi (YDYBÜ) yatışı sırasında eks olduğu ifade edildi (Şekil 4-6).

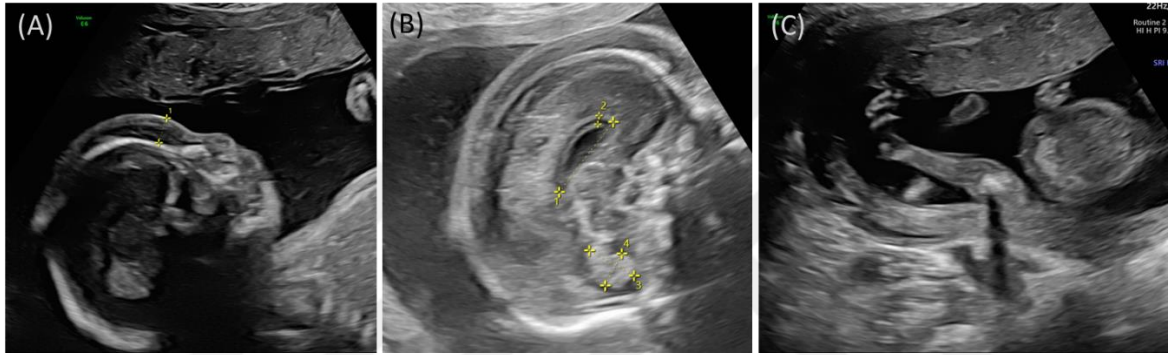


Şekil 4-6: MCC #2 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi. Anne adayı, ilk trimesterde yapılan US'de NT artışı (4.5 mm), anormal posterior fossa, VSD (?), PEV saptanması ve benzer

etkilenmiş gebelik ürünü öyküsü olması nedeniyle II. düzey US izlemi ve genetik danışma almak amacıyla merkezimize başvurdu.

24. GH'de merkezimizde yapılan US'de simetrik IUGG (22⁺ GH ile uyumlu fetal biyometri), skalp ödemi ve NF kalınlığında artış, sol aks deviasyonu, septum primum, minimal perikardiyal efüzyon, bilateral PEV ve *clenched hands*, serebellar hipoplazi (TCD: 20.4 mm, <1p.), kısa korpus kallozum (21 mm, <5p.), prenatal ödem (7.4 mm), hafif basık fetal alın ve retrognati saptandı. Muayene boyunca fetal hareket izlenmedi; bununla birlikte AMV ölçümü normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: MCC #2 – V:2'ye ait ikinci trimester US görüntüleri

Fetal profilde artmış prenatal kalınlık ve hafif basık alın (A), gestasyon haftasına göre kısa korpus kallozum ve skalp ödemi (B) ve PEV deformitesi (C) izlenmektedir.

CVS ile fetal kromozom/array analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 25. GH'de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.

Postmortem fizik muayene bulguları

25⁺¹ haftalık dişi fetusun boyu 28 cm (-1.88 SD), tartısı 720 g (0.1 SD), baş çevresi 23,5 cm (0.87 SD) ölçüldü. Kısa boyun, kaba yüz görünümü, belirgin glabella, hipertelorizm, basık burun kökü, bülböz burun ucu ve kısa kolumella, uzun filtrum, mikrognati, düşük kulaklar ve yüksek damak saptandı. Orofarinks muayenesinde uvula görülmeydi. Sağ el DII-V ve sol el DIII-V'e ait PIP eklemlerinde kamptodaktili, bilateral silik el içi çizgileri izlendi; DII-V'e ait fleksiyon çizgileri görülmeydi. Bilateral dirseklerde 20° ekstansiyon kısıtlılığı ve ağır PEV

izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi. Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: MCC #2 – V:2'nin klinik muayene bulguları

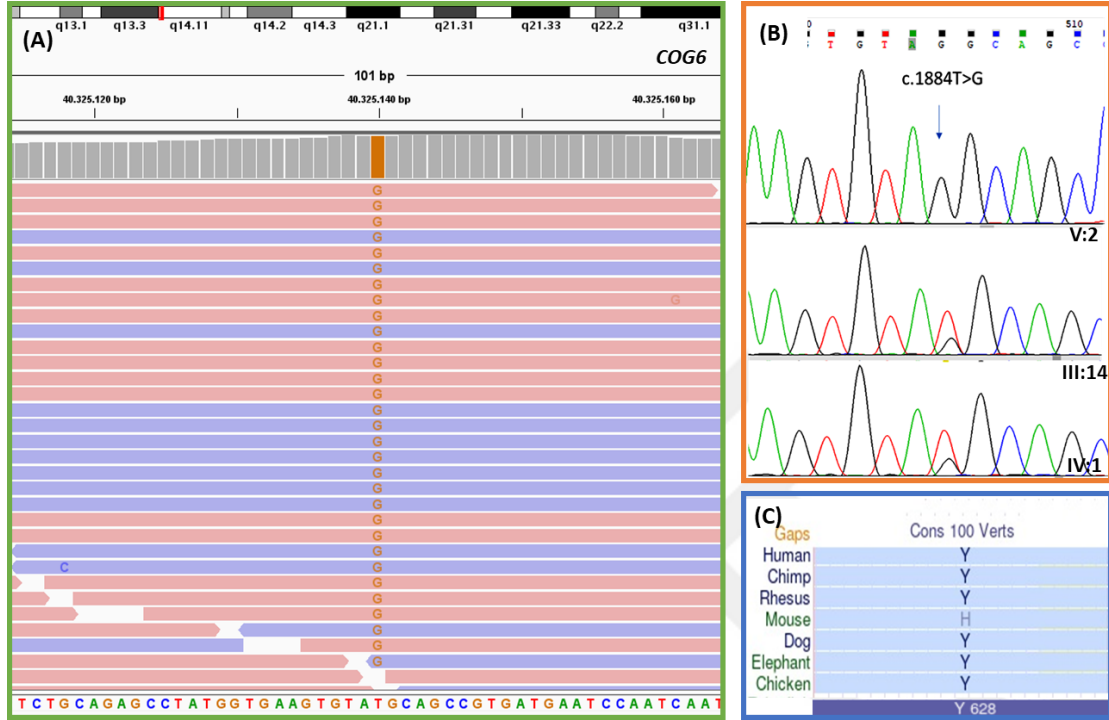
(A1,A2) 25⁺¹ haftalık fetusta kısa boyun, kaba yüz görünümü, belirgin glabella, hipertelorizm, basık burun kökü, bülböz burun ucu ve kısa kolumella, uzun filtrum, mikrognati, düşük kulaklar, dar omuz kavşağı, diz ve dirseklerde fleksiyon kontraktürleri, (B1,B2) el bileklerinde ulnar deviasyon, kamptodaktili, silik el içi ve interfalangeal fleksiyon çizgileri, (C1,C2) ayaklarda bilateral ağır PEV ve belirgin topuklar izlendi.

Benzer etkilenmiş kardeş öyküsü de olan olguda ayırıcı tanıda serebellar bulgulara eşlik eden kardiyak anomali ve dismorfizm ile Ritscher-Schinzel Sendromu ve kaba yüz görünümüne eşlik eden hidrops bulguları ile OR kalıtım paterni gösteren nörometabolik antiteler düşünüldü.

Moleküler Bulgular

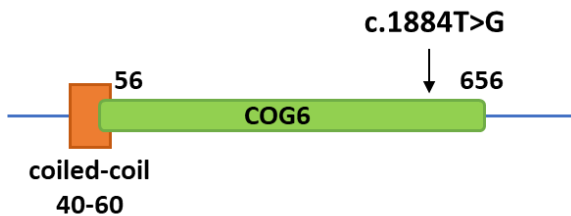
İndeks olguda yapılan TED analizinde, *COG6* geninde (13q14.11, *component of oligomeric golgi complex 6*, NM_020751.3, NP_065802.1) ekzon 19'da homozigot c.1884T>G (p.(Y628*)) değişimi saptandı ve Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde yapılan incelemede, anne ve babanın c.1884T>G değişimini heterozigot taşıdığı belirlendi (Şekil 4-9). Bu gende yer alan biallelik varyantlar konjenital glikozilasyon defekti tip IIL (CDG2L, MIM#614576) ve Shaheen sendromu (MIM#615328) ile ilişkilendirilmiştir. *COG6* proteinine ait domainler ve MCC #2 –V:2'de saptanan varyant

Şekil 4-10'da şematize edilmiştir. Dur kodonuna yol açması beklenen bu değişim daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş olup ACMG kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 4-9).



Şekil 4-9: MCC #2 ailesine ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndeks olguda *COG6* geninde saptanan değişimin IGV görüntüsü izlenmektedir. (B) Sanger dizileme ile fetal olgunun (V:2) c.1884T>G değişimini homozigot; anne (III-14) ve babanın (IV:1) heterozigot formda taşıdığı gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Tyr rezidüsü türler arasında evrimsel olarak korunmuştur.



Şekil 4-10: COG6 proteinine ait domainler (191)

Olgumuzda saptanan varyantın ilişkili domain üzerindeki yerleşimi siyah ok ile gösterilmiştir.

Tablo 4-9: MCC #2 ailesinde saptanan COG6 varyantına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico		Ref
				MT	GERP++	
COG6 NM_020751.3	c.1884T>G p.(Y628*)	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	DC [1.0]	2.68	<i>Novel</i>

MT, MutationTaster; DC, Disease causing

Bu verilere ek olarak, olgunun TED analizinde tesadüfen *BRF1* (NM_001519.4) geninde heterozigot c.875C>A (p.(P292H), rs606231450) patojenik varyantı saptandı ve olgunun serebellofasiodental sendrom (MIM#616202) için taşıyıcı olduğu belirlendi.

4.6.3. Aile MCC #3

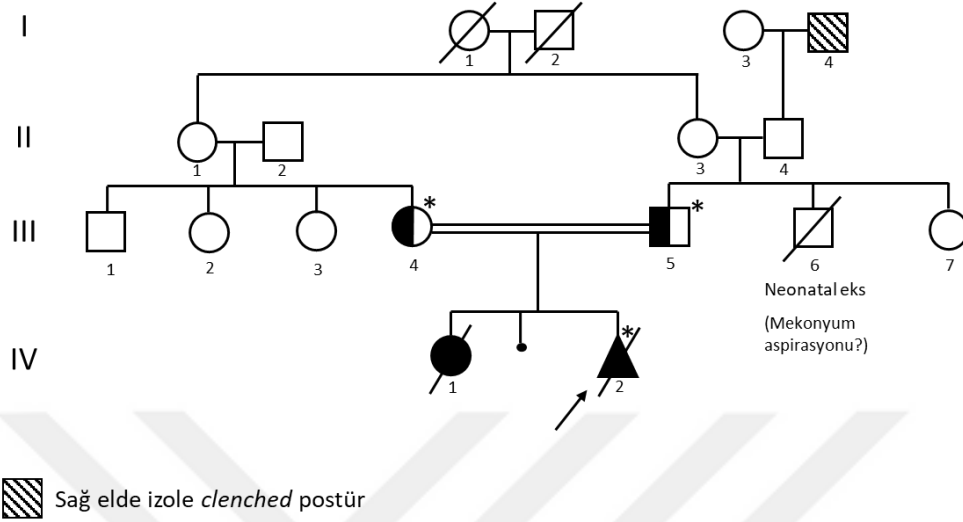
Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında 1° kuzen evliliği bulunan 28 yaşında sağlıklı anne ve 27 yaşında sağlıklı babanın 3. gebelik ürünü olan fetus, indeks olgu olarak çalışmamıza dahil edildi (G3 Ab1 IUMF2, MCC#3 – IV:2). G1'in gebelik takibinde patolojik US bulgularının (artmış NF kalınlığı, prenazal ödem, mikrognati, dirseklerde fleksiyon kontraktürü, *clenched hands* ve *rocker bottom feet*) saptandığı ve 28⁺ GH'de IUMF olduğu; G2'nin ise 7. GH'da missed abortus olarak sonlandığı belirtildi (Şekil 4-11). İki olguya da postmortem inceleme, fetal otopsi, prenatal karyotipleme ve DNA bankalama yapılmadığı öğrenildi.

Bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü tariflenmedi. İlk trimesterde ikili tarama testi ve US takibi yaptırmayan anne adayını, II. düzey US izlemi ve benzer etkilenmiş gebelik öyküsü nedeniyle genetik danışma amacıyla merkezimize yönlendirildi.

27. GH'de merkezimizde yapılan US'de hafif polihidramniyos, eklem kontraktürleri (dirseklerde fleksiyon, sağ dizde ekstansiyon, sol dizde fleksiyon kontraktürü, bilateral *clenched hands*), sağ ayakta *rocker bottom* görünümü, plevral efüzyon, retromikrognati, MCM (14 mm), serebellar hipoplazi (TCD: 25mm, <1p) ve VSD saptandı. Mide küçük izlendi; skalp, boyun/karın cildi ve üst ekstremitelerde ödemli görünüm ve umbilikal ven varisi gözlendi. Muayene boyunca fetal hareket izlenmedi.

CVS ile fetal kromozom/array analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben gebeliğe devam kararında olan aile, fetusun 33⁺² GH'de IUMF olması üzerine postmortem muayene amacıyla kliniğimize başvurdu.



Şekil 4-11: MCC #3 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Postmortem fizik muayene bulguları

33⁺² haftalık erkek fetusun boyu 43 cm (-0.31 SD), tartısı 2360 g (0.71 SD), baş çevresi 33 cm (1.66 SD) ölçüldü. Ödemli ve kısa boyun, düşük ense saç çizgisi, bilateral epikantus, belirgin burun kökü, antevert ve asimetric burun delikleri, uzun ve düz filtrum, küçük ağız, retromikrognati, dar-yüksek damak, düşük kulaklar, bilateral küçük kulaklar (longitudinal kulak boyu: 3 cm) ve düzleşmiş antitraguslar saptandı. Gövde ve üst ekstremitelerin değerlendirilmesinde pektus ekskavatum, dar omuz kavşağı, bilateral ellerde ulnar deviasyon ve el DII-V'te kamptodaktili, bilateral klinodaktili (D5), sağda silik el içi çizgileri ve solda tek transvers palmar deri çizgisi izlendi. Sağ femur üst 1/3 hizasında krepatasyon alındı, bilateral tibial *bowing*, ayaklarda solda PEV ve sağda *rocker bottom* görünümü saptandı. Genital yapısı erkek olarak değerlendirilen olguda mikropenis gözlemlendi. Anüs ve kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-12, A-E). Grafide sağ subtrokanterik femur fraktürü saptandı; kotlar ve tübüler kemikler ince olarak değerlendirildi (Şekil 4-12, F).



Şekil 4-12: MCC #3 – IV:2’nin klinik ve radyolojik muayene bulguları

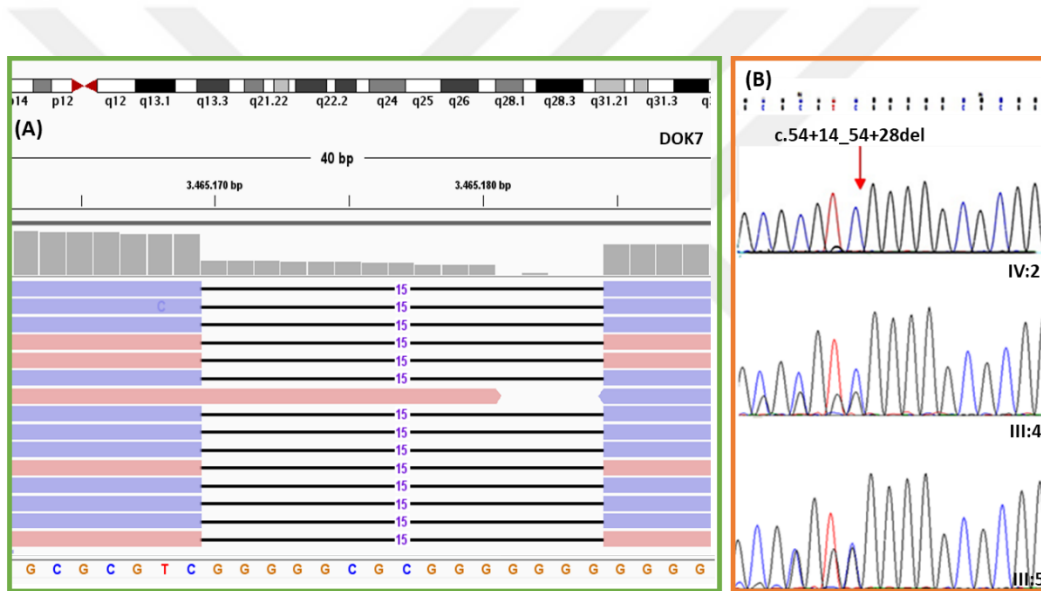
(A,B) 33⁺² haftalık fetusta ödemli ve kısa boyun, bilateral epikantus, antevort ve asimetric burun delikleri, uzun ve düz filtrum, küçük ağız, retromikrognati, dar-yüksek damak, pektus ekskavatum, dar omuz kavşağı, diz ve dirseklerde ekstansiyon kısıtlılığı, solda PEV, sağ ayakta *rocker-bottom* görünümü, (C) Sol elde *clenched* postür, (D) Mikropenis, (E) Sağ ayakta *rocker bottom* görünümü ve dorsofleksiyon postürü, (F) Sağ subtrokanterik femur fraktürü, ince kotlar ve tübüler kemikler izlenmektedir.

Fetal otopside pulmoner hipoplazi, VSD ve timik hiperplazi saptandı. Kas histopatolojisi (Quadriceps-biceps brachi) frozen kesitlerde liflerin MGT, NADH-TR, SDH, COX, ORO, fosforilaz, H&E, myozin ile boyandığı, değerlendirilebilen alanlarda kas liflerinde yuvarlaklaşma ve çap farkı olduğu, her iki lif tipinde de normal boyutlu ve küçük boyutlu liflerin bulunduğu, nukleusların hafif dismorfik olmakla birlikte internal nukleus artışının eşlik etmediği, nekroz, dejenerasyon-rejenerasyon, miyofagositoz, perimisyal ve endomisyal inflamasyon lehine bulgu olmadığı, lif içeriğinde hafif lipid artışı olmakla birlikte lipid birikim miyopatisi için yeterli bulunmadığı ve endomisyal bağ doku artışı gözlenmediği kaydedildi. Bulgular nonspesifik miyopatik değişiklikler ile uyumlu bulundu.

Olguda, klinik değerlendirmeye eşlik eden otopsi bulguları ve benzer etkilenmiş kardeş öyküsü ile ayırıcı tanıda otozomal resesif kalıtım gösteren konjenital miyopatiler, konjenital fraktürler ile seyreden SMA formları (SMABF1 ve SMABF2) ve letal konjenital kontraktür sendromları düşünüldü.

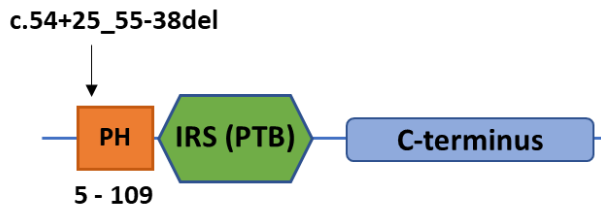
Moleküler Bulgular

İndeks olguda yapılan TED analizinde, *DOK7* geni (4p16.3, *downstream of tyrosine kinase 7*, NM_173660.5, NP_775931.3) intron 1'de homozigot c.54+25_55-38del (p.(Y19Vfs*23), rs769850502) değişimi saptandı ve Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde yapılan incelemede, anne ve babanın bu varyantı heterozigot formda taşıdığı belirlendi (Şekil 4-13). *DOK7* proteinine ait domainler ve MCC #3 – IV:2'de saptanan değişim Şekil 4-14'te gösterilmiştir. Bu varyant daha önce konjenital myastenik sendrom ile ilişkilendirilmiş, ancak literatürde hiç homozigot formda bildirilmemişti (192). *DOK7* geninde saptanan varyanta ait bilgiler Tablo 4-10'da belirtilmiştir.



Şekil 4-13: MCC #3 ailesine ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndeks olguda *DOK7* geninde saptanan homozigot c. değişiminin IGV görüntüsü. (B) Sanger dizileme ile fetal olguda (IV:2) homozigot delesyon varlığı konfirme edilmiş; anne (III-3) ve babanın (III-5) bu varyantı heterozigot formda taşıdığı gösterilmiştir.



Şekil 4-14: *DOK7* proteinine ait domainler (191)

Olgumuzda saptanan varyantın ilişkili domain üzerindeki yerleşimi siyah ok ile gösterilmiştir.

Tablo 4-10: MCC #3 ailesinde saptanan DOK7 varyantına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico		Ref.
				MT	Human Splicing Finder	
DOK7 NM_173660	c.54+14_54+28del p.(Y19Vfs*23)	rs769850502	Hot VUS (PP5)	DC	"Kırılma beklenmiyor"	(192- 194)

MT, MutationTaster; DC, Disease causing

Bu verilere ek olarak, olgunun TED analizinde her biri heterozigot formda olmak üzere, ADA (NM_000022.4) geninde c.956_960delAAGAG (p.(E319Gfs*3)), rs771266745), CLPB (NM_030813.6) geninde c.690G>A (p.(W230*), rs780554501) ve TCTN1 (NM_001082538.3) geninde c.1454G>A (p.(W485*), rs1593376626) patojenik varyantları saptandı ve olgunun sırasıyla ADA eksikliği ilişkili ağır kombine immün yetmezlik (SCID, MIM#102700), 3-metilglutakonik asidüri tip VII (MIM#616271) ve Joubert sendromu 13 (MIM#614173) için taşıyıcı olduğu belirlendi.

4.6.4. Aile MCC #4

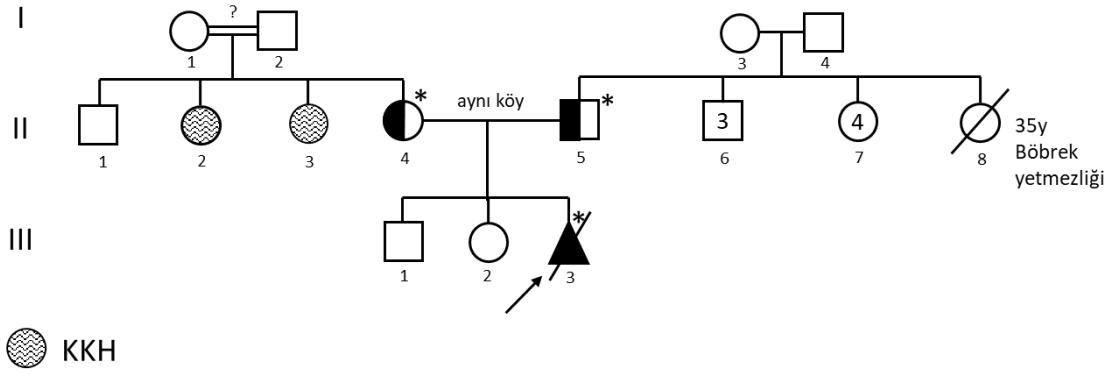
Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

İndeks olgu (MCC #4 – III:3) aralarında akrabalık tariflenmeyen; ancak yakın yerleşim birimlerinden gelen 24 yaşında sağlıklı anne ve 30 yaşında sağlıklı babanın 3. gebelik ürünü olan fetal olgu (G3 P2 TT1) idi. Ailede benzer etkilenmiş olgu tariflenmedi (Şekil 4-15).

Bilinen maternal hastalık, gebelik süresince enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti ve abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi. İlk trimesterde ikili tarama testi ve US takibi yaptırmayan anne adayını, dış merkez II. düzey US izleminde hidropik bulgular izlenmesi üzerine merkezimize yönlendirildi.

25. GH'de yapılan US'de yaygın masif cilt ödemi, bilateral plevral efüzyon, batında asit ve bilateral PEV saptandı. İndirekt Coombs testi negatif saptanan olgu, ön planda non-immun hidrops fetalis (NIHF) olarak değerlendirildi.

KS ile fetal kromozom/array analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 26. GH'de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.



Şekil 4-15: MCC #4 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Postmortem fizik muayene bulguları

26⁺² haftalık erkek fetusun boyu 28 cm (suboptimal, -2.69 SD), tartısı 1080 g (1.27 SD), baş çevresi 26 cm (1.51 SD) ölçüldü. Yaygın ödematöz görünüm nedeniyle dismorfik muayene suboptimal değerlendirildi. Hipertelorizm, basık burun kökü, antevort burun delikleri, uzun filtrum, *tented upper lip*, çenede vertikal *dimple*, düşük yerleşimli geriye dönük kulaklar ve yüksek damak saptandı. Bilateral aksiller, kübital, popliteal ve inguinal pterijyumlar izlendi. Dirsek eklemlerinde ve el bileklerinde 90° fleksiyon kontraktürü, el bileklerinde radyal deviasyon ve bilek dorsal yüzlerinde gamzellenme, DI-II arasında yüksek *web*, DII-DV'te kamptodaktili, dizlerde 90° ekstansiyon kısıtlılığı, kalça ekleminde ekstansiyon-addüksiyon kısıtlılığı ve bilateral ağır PEV izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi. Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: MCC #4 – III:3’e ait klinik ve radyolojik muayene bulguları

(A,B) 26⁺² haftalık fetusta yaygın cilt ödemi, kısa boyun ve dar omuz kavşağı, bütün eklemlerde ağır fleksiyon kontraktürleri, (C) Hipertelorizm, basık burun kökü, antevort burun delikleri, uzun filtrum, *tented upper lip* bulgularını içeren fasiyal dismorfizm, (D) sol antekübital pterijiyum, (E) AP babygramda ince tübüler kemikler ve yaygın eklem kontraktürleri izlendi.

Olgu; fleksiyon kontraktürleri, hidrops ve pterijiyumların varlığı ile **Letal multipl pterijiyum sendromu (LMPS)** ile uyumlu bulundu.

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (III-3) yapılan TED analizinde *RYR1* geni (19q13.2, ryanodine receptor 1, NM_000540.3, NP_000531.2) ekzon 71’de heterozigot c.10504C>T (p.(R3502W), rs375127981) değişimi saptandı. Ancak, segregasyon analizleri ile annenin de bu VUS (*variant of uncertain significance*) niteliğindeki (PM2, PP3) varyantı taşıdığı gösterildi. Ekzom verisinde *RYR1* geninde yer alan ikinci bir değişim veya klinik bulguları açıklayacak ek aday varyant saptanmadı.

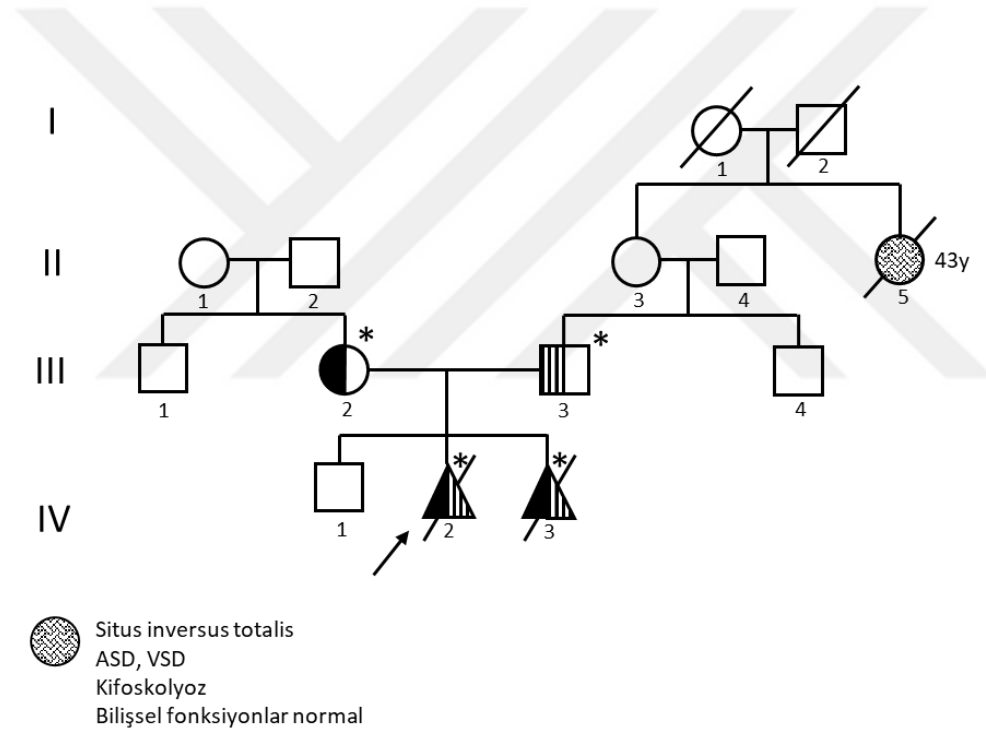
4.6.5. Aile MCC #5

Benzer etkilenmiş iki kardeş olgunun prenatal takipleri ve postmortem muayeneleri merkezimizde yapılmış olup her iki olguya ait US ve postmortem muayene detayları aşağıda ayrı ayrı belirtilmiştir.

Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında akrabalık bulunmayan ve yakın yerleşim birimlerinden gelmeyen sağlıklı anne ve babanın birinci çocukları sağlıklı olup, ikinci ve üçüncü gebelikleri patolojik US bulguları nedeniyle tarafımızca izlenmiş; her iki fetus da postmortem muayene ile değerlendirilmişti (G3 P1 TT2, MCC #5 – IV:2, IV:3) (Şekil 4-17).

Bilinen maternal hastalığı olmayan anne adayının her iki gebelikte de enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi. İkili tarama testinde her iki olguda da NT artışı saptanmış (5.6 mm, 4.9 mm) ve iki gebelik de II. düzey US amacıyla fakültemiz Perinatoloji BD’da izleme alınmıştı.



Şekil 4-17: MCC #5 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

MCC #5 – IV:2: 21(-) GH’de gerçekleştirilen US incelemesinde polihidramniyos, *clenched hands*, mikrognati saptandı; fetusun üst ekstremitelerinin hareketsiz olduğu izlendi. AS ile fetal kromozom ve array analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 22. GH’de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.

MCC #5 – IV:3: 20(-) GH’de gerçekleştirilen US incelemesinde *clenched hands*, dirseklerde fleksiyon kontraktürü ve prenatal ödem (5 mm) saptandı, fetal hareket izlenmedi. AS ile fetal kromozom analizinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 21. GH’de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.

Postmortem fizik muayene bulguları

MCC #5 – IV:2: 22 haftalık dişi fetusun boyu 24,5 cm (-1.92 SD), tartısı 350 g (-2.38 SD), baş çevresi 19 cm (-0.44 SD) ölçüldü. Kısa ve ödemli boyun, hipertelorizm, hafif aşağı çekik palpebral fissürler, basık burun kökü, kısa burun, antevort burun delikleri, hafif uzun filtrum, bilateral düşük ve geriye dönük kulaklar saptandı. Bilateral trizomi 18 benzeri üst üste binmiş parmaklar ve silik distal fleksiyon çizgileri, solda çentikli olmak üzere bilateral tek transvers palmar deri çizgisi ve klinodaktili (D5), bilateral fırlak topuk ve pes planovarus gözlemlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-18, A-B). Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.

MCC #5 – IV:3: 21 haftalık erkek fetusun boyu 20 cm (-4.35 SD), tartısı 340 g (-1.85 SD), baş çevresi 17 cm (-1.60 SD) ölçüldü. Kısa ve ödemli boyun, hipertelorizm, basık burun kökü, antevort burun delikleri, hafif uzun filtrum, dar ve yüksek damak, bilateral düşük ve geriye dönük kulaklar saptandı. Bilateral dirseklerde hafif ekstansiyon kısıtlılığı, trizomi 18 benzeri üst üste binmiş parmaklar, bilateral tek transvers palmar deri çizgisi, kalça ekleminde fleksiyon ve addüksiyon kontraktürü ve bilateral *rocker bottom feet* görünümü izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-18, C-E). Grafide hafif çan toraks dışında özellik saptanmadı.



Şekil 4-18: MCC #5 – IV:2 ve IV:3'e ait fizik muayene bulguları

(A-B) IV:2'nin muayene bulgularını; (C-E) IV:3'ün muayene bulgularını göstermektedir.

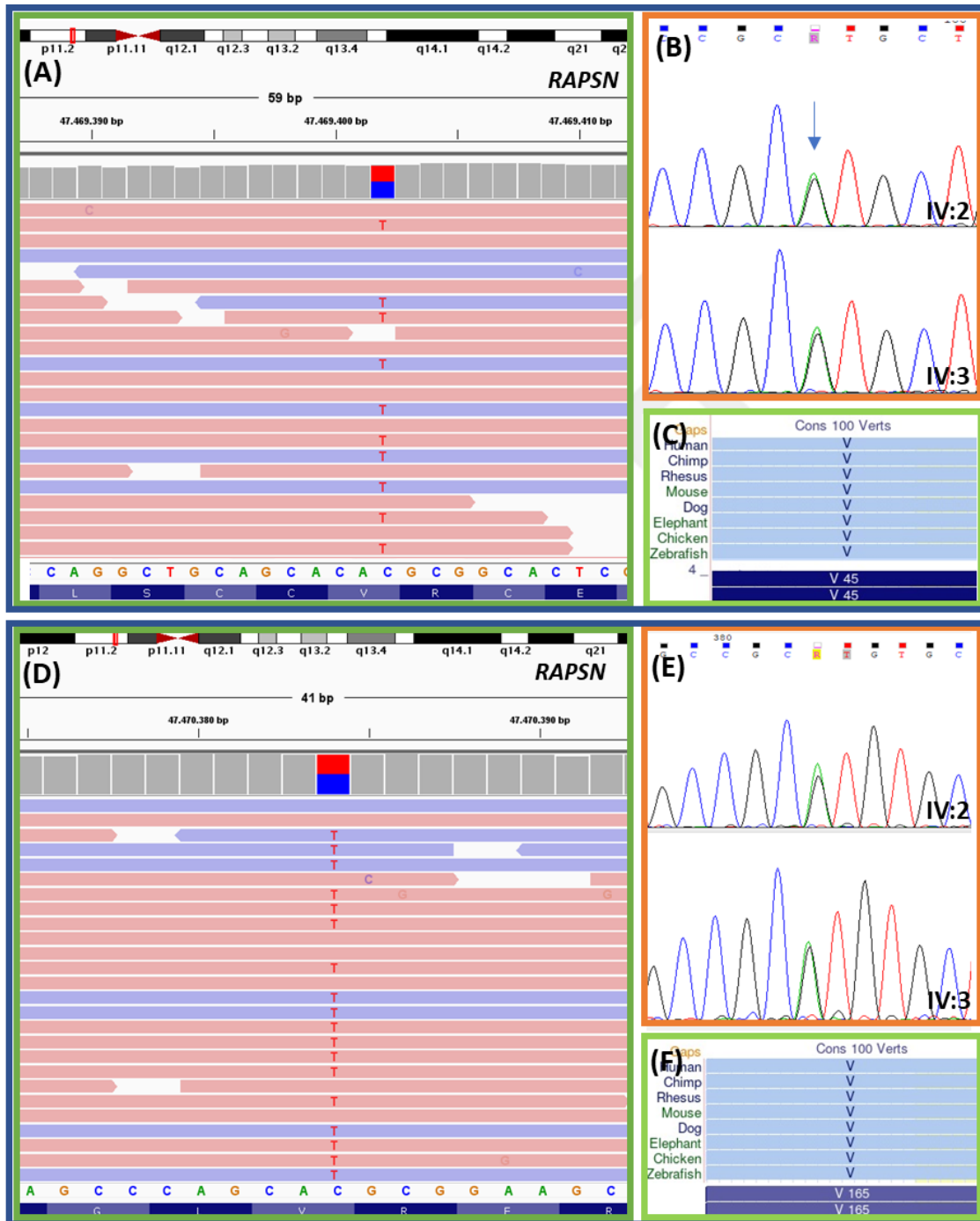
(A) 22 haftalık fetusta kısa ve ödemli boyun, hipertelorizm, hafif aşağı çekik palpebral fissürler, basık burun kökü, kısa burun, antevert burun delikleri, hafif uzun filtrum, (B) Bilateral dirsek ve dizlerde fleksiyon kontraktürü, ellerde *clenched* postür izlenmektedir. (C) 21 haftalık fetusta kısa ve ödemli boyun, hipertelorizm, basık burun kökü, antevert burun delikleri, hafif uzun filtrum, dirsek ve dizlerde fleksiyon kontraktürü, (D) sağ ayakta *rocker bottom* görünümü ve (E) sağ elde *clenched* postür izlenmektedir.

Ebeveynler arasında akrabalık olmaması, ancak iki benzer etkilenmiş gebelik öyküsü varlığı ile ayırıcı tanıda biallelik kalıtım gösteren (birleşik heterozigot formda) fetal akinezi deformasyon sekansı fenotipleri düşünüldü.

Moleküler Bulgular

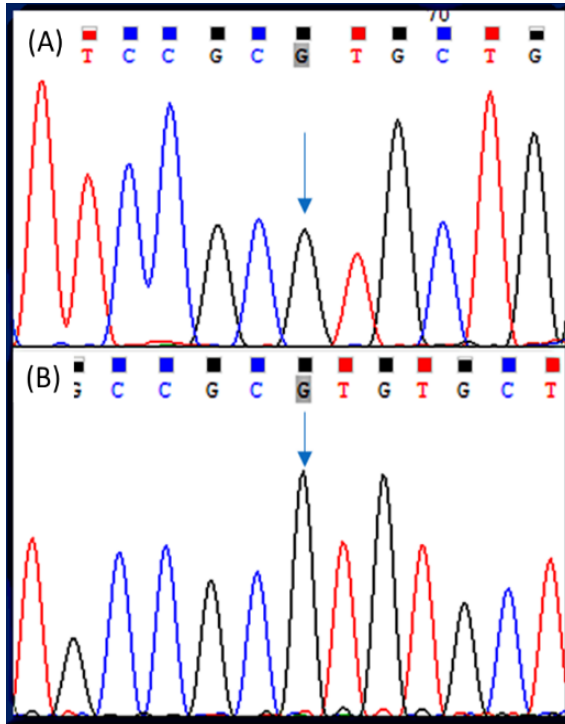
İndeks olguda (MCC #5 – IV:2) yapılan TED analizinde, *RAPSN* geni (11p11.2, *receptor associated protein of the synapse*, NM_005055.5, NP_005046.2) ekzon 1'de heterozigot c.133G>A (p.(V45M), rs121909254) ve ekzon 2'de heterozigot c.493G>A (p.(V165M), rs761584017) değişimleri saptandı. Bu değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Benzer etkilenmiş kardeşin (IV:3) de her iki varyantı taşıdığı gösterildi (Şekil 4-19). Ebeveynlere ait genomik DNA örneklerinin elde edilememesi nedeniyle, saptanan varyantların birbirlerine göre konumlarının belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen allel-spesifik PZR ile varyantların trans konumda bulunduğu belirlendi (Şekil 4-20). Olgularımızda gösterilen bu varyantlar literatürde daha önce konjenital myastenik sendrom ile ilişkilendirilmişti (195, 196). RAPSYN proteinine ait domainler ve MCC #4 ailesinde

saptanan varyantların protein üzerindeki yerleşimleri Şekil 4-21’de şematize edilmiştir. Ayrıca, p.V45M ve p.V165M varyantlarına ait bilgiler Tablo 4-11’de belirtilmiş; protein üzerindeki tahmini etkileri sırasıyla Şekil 4-22 ve Şekil 4-23’te görselleştirilmiştir.



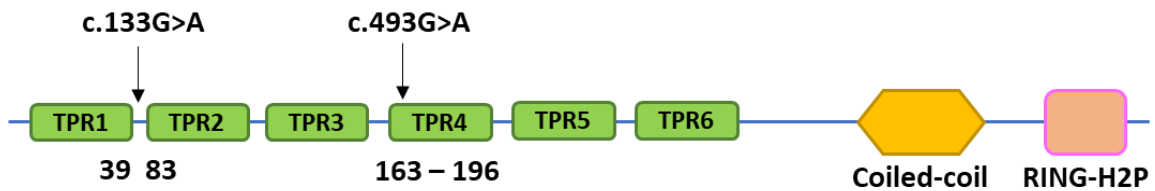
Şekil 4-19: MCC #5 ailesine ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndeks olguda (IV:2) *RAPSN* geninde saptanan heterozigot c.133G>A değişiminin IGV görüntüsü, (B) Sanger dizileme ile benzer etkilenmiş iki fetusun da (IV:2, IV:3) bu değişimi heterozigot taşıdığı gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Val rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir. (D) İndeks olguda (IV:2) *RAPSN* geninde saptanan heterozigot c.493G>A değişiminin IGV görüntüsü, (E) Sanger dizileme ile benzer etkilenmiş iki fetusun da (IV:2, IV:3) bu değişimi heterozigot taşıdığı gösterilmiştir. (F) Değişimin bulunduğu bölgedeki Val rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir.



Şekil 4-20: MCC #5 – IV:2'ye ait allel-spesifik PZR sonuçları

(A) Ekzon 1'deki varyantın (c.133G>A) 137 baz öncesine konumlandırılmış ileri primer ve ekzon 2'de yer alan varyantın bulunduğu mutant allele özgü tasarlanan geri primer ve ile gerçekleştirilen PZR deneyini takiben ileri primer ile dizilenen bölgede ekzon 1'de yer alan değişim bölgesinde G nükleotidi olduğu; yani sağlıklı alleli yansıttığı gözlemlendi. (B) Ekzon 1'de yer alan varyantın bulunduğu mutant allele özgü tasarlanan ileri primer ve ekzon 2'deki varyantın (c.493G>A) 235 baz ilerisinde konumlandırılmış geri primer ile gerçekleştirilen PZR deneyini takiben, geri primer ile dizilenen bölgede ekzon 2'de bulunan değişim bölgesinde G nükleotidi olduğu; yani sağlıklı alleli yansıttığı gözlemlendi.



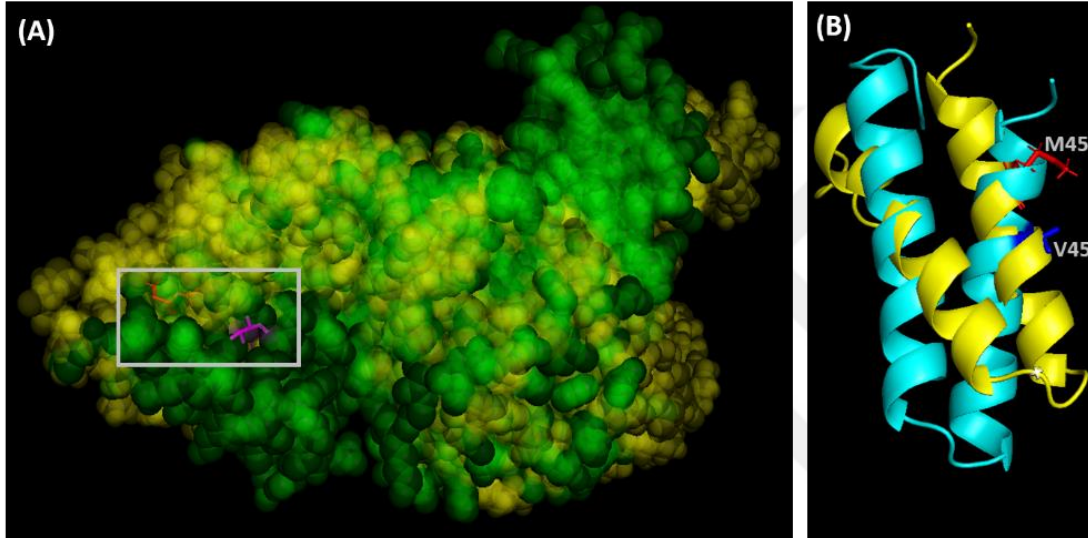
Şekil 4-21: RAPSIN proteinine ait domainler (191)

Olgularımızda saptanan varyantların ilişkili domainler üzerindeki yerleşimi siyah ok ile belirtilmiştir.

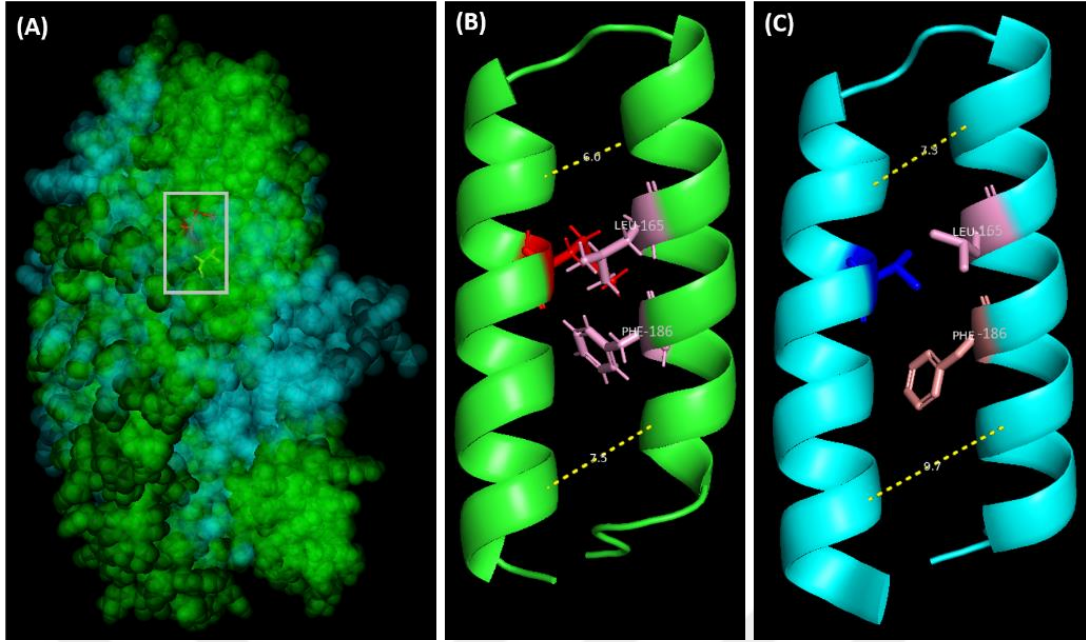
Tablo 4-11: MCC #5 ailesinde saptanan *RAPSN* varyantlarına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico					Ref.
				MT	GERP ++	Polyphen II HDiv/HVar	MCAP	SIFT	
<i>RAPSN</i> NM_005055.5	c.133G>A p.(V45M)	121909254	Patojenik PP5, PM2, PP3	DC [1.0]	5.14	D/D [0.997/ 0.98]	D [0.075]	D [0.01]	(195)
<i>RAPSN</i> NM_005055.5	c.493G>A p.(V165M)	761584017	Olası patojenik PM1, PM5, PP3	DC [1.0]	5.58	D/D [1/ 0.91]	D [0.075]	D [0.004]	(196)

MT, MutationTaster; DC, Disease causing; D, Damaging/Deleterious

**Şekil 4-22: p.(V45M) değişiminin RAPSIN proteini üzerindeki tahmini etkisi**

Normal ve mutant RAPSIN proteinine ait 3 boyutlu yapının (A) ve varyantın bulunduğu bölgenin (B) çakıştırılmış görüntüsü (mavi heliks mutant, sarı heliks normal proteini göstermektedir). Aminoasit değişikliği ile mutant proteindeki alfa heliks yapılarının konumunda rotasyonel değişiklik olduğu izlenmektedir (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*).



Şekil 4-23: p.(V165M) değişiminin RAPSIN proteini üzerindeki tahmini etkisi

(A) Normal ve mutant proteine ait 3 boyutlu yapısının çakıştırılmış görüntüsü. Normal proteinde Val165, Leu183 ile hidrofobik etkileşim halindeyken (B), valin yerine daha küçük bir aminoasit olan metioninin (Met165) bulunduğu mutant proteinde (C) iki rezidü arasındaki hidrofobik etkileşimin zayıfladığı ve bunun sonucunda iki helikal yapının birbirlerinden uzaklaştığı görülmektedir (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*).

Bu verilere ek olarak, olgunun TED analizinde tesadüfen *CLDN14* (NM_001146077.1) geninde heterozigot c.301G>A (p.(G101R), rs74315438) patojenik varyantı saptandı ve olgunun otozomal resesif sağırılık tip 29 (MIM#614035) için taşıyıcı olduğu belirlendi.

4.6.6. Aile MCC #6

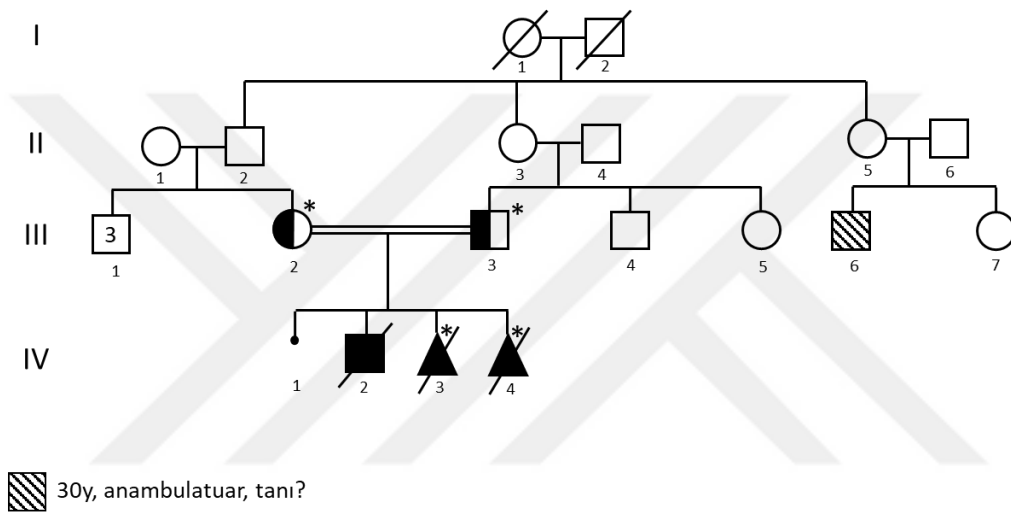
Benzer etkilenmiş üç kardeş olgudan ikisinin prenatal takipleri ve postmortem muayeneleri merkezimizde yapılmış olup iki olguya ait US ve postmortem muayene detayları aşağıda ayrı ayrı belirtilmiştir (MCC #6 – IV:3, IV:4).

Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında 1.° kuzen evliliği olan sağlıklı anne ve babanın ilk gebeliklerinin 12. GH'de spontan abortus ile sonlandığı; ikinci gebeliklerinin ise patolojik US bulguları (VM, retromikrognati, eklem kontraktürleri) nedeniyle izlenirken IUMF olarak sonuçlandığı öğrenildi (postmortem muayene/otopsi yapılmamış, fetal doku saklanmamış). Ailenin üçüncü

ve dördüncü gebelikleri merkezimizde izlendi; her iki gebelik ürünü de postmortem muayeneye tabii tutuldu (G4 A1 IUMF1 TT2) (Şekil 4-24).

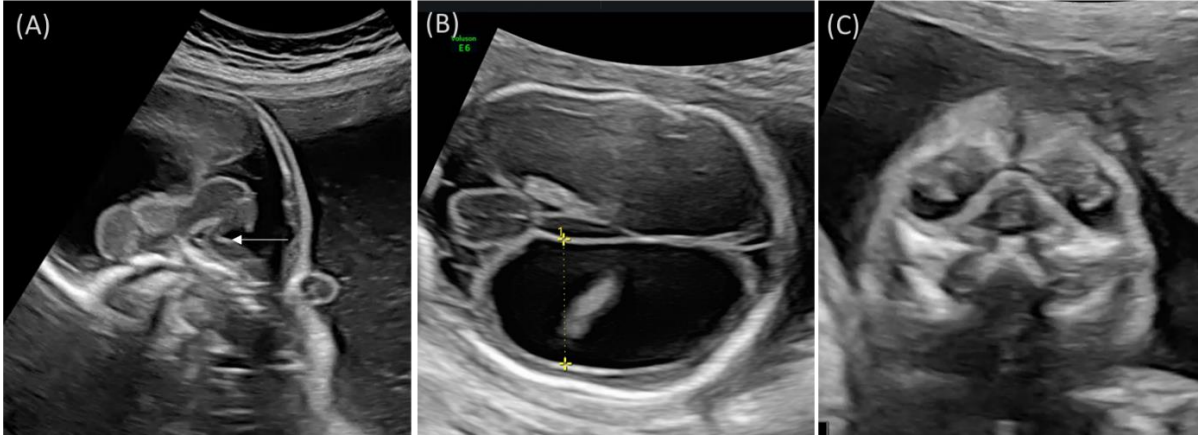
Bilinen maternal hastalığı olmayan anne adayının gebeliklerinde enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi. Annenin G3'e olan gebeliği sırasında ilk trimester US ve ikili tarama testi yaptırmadığı ifade edildi. Bununla birlikte obstetrik öyküsü nedeniyle izleme aldığımız çiftin gebeliği (G4) sırasında yapılan 11-14 tarama testinde NT yüksekliği saptandı (6.3 mm); US'da ellerde *clenched hands*, PEV, kuşku genitalya şüphesi ve fetal akinezi izlendi.



Şekil 4-24: MCC #6 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

MCC #6 – IV:3: 24⁺⁴ GH'deki US'de kısa femurlar (FL<3p), nazal hipoplazi, retromikrognati, kistik higroma, bilateral plevral efüzyon, bilateral PEV, ellerde üst üste binmiş parmaklar, diz-dirsek ve el bileklerinde fleksiyon kontraktürü, bacaklarda atrofik görünüm, bilateral ağır hidrosefali (lateral ventrikül atriyal bölge genişliği R: 29 mm, L: 35 mm), Z şeklinde beyin sapı ve çilek kafa görünümü saptandı, TCD: 22mm (<5p.) ölçüldü (serebellar hipoplazi). AS ile fetal kromozom/array analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 28. GH'de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.

MCC #6 – IV:4: 21⁺³ GH'deki US'de bilateral katarakt, bilateral ağır VM (lateral ventrikül atriyal bölge genişliği 18 mm), ileri derecede kortikal atrofi, irregüler kavum septum pellucidum (CSP), beyin orta hat hipoplazisi, vermiyan agenezi, hipoplazik ve Z şeklinde beyin sapı, solda plevral efüzyon, alt ekstremitelerde kalça ve diz eklemlerinde fleksiyon kontraktürü, el bileklerinde fleksiyon postürü, ellerde üstüste binmiş parmaklar ve bilateral PEV saptandı (Şekil 4-25). Kuşku genitalya şüphesi oluştu.



Şekil 4-25: MCC #6 – IV:4’e ait ikinci trimester US görüntüleri

Fetusun santral sinir sistemi değerlendirmesinde Z şeklinde beyin sapı (beyaz ok) (A) ve bilateral ağır hidrosefali (kesik çizgiler) (B) mevcut olup koronal planda konjenital katarakt ile uyumlu ekojenite izlenmektedir.

İlk trimesterde CVS materyalinde yapılan fetal kromozom analizi normal sonuçlanmış olan gebelik, olumsuz prognoz nedeniyle 22. GH’de termine edildi.

Postmortem bulgular

MCC #6 – IV:3: 28 haftalık erkek fetusun boyu 31 cm (-2.26 SD), tartısı 1140 g (0.28 SD), baş çevresi 28 cm (1.70 SD) ölçüldü. Ödemli ve gevşek görünümde olan ense derisi, makrosefali, çökük kaş kemerleri, hipertelorizm, aşağı çekik palpebral fissürler, belirgin burun kökü, hipoplastik burun kanatları, belirgin malar hipoplazi, kısa filtrum, açık ağız, geniş ve kısa üst frenulum, dar-yüksek damak ve bilateral düşük kulaklar saptandı. Kısa-yele boyun, aksiller, antekubital, inguinal ve popliteal pterijiyum izlendi. Bilateral addükte başparmaklar, PIP ve DIP eklemlerinde fleksiyon kontraktürü ve bilateral ağır PEV saptandı. Anal stenoz gözlemlendi, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-26, A-C). Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.

MCC #6 – IV:4: 22 haftalık erkek fetusun boyu 23 cm (-3.04 SD), tartısı 520 g (0.38 SD), baş çevresi 21 cm (1.04 SD) ölçüldü. Bol ve gevşek görünümde olan ense derisi, makrosefali, hafif hipertelorizm, belirgin burun kökü, antevort burun delikleri, *tented upper lip*, açık ağız ve sekonder yarık damak saptandı. Belirgin aksiller, antekubital, inguinal ve popliteal pterijiyum izlendi. Bilateral dirseklerde 40° ekstansiyon kısıtlılığı ve tüm

parmaklarda kamptodaktili, bilateral addükte başparmaklar, silik interfalangeal fleksiyon ve el içi çizgileri, kalça ekleminde fleksiyon ve addüksiyon kontraktürü, dizlerde 30° ekstansiyon kısıtlılığı ve bilateral PEV izlendi. Kuşkulu genital yapı mevcuttu; fallus 1 mm ölçüldü, fallusun ucunda tek açıklık mevcut olup ürogenital katlantı yapılarının oluşmadığı gözlemlendi (Skrotal aplazi?). Anal açıklık ve kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-26, D-F). Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.



Şekil 4-26: MCC #6 – IV:3 ve IV:4’e ait fizik muayene bulguları

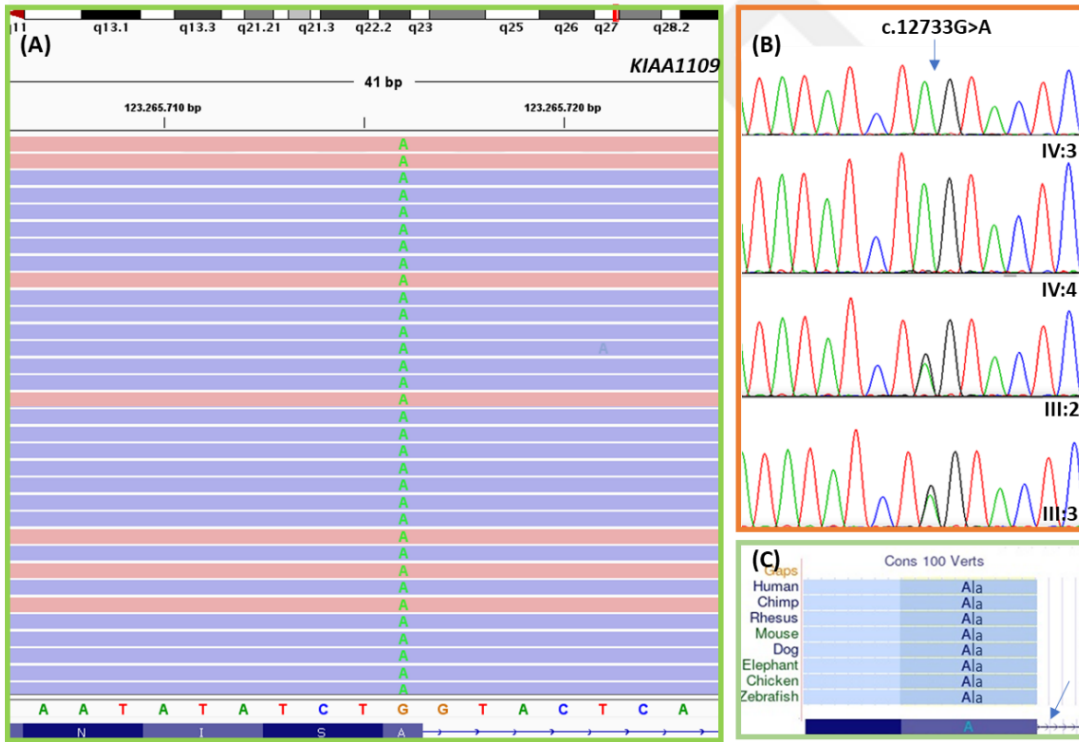
(A-C) IV:3’e ait muayene bulguları ve (D-F) IV:4’e ait muayene bulgularını göstermektedir.

(A) 28 haftalık fetusta makrosefali görünüm, kısa-yele boyun ve alt ekstremitelerde daha ağır olmak üzere yaygın fleksiyon kontraktürleri, (B) çökük kaş kemerleri, hipertelorizm, aşağı çekik palpebral fissürler, belirgin burun kökü, hipoplastik burun kanatları, belirgin malar hipoplazi, kısa filtrum ve “O” şeklinde açık ağızı içeren fasiyal dismorfizm ve (C) anal stenoz saptandı. (D) 22 haftalık fetusta makrosefali görünüm, kısa boyun, popliteal pterijyumlar, alt ekstremitelerde daha belirgin olan yaygın fleksiyon kontraktürleri, hafif hipertelorizm, belirgin burun kökü, antevert burun delikleri, *tented upper lip*, açık ağız, (E) sekonder yarı damak, (F) kuşkulu genitalya; ucunda tek açıklığın izlendiği fallik yapı ve ürogenital katlantı aplazisi izlendi.

Kontraktürlere eşlik eden konjenital katarakt, kompleks SSS anomalileri ve OR kalıtım modeliyle uyumlu olan pedigrî nedeniyle ayırıcı tanıda ön planda **Alkuraya-Kucinskask sendromu** düşünüldü.

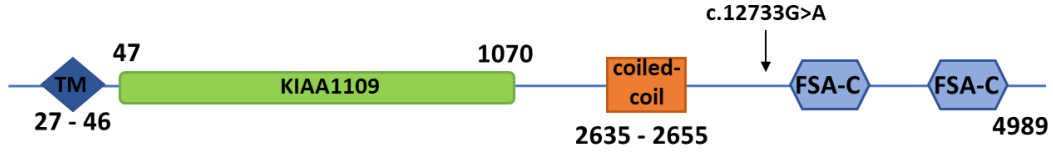
Moleküler Bulgular

İndeks olguda (MCC #6 – IV:3) yapılan TED analizinde, *KIAA1109* geni (4q27, NM_015312.3, NP_056127.2) ekzon 76'da homozigot c.12733G>A (p.(A4245T)) değişimi saptandı ve Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Ailevi segregasyon incelemelerinde benzer etkilenmiş kardeşin (IV:4) bu varyantı homozigot formda; ebeveynlerin ise heterozigot formda taşıdığı belirlendi (Şekil 4-27). *KIAA1109* geninde yer alan biallelik patojenik varyantlar Alkuraya-Kucinskas sendromu (MIM#617822) ile ilişkilendirilmiş olup MCC #6 – IV:3 ve IV:4'de saptanan değişimin protein üzerindeki yerleşimi Şekil 4-28'de gösterilmiştir. Olgularımızda gösterilen bu değişim literatürde daha önce bildirilmemiş, varyanta ait bilgiler Tablo 4-12'de belirtilmiştir. Yanlış anlamlı c.12733G>A varyantının, ilgili ekzonun son bazında yer alması nedeniyle kırılmayı etkilemesi beklenmekte; *KIAA1109* proteininde majör konformasyonel değişiklik yapması öngörülmemektedir (Şekil 4-29).



Şekil 4-27: Aile MCC #6'ya ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndeks olguda (IV:3) *KIAA1109* geninde saptanan değişimin IGV görüntüsü izlenmektedir. (B) Sanger dizileme ile fetal olgunun (IV:3) ve benzer etkilenmiş kardeşin (IV:4) c.12733G>A değişimini homozigot; anne (III-2) ve babanın (III:3) heterozigot formda taşıdığı gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Ala rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir.



Şekil 4-28: KIAA1109 proteinine ait domainler (191)

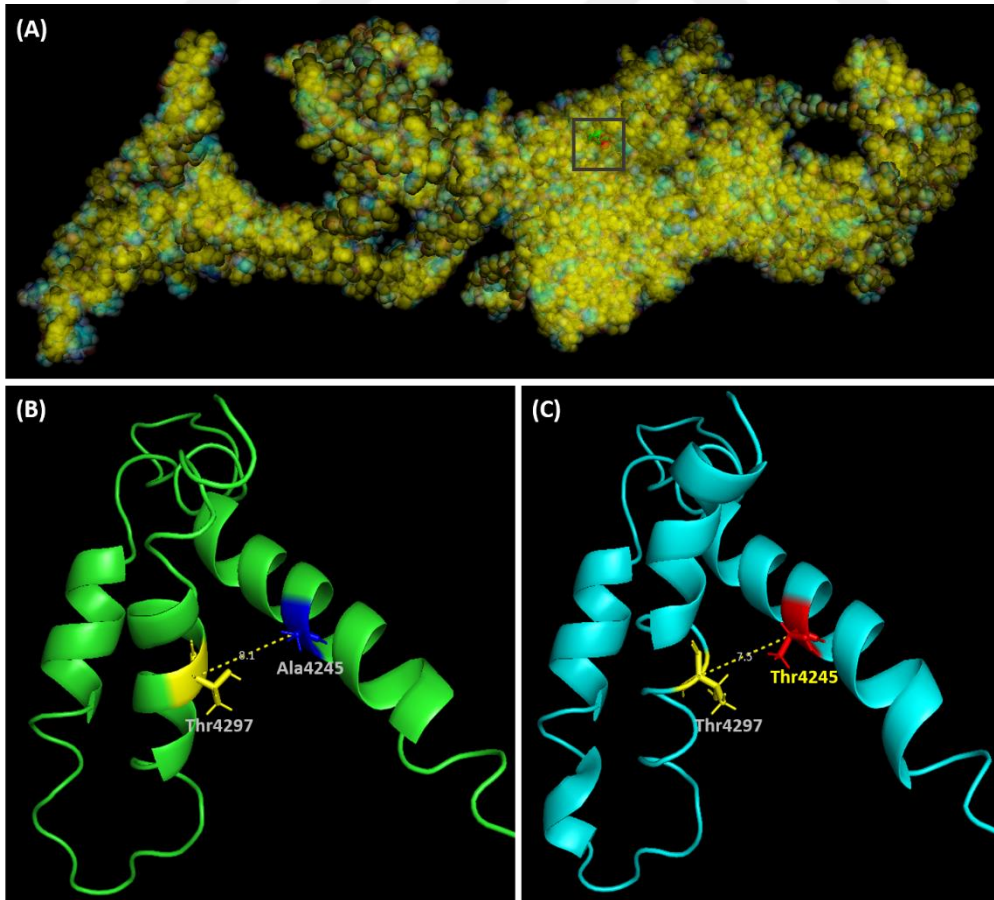
Olgularımızda saptanan varyantın protein üzerindeki yerleşimi siyah ok ile belirtilmiştir.

Tablo 4-12: MCC #6 ailesinde saptanan KIAA1109 varyantına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico					Ref.
				MT	Polyphen II HDiv/HVar	GERP ++	SIFT	HSF	
KIAA1109 NM_001384125.1	c.12997G>A p.(A4333T)	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	DC [1.0]	D/D [0.67/0.99]	5.52	T [1.0]	KE†	Novel

MT, MutationTaster; DC, Disease causing; D, Damaging/Deleterious; T, Tolerated, HSF, Human Splicing Finder; KE, "Kırılmayı etkiliyor"

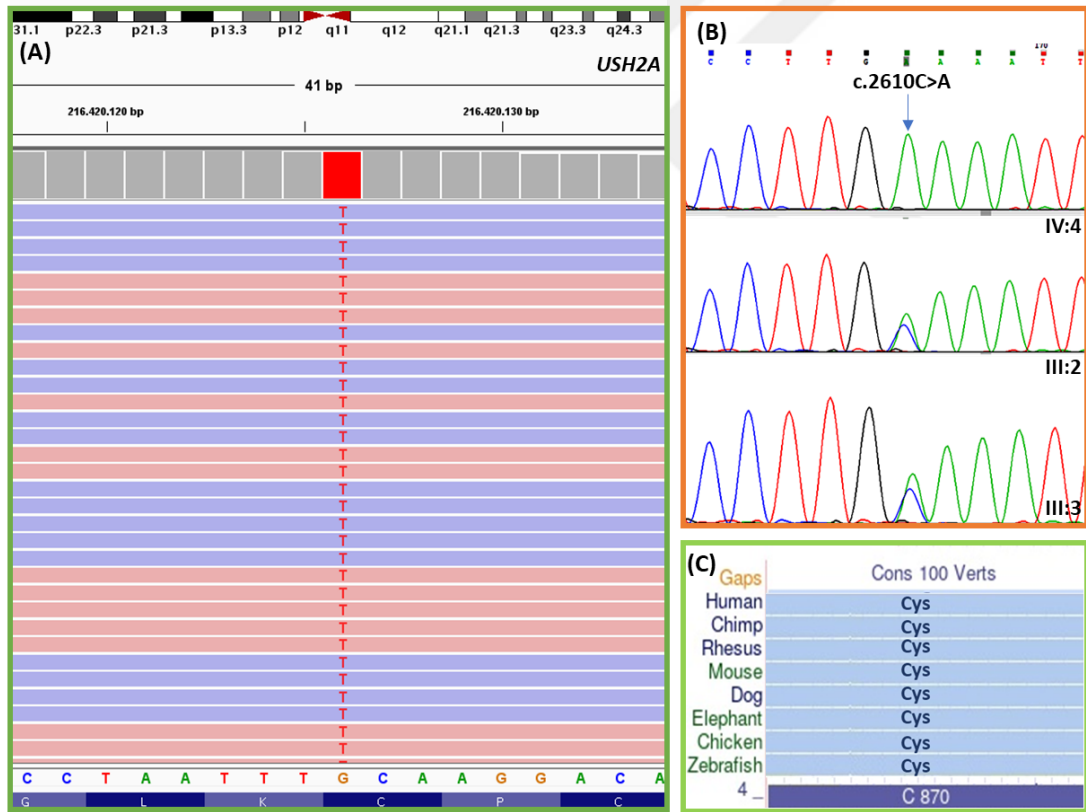
† Alteration of auxiliary sequences, significant alteration of ESE/ESS ratio (-2)
Broken WT donor site, most probably affecting splicing



Şekil 4-29: p.(A4245T) değişiminin KIAA1109 proteini üzerindeki tahmini etkisi

(A) Normal ve mutant proteine ait 3 boyutlu yapının karşılaştırılmış görüntüsü. Normal protein (B) ile kıyaslandığında, bu değişimin mutant rezidünün üzerinde bulunduğu alfa heliks ile Thr4297'in üzerinde bulunduğu alfa heliks arasındaki açığı değiştirerek, Thr4297'nin oturduğu alfa heliksin C terminale kaymasına (C) yol açtığı gözlenmiştir (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*).

Bu verilere ek olarak, olgunun TED analizinde *USH2A* (NM_206933.4) geninde homozigot c.2610C>A (p.(C870*), rs767078782) varyantı saptandı. Bu değişim, yakın zamanda fetal dönemde tanınamayacak bir antite olan Usher sendromu tip 2A sendromlu bir olguda gösterilmişti (197). Sanger analizleri ile olgunun bu varyantı homozigot, ebeveynlerin heterozigot formda taşıdığı belirlendi (Şekil 4-30). MCC #6 ailesinde saptanan *USH2A* varyantına ait bilgiler Tablo 4-13'te detaylandırılmıştır.



Şekil 4-30: MCC #6 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 2

(A) İndeks olguda *USH2A* geninde saptanan homozigot değişimin IGV görüntüsü izlenmektedir. (B) Sanger dizileme ile fetusun (IV:4) c.2610C>A değişimini homozigot, anne (III:2) ve babanın (III:3) heterozigot formda taşıdığı gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Cys rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir.

Tablo 4-13: MCC #6 ailesinde saptanan *USH2A* varyantına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico		Ref.
				MT	GERP++	
<i>USH2A</i> NM_206933.4	c.2610C>A p.(C870*)	767078782	VUS PM2, PP3	DC [1.0]	6.03	(197)

MT, MutationTaster; DC, Disease causing; D, Damaging/Deleterious; T, Tolerated

4.6.7. Aile MCC #7

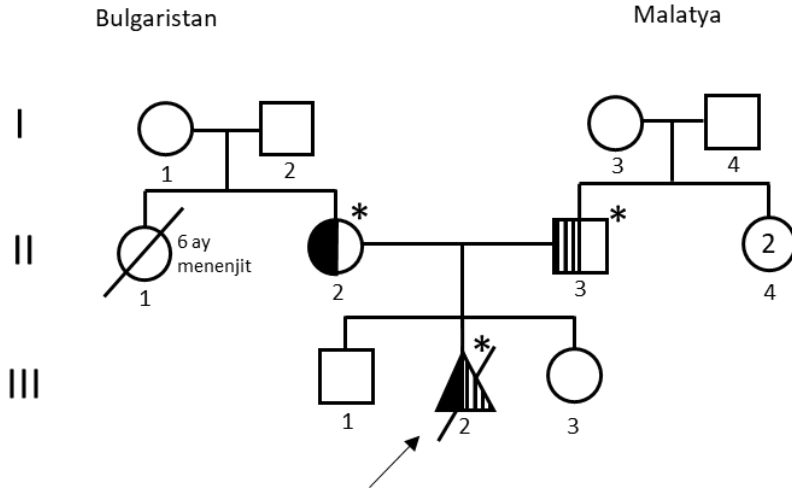
Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında akrabalık tariflenmeyen ve yakın yerleşim birimlerinden gelmeyen 30 yaşında sağlıklı anne ve 32 yaşında sağlıklı babanın 2. gebelik ürünü olan fetal olgu (G2 P1 TT1, MCC #7 – III:2). Ailede benzer etkilenmiş olgu tariflenmedi (Şekil 4-31).

Annenin öyküsünde; bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti ve abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi. Rutin 1. trimester US izlemi ve ikili tarama testi (NT: 1.1 mm) normal sonuçlanmış olan anne adayı, II. düzey US izlemi amacıyla merkezimize yönlendirildi.

21. GH'de gerçekleştirilen US'de skalp ödemi, prenatal kalınlık, sol ayakta PEV, solda plevral efüzyon, kompleks kardiyak anomali (geniş inlet ve outlet uzanımlı VSD, malpoze büyük arterler, ata biner aorta), küçük mide cebi, mikrognati, ayaklar hiperekstansiyon ve el bilekleri fleksiyon postüründe izlendi.

KS ile fetal kromozom ve array-CGH analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 25. GH'de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.



Şekil 4-31: MCC #7 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Postmortem fizik muayene bulguları

25 haftalık erkek fetusun boyu 34 cm (0.8 SD), tartısı 860 g (0.91 SD), baş çevresi 26 (2.53 SD) cm ölçüldü. İnce ve mediyalde seyrek kaşlar, belirgin hipertelorizm, kısa ve yukarı çekik palpebral fissürler (blefarofimozis?), geniş burun kökü, antevort burun delikleri, uzun filtrum, midfasiyal hipoplazi, yüksek-dar damak ve mikrognati saptandı. El başparmakları addükte durma eğiliminde olup bilateral el DII-IV'te kamptodaktili ve ulnar deviasyon, bilateral PEV, geniş ayak başparmakları ve sandal *gap* izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-32). Grafide tüm tübüler kemiklerde incelik dışında iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.



Şekil 4-32: MCC #7 – III:2’ye ait fizik muayene bulguları

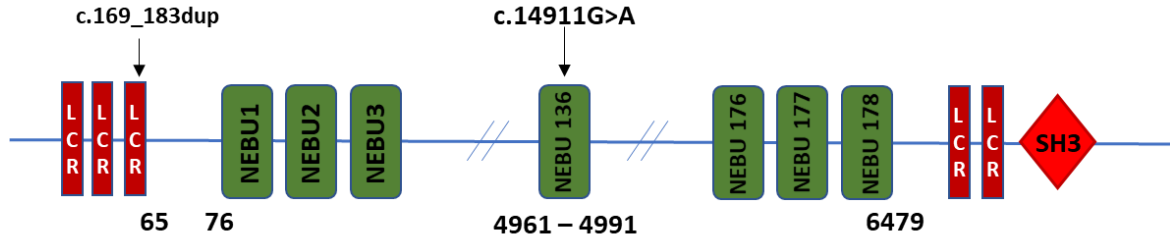
(A) 25 haftalık fetusta, (B) makrosefalik görünüm, ince ve mediyalde seyrek kaşlar, belirgin hipertelorizm, kısa ve yukarı çekik palpebral fissürler, geniş burun kökü, antevort burun delikleri, uzun filtrum, midfasial hipoplazi, (C) el bileklerinde ulnar ve parmaklarda ulnar deviasyon ve kamptodaktili izlenmektedir.

Olguda antenatal US’da saptanan konjenital kalp anomalilerine eşlik eden kısa palpebral fissürler (blefarofimozis?), geniş burun kökü, mikrognati gibi fasiyal dismorfik bulgular ve ellerde kamptodaktili, bilateral PEV gibi eklem kontraktürleri ile ayırıcı tanıda ön planda Marden-Walker ve Ohdo sendromları düşünüldü.

Moleküler Bulgular

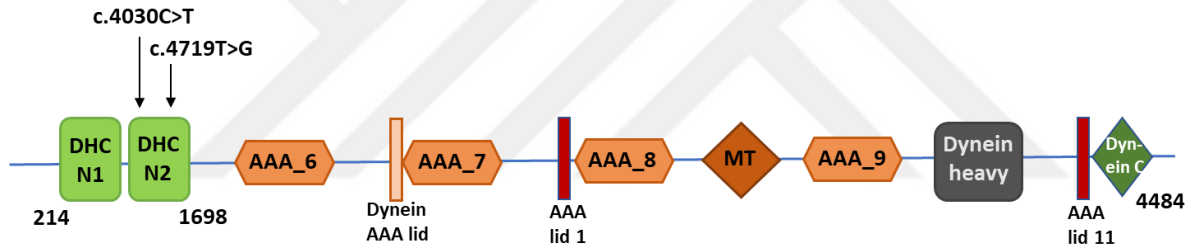
İndeks olguda yapılan TED analizinde, *NEB* geninde (2q23.3, *nebulin*, NM_001271208.2, NP_001258137) ekzon 5’te heterozigot c.169_183dup CTGGCACAGCCAGCA (p.A61_S62insLAQPA) ve ekzon 96’da c.14911G>A (p.(A4971T)) değişimleri; *DNAH9* geninde (17p12, *dynein axonemal heavy chain 9*, NM_001372.4, NP_001363.2) ekzon 20’de heterozigot c.4030C>T (p.(R1344*)) ve ekzon 21’de heterozigot c.4719T>G (p.(Y1573*)) değişimleri saptandı. *NEB* geni tarafından kodlanan nebulin proteinine ait domainler ve olguda saptanan varyantların protein üzerindeki yerleşimi Şekil 4-33’te, *DNAH9* proteinine ait domainler ve olguda saptanan varyantların protein üzerindeki yerleşimi Şekil 4-34’te şematize edilmiştir. Saptanan değişimlerin özellikleri Tablo 4-14’de detaylandırılmıştır. Segregasyon amacıyla yapılan incelemelerde anne adayının *NEB* geninde yer alan 15 bazlık duplikasyonu ve *DNAH9* geninde yer alan c.4030C>T (p.(R1344*)) varyantlarını; baba adayının *NEB* geninde c.14911G>A

(p.(A4971T)) ve *DNAH9* geninde yer alan c.4719T>G (p.(Y1573*)) varyantlarını heterozigot formda taşıdığı belirlendi (Şekil 4-35 ve Şekil 4-36).



Şekil 4-33: Nebulin proteinine ait domainler (191)

MCC#7 ailesinde saptanan *NEB* varyantlarının ilişkili domainler üzerindeki yerleşimi siyah ok ile gösterilmiştir.



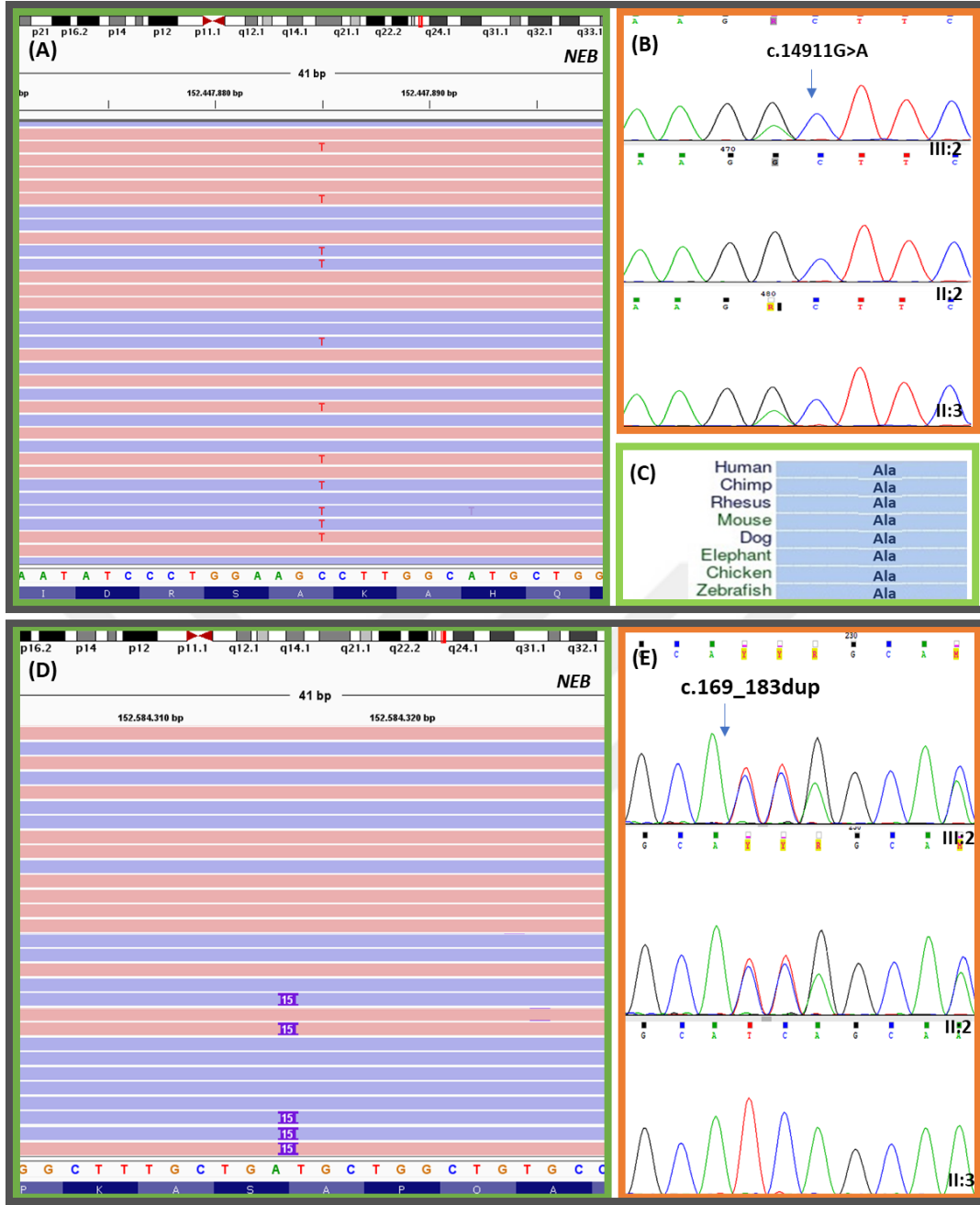
Şekil 4-34: DNAH9 proteinine ait domainler (191)

MCC#7 ailesinde saptanan varyantların ilişkili domainler üzerindeki yerleşimi siyah ok ile belirtilmiştir.

Tablo 4-14: MCC #7 ailesinde saptanan *NEB* ve *DNAH9* varyantlarına ait bilgiler

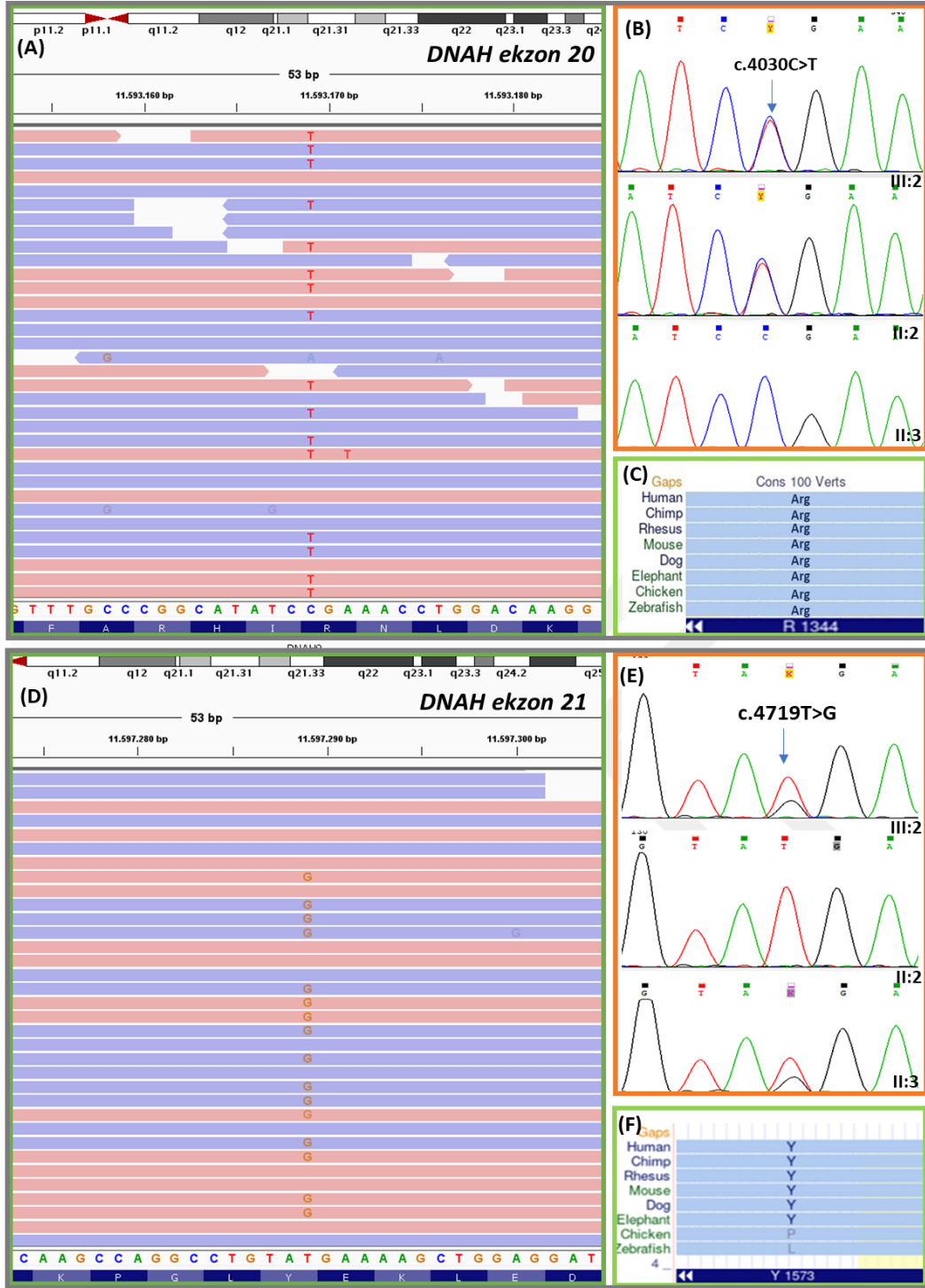
Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico				Ref.
				MT	GERP ++	MCAP	SIFT	
<i>NEB</i> NM_001271208.2	c.169_183dup p.(A61_S62ins)	rs770886969	Hot VUS PM2, PM4	Polimorfik [0.99]	-	-	-	(198)
<i>NEB</i> NM_001271208.2	c.14911G>A p.(A4971T)	rs761473319	VUS PM2, BP4	DC [0.9]	3.18	D [0.05]	T [0.182]	Novel
<i>DNAH9</i> NM_001372.4	c.4030C>T p.(R1344*)	rs760026221	Patojenik PVS1, PM2, PP3	DC [1.0]	3.27	-	-	Novel
<i>DNAH9</i> NM_001372.4	c.4719T>G p.(Y1573*)	rs200681631	Patojenik PVS1, PM2, PP3	DC [1.0]	-0.13	-	-	Novel

MT, MutationTaster; DC, Disease causing; D, Damaging/Deleterious; T, Tolerated



Şekil 4-35: MCC #7 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 1

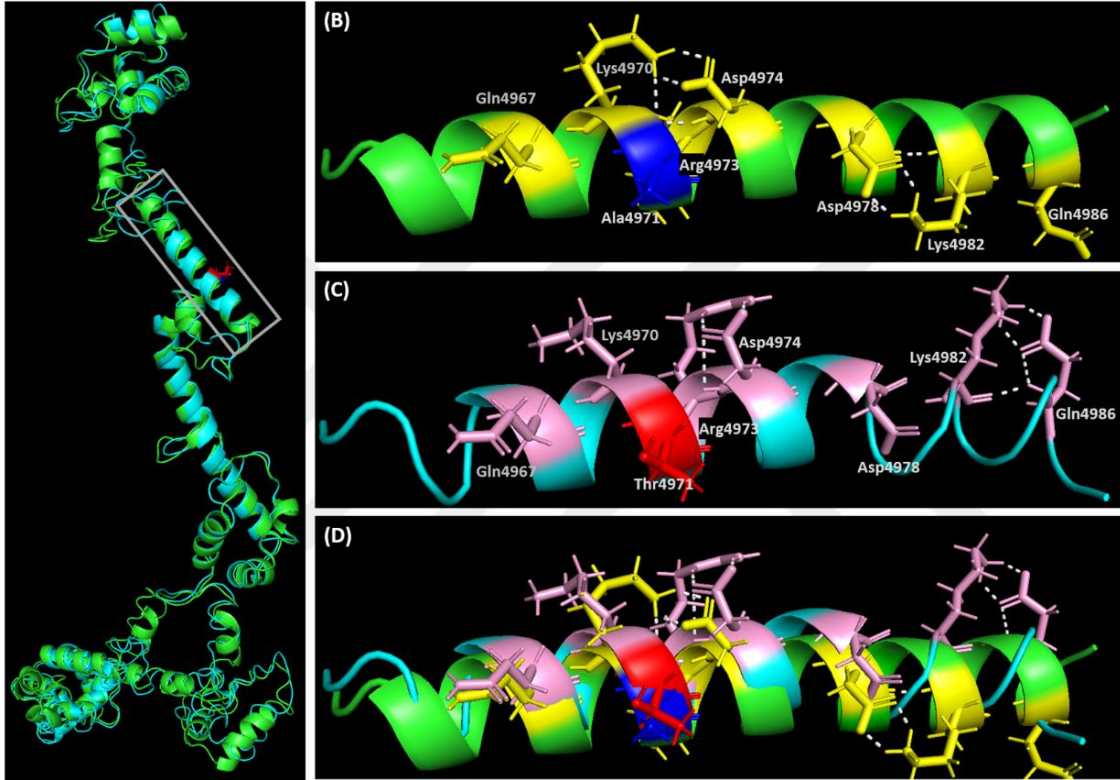
(A) İndeks olguda (III:2) *NEB* geninde saptanan heterozigot c.14911G>A değişimin IGV görüntüsü. (B) Sanger dizileme ile fetus (III:2) ve babanın (II:3) bu değişimi heterozigot taşıdığı, annenin (II:2) ise homozigot normal olduğu gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Ala rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir. (D) İndeks olguda (III:2) *NEB* geninde saptanan heterozigot c.169_183dup değişimin IGV görüntüsü. (E) Sanger dizileme ile fetus (III:2) ve annenin (II:2) bu duplikasyonu heterozigot taşıdığı, babanın (II:3) ise homozigot normal olduğu gösterilmiş; böylece fetustaki iki varyantın birleşik heterozigot konumunda bulunduğu doğrulanmıştır.



Şekil 4-36: MCC #7 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 2

(A) İndeks olguda (III:2) *DNAH9* geninde saptanan heterozigot c.4030C>T değişiminin IGV görüntüsü. (B) Sanger dizileme ile fetus (III:2) ve annenin (II:2) bu değişimi heterozigot taşıdığı, babanın (II:3) ise homozigot normal olduğu gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Arg rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir. (D) İndeks olguda (III:2) *DNAH9* geninde saptanan heterozigot c.4719T>G değişiminin IGV görüntüsü. (E) Sanger dizileme ile fetus (III:2) ve babanın (II:3) bu varyantı heterozigot taşıdığı, annenin (II:2) ise homozigot normal olduğu gösterilmiş; böylece fetustaki iki varyantın birleşik heterozigot konumunda bulunduğu doğrulanmıştır.

Olgumuzda *NEB* geninde saptanan c.169_183dupCTGGCACAGCCAGCA (p.(A61_S62insLAQPA)) varyantı daha önce konjenital başlangıçlı nemalin miyopati tanımlı bir olguda başka bir varyant ile birleşik heterozigot formda bildirilmiş; diğer üç varyant ise literatürde daha önce bildirilmemişti (198). Saptadığımız yanlış anlamalı *novel NEB* varyantına ait normal ve mutant protein yapısı, üç boyutlu modelleme sistemi kullanılarak Şekil 4-37’de görselleştirilmiştir.



Şekil 4-37: p.(A4971T) değişiminin nebulin proteini üzerindeki tahmini etkisi

(A) Yabanıl tip ve mutant tip protein modellerinin karşılaştırılmış görüntüsü. Normal protein (B)’de Lys4970’in Asp4974 ile, Asp4978’in ise Lys4982 ile etkileşim halinde olduğu görünmektedir. 4971. pozisyonundaki alaninin treonine dönüşmesi (C) ile gerçekleşen ve alfa heliksin kısalması ile sonuçlanan bir dizi değişikliğin ardından bu iki bağlantının koptuğu, Asp4978’in Arg4973 ile, Lys4982’nin ise Gln4986 ile yeni bağlantılar kurduğu gözlenmektedir. Aminoasit dönüşümü ile ortaya çıkan topolojik değişiklikler, mutant ve normal proteindeki varyant bölgesinin karşılaştırılması (D) ile görselleştirilmiştir (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*).

Bu verilere ek olarak, olgunun TED analizinde tesadüfen *GJB2* (NM_004004.6) geninde heterozigot c.35delG (p.(G12Vfs*2, rs80338939) patojenik varyantı saptandı ve olgunun otozomal resesif sağlıklı tip 1A (MIM#220290) için taşıyıcı olduğu belirlendi.

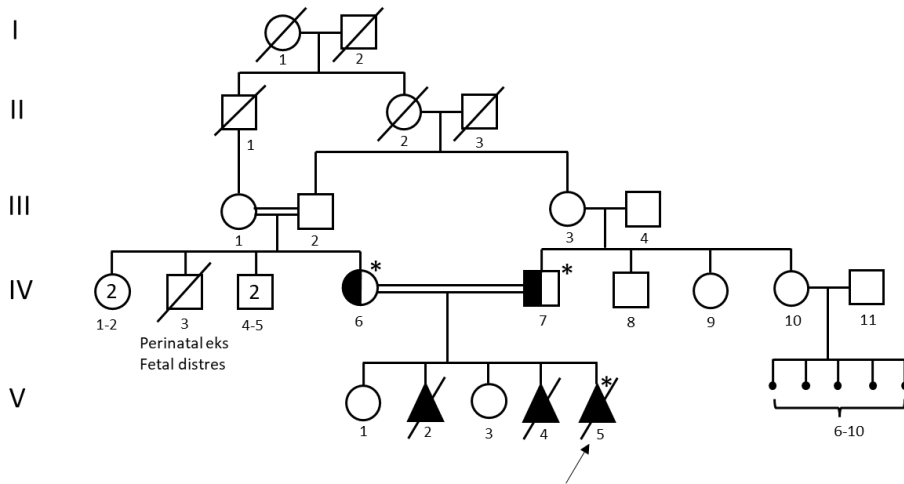
4.6.8. Aile MCC #8

Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında 1.° kuzen evliliği bulunan 35 yaşında sağlıklı anne ve 38 yaşında sağlıklı babanın beşinci gebelik ürünü olan fetal olgu (G5 P2 TT3, MCC #8 – V:5). G1 ve G3'ün sağlıklı dişi olgular olduğu; G2 ve G4'e olan (MCC #8 – V:3 ve V:4) her iki gebeliğin de IUMF olarak sonlanan erkek fetal olgular olduğu öğrenildi (Şekil 4-38). Bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı ifade edildi. İlk trimester US ve ikili tarama testi yaptırmayan anne adayı, 15+ GH'de dış merkezde yapılan US'de kistik higroma ve hidrops şüphesi saptanması nedeniyle merkezimize başvurdu.

16. GH'de merkezimizde yapılan US'de kistik higroma, batında asit, ciltte yaygın ödem ve hidrotoraks saptandı. CVS ile fetal kromozom analizinin 46,XY olarak sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz hakkında genetik danışma alan ve gebeliğe devam kararında olan aile izleme alındı. 24. GH'de yapılan US'de anhidramniyos, dev kistik higroma (86x101x85 mm), hidrops fetalis bulguları (yaygın masif cilt ödemi, batında masif asit, hidrotoraks, perikardiyal efüzyon), dar toraks (TC<2.5p.), tüm tübüler kemiklerde kısalık ve beyinde periventriküler ekojenite saptandı.

26. GH'de IUMF olan fetus postmortem muayene amacıyla kliniğimize getirildi.



Şekil 4-38: MCC #8 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Postmortem bulgular

26 haftalık erkek fetusun boyu 23 cm (suboptimal, -4.79 SD), tartısı 810 g (-0.19 SD), baş çevresi 22 cm (-1.28 SD) ölçüldü. Dev kistik higroma, gergin yüz cildi, blefarofimozis,

hipertelorizm, enoftalmi, basık burun kemeri, belirgin hipoplazik ala naziler, kısa kolumella, malar hipoplazi, uzun filtrum, invertte üst dudak, açık ağız, komplet yarık damak ve retrognati saptandı. Bilateral ağır aksiller, kubital, inguinal ve popliteal pterijyumlar izlendi; pektus ekskavatum, bilateral el bileklerinde ulnar deviasyon, kamptodaktili, parmaklar arası yüksek webler, addükte başparmaklar ve klinodaktili (DV) gözlemlendi. Genital yapı erkek lehine değerlendirilmekle birlikte penis boyu gestasyon haftasına göre küçük olarak değerlendirildi (mikropenis? hidropsa sekonder?). Kord çapı ince olup damar yapısı net değerlendirilemedi (Şekil 4-39). Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.

MCC#8 – V:5; dev kistik higroma, multipl pterijyumlar, ödem ve fasiyal dismorfik bulguları ile klinik olarak **Letal Multipl Pterijyum sendromu** tanısı aldı. Benzer etkilenmiş ve spontan abortus ile sonuçlanan üç erkek fetus öyküsü nedeniyle ayırıcı tanıda ön planda XL form düşünüldü; ancak akraba evliliği nedeniyle OR form da olasılıklar dahilinde değerlendirildi.

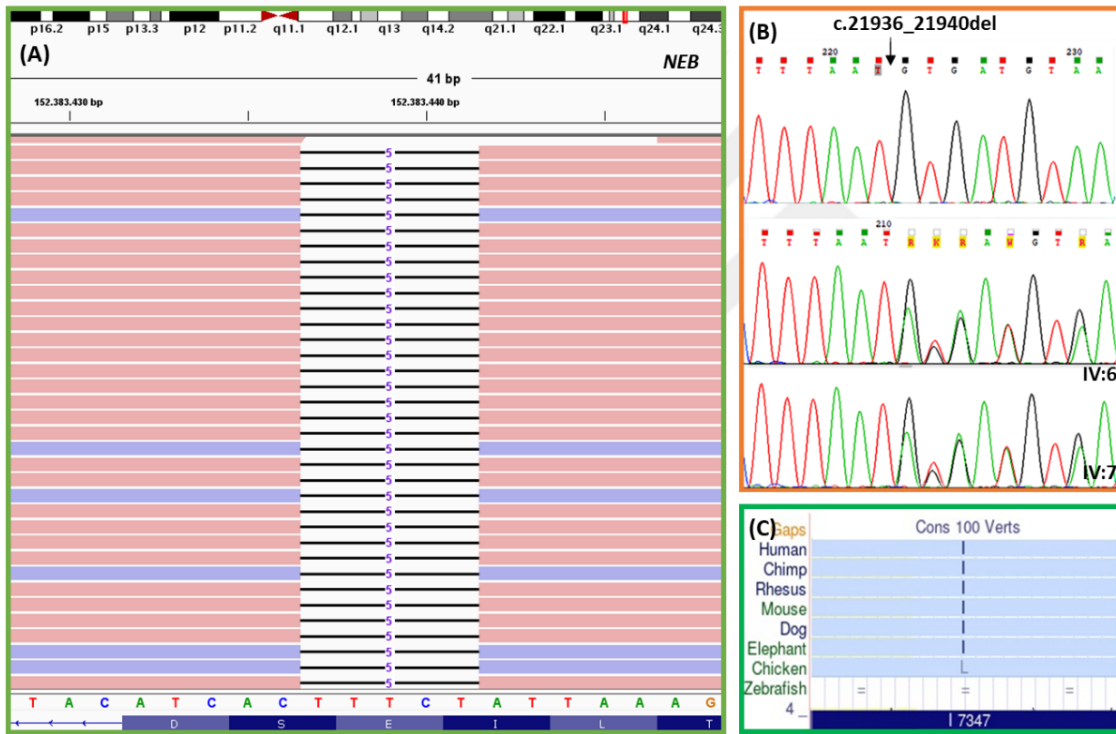


Şekil 4-39: MCC #8 – V:5’e ait fizik muayene bulguları

(A) 26 haftalık fetusta gergin yüz cildi, blefarofimozis, hipertelorizm, enoftalmi, basık burun kemeri, belirgin hipoplazik ala naziler, kısa kolumella, malar hipoplazi, uzun filtrum, invertte üst dudak, açık ağız, tüm eklemlerin tutulduğu şiddetli kontraktürler, yaygın pterijyumlar, (B) dev kistik higroma, (C) mikropenis şüphesi ve (D) antekubital ve aksiller pterijyum oluşumları izlenmektedir.

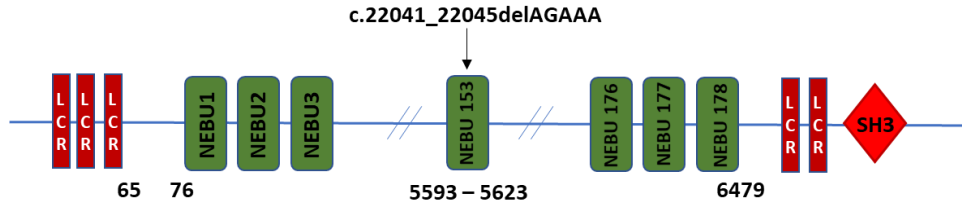
Moleküler Bulgular

İndeks olguda yapılan TED analizinde, *NEB* geni (2q23.3, nebulin, NM_001271208.2, NP_001258137) ekzon 148'de homozigot c.22041_22045delAGAAA (p.(I7347Mfs*2)) değişimi saptandı ve Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla yapılan incelemelerde ebeveynlerin bu varyantı heterozigot formda taşıdığı belirlendi (Şekil 4-40). Olgumuzda saptanan varyantın nebulin proteini üzerindeki yerleşimi Şekil 4-41'de gösterilmiştir. Çerçeve kaymasına neden olan bu değişim literatürde daha önce bildirilmemiş olup ACMG kriterlerine göre patojenik olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 4-15).



Şekil 4-40: MCC #8 ailesine ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndeks olguda *NEB* geninde saptanan homozigot değişimin IGV görüntüsü. (B) Sanger dizileme ile fetal olguda (V:5) homozigot delesyon varlığı konfirme edilmiş; anne (IV:6) ve babanın (IV:7) bu varyantı heterozigot formda taşıdığı gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki İle rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir.



Şekil 4-41: c.22041_22045delAGAAA varyantının nebulin proteini üzerindeki yerleşimi (191)

Olgumuzda saptanan varyantın protein üzerindeki yerleşimi siyah ok ile belirtilmiştir.

Tablo 4-15: MCC #8 ailesinde saptanan *NEB* varyantına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico	Ref.
				MT	
<i>NEB</i> NM_001271208.2	c.22041_22045delAGAAA p.(I7347Mfs*2)	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	DC [1]	Novel

MT, MutationTaster; DC, Disease causing

Tesadüfi olarak, olgunun TED analizinde *C8B* (NM_000066.4) geninde heterozigot c.1282C>T (p.(R428*), rs41286844) patojenik varyantı saptanarak C8 eksikliği tip II için taşıyıcı olduğu belirlendi. Ayrıca, *CACNA1B* (NM_000718.4) geninde daha önce bildirilmemiş olmakla birlikte 57 bp uzunluğunda ve kırılma bölgesinde yer alan heterozigot bir insersiyon saptandı (c.390+1_390+2ins). Bu gende yer alan biallelik varyantlar, nöbetler ve non-epileptik hiperkinetik hareketlerle seyreden bir nörogelişimsel hastalık (MIM#618497) ile ilişkili olup saptadığımız değişim ACMG kriterlerine göre patojenik olarak değerlendirilmektedir.

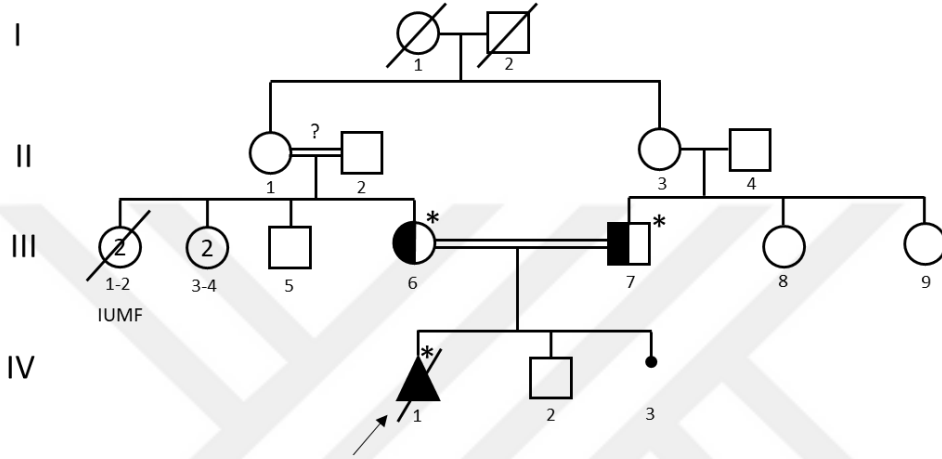
4.6.9. Aile MCC #9

Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında 1.° kuzen evliliği bulunan 19 yaşında sağlıklı anne ve 23 yaşında sağlıklı babanın ilk gebelik ürünü olan fetus, indeks olgumuzdu (G1 TT1, MCC #9 – IV:1). Bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi. Ailede benzer etkilenmiş olgu tariflenmedi (Şekil 4-42). 11-14 tarama testi normal sonuçlanmış (NT: 1.1 mm) olan aile, gebelik takibi sırasında IUGG saptanması ve kötü obstetrik öykü nedeniyle merkezimize yönlendirildi.

27. GH'de merkezimizde yapılan US'de simetrik IUGG, skalp ödemi, dolikosefali, mikrosefali, serebellar hipoplazi, korpus kallozumda ekojenite artışı ve bilateral PEV saptandı.

KS ile fetal kromozom ve array analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 31. GH'de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.



Şekil 4-42: MCC #9 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Postmortem fizik muayene bulguları

31 haftalık dişi fetusun boyu 29 cm (suboptimal, -4.16 SD), tartısı 730 g (-2.14 SD), baş çevresi 22,5 cm (-3.7 SD) ölçüldü. Yüz ve skalpte daha yoğun olmak üzere tüm vücutta açık renkli cilt lezyonları izlendi (hafif iktiyozis? postmortem değişiklik?). Gözler açık görünümde idi. Kısa boyun, mikrodolikosefali, geriye eğimli alın, hipertelorizm, belirgin glabella ve burun kökü, kısa kolumella, yüksek damak, mikroretrognati ve geriye yerleşimli kulaklar saptandı. Bilateral omuzlarda, dirseklerde ve el bileklerinde 45° ekstansiyon kısıtlılığı, silik el içi ve DIII-V'e ait distal interfalangeal çizgiler, bilateral DII'de ekstansiyon kontraktürü, uzun görünen parmaklar ve dar eller, kalça ve diz eklemlerinde 45° fleksiyon kontraktürü, *rocker-bottom feet*, dar ve uzun görünen ayaklar, patülöz (*tree-frog* görünümü) sonlanan ayak parmakları ve solda daha belirgin olmak üzere hipoplazik ayak tırnakları gözlemlendi. Diz üstü deri gergin görünümde idi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-43). Grafide dolikosefali ve hipopazik mandibula izlenmiş olup iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.



Şekil 4-43: MCC #9 – IV:1’e ait fizik muayene bulguları

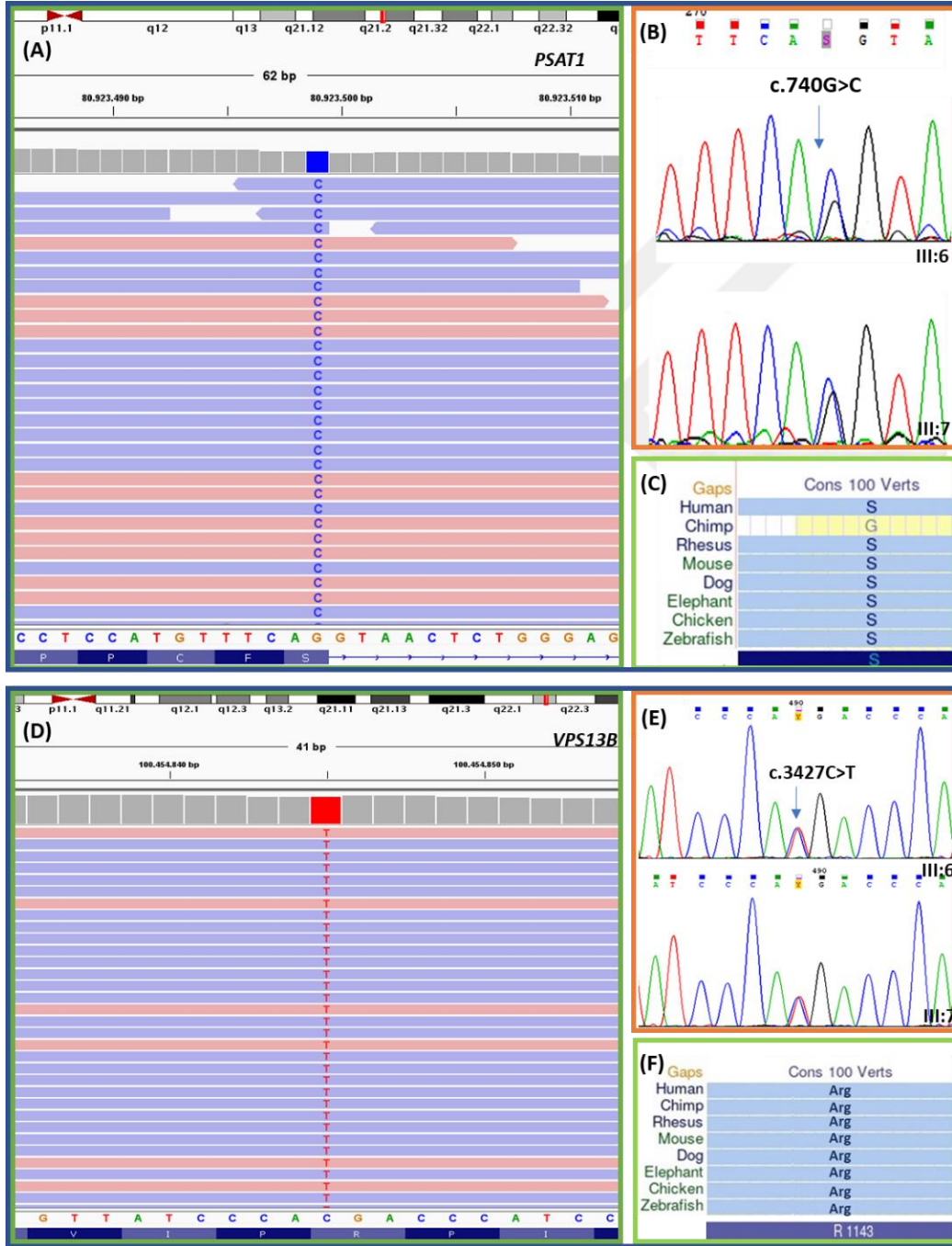
(A) 31 haftalık fetusta; tüm vücutta açık renkli cilt lezyonları (hafif iktiyozis?), kısa boyun, geriye eğimli alın, bilateral omuzlarda, dirseklerde, el bileklerinde, kalça ve diz eklemlerinde ekstansiyon kısıtlılığı, uzun görümlü parmaklar, (B) açık gözler, hipertelorizm, belirgin glabella ve burun kökü, kısa kolumella, mikroretrognati, (C) patülöz (*tree-frog* görünümü) sonlanan ayak parmakları, hipoplazik ayak tırnakları, (D) *rocker-bottom feet*, dar ve uzun görünen ayaklar izlenmektedir.

Ayırıcı tanıda Pena-Shokeir sendromu tip II (Serebrokölöfasiyoskeletal sendrom, COFS), Neu-Laxova sendromu, AMC tip 4 (Zain sendromu) ve pontoserebellar hipoplazi alttipleri düşünüldü.

Moleküler Bulgular

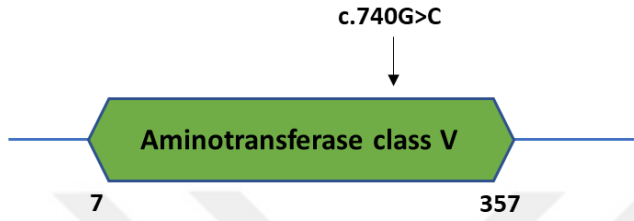
İndeks olguda yapılan TED analizinde; *PSAT1* geni (9q21.2, *phosphoserine aminotransferase 1*, NM_058179.4) ekzon 6’da homozigot c.740G>C (p.(S247T)) ve *VPS13B* geni (8q22.2, *vacuolar protein sorting 13 homolog B*, NM_017890.4) ekzon 23’te homozigot c.3427C>T (p.(R1143*), rs386834080) değişimleri saptandı. Segregasyon incelemelerinde ebeveynlerin her iki varyantı da heterozigot formda taşıdığı belirlendi (Şekil 4-44). *PSAT1* tarafından kodlanan Fosfoserin aminotransferaz proteinine ait domainler ve olguda saptanan varyantın protein üzerindeki yerleşimi Şekil 4-45’de, *VPS13B* proteinine ait domainler ve olguda saptanan varyantın protein üzerindeki yerleşimi Şekil 4-46’de şematize edilmiştir. *PSAT1* geninde gösterilen varyant literatürde daha önce bildirilmemiştir; *VPS13B*

geninde saptanan varyant ise literatürde hastalık ile ilişkilendirilmişti (199). Saptadığımız varyantlara ait özellikler Tablo 4-16’da detaylandırılmıştır. *PSAT1*’deki yanlış anlamlı değişimin, ilgili ekzonun son bazında yer alması nedeniyle kırılmayı etkilemesi beklenmekte; protein yapısında konformasyonel değişiklik yapması öngörülmemektedir (Şekil 4-47).



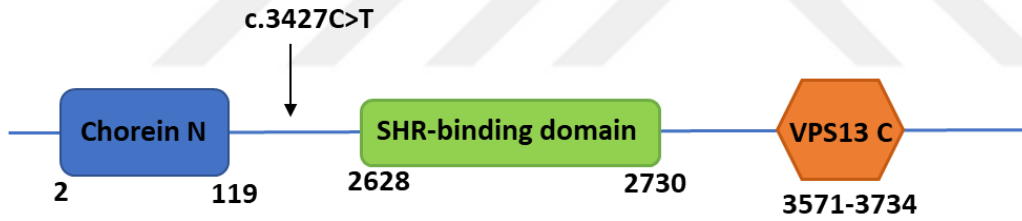
Şekil 4-44: MCC #9 ailesine ait moleküler analiz sonuçları

(A) İndeks olguda (IV:1) *PSAT1* geninde saptanan homozigot değişimin IGV görüntüsü. (B) Sanger dizileme ile anne (III:6) ve babanın (III:7) c.740G>C değişimini heterozigot formda taşıdığı gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Ser rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir. (D) İndeks olguda (IV:1) *VPS13B* geninde saptanan homozigot değişimin IGV görüntüsü izlenmektedir. (B) Sanger dizileme ile anne (III:6) ve babanın (III:7) c.3427C>T değişimini heterozigot formda taşıdığı gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki Arg rezidüsünün türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir.



Şekil 4-45: *PSAT1* tarafından kodlanan Fosfoserin aminotransferaz proteininin domain yapısı (191)

Olgumuzda saptanan varyantın protein üzerindeki yerleşimi siyah ok ile belirtilmiştir.



Şekil 4-46: *VPS13B* proteinine ait domainler (191)

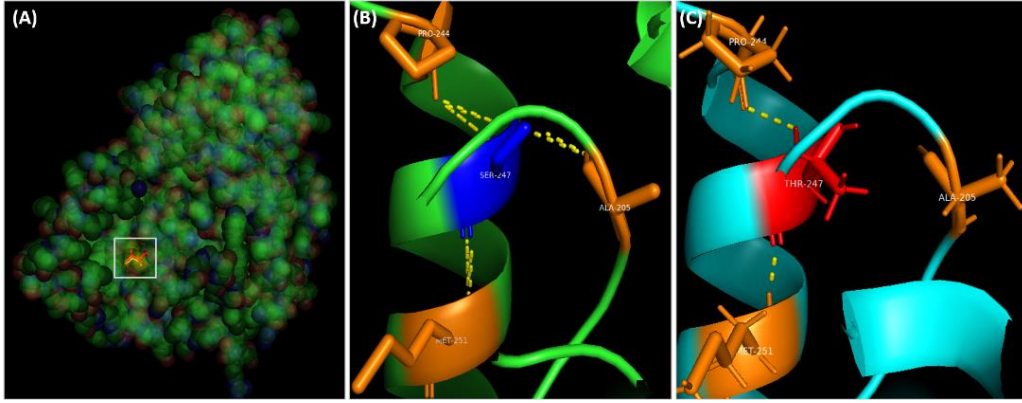
Olgumuzda saptanan varyantın protein üzerindeki yerleşimi siyah ok ile belirtilmiştir.

Tablo 4-16: MCC #9 ailesinde saptanan *PSAT1* ve *VPS13B* varyantlarına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico					Ref
				MT	GERP ++	Polyphen II HDiv/HVar	MCAP	HSF	
<i>PSAT1</i> NM_058179.4	c.740G>C p.(S247T)	-	Patojenik PVS1, PM2, PP3	DC [1.0]	5.72	P/P [0.85/035]	D [0.24]	KE‡	Novel
<i>VPS13B</i> NM_017890.4	c.3427C>T p.(R1143*)	386834080	Patojenik PVS1, PP5, PM2, PP3	DC [1.0]	1.58	-	-	-	(199)

MT, MutationTaster; DC, Disease causing; P, Pathogenic; D, Damaging/Deleterious; HSF, Human Splicing Finder; KE, "Kırılmayı etkiliyor"

‡ Broken WT donor site, most probably affecting splicing



Şekil 4-47: p.(S247T) değişiminin PSAT1 proteini üzerindeki tahmini etkisi

(A) Normal ve mutant proteinin 3 boyutlu yapısının karşılaştırılmış görüntüsü. Yabancı (B) ve mutant tip modelde (C) alfa-heliks oluşumuna katılan hidrojen bağları arasında fark olmadığı ve yan zincirlerinden kaynaklanan herhangi bir molekül içi etkileşimin oluşmadığı gözlenmektedir (*I-Tasser, Discovery Studio Visualiser*).

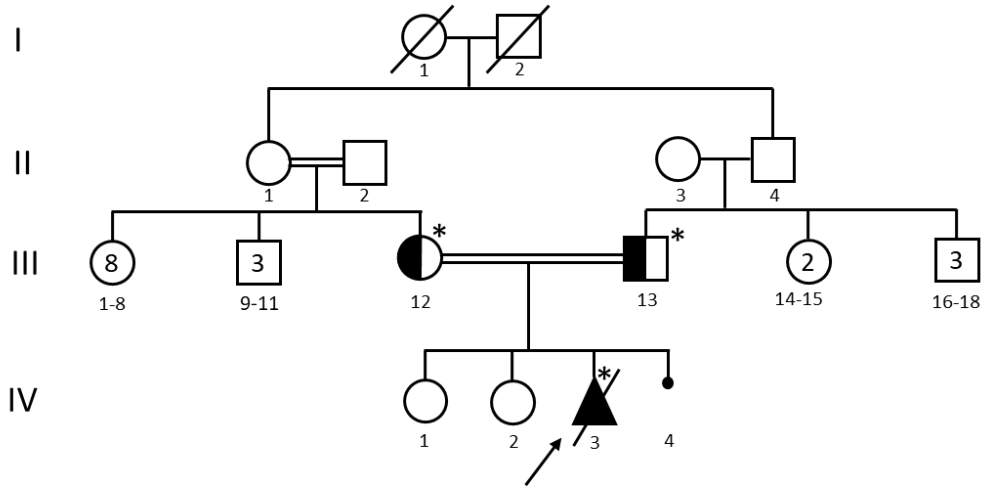
4.6.10. Aile MCC #10

Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında 1.° kuzen evliliği bulunan 26 yaşında sağlıklı anne ve 30 yaşında sağlıklı babanın 3. gebelik ürünü olan fetal olgu (G3 P2 TT1, MCC #10 – IV:3). Bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi. Ailede benzer etkilenmiş olgu tariflenmedi (Şekil 4-48). 11-14 tarama testi ve 1. trimester US görüntülemesini yaptırmamış olan anne adayı, rutin gebelik takibinde hidrops bulguları saptanması üzerine merkezimize başvurdu.

31. GH’de merkezimizde yapılan US’de polihidramniyos, hidrops fetalis bulguları (yaygın yüz, skalp ve cilt ödemi, batında asit, bilateral hidrotoraks, kardiyomegali), bilateral ellerde fleksiyon kontraktürü ve PEV, inlet VSD şüphesi ve kısa femurlar (FL<1p) saptandı.

Olumsuz prognoz nedeniyle 31. GH’de tıbbi terminasyon işlemi planlanması üzerine VDRL/ParvoB19 antikor analizi için maternal kan ve CMV/Toxo-PZR amacıyla AS işlemini takiben fetal karyotip/array-CGH için kardiyosentez girişimi yapılarak gebelik sonlandırıldı.



Şekil 4-48: MCC #10 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Postmortem fizik muayene bulguları

31 haftalık dişi fetusun boyu 32 cm (-3.01 SD), tartısı 1040 g (-1.28 SD), baş çevresi 28 cm (0.07 SD) ölçüldü. Kısa ve ödemli boyun, düşük ense saç çizgisi, hipertelorizm, aşağı çekik palpebral fissürler, geniş ve basık burun kökü, kısa kolumella, *tented upper lip*, dar ve yüksek damak ve düşük kulaklar saptandı. Dar omuz kavşağı, bilateral dirseklerde 30° ekstansiyon kısıtlılığı, el bilek eklemlerinde subluksasyon, hafif addükte başparmaklar, tenar atrofi, ileri derecede proksimal yerleşimli PIP eklemi fleksiyon çizgisi, silik distal falangeal fleksiyon çizgileri, bilateral kalça ve diz ekleminde ekleminde fleksiyon kontraktürü, bilateral PEV ve fırlak topuklar gözlemlendi. Anüs, genital yapı ve kord ödematöz görünüm dışında normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-49, A-C). Grafide bilateral radiokarpal subluksasyona ek iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı (Şekil 4-49, D).



Şekil 4-49: MCC #10 – IV:3’e ait klinik ve radyolojik muayene bulguları

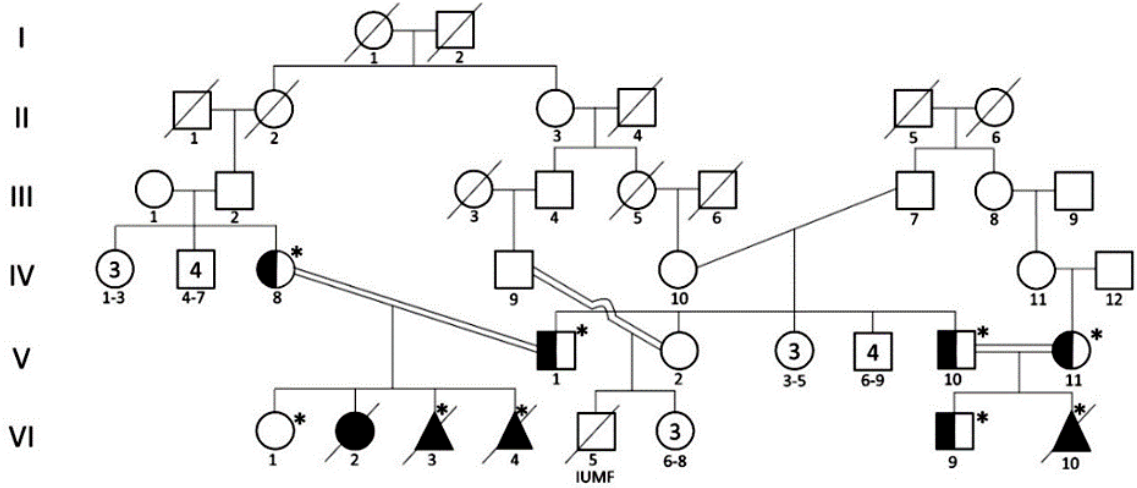
(A) 31 haftalık dişi fetusta hipertelorizm, aşağı çekik palpebral fissürler, geniş ve basık burun kökü, kısa kolumella, *tented upper lip*, (B) addükte başparmaklar ve kamptodaktili, (C) kısa ve ödemli boyun, dar omuz kavşağı, dirsek ve dizlerde fleksiyon kontraktürleri, el bilek eklemlerinde ulnar deviasyon ve fırlak topuklar izlenmektedir. (D) Postmortem AP grafide bilateral radiokarpal subluksasyon dikkat çekmektedir.

Moleküler Bulgular

İndeks olguda (IV-3) yapılan TED analizinde *PIEZO2* geni (18p11.2, *Piezo-type mechanosensitive ion channel component 2*, NM_001378183.1, NP_001365112.1) ekzon 36’da heterozigot c.4958G>C, (p.(R1653P)) değişimi saptandı. Ancak, segregasyon analizleri ile annenin de bu VUS (*variant of uncertain significance*) niteliğindeki (PM2, PP3) varyantı taşıdığı gösterildi. Ekzom verisinde *PIEZO2* geninde yer alan ikinci bir değişim veya klinik bulguları açıklayacak ek aday varyant saptanmadı.

4.6.11. Aile MCC #11

Akraba evlilikleri olan aileden benzer etkilenmiş 3 fetal olgunun (2 kardeş ve bir 1.° kuzen) (sırasıyla MCC #11 – VI:3, VI:4, IV:10) gebelikleri merkezimizde izlendi ve üçünün de postmortem fizik muayenesi yapıldı. Olgulara ait prenatal US bulguları ve postmortem verileri aşağıda detaylandırıldı. Aile ağacı Şekil 4-50’de gösterildi.

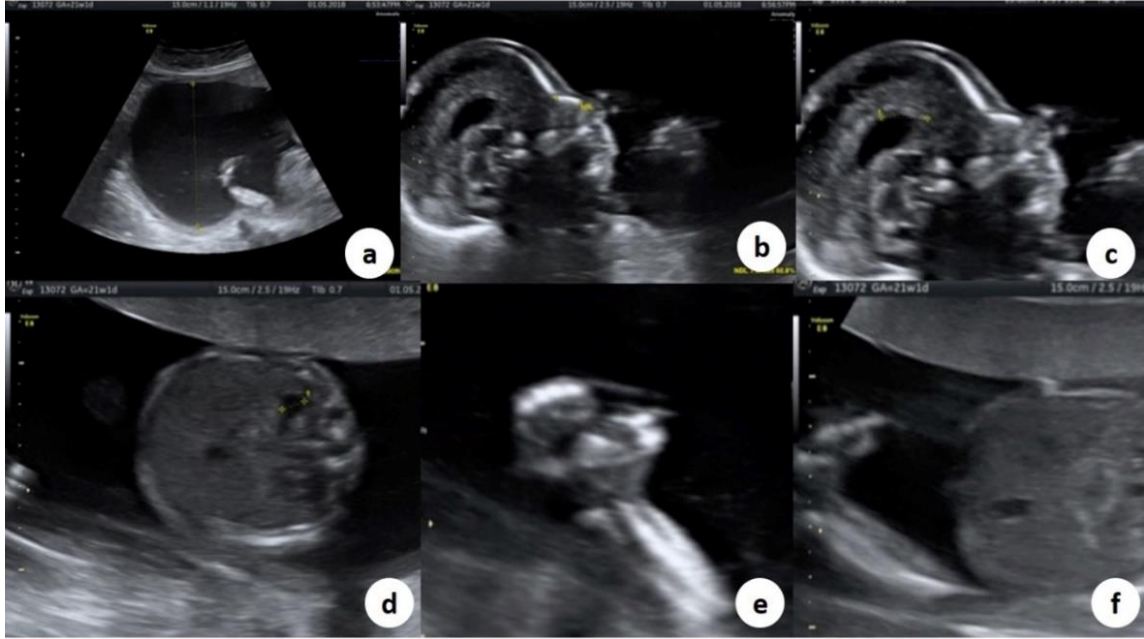


Şekil 4-50: MCC #11 ailesine ait aile ağacı görüntüsü

Prenatal öykü ve II. düzey US bulguları

Aralarında 2,5° kuzen evliliği bulunan sağlıklı anne (IV-8) ve babanın (V-1) ikinci gebeliklerinden olan dişi olgunun 32. GH'de dış merkezde doğduğu ve PN 52. günde çoklu konjenital anomalilere eşlik eden respiratuar distres ile kaybedildiği öğrenildi (otopsi ve DNA bankalama yapılmamış). Ailenin üçüncü ve dördüncü gebelikleri patolojik US bulguları nedeniyle merkezimizde izlendi ve fetusların postmortem fizik muayenesi gerçekleştirildi (G4 P2 TT2). Annenin öyküsünde bilinen maternal hastalık, gebelik süresince ilaç kullanımı, mesleki teratojen maruziyeti ve abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi. Etkilenmiş 3 olguya ait II. düzey US bulguları Tablo 4-17'de belirtildi. G3'ün gebeliğinde 22. GH'de kordosentez materyalinde fetal karyotip ve Miller-Dieker sendromu için FISH çalışmalarının; G4'ün gebeliğinde 19. GH'de AS materyalinde kromozom ve array analizlerinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle iki gebelikte de tıbbi terminasyon işlemi gerçekleştirildi.

İlk etkilenmiş fetal olgunun konsepsiyonundan 6 yıl sonra, indeksin babasının kardeşi ve aralarında 1,5° kuzen evliliği bulunan eşinin 2. gebeliklerinde benzer US bulguları saptanması üzerine aile merkezimizde izleme alındı (G2P1TT1). Fetusa ait II. düzey US bulguları Şekil 4-51'da gösterildi ve ailede diğer benzer etkilenmiş olgular ile birlikte karşılaştırmalı olarak Tablo 4-17'de detaylandırıldı. AS ile fetal kromozom analizinin normal sonuçlanmasını takiben olumsuz prognoz nedeniyle 22. GH'de tıbbi terminasyon işlemi yapıldı.



Şekil 4-51: MCC #11 – VI:10’a ait ikinci trimester US görüntüleri

21 haftalık fetusta polihidramniyos (a), mikrognati (b), hipoplastik korpus kallozum (c), hafif pelviyektazi (d), bilateral *clenched hands* görünümü (e) ve PEV (f) izlenmektedir.

Tablo 4-17: MCC #11 ailesinde etkilenmiş olguların karşılaştırmalı prenatal US verileri

II. düzey US parametreleri	Aile 1		Aile 2	
	VI:2	VI:3	VI:4	VI:10
Prenatal değerlendirme (GH)/Cinsiyet	NA/K	23/E	18/E	21/K
IUGG	-	-	-	-
Polihidramniyos	+	+	+	+
Anormal fasiyal profil				
Mikrognati	NA	+	+	+
Prenatal ödem	NA	+	-	-
SSS anomalileri				
Korpus Kallozum anomalileri	CCA	CCH	CCH	CCH
Sulkasyon/Girasyon anomalileri	NA	+	NA	-
Orta-ağır ventrikülomegali	+	-	+	-
Ekstremitte anomalileri				
<i>Clenched hands</i>	+	+	+	+
PEV	+	+	+	+
Renal pelviyektazi	+	+	+	+
Konjenital kalp hastalığı	ASD	-	-	-

NA, “not applicable”; +, var; -, yok; CCH, korpus kallozum hipoplazisi; CCA, korpus kallozum agenezisi; ASD, atriyal septal defekt

Postmortem fizik muayene bulguları

MCC #11 – VI:3: 27 haftalık erkek fetusun boyu 30,5 cm (-1.73 SD), tartısı 950 g (-0.03 SD), baş çevresi 24,5 cm (-0.07 SD) ölçüldü. Medialde seyrek kaşlar, hipertelorizm, belirgin burun kökü, basık burun ucu, antevort burun delikleri, hipoplastik burun kanatları, düz filtrum, ince üst dudak ve mikrognați saptandı. İnferior krusları ve kökü belirgin olan antiheliks yapısı, basit heliksli ve bilateral lobülde anterior çizgilenmeleri olan düşük yerleşimli kulaklar mevcuttu. Bilateral DII-III'te kamptodaktili ve silik DIP çizgileri, sol başparmakta radyal deviasyon, patülöz sonlanan el ve ayak parmakları, bilateral PEV ve parmak pozisyon anomalisi (sağda 5, 4' ün, 4, 3' ün üstünde, solda 4, 3' ün üstünde) izlendi. Anüs, genital yapı ve kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-52, A1-A4). Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.

MCC #11 – VI:4: 20 haftalık erkek fetusun boyu 25 cm, tartısı 380 g, baş çevresi 19 cm ölçüldü (<22 GH için standart büyüme eğrileri bulunmamaktadır). Hipertelorizm, geniş burun kökü, hipoplastik burun kanatları ve aşağı yerleşimli kolumella, düz ve uzun filtrum, dilin sol yarısında longitudinal laserasyon (travmaya sekonder?) ve mikrognați saptandı. İnferior krusları ve kökü belirgin olan antiheliks yapısı, basit heliksli ve sağda anterior helikal pitin eşlik ettiği düşük yerleşimli kulaklar mevcuttu. Bilateral el bileklerinde ulnar deviasyon, bilateral tek transvers palmar çizgi, sağ DII'de kamptodaktili, bilateral klinodaktili (DV), sağ DV'te tek fleksiyon çizgisi, bülböz yapıda sonlanan el ve ayak parmakları ve bilateral ağır PEV izlendi. Genital yapısı erkek lehine değerlendirilen olguda skrotum haftasına göre hipoplazik olarak değerlendirildi, penis boyu dorsalde 0.6 cm ölçüldü (18⁺ GH ile uyumlu). Anüs ve kord yapısı normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-52, B1-B4). Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.

MCC #11 – VI:10: 22 haftalık dişi fetusun boyu 25 cm (-1.60 SD), tartısı 460 g (-0.34 SD), baş çevresi 19.5 cm (0.01 SD) ölçüldü. Kısa boyun, hipertelorizm, kısa palpebral fissürler, belirgin ve geniş burun kökü, antevort burun delikleri, hipoplastik burun kanatları, uzun filtrum, ince üst dudak ve mikrognați saptandı. İnferior krusları ve kökü belirgin olan antiheliks yapısı, basit heliksli ve bilateral lobülde anterior çizgilenme bulunan düşük yerleşimli kulaklar gözlemlendi. Ellerde bilateral DII-V'te kamptodaktili, DII ve DV'te klinodaktili, bilateral proksimal yerleşimli ve addükte başparmaklar, D4'e ait silik distal fleksiyon çizgileri, alt ekstremitelerde distal kaslarında atrofik görünüm, ağır PEV, sol ayakta parmak pozisyon anomalisi (2, 1'in üstünde) ve plantar çizgi izlendi. Anüs, genital yapı ve

kord normal olarak değerlendirildi (Şekil 4-52, C1-C4). Grafide iskelet anomalisi lehine bulgu saptanmadı.



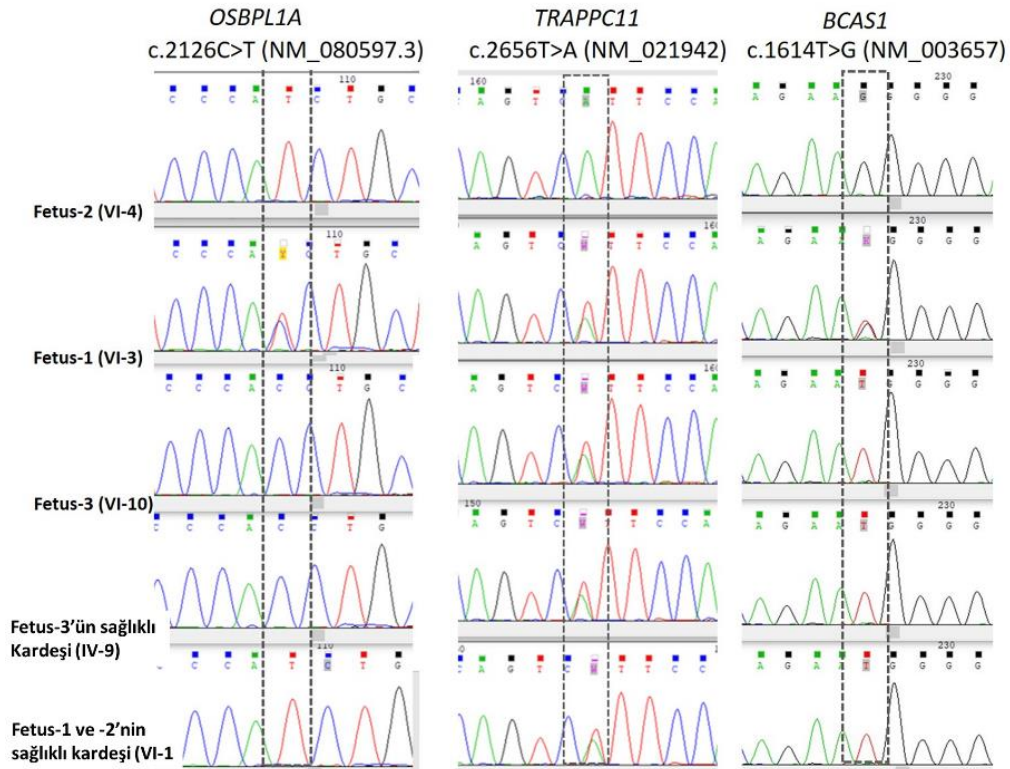
Şekil 4-52: MCC #11 – VI:3, VI:4 ve VI:10’a ait klinik muayene bulguları

A, B ve C sırasıyla MCC #11 – VI:3, MCC #11 – VI:4, ve MCC #11 – VI:10’e ait fizik muayene bulgularını göstermektedir. Mediyalde seyrek kaşlar, hipertelorizm, belirgin burun kökü, basık burun ucu ve antevort burun delikleri, hipoplastik burun kanatları, uzun/düz filtrum ve mikrognatiiyi içeren ortak fasiyal dismorfizm (A1, B1, C1) izlenmektedir. İnferior crus ve antiheliksları belirgin, basit helikal katlantılı ve düşük yerleşimli kulaklar (A2, B2, C2); VI:2 ve VI:10’te bilateral anterior lobüler çizgilenme (A2-C2) ve VI:4 anterior helikal pit gözlenmektedir (B2). Olgularda el bileklerinde ulnar deviasyon, kamptodaktili ve pes ekinovarusu içeren distal artrogripozis, alt ekstremitelerde distal kaslarında atrofi (A3, A4, B4, C3, C4) bulguları ve Fetus-2’de (VI:4) bu bulgulara ek olarak skrotal hipoplazi (B3) görülmektedir.

Moleküler Bulgular

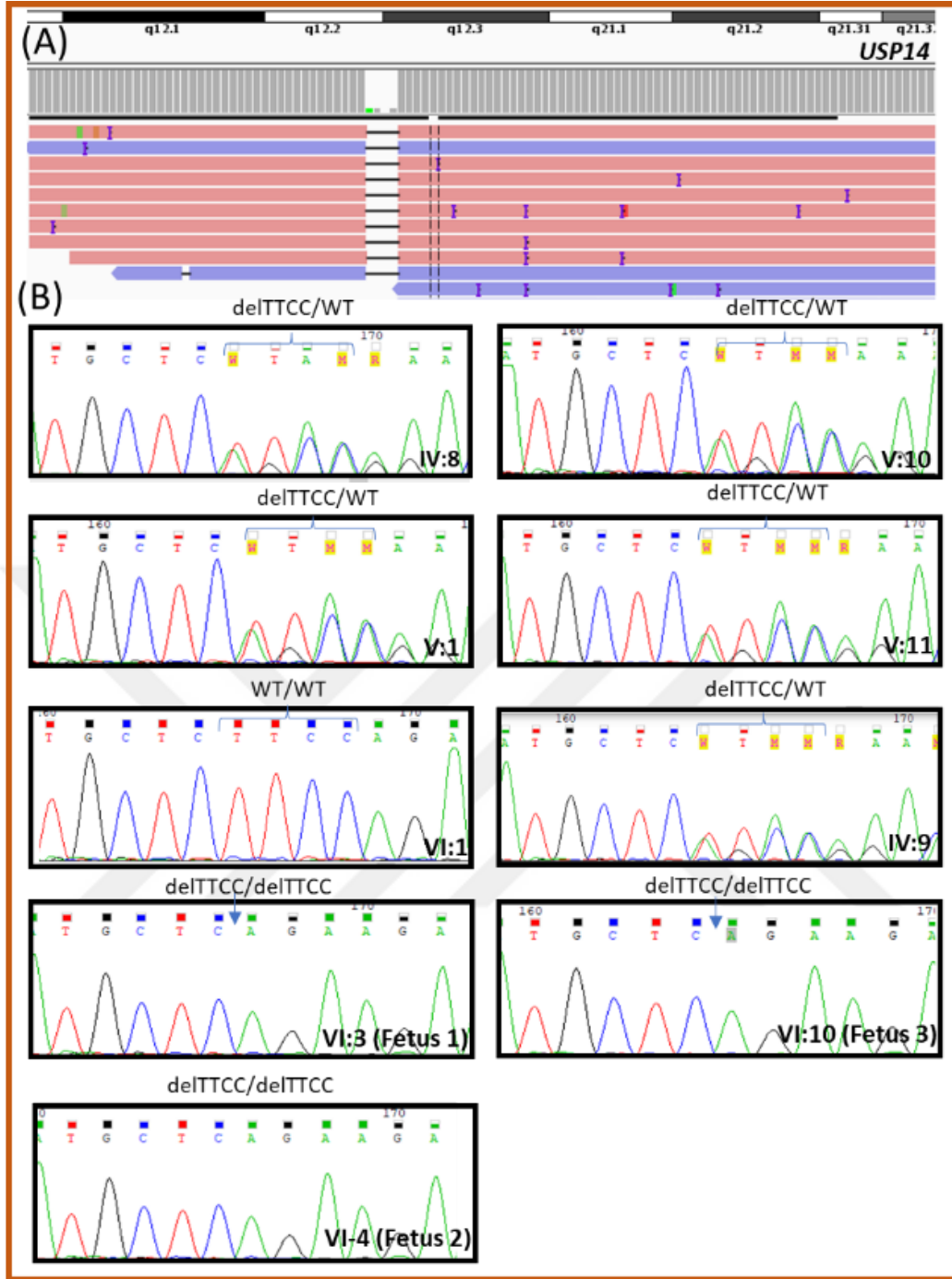
İndeks olguya yapılan solo-TED analizinde daha önce MCC ile ilişkisi gösterilmemiş 4 ayrı biallelik değişim saptandı. Bu değişimler *TRAPPC11* geninde c.2656T>A (rs376514277), *OSBPL1A* geninde c.2126C>T (rs45467295), *BCAS1* geninde c.1614T>G (rs539620158) ve *USP14* geni c.233_236delTTCC (p.L78Q*11) olup ailevi segregasyon analizleri ile *TRAPPC11*, *OSBPL1A* ve *BCAS1* genlerindeki varyantların klinik ilişkisi dışlandı (Şekil 4-53). Bununla birlikte, Sanger dizi analizi ile indeks ve benzer etkilenmiş iki fetal olgunun *USP14* geni ekzon 4’teki 4 bazlık delesyonu homozigot, ebeveynlerin heterozigot, sağlıklı kardeşlerin ise yabancıl veya heterozigot formda taşıdığı gösterilerek bu varyantın aile içinde OR formda

segrege olduğu doğrulandı (Şekil 4-54). Ayrıca bu delesyonun, polimorfik bir varyant olan c.300+10A>G değişimi ile haplotip olarak kalıtıldığı segregasyon analizleri ile gösterildi. USP14 proteinine ait domainler ve MCC #11 ailesinde tanımladığımız patojenik varyant Şekil 4-55'te şematize edilmiş; saptanan varyantlara ait özellikler Tablo 4-18'de belirtilmiştir. Bu gendeki değişimlerin daha önce insanda klinik fenotip oluşturduğu gösterilmemiş; ancak *Usp14*-mutant fare modellerinde fetuslarımız ile benzer fenotipe sebep olduğu bildirilmişti (200-202).



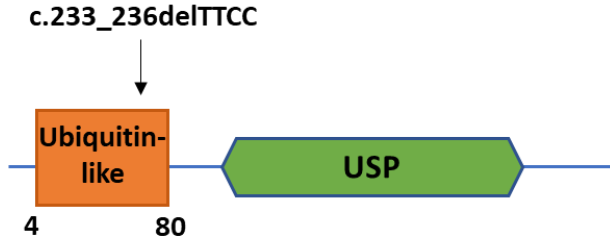
Şekil 4-53: MCC #11 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 1

OSBPL1A, *TRAPPC11* ve *BCAS1* genlerinde saptanan varyantlara ait elektroferogram görüntülerinde her üç varyantın da aile içinde beklenen kalıtım modeline göre segregasyon olmadığı görülmektedir.



Şekil 4-54: MCC #11 ailesine ait moleküler analiz sonuçları – 2

(A) İndeks olguda (VI:4) *USP14* geninde saptanan homozigot değişimin IGV görüntüsü. (B) Sanger dizileme ile Fetus 1 (VI:3), Fetus 2 (VI-4) ve Fetus 3 (VI:10)'ün bu 4 bazlık delesyonu homozigot, ebeveynlerin (IV:8, V:1, V:10, V:11) heterozigot, sağlıklı kardeşlerin (VI:6, IV:9) heterozigot veya yabanıl tipte taşıdığı gösterilmiştir.



Şekil 4-55: USP14 proteinine ait domainler (203)

Olgularımızda saptanan varyantın ilişkili domain üzerindeki yerleşimi siyah ok ile belirtilmiştir.

Tablo 4-18: MCC #11 ailesinde saptanan *USP14* varyantlarına ait bilgiler

Gen Transkript	Varyant	dbSNP ID	ACMG	In-silico	Ref
				MT	
<i>USP14</i> ‡ NM_005151.4	c.233_236delTTCC p.(L78Qfs*11)	SCV002028347	Patojenik PVS1, PM2, PP3	DC [1]	(181)†
	c.300+10A>G	rs774871774	Olası <i>benign</i>	-	-

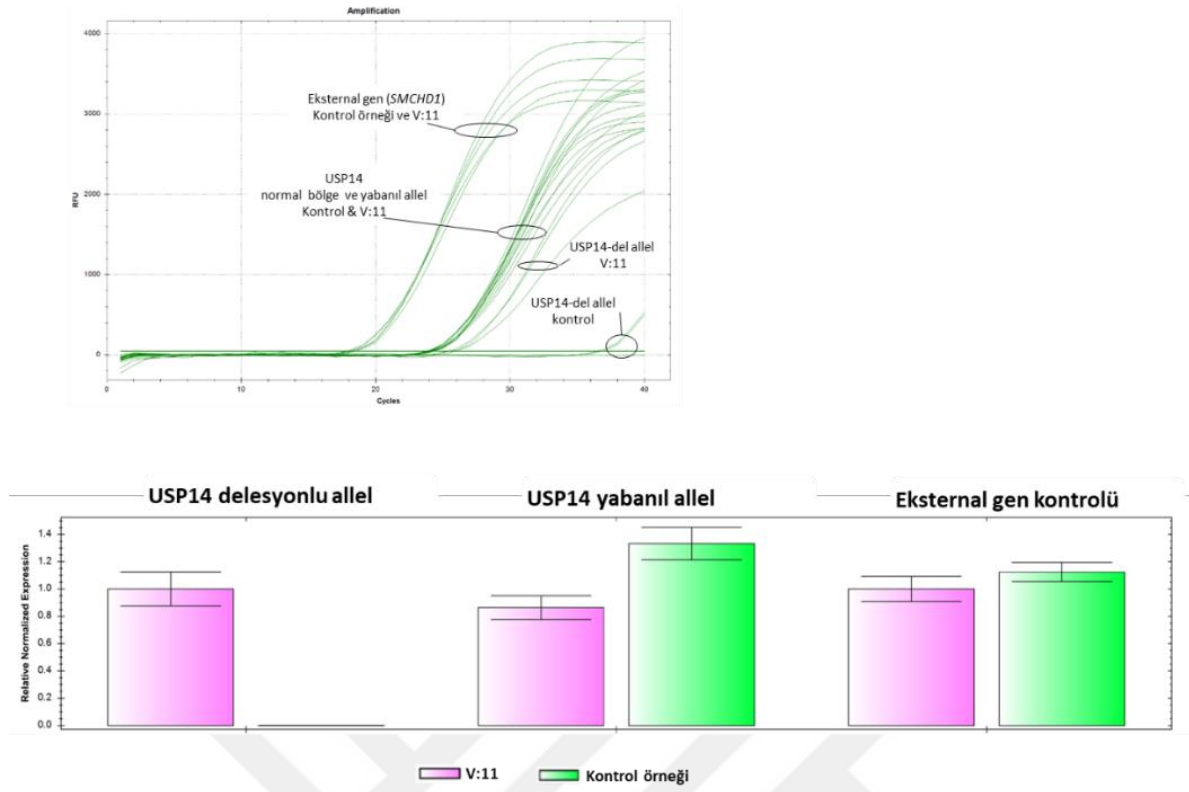
MT, MutationTaster; DC, Disease causing

‡ *USP14* geninde yer alan bu iki varyant haplotip olarak kalıtılmaktadır.

† Bu referans, tez kapsamında incelenen MCC #11 ailesini içeren çalışmaya atıf yapmakta olup İTF Tıbbi Genetik AD tarafından literatüre katılmıştır (Turgut GT et al., 2022 – Clinical Genetics).

USP14 İfadesinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile Analiz Edilmesi

MCC #11 ailesinden V:11 nolu birey ve kontrol bireyde USP14-mRNA ifade düzeyi kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile tespit edildi. Çalışmada USP14 transkriptinin göreceli ifadesi, kontrol olarak *SMCHD1* ifadesine göre normalize edildi. Deney üç kere tekrarlandı ve her bir deneyde hesaplanan *USP14* transkriptinin göreceli ifadelerinin ortalaması alındı. Çalışma sonucunda, V:11’de mutant ve yabancı alelin eşit oranda eksprese olduğu gösterildi (Şekil 4-56).



Şekil 4-56: Kontrol ve taşıyıcı bireyde USP14 mRNA ifade düzeyinin analizi

A: USP14 amplifikasyon eğrisi, B: USP14 transkriptinin göreceli normalize ekspresyon konsantrasyonu

5. TARTIŞMA

Artrogripozis Multipleks Konjenita (AMC), diğer adıyla çoklu konjenital kontraktürler (MCC); çok sayıda sendromun yol açtığı ortak bir klinik tabloyu nitelemek için kullanılan bir terim olup en az iki farklı vücut bölgesinde intrauterin başlangıçlı hareket kısıtlılığı ile karakterizedir. Belirgin ekspresivite değişkenliği, genotipik ve fenotipik heterojenitenin yanında genetik dışı faktörlerin de etyolojide yer alması, bu grupta klinik ve moleküler tanı sürecini güçleştirmektedir. TED analizlerinin MCC olgularında kullanımının yaygınlaşması ile bu süreçler belirgin düzeyde hızlanmış ve son yıllarda çok sayıda MCC ilişkili aday gen tanımlanmasına olanak sağlanmıştır. Günümüzde, MCC'nin moleküler etyopatogenezi hız kesmeksizin güncellenmektedir. 2016 yılında MCC ilişkili 320 gen bilinmekteyken 2019 yılında bu sayı 402'ye çıkmış; 2019'dan günümüze kadar olan süreçte ise literatür verileri derlendiğinde 70'den fazla genin MCC ile ilişkisi gösterilmiş veya hastalık ilişkisi lehine güçlü kanıtlar elde edilmiştir (15, 75). Bütün bu bilgiler ışığında, çalışmamız kapsamında, prenatal takipleri ve postmortem muayeneleri merkezimizde yapılmış olan ve letal seyirli MCC grubunda değerlendirilen 15 fetusta genetik etiyopatogenezin aydınlatılması planlanmış; her aileden birer olgu dahil edilmek koşuluyla, 11 indeks fetusa ait solo-TED verileri incelenmiştir.

Araştırmamızda, TED çalışmaları ile 11 ailenin 9'unda tanısal genetik varyant saptanmıştır. Bu varyantların tamamı OR kalıtım gösteren genetik hastalıklara neden olmaktadır. MCC etyolojisinde yer alan tek gen hastalıklarında her türlü Mendeliyen kalıtım bildirilmiş olmakla birlikte, letal seyreden grupta OR hastalıkların nispeten sık gözlenmesi ülkemizdeki görece yüksek akraba evliliği oranları (%21,3) ile uyumlu bulunmuştur (204). Çalışmamızda, MCC fenotipleri ile ilişkisi bilinen *HSPG2*, *COG6*, *DOK7*, *RAPSN*, *KIAA1109*, *NEB*, *PSAT1* genlerinde, 6'sı ilk kez bu çalışmada belirlenmiş olan toplam 10 farklı varyant saptanmıştır. *Novel* nitelikteki altı varyantın dördü ACMG kriterlerine göre patojenik, ikisi ise VUS olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 4-5). İki olguda fenotipin ikinci bir hastalık ile komplike olduğu düşünülmüş; bu olgularda *DNAH9* ve *VPS13B* genlerinde ikisi *novel* nitelikte olmak üzere üç farklı patojenik varyant saptanmıştır. Ayrıca, çalışmamız kapsamındaki testler ile MCC moleküler etiyopatogenezinin aydınlatıldığı bir olgunun, *USH2A* geninde daha önce hastalık ile ilişkilendirilmiş homozigot bir değişim taşıdığı gösterilmiştir. Bir ailede, daha önce insan fenotipi gösterilmemiş bir gen olan *USP14*'te

saptanan çerçeve kayması varyantının, fonksiyonel çalışmalar ile fetal olgulardaki klinik bulguları açıkladığı güçlü biçimde desteklenmiştir (181).

Prenatal-postnatal vaka ayrımı yapılmaksızın oluşturulmuş çeşitli MCC kohortlarında TED analizinin tanı başarısı %42-73 arasında bildirilmiştir (9, 12-14). Genetik bilginin ivmeli artışına paralel olarak YND yöntemlerinin tanı başarısı da yükselmektedir. Ancak ilginç bir şekilde MCC kohort çalışmaları kronolojik olarak incelendiğinde, bildirilmiş en düşük başarı oranlarının günümüze en yakın dönemde gerçekleştirilen araştırmaların sonucunda elde edildiği göze çarpmaktadır. 2021 yılında gerçekleştirilen ve 190 olgunun dahil edildiği bir MCC kohortu çalışmasında olguların %42'sine TED ile tanı konulduğu ve tanı alan olguların %32'sinde, yakın zamanda klinik ilişkisi gösterilmiş genlerde varyant saptandığı belirtilmiştir (14). Benzer araştırmalar ile kıyaslandığında bu araştırmada daha düşük başarı yüzdesi varlığı, tanı aldığı belirtilen iki olgu hariç tüm olgularda saptanan varyantların ACMG sınıflamasına göre patojenik/olası patojenik kategorisinde olması ve diğer çalışmaların aksine aday genlerin tanı istatistiğine dahil edilmemesi ile açıklanabilir. Bununla birlikte kalan iki olguda fenotip ile ilişkili genlerde saptanan VUS niteliğindeki varyantların kliniği açıkladığı düşünülmüş ve bu olgular moleküler tanı alan grupta değerlendirilmiştir.

Kısıtlı örnek sayısı ile yapılan çalışmamızda, TED analizinin tanıdaki rolü %81,8 olarak hesaplanmış olup literatür verilerinin üzerinde bir başarı elde edilmiştir. Bu durum, benzer çalışmalardan farklı olarak kohortumuzun klinik sınıflama ile 3. grupta (MCC ve SSS disfonksiyonu ve/veya bilişsel gerilik ve/veya letalite) değerlendirilen olgulardan oluştuğu göz önünde bulundurulduğunda, letal seyreden MCC fenotiplerinde genetik etiyopatogenezin daha baskın bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, beş indeks olguda saptadığımız sorumlu genlerin fenotip ile ilişkisinin 2010 yılından sonra gösterilmiş olmasının da görece yüksek tanı oranlarımızda rolü olabileceği ve test başarı oranlarının zaman içinde hızla artacağı öngörüsünü desteklediği kanaatine varılmıştır. Bu beş aileden biri, üç benzer etkilenmiş fetusun bulunduğu MCC #11 ailesi olup TED analizi ile sorumlu genin *USP14* olduğu belirlenmiş ve *USP14* varyantlarının insandaki fenotipik manifestasyonu ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir (181).

Ekzom çalışmalarının klinik pratikte kullanımının yaygınlaşması, diyagnostik süreci hızlandırmasının yanında; “harman fenotip”lerin tanınabilirliğini de artırmış ve iki hastalık birlikteliğinin öngörülenden sık olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızda MCC #6, MCC #7 ve MCC #9 numaralı ailelerde sırasıyla Alkuraya-Kucinskas sendromu – Usher sendromu,

Nemalin miyopati – Primer siliyer diskinezi ve Neu-Laxova – Cohen sendromu birliktelikleri saptanmıştır. Yang ve ark tarafından nörolojik hastalığı olan 250 olguda yapılan TED çalışmasında, olguların 62'sine tanı konulduğu ve bu 62 olgunun 4'ünde (%6) iki ayrı hastalık saptandığı bildirilmiştir (205). 486 hastalık başka bir kohortta TED ile tanı konulmuş 85 olgunun 6'sında (%7) fenotipin ikinci bir hastalık ile komplike olduğu gösterilmiştir (206). Rossi ve ark. tarafından bildirilen otizm spektrum bozukluğu grubunda ikili moleküler tanı oranı %9,5; Posey ve ark. ve Smith ve ark. tarafından gerçekleştirilen iki ayrı retrospektif çalışmada ise sırasıyla bu oranlar %4,9 ve %8,5 olarak saptanmıştır (206-208). Kontraktürler ile seyredabilen şiddetli SMA formları hariç letal seyirli MCC fenotiplerinin tamamı prenatal dönemde düzenli US izlemi ile tanınabilmekte iken aile hikâyesi yokluğunda Usher sendromu veya Cohen sendromu gibi fetal dönemde bulgu vermeyen veya tanınması güç olan hastalıklar ancak YND yöntemleri ile saptanabilmektedir. Üç olgumuzda gözlediğimiz gibi, intrauterin dönemde saptanan bulguların doğrudan bir gen grubuna yönlendirebildiği genetik hastalıklardan etkilenmiş olgularda ikinci bir hastalık varlığının gözden kaçabileceği ve harman fenotiplerin ortalama %7 oranında bildirildiği göz önünde bulundurulduğunda, analizler sırasında kliniği açıklayıcı bir patojenik varyantın saptanması durumunda dahi ekzom verisinin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

YND çalışmalarından, hastalıkların moleküler temellerinin aydınlatılmasının yanında bir takım insidental veriler de elde edilmektedir. Uzun yıllardır, birey başına zararlı varyant yükünün belirlenebilmesi amacıyla hesaplamalı ve/veya popülasyon genetiği yaklaşımları ile çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmektedir. 2011 yılında Bell ve ark., 104 olgunun dahil edildiği bir çalışmada OR geçişli ağır hastalıklar (belirgin morbidite veya düşük sürvi) açısından bir bireyin 2,8 allel taşıdığını bildirmiş, 2014'te daha geniş kohortlarda yapılan benzer bir çalışmada bu sayı 0,6 olarak hesaplanmıştır (209, 210). Çalışmamızda, daha önce HGMD ve/veya Clinvar veritabanında hastalık ile ilişkili olduğu bildirilmiş veya ACMG kriterlerine göre patojenik olarak değerlendirilen varyantlar açısından gerçekleştirilen analizler sonucunda, birey başına patojenik allel oranının 0,9 olduğu saptanmıştır. Yaşam süresini etkilemeyen antiteler de bu orana dahil edilmiş olmakla birlikte sadece bildirilmiş veya ACMG'ye göre patojenik olan varyantlar dikkate alınmış; genetik danışmanın kapsamı bu yönde genişletilmiştir. Taşıyıcılıklar incelendiğinde, aile öyküsünde sağırılık bulunmayan iki bağımsız fetusta heterozigot *GJB2* – c.35delG varyantı saptanması dikkat çekmiştir. Ülkemizde OR non-sendromik sağırılık tablosunun %31.7'sinden *GJB2* varyantları sorumlu olup bunların %73'ünü 35delG mutasyonu oluşturmaktadır (211). Akdeniz çevresinde yaygın

olarak bildirilen bu varyantın Türk popülasyon çalışmalarında taşıyıcılık sıklığının %1,17 olduğu belirlenmiş; çalışmamızda ise biri Bitlis biri Malatya kökenli olan iki olgunun (%18) bu değişimi taşıdığı gösterilmiştir. Bu sonuç, kohortun küçük olması ile ilişkili yanıltıcı bir oranı yansıtır olabilir.

Konjenital kontraktür tablosu ile sonuçlanan bütün durum ve antitelerin ortak noktası, etyolojik faktörden bağımsız olarak tamamının fetal hareket azlığına sekonder ortaya çıkmasıdır. Fetal disfonksiyon nedeniyle gelişen fetal akinezinin etyopatogenezinde nöropatik faktörler, NMK anomalileri, miyojenik faktörler, çeşitli iskelet displazileri ve bağ doku hastalıkları yer almaktadır. Nörojen kökenli MCC'ler, MCC etyopatogenezinin %70-80'ini oluşturmaktadır. Ancak bu oran, yapısal/fonksiyonel SSS anomalileri, myelinizasyon defektleri, periferik sinir sistemi tutulumu, NMK hastalıkları gibi geniş bir spektrumu yansıtmakta olup literatürde bu alt sınıflar bazında sıklık sırası veya ana grup içindeki yüzdelik dilimlerine dair geniş kohortlardan elde edilmiş veriler bulunmamaktadır. 1986 yılında Banker, MCC bulguları olan 96 olguyu patolojik bulgular açısından değerlendirmiş; 90 olguyu nörojen, 6 olguyu miyopatik kökenli MCC olarak sınıflamıştır (21). 2019 yılında ise Pergande ve ark. tarafından 51 MCC olgusunun dahil edildiği bir TED çalışmasında olguların %31'i nörojen, %31'i miyojen, %16'sı NMK, %9'u sendromik malformasyon, %7'si ekstremite anomalileri grubunda değerlendirilmiş; %7'si sınıflandırılmamıştır (12). Otuz üç yıl arayla gerçekleştirilen bu iki çalışma; MCC ilişkili genlerin kompleks fonksiyonlarının anlaşılması ile bazı hastalıkların birden fazla etyolojik sınıfa dahil olduğunun ortaya çıkması sonucunda, NMK hastalıklarının ve miyojen faktörlerin MCC etyopatogenezinde ön görülenden daha büyük bir payı olduğunu göstermiştir. Çalışmamız kapsamında tanı alan dokuz indeks olgunun moleküler sonuçları primer etyolojik açıdan sınıflandırıldığında; kohortun %36'sının nöromusküler son plak, %18'inin miyopatik, %8'inin metabolik, %8'inin bağ doku hastalığı ve %8'inin iskelet displazisi kökenli MCC'den etkilenmiş olduğu saptanmış; TED analizi ile kesin tanı alamamış iki olgu (%18) ise sınıflandırılmamıştır. Bununla birlikte, genlerin ikincil fonksiyonları da etyolojik sınıflamaya dahil edildiğinde, kohortun %45'inde sinaptogenez, sinaptik ileti veya NMK fonksiyonunda görev alan genlerin saptanmış olması dikkat çekmiştir. Sinaptopatilerin çalışma grubumuzun yaklaşık yarısını oluşturması, literatür verilerine kıyasla bir hayli yüksek görünmektedir. Bu durum, olgularımızda saptanan hastalıkların tamamının otozomal resesif kalıtım modeli göstermesi ve bu hastalıkların toplum sıklıklarının coğrafi konuma göre değişkenlik göstermesi ile açıklanabilir.

KoA, koenzim A; ChAT, kolinasetiltransferaz; α -DG, alfa-distroglikan; β -DG, beta-distroglikan; AchE, asetilkolinesteraz; ColQ, asetilkolinesteraz kollajen kuyruk peptidi; ER, endoplazmik retikulum

Çalışmamızda saptanan HSPG2, COG6, DOK7, RAPSN, KIAA1109 ve NEB genlerinin kodladığı proteinler kırmızı asterisk (*) ile belirtilmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen **Aile MCC #1** – V:2'nin klinik ve radyolojik muayene bulgularının Schwartz-Jampel sendromu (SJS, MIM#255800) ile uyumlu olabileceği düşünülmüştü. Fetal olgunun TED analizinde, ön tanıya uyumlu olarak HSPG2 (*heparan sulfate proteoglycan of basement membrane*) geninde homozigot c.12353C>T (p.(T4118M)) değişimi saptandı. HSPG2 (MIM*142461), 1p36.1 bölgesinde yer alan ve ters zincirden transkribe olan 97 ekzonlu bir gen olup bazal membranın ana bileşenlerinden biri olan perlekan proteinini kodlamaktadır. Bir heparan sülfat proteoglikanı olan perlekan; laminin A zinciri, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDL-R), nöral hücre adezyon molekülü (N-CAM) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) ile homoloji gösteren beş ayrı domainden meydana gelir. Bu domainlerin her biri farklı hücresel işlevleri yerine getirmektedir. Domain I, proteine özgü tek domain olup glikozaminoglikan (GAG) bağlanma bölgesi olarak işlev gören üç adet konsensus SGD motifi içermektedir. Perlekan, domain I'e bağlı bu GAG zincirleri aracılığıyla, heparin bağlayıcı büyüme faktörlerinin (FGF-2, VEGF vb.) depolanması ve salınması için bir ligand rezervuarı olmanın yanı sıra, bu moleküllerin proteolitik sindirim ile inaktivasyonunun önlenmesinde de rol almaktadır (212). LDL reseptörünün ligand bağlanmasına aracılık eden bölümü ile homoloji gösteren domain II, Wnt sinyal yolağı ve kalsiyum sinyalizasyonunda görev alır (213, 214). Bozulmuş kalsiyum sinyal iletisi, kalsiyum-ATPaz 1 ve ryanodin reseptörü 1 aracılığıyla endoplazmik retikulumdaki kalsiyum dinamiklerinin normalden sapmasına neden olarak kasılma fonksiyonunu etkiler (215). Bunun yanı sıra perlekan eksikliği, miyostatin sinyalinin azalması ile hızlı kasılan kaslarda hipertrofiye; Akt/mTORC1 sinyalinin azalmasına bağlı olarak ise yavaş kasılan kaslarda atrofiye neden olabilir (215). Domain III, laminin proteininin IVa ve IVb domainleri ile homoloji göstermekte olup FGF7, FGF18, PDGF gibi çeşitli büyüme faktörlerinin direkt olarak bağlandığı kritik bir bölgedir. Ekspresyon çalışmaları, domain III'ün perlekan proteininin ekstrasellüler alana salınmasında da anahtar rol oynadığını göstermiştir (216, 217). Beş domainin en büyüğü olan Domain IV, birbirine ardışık olarak bağlanan 21 IgC2 motifi tekrarından oluşur. Genel olarak, Ig motiflerinin hücre adezyon dinamiklerinde rol oynadığı göz önüne alındığında, bu domainin nidojen ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks bileşenleri ile etkileşim halinde olması beklenen bir durumdur. Ig tekrarlarını içeren

proteinler, tipik olarak kıkırdak ve kas gibi dokularda bulunan esnek proteinlere mekanik dayanıklılık sağlanmasında etkin rol almaktadır (218). Domain V, üç adet laminin tip G (LG) ile dört adet EGF motifinden oluşmakta ve domain I ile benzer şekilde GAG bağlanma bölgesi içermektedir. LG bölgesi Laminin α zincirinin globüler domaini ile homoloji göstermekte olup anjiyogenez, vasküler hücre etkileşimleri, yara iyileşmesi ve otofaji gibi bir dizi biyolojik süreçte kilit role sahiptir (219). Olgumuzda saptanan homozigot *HSPG2* varyantı, Domain V üzerinde yer almaktadır.

Perlekan ekspresyonu ve birikimi embriyogenezin erken aşamalarında başlamaktadır. Murin modellerinde gerçekleştirilen çalışmalar, bu proteinin iki hücreli aşamada blastomerlerin hücre yüzeyi boyunca ve implantasyonun bağlanma fazı sırasında trofektodermin dış yüzeyinde saptandığını göstermiştir (213, 220). Gelişimin ileri evrelerinde akciğer, böbrek, karaciğer, gastrointestinal sistem ve beyin gibi organların bazal laminası boyunca eksprese edilen perlekan, vertebral cisimlerin primordiyumu ve kaburga kıkırdağı gibi endokondral ossifikasyon ile kemikleşen dokulardaki büyüme plağında en yüksek düzeylerine ulaşmaktadır (221). “*Knock-out*” fare modeli çalışmaları, perlekanın kıkırdak gelişimi ve iskelet oluşumunda temel rol oynadığını ortaya koymuş; doğuma kadar hayatta kalabilen homozigot mutant farelerde aksiyel iskelet ve uzun kemiklerin tutulduğu kondrodistrofi, yarık damak, büyüme plaklarında histolojik anomaliler ve kardiyovasküler bulgular izlenmiştir (217, 222).

İnsan perlekan genindeki patojenik varyantlar, Silverman-Handmaker tipi dissegmental displazi (DDSH) ve SJS adı verilen iki adet iskelet displazisi ile ilişkilendirilmiştir. DDSH neonatal letal seyirli bir antite iken SJS daha hafif bir klinik ile karakterizedir. Her ne kadar günümüzde henüz net bir genotip-fenotip korelasyonu kurulamamış olsa da genel olarak bulguların ağırlığının ekstrasellüler matrikste biriken perlekan miktarı ile ters orantılı olduğu söylenebilir (215, 223). Yani, perlekan salınımını tamamen önleyen *HSPG2-null* varyantların DDSH fenotipine yol açması beklenirken matrikse salınan protein miktarının normale kıyasla azalmasının SJS ile sonuçlanması beklenmektedir.

SJS; boy kısalığı, osteokondrodizplazi, miyotoni ve tanınabilir bir yüz görünümü (sabit yüz ifadesi, blefarofimozis, küçük ağız/*pursed lips*, mikrognati, düşük kulaklar) ile karakterize nadir bir iskelet displazisidir. Kas kasılması ve kondrogenesis regülasyonunda kritik bir matriks proteini olan perlekanın işlevinin bozulması, SJS tablosunun kardinal özellikleri olan uzamış kas kontraksiyonu (miyotoni) ve kondrodizplazi ile sonuçlanmaktadır.

Sendrom dahilinde gözlenen iskelet bulguları; kifoskolyoz, platisspondili, vertebral koronal kleftler, epi/metafizyal displazi ve eklem kontraktürleri olarak sıralanabilir. EMG’de özellikle fasiyal ve uyluk kaslarında sürekli spontan aktivite gözlenmekte olup kas biyopsisinde non-spesifik miyopati bulguları izlenmektedir. Klinik tablonun ağırlığı ve bulguların başlangıç yaşı değişkenlik göstermektedir. Hafif etkilenmiş olgularda çocukluk çağında ortaya çıkan kemik displazisi, hastalığın ağır formlarında infantil dönemde Kniest displazisi (MIM#156550) ile benzerlik gösterecek şiddette olabilir. Literatürde SJS tanılı yaklaşık 130 olgu ve SJS ilişkili 42 *HSPG2* varyantı bildirilmiş olmakla birlikte olguların büyük bir kısmında moleküler analizler gerçekleştirilememiştir. İlişkili varyantların herhangi bir domain veya bölgede özellikle yoğunlaşmadığı, tüm gen üzerine dağılmış şekilde yerleştiği gözlenmiştir.

SJS’de kas tutulumunun (miyotoni) patogeneze yönelik iki potansiyel mekanizma önerilmiştir. Bunların ilki, kas kontraksiyonunun temel fizyolojik mekanizması olarak kabul edilen “asetilkolin birikimi” ile açıklanmaktadır. Normal uzunlukta ve işlevsel olan perlekan, domain V’deki membran distroglükana bağlanarak NMK membranında asetilkolinesterazın kümelenmesinde etkin rol oynamaktadır (213). Domain V’teki varyantlar, proteinin membrana bağlanmasını önleyerek asetilkolinin daha yavaş yıkımına neden olur. Hipereksitabilite ile sonuçlanan bu tablo, olgumuzda gözlenen erken başlangıçlı kontraktürlerin etyolojisini açıklayabilmektedir. İkinci mekanizma, domain V’in, kas hücresindeki sodyum veya klor iyon kanallarına doğrudan bağlanarak hipereksitabiliteye neden olması ile açıklanmaktadır (224). Bunların yanı sıra, domain V varyantları, kas-iskelet sisteminden bağımsız olarak ek anomaliler ile de ilişkilendirilmiştir. Örneğin, *HSPG2* c.11827 G>A (p.(A3943T)) değişimi taşıyan SJS olgularında böbrekte ektopik mineralizasyona bağlı juvenil nefrolitiazis ve osteopeni bulguları bildirilmiştir (224). Bu tabloda altta yatan fizyolojik süreç halen araştırılmakla birlikte olası bir mekanizma, varyantın yeni bir hidrojen bağı üretmesi, böylece protein katlanma modelini değiştirmesi ve potansiyel yeni kalsiyum bağlanma bölgelerini ortaya çıkarmasıdır. Perlekan ilişkili patofizyolojik süreçlerin aydınlatılması amacıyla ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Olgumuzda postmortem muayenede gözlenen kliteromegali daha önce SJS dahilinde gözlenmemiş, yarık damak ise sadece iki olguda bildirilmiştir (225). Çalışmamız dahilinde, domain V’te yer alan yeni bir *HSPG2* varyantının gösterilmesi ve II. trimesterde gözlenebilecek SJS klinik bulgularının ilk kez bildirilmiş olması ile hastalığın moleküler ve klinik spektrumuna katkı sağlanmıştır.

MCC etiolojisinde metabolik fenotiplerin de rolü olduğu bilinmektedir. Çalışmamız dahilinde, multisistem tutulumuna eşlik eden kaba yüz bulguları ile nörometabolik hastalıkların ön planda düşünüldüğü **Aile MCC #2 – V:2'**nin TED analizinde *COG6* geninde (*Component of oligomeric golgi complex 6*) homozigot c.1884T>G (p.(Y628*)) değişimi saptandı. *COG6* (MIM*606977), 13q14.1 bölgesinde yer alan ve düz zincirden transkribe olan 19 ekzonlu bir gen olup “Korunmuş Oligomerik Golgi Kompleksi” alt birimlerinden biri olan *COG6* proteinini kodlamaktadır. Bu gendeki patojenik varyantlar, Konjenital Glikozilasyon Bozukluğu tip IIL (CDG IIL, MIM#614576) ile ilişkilendirilmiştir.

Glikozilasyon; monosakkaritlerin, glikoprotein veya glikolipid gibi bir alıcı moleküle tek tek eklendiği temel, karmaşık ve evrimsel olarak korunmuş bir hücresel süreçtir. Bu süreç, sitoplazmada şeker rezidülerinin aktivasyonu ve transportunu, dolikol ve dolikol bağlı glikan sentezini, endoplazmik retikulum (ER) aracılı glikan sentezi ve kompartmanlar arasındaki iletimi, Golgi aygıtındaki transport ve sekresyon basamaklarını, glikoz sinyalizasyonunu, glikozun proteine aktarımını, glikoproteinlerin hareketlerini ve işlenme basamaklarını içermektedir (226). İnsanda, bu basamaklarda görev alan enzimlerin yapı ve işlev bozuklukları, “Konjenital Glikozilasyon Bozukluğu” (CDG) kliniği ile sonuçlanmaktadır. Glikozilasyon işleminin farklı basamaklarını katalizleyen enzimlerin kusuru, hastalığın farklı alt tiplerini oluşturmaktadır. Günümüzde 140'dan fazla CDG alt tipi tanımlanmış olmakla birlikte, en sık form olan PMM2-CDG hariç tutulduğunda, her biri 100'den az hastada bildirilmiştir (227).

Konjenital glikozilasyon bozuklukları; protein N-glikozilasyon, protein O-glikozilasyon, kombine N- ve O-glikozilasyon ve lipid glikozilasyon bozuklukları olmak üzere dört ana biyokimyasal grupta incelenmektedir (228). Bu grubun en büyük kısmını oluşturan N-glikozilasyon bozuklukları, eksik enzimin lokasyonuna göre tip I ve II olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. CDG tip I, N-glikan oluşumu ve proteine eklenme aşamasında (sitozol, ER); CDG tip II ise N-glikan işlenmesi sürecindeki (sıklıkla Golgi düzeyinde) bozuklukları kapsamaktadır (229).

CDG tip II'nin bir alt grubunu, glikozilasyonun Golgi aparatında gerçekleşen basamaklarında işlev gören “Korunmuş Oligomerik Golgi kompleksi” (*Conserved oligomeric Golgi complex*, COG kompleksi) bozuklukları oluşturmaktadır. COG kompleksi, hücre içi transport/glikoprotein modifikasyonunda rol alan bir multiprotein olup 8 alt birimden meydana gelmektedir. Bu alt birimler, COG1-4'ten oluşan lob A ve COG5-8'den oluşan lob B

olmak üzere bilobar bir yapı oluşturur. Kompleks alt birimlerinin (COG1–8) eksikliği, Golgi glikozilasyon sistemi bileşenlerini destabilize eder ve alt birimlerin yanlış yerleşimine neden olur. Bu durum N- ve O-protein glikozilasyonun bozulması, yani kombine “konjenital glikozilasyon defekti” olarak sonuçlanır.

COG kompleksi ve CDG ilişkisi ilk kez 2004 yılında COG7 üzerinden gösterilmiş; günümüze kadar COG3 dışında alt birimleri kodlayan bütün genler CDG kliniği ile ilişkilendirilmiştir (230, 231). COG ilişkili CDG (COG-CDG) fenotipleri; nöromotor gerilik, hipotoni, mikrosefali, dismorfik özellikler, cilt bulguları, boy kısalığı, iskelet anomalileri, karaciğer ve gastrointestinal disfonksiyon bulguları ile karakterizedir. Olgumuzda klinik ilişkili varyantın saptandığı COG6 genindeki biallelik varyantlar, CDG IIL alt tipine neden olmaktadır.

COG6-CDG ilişkisi ilk kez 2010 yılında, fokal nöbetleri, kusma ve intrakraniyal kanamaya sekonder bilinç kaybı olan bir yenidoğanda bildirilmiştir. Olgunun transferrin izoelektrik fokuslama testinin CDG tip II eksiklikleri ile uyumlu olması üzerine fibroblast hücrelerinde COG kompleks proteinlerinin (COG1, COG4, COG5, COG6, COG7) ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiş; COG1 ve COG4 düzeyleri normal saptanırken COG5, COG6 ve COG7 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bu proteinleri kodlayan genlere yönelik gerçekleştirilen dizi analizlerinde COG6’da homozigot c.G1646T (p.(G549V)) değişimi saptanmış ve COG6-CDG ilişkisi kanıtlanmıştır (232).

Literatürde bugüne kadar COG6-CDG tanılı 20 olgu ve bu hastalık ile ilişkili 16 patojenik varyant bildirilmiştir (229, 232-242). Olgumuzda gözlenen VSD ve kallozal disgenezi üçer olguda, serebellar hipoplazi ise daha önce bir olguda izlenmiştir. Yedi olguda artrogripozis bulgularının varlığı dikkat çekmektedir (229, 236, 238, 240, 242, 243). ASD, VSD ve PDA gibi kalp anomalileri olgu bazında bildirilmiş olmakla birlikte olgumuzun benzer etkilenmiş ve neonatal dönemde eks olan kardeşinde saptanan TT-DORV anomalisi daha önce COG6-CDG dahilinde tanımlanmamıştır. Ayrıca; hiperkeratozis, kuruluk/gerginlik, lipodistrofi, döküntü ve iktiyozis gibi dermatolojik tutulum tabloya sıklıkla eşlik etmekte olup literatürde bu anomalilerin tariflendiği en küçük olgu 32. GH’de doğan ve postnatal muayenede ciltte belirgin erozyonlar ve soyulmaların gözlemlendiği bir kız çocuğudur (242). Olgumuzda, cilt bulguları gebelik haftası (25. GH) nedeniyle optimal değerlendirilemediği için saptadığımız yeni varyantın cilt tutulumu ile ilişkisi yönünde bir genotip-fenotip korelasyonu çıkarımı yapılamamıştır.

Günümüze kadar bildirilmiş 20 COG6-CDG olgusunun 14'ü, çoğunluğu infantil dönemde olmak üzere, kanama diyatezi, dissemine intravasküler koagülasyon, solunum yetmezliği, serebral ödem gibi nedenler ile kaybedilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen aile ile birlikte, hastalığın letal seyrettiği 16 olgunun 12'sinde protein trunkasyonu ile sonuçlanan varyantların saptanması ve COG6 ile ilişkilendirilmiş ve daha hafif seyirli başka bir fenotip olan Shaheen sendromunun (MIM#615328) moleküler etyopatogenezinde derin intronik varyantların yer alması, rezidüel COG6 aktivitesinin kliniği hafıflettiğini göstermektedir. Ayrıca, fonksiyonel çalışmalar ile COG6-CDG hastalarında COG5 ve COG7 protein düzeylerinin de azaldığının saptanması, COG kompleksi lob B'nin daha instabil bir yapı olduğuna işaret etmektedir. Bu durum, COG6-CDG'nin diğer CDG formlarına kıyasla daha ağır seyretmesini açıklıyor olabilir. COG alt birim eksikliklerinde ortaya çıkan konjenital anomalilerin patofizyolojik mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Bu araştırma ile, çok nadir bir hastalık grubu olan COG-CDG etiyolojisinde yer alan yeni bir COG6 varyantının gösterilmesi ve detaylı klinik bulguların tanımlanması ile hastalığın moleküler ve klinik spektrumuna katkı sağlanmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen **Aile MCC #3** – IV:2'de gerçekleştirilen solo-TED analizinde, *DOK7* geni (*downstream of tyrosine kinase 7*) intron 1'de homozigot c.54+25_55-38delGGGGGGGGGCGCGGG değişimi saptandı. *DOK7* (MIM*610285), 4p16.3 bölgesinde yer alan ve düz zincirden transkribe olan 7 ekzonlu bir gen olup 2,566 bç uzunluğunda ve 504 aminoasitten (aa) oluşan bir proteini kodlamaktadır. Bu gende yer alan biallelik patojenik varyantlar, konjenital myastenik sendrom 10 (KMS10, MIM#254300) ve olgumuzun fenotipi ile uyumlu bulunan fetal akinezi deformasyon sekası 3 (FADS3, MIM#618389) fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir.

Ailemiz, literatürde *DOK7* ilişkili FADS tanısı alan üçüncü ailedir. Gen-fenotip ilişkisi ilk kez 2009 yılında Vogt ve ark. tarafından, FADS bulgularıyla 32, 24 ve 22. GH'de ölü doğan üç kardeş fetusta tanımlanmıştır (244). Olgularda fasiyal dismorfizm (aşağı çekik palpebral fissürler, mikrognati), kısa boyun, kamptodaktili, azalmış kas kitlesi, bilateral PEV, hidrotoraks ve jeneralize ödem bulguları izlenmiştir. Moleküler analizlerde *DOK7*'de saptanan homozigot c.331+1G varyantı, daha önce KMS10 tanılı bir bireyde c.1124_1127dupTGCC değişimi ile birleşik heterozigot formda bildirilmiş; fonksiyonel çalışmalar ile kırılma bölgesinde yer alan varyantın ekzon 3'ü atlattığı gösterilmiştir (193).

İkinci aile, 2020 yılında Radhakrishnan ve ark. tarafından bildirilmiştir (245). Benzer bulgularla intrauterin dönemde kaybedilmiş kardeş öyküsü olan ve FADS fenotipi ile 32. GH'de IUMF olarak sonlanan bu fetal olguda homozigot c.1263dupC değişimi saptanmıştır. Klinik açıdan, ikinci ailede pterijiyumun tabloya eşlik etmesi dikkat çekmiştir. Çalışmamız kapsamında tanımlanan üçüncü ailenin indeks bireyinde saptanan serebellar hipoplazi, kemik fraktürleri ve mikropenis daha önce bu sendrom dahilinde bildirilmemiş olup klinik spektrumun genişletilmesine katkı sağlamış; otopside kökeni otoimmün olmayan bir myasteni tablosunda timik hiperplazi saptanması dikkat çekmiştir. Ayrıca, literatürde bir olguda 32. GH'de histopatolojik inceleme gerçekleştirilmiş; yapılan kas biyopsisinde fokal atrofi ve lif boyutlarında artış olduğu belirtilmiştir (245). Olgumuzda 33⁺ GH'de yapılan otopside kas liflerinde yuvarlaklaşma ve çap farkı olduğu, her iki lif tipinde de normal boyutlu ve küçük boyutlu liflerin bulunduğu ve nukleusların hafif dismorfik olduğu gözlenmiştir. Bu iki olgu birlikte değerlendirildiğinde, non-spesifik miyopati bulgularının, *DOK7* ilişkili KMS'de olduğu gibi, FADS fenotipinin de bir komponenti olduğu söylenebilir.

DOK7, nöromusküler bileşkedeki postsinaptik farklılaşma sürecinde görev alan bir adaptör protein olup ekseriyetle iskelet ve kalp kasında eksprese edilmektedir (246). Diğer Dok ailesi proteinleri gibi, Dok-7 de N-terminal bölgede “plekstrin homoloji” (PH) ve fosfotirozin bağlama (PTB) domaini; C-terminal bölgede ise Src homoloji 2 (SH2) domain motifleri içermektedir.

Nöromusküler sinapsların oluşumu, presinaptik ve postsinaptik membranlarda yer alan özelleşmiş birkaç anahtar molekülün koordineli çalışmasına bağlıdır. Motor sinir ucundan salınan AGRIN, postsinaptik lipoprotein reseptör ilişkili protein 4'e (LRP4) bağlanarak, sinaptik farklılaşmanın ana düzenleyici moleküllerinden kas spesifik kinaz (MUSK) ve LRP4 arasında bir kompleks oluşumunu uyarır. MUSK aktivasyonu sonucunda postsinaptik zarda kümelenen LRP4 molekülleri, presinaptik farklılaşmayı uyarmak için doğrudan motor aksonlara sinyal gönderir. Öte yandan, AGRIN'in MUSK fosforilasyonunu gerçekleştirebilmesi, *DOK7*'nin N-terminal bölgesinde yer alan PTB domaininin MUSK jukstamembranında yer alan tirozin motifine bağlanmasına bağlıdır. Yani, MUSK fosforilasyonunun postsinaptik stabilizasyonunda kritik rol *DOK7* molekülüne ait olup MUSK-*DOK7* bağı kurulamaması durumunda aktivasyon gerçekleşemez. Fosforile MUSK, Rapsin aracılığıyla AChR'leri etkileyerek AChR'nin NMJ'da bulunan postsinaptik yarıklarda kümelenmesini; sonuç olarak sinaptik iletinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesinde işlev görür. Aynı nörofizyolojik yolda yer alan AGRIN, LRP4, MUSK ve AChR alt

birimlerini kodlayan genlerdeki patojenik varyantlar bu nedenle benzer fenotipler ile sonuçlanmaktadır (Şekil 5-1).

2009 yılına kadar *DOK7*'nin sadece KMS etyopatogenezindeki rolü bilinmekteydi. Çeşitli fonksiyonel çalışmalar ile *DOK7*'nin N-terminalinde, yani PH veya PTB domainlerindeki fonksiyon kaybına yol açan varyantların işlevsiz bir protein üretimine neden olduğu; yaşamla bağdaşan bir hastalık olan KMS10 olgularının neredeyse tamamında en az bir varyantın C-terminal bölgede yer aldığı gösterilmişti (247). 2009 yılında Vogt ve ark. tarafından bildirilen FADS olgusunda *DOK7* geninin PH domaini üzerinde yer alan homozigot bir değişimin gösterilmesi ile *DOK7*-FADS ilişkisi ilk kez tanımlanmıştı. Bu fenotipik farklılık, N-terminal bölgede (PH, PTB alanı) yer alan biallelik varyantların total fonksiyon kaybına neden olması hipotezi ile uyumluydu (244). Hayvan deneylerinde de bu veriler ile korele sonuçlar elde edilmiş; homozigot *Dok7-knockout* fare çalışmalarında, farelerin nefes alamadığı, hareket kabiliyetlerinin olmadığı ve neonatal dönemde öldüğü kaydedilmişti. Ayrıca bu mutant modellerde, diyafram kasına ait motor son plakta AChR kümelerinin saptanamaması, genin nöromusküler sinaptogenezdeki kritik işlevini ve FADS fenotipi etyopatogenezindeki rolünü destekler nitelikteydi (248). Varyantların yerleşimi ve fenotip ilişkisi üzerine yapılan bu çalışmalarda birbiriyle uyumlu veriler elde edilmiş olmasına rağmen, literatürde *DOK7*-FADS tanılı 2. ailenin moleküler sonuçları ilginç bir şekilde bu hipotez ile uyuşmamaktadır. Vogt ve ark.'nın (2009) ve bizim bildirdiğimiz olgu ile benzer bir fenotipe sahip bu fetusta, daha önce KMS10 hastalarında bildirilmiş en sık 2. değişim olan c.1263dupC varyantı homozigot formda saptanmış; ancak bu interfamiliyal varyabilitenin nedeni açıklanamamıştır (245, 249). Bu durum, modifiye edici genlerde yer alan başka varyantların veya eşlik eden ikinci bir antitenin varlığına işaret ediyor olabilir.

Olgumuzdaki 15 bazlık homozigot delesyon, PH domaininde yer almaktadır. Daha önce 4 ayrı çalışmada, her biri C-terminalde yer alan ikinci bir varyant ile birleşik heterozigot formda olmak üzere, bu varyantı taşıyan KMS olguları bildirilmiştir.

Saptadığımız değişim ilk olarak 2008 yılında KMS tanılı iki olguda c.1124_1127dupTGCC varyantı ile birleşik heterozigot formda bildirilmiş; kas biyopsisi materyalinde yapılan çalışmalarda değişimin mRNA düzeyinde intron 1 inklüzyonuna yol açtığı ve 23 rezidü sonrası trunkasyon ile sonuçlandığı gösterilmiştir (p.(Y19Vfs*23)) (193). 2009 yılında 15 olgunun yer aldığı bir seride, aynı varyantları birleşik heterozigot formda taşıyan başka bir KMS tanılı olgu bildirilmiş; biri bu birey olmak üzere sadece iki olguda

antenatal bulgu (fetal akinezi) izlenmiş olması dikkat çekmiştir (192). Efedrin tedavisinin *DOK7* ilişkili KMS'deki etkinliği üzerine yapılan bir çalışmada yer alan 12 olgudan 2'sinin yine aynı iki varyantı taşıdığı belirtilmiştir (250). En son, 2013 yılında *DOK7*-KMS olgularında salbutamol etkinliğinin araştırıldığı çalışmaya dahil edilen dokuz olgudan birinde, birleşik heterozigot konumunda, intron 1'deki değişim ve c.1263delC varyantı saptanmıştır (194).

Olgumuzdaki varyant, lokalizasyonu itibarıyla Sanger konfirmasyonu ve segregasyon aşamasında teknik problemlere yol açmıştır. Tasarladığımız primerler ile 280 bp uzunluğunda olan ve %74 GC oranına sahip bir bölgenin çoğaltılması hedeflenmiş, primer bağlanma ısıları ileri ve geri primerler için sırasıyla 63,6°C ve 64,5°C olarak hesaplanmıştı. Ancak bu değerlerle uyumlu PZR deneyi ile dizileme sırasında *allel drop-out* geliştiği ve hem fetus hem ebeveynlerde sadece mutant allelin amplifiye olduğu gözlemlendi. Bu noktada olası iki mekanizmadan biri primerin bağlandığı bölgede nadir bir polimorfizm varlığı, ikincisi ise sağlıklı allelin G-zengin dizisinde kararlı G-kuadrupleks yapılarının oluşmuş olma ihtimali idi. Bu nedenle ilk aşamada daha yüksek ısıda PZR deneyinin tekrarlanması, problemin çözülememesi durumunda yeni primerlerin tasarlanması planlandı. 66-64°C'de tekrarlanan PZR deneyini takip eden Sanger sekanslama sonucunda her iki allelin de çoğaldığı gözlemlendi. *DOK7*'nin kanda ifade edilmemesi ve elimizde RNA ekstrakte edilebilecek taze saklanmış fetal doku olmaması nedeniyle saptadığımız varyantın kırılma üzerine olan etkisini gösteremedik; ancak daha önce bu değişimin birbirinden bağımsız hastalarda gösterilmiş olması ve kas dokusunda gerçekleştirilmiş cDNA çalışmaları varyantın hastalık ilişkisini güçlendirmektedir.

Son yıllarda *DOK7* geni taşıyan adenovirüs aracılı (AAV) gen terapi çalışmalarına ağırlık verilmiş ve umut vaat edici sonuçlar elde edilmiştir. AAV-D7 tedavisinin; hayvan modellerinde *DOK7* ilişkili myasteni, OD Emery-Dreyfus musküler distrofi, Amyotrofik Lateral Skleroz gibi bir grup nöromusküler hastalıkta NMK yapılarını genişlettiği, bozulmuş motor aktiviteyi iyileştirdiği ve yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (251-253). Yakın zamanda, SMA fare modellerinde de bu gen terapisi ile kas lifi atrofisinin azaldığı ve NMK yapısının düzelme eğilimine girdiği bildirilmiş; *DOK7*'nin SMA hastalığında modifiye edici bir rolü olduğu anlaşılmıştır (248). *DOK7* temelli terapötik çalışmalar ile *DOK7*'nin yanısıra nöromusküler kavşağı genişletebilen başka moleküllerin de birçok nöromusküler hastalıkta potansiyel tedavi hedefi olarak kullanılabileceği hipotezi, günümüzde heyecan verici çalışmalara yön vermektedir.

Çalışmamıza dahil edilen **Aile MCC #4** – III:3’de klinik tanı LMPS ile uyumlu bulunmuştu. Solo-TED analizinde *RYR1* geninde saptanan heterozigot c.10504C>T (p.(R3502W)) varyantı, annenin de bu değişimi taşıması nedeniyle ailevi nadir bir polimorfizm olarak değerlendirildi. Bununla birlikte hem *de novo* hem biallelik *RYR1* varyantlarının LMPS/FADS kliniği ile ilişkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda, *RYR1*’de TED yöntemi ile belirlenemeyecek bir pozisyonda (promoter bölge, derin intronik vb.) yer alan ikinci bir değişim varlığı da ihtimaller dahilindedir.

Multipl pterijiyum sendromları, konjenital kontraktürler ve büyük eklemler çevresinde “web”lere (pterijiyum) eşlik edebilen bir takım sistemik anomaliler ile karakterizedir. Belirgin fenotipik ve genetik heterojenitenin izlendiği bu grup, hafif tutulumdan letal formlara kadar geniş bir spektrumda prezante olabilmektedir. Günümüze kadar bu fenotiplerle ilişkili genlerin bir kısmı tanımlanmıştır. MCC bulguları olan birçok olguda eklem hareketini sınırlayan pterijiyumların tabloya eşlik ettiği bilinmekle birlikte, belirgin pterijiyumların varlığı spesifik bazı antitelerin kardinal özelliğidir. Bu hastalıklar ve pterijiyumun eşlik edebildiği diğer nadir antiteler Tablo 5-1’de özetlenmiştir.

Tablo 5-1: Multipl pterijiyum ile seyreden sendromlar

1. Myasteni spektrumu

- a. Letal Multipl Pterijiyum sendromları (LMPS), XL, OR, OD?
- b. Pterijiyum sendromu, Escobar, OR, OD
- c. Konjenital myastenik sendrom, OR
- d. Embriyonik nöroreseptör altbirimlerine karşı gelişen maternal antikorlar

2. PPS-BPS-Cocoon spektrumu

- a. Popliteal Pterijiyum sendromu, OD, OR?
- b. Bartsocas-Papas sendromu, OR
- c. Cocoon sendromu, OR

3. MYH3 ilişkili fenotipler

- a. Kontraktürler, pterijiya ve spondilokarpotarsal füzyon sendromu 1A (DA8), OD
- b. Kontraktürler, pterijiya ve spondilokarpotarsal füzyon sendromu 1B, OR

4. Ağır amyoplazi

5. Malign Hipertermi ile seyreden Multipl Pterijiyum Sendromları

- a. Multipl Pterijiyum sendromu ve Malign Hipertermi, OR
- b. King Denborough sendromu, OD

6. Antekubital Pterijiyum Sendromu (Shin Shun), OD

7. Pterijiyum ile seyredabilen antiteler, diğer

- a. Kromozom anomalileri
 - i. Haspeslagh sendromu
 - ii. Diğer
- b. Fetal akinezi sekansı hastalıkları
- c. Diğer Konjenital Miyopatiler
- d. Shalev tipi – üst ekstremitelerde pterijiyum, ptosis ve periumbilikal anomaliler, OR
- e. Kutis Laksa (*LOX*, *FBLN4*, *FBLN5*)
- f. Bruck sendromu tip 1/tip 2 (OR)
- g. Alkuraya-Kucinskas sendromu, OR
- h. Skrotal dil (*creased/furrowed tongue*) ile seyreden Escobar varyantı, OR
- i. Pfeiffer sendromu, OD (254)
- j. PHAVER sendromu (255)
- k. Sakral agenezi/Nöral tüp defektleri
- l. Otomandibuler anomaliler – pterijiyum sendromu (256)

OR, Otozomal resesif; OD, otozomal dominant; XL, X'e bağlı

Multipl pterijiyum sendromları her ne kadar geniş bir hastalık grubunu yansıtır olsa da geleneksel klinik yaklaşım, fenotipin “letal” (LMPS) ve yaşamla bağdaşan form (Escobar) olarak ikiye ayrılmasına dayanmaktadır. Olgumuzun da içinde bulunduğu LMPS, kistik higroma ve hidropsa eşlik eden intrauterin büyüme geriliği, şiddetli fleksiyon kontraktürleri ve yaygın pterijiyumlar ile karakterizedir. Hipertelorizmin belirgin olduğu fasiyal dismorfizm, kardiyak hipoplazi ve erkeklerde kuşku genitalya/kriptorşidizm beklenen ek bulgular arasındadır. Ağır pulmoner hipoplazi nedeniyle letal seyreden bu antite sıklıkla otozomal resesif kalıtılmaktadır. Bununla birlikte, literatürde X'e bağlı resesif kalıtım paterni ile uyumlu olabilecek bazı aileler bildirilmiş; ancak X kromozomu üzerinde ilişkili bir gen henüz tanımlanmamıştır (257, 258). Moleküler etyopatogeneizde en büyük payı embriyonik nörotransmitter reseptör alt birimlerini kodlayan *CHRNA1*, *CHRND*, *CHRNA1* genleri oluşturmaktadır. Bununla birlikte, son 10 yıl içerisinde YND teknolojilerinin yaygın kullanımı ile daha önce çeşitli fenotiplerle ilişkisi bildirilmiş birçok genin LMPS etyopatogeneizinde de rolü olduğu gösterilmiştir.

2014 yılında farklı ailelerden 36 FADS/LMPS ve 30 Escobar varyantı olgusunun dahil edildiği bir çalışmada FADS/LMPS grubunda yer alan üç fetal olguda biallelik *RYR1* varyantları saptanmıştır (259). Olgularda NT artışı, kistik higroma, pulmoner hipoplazi, yaygın pterijiyum ve fleksiyon kontraktürleri izlenmiş, bir olguda yarı damak ve humerus

fraktürü bildirilmiştir. Kas dokusunda yapılan histopatolojik değerlendirme; lif atrofi, lif boyutlarında orantısızlık ve endomisyal fibrozis ile uyumlu saptanmıştır. 2016 yılında LMPS klinik tanılı ve eşlik eden hidropik bulgular ile kistik higroması olan iki fetusta daha birleşik heterozigot *RYR1* varyantı gösterilmiştir (260). Bu çalışmalarda heterozigot olduğu moleküler olarak da gösterilen ebeveynlerin hiçbirinde malign hipertermi öyküsü olmaması dikkat çekmektedir. 2017 yılında başka bir LMPS tanılı fetusta *NEB* geninde homozigot bir kırılma bölgesi varyantı saptanmış; *NEB* ilişkili diğer bir antite olan nemalin myopati postmortem kas biyopsisi ile dışlanarak *NEB* geni-LMPS ilişkisi gösterilmiştir (261). 2020 yılında, benzer bulguları olan bir diğer fetal olguda *DOK7* geninde daha önce KMS10 ile ilişkilendirilmiş homozigot bir patojenik varyant saptanmıştır. Aynı varyantı taşıyan olgulara kıyasla fenotipin bu denli ağır olması, modifiye edici ek faktörlerin fenotipte rolü olduğunu düşündürmektedir (245). AchR alt birimleri ve *DOK7* gibi nöromusküler kavşakta eksprese edilen proteinleri kodlayan diğer genlerin sorumlu olduğu farklı bazı KMS alt tiplerinin de (*RAPSN*, *MUSK*) ile MPS ile ilişkisi gösterilmiştir. Konjenital kontraktürler ve pterijiyum varlığı konjenital miyopati grubunda çok nadir olmakla birlikte spektrumun letal ucunda yer alan fenotiplerde gözlenebilmektedir (4). Nemalin miyopati, kor-rod myopatiler, *cap* hastalığı, santral kor hastalığı ve sentronükleer miyopati, US'de fetal akinezi ve kontraktürlere, nadiren de pterijiyuma neden olabilen konjenital myopatilere örnek olarak verilebilir (262). Son olarak, popliteal pterijiyumla seyreden antiteler içerisinde yer alan Bartsocas-Papas sendromu (Letal popliteal pterijiyum sendromu, MIM #263650) ve bu grubun en ağır formu olan Cocoon sendromu (MIM #613630) da letal seyretmekte olup biallelik *RIPK4* ve *CHUK* varyantları ile ilişkilendirilmiştir.

Olgumuzun TED analizinde LMPS ve FADS ile ilişkisi gösterilmiş genlerde kliniği açıklayabilecek bir varyant saptanmaması nedeniyle, bir sonraki aşamada TGD yöntemi ile analiz edilerek değerlendirilmesi planlandı.

Çalışmamıza dahil edilen **Aile MCC #5** – IV:2 ve IV:3'te *RAPSN* geninde (*receptor associated protein of the synapse*) heterozigot c.133G>A (p.(V45M), rs121909254) ve c.493G>A (p.(V165M), rs761584017) değişimleri saptandı ve bu varyantların *trans* konumunda bulunduğu allel-spesifik PZR yöntemi ile gösterildi. *RAPSN* (MIM*601592), 11p11.2 bölgesinde yer alan ve ters zincirden transkribe olan 8 ekzonlu bir gen olup 1,622 bp uzunluğunda ve 412 aa'den oluşan bir proteini kodlamaktadır. Bu gende yer alan biallelik patojenik varyantlar, AchR eksikliği ilişkili konjenital myastenik sendrom 11 (KMS11, MIM#616326) ve olgumuzun fenotipi ile uyumlu bulunan fetal akinezi deformasyon sekası 2

(FADS2, MIM#618388) fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde *RAPSN* ilişkili KMS'nin erken başlangıçlı formunda MCC bulgularının sıklıkla bildirilmesi ve aynı homozigot varyanta sahip olguların bazılarında letal seyir gözlenmesi, bu fenotiplerin iki ayrı antite olmaktan ziyade bir hastalık spektrumu altında değerlendirilebileceğini düşündürmektedir (263). Fenotipin ağırlığını öngörebilmeye yönelik bir genotip-fenotip korelasyonu günümüzde net olarak aydınlatılamamıştır.

RAPSN, nikotinik AchR'yi motor uç plağa bağlayan “Rapsyn” isimli postsinaptik bir membran proteinini kodlar. Bu protein, AchR'yi sitoskeletal distrofin-glikoprotein kompleksi (DGC)'nin β -distroglukan ünitesine bağlayarak, kalpain ile etkileşimi sonucunda AchR'nin postsinaptik membranda kümelenmesinde rol alır (Şekil 5-1). Nöromusküler sinyal iletinin sağlanabilmesi için yolakta görev alan tüm alt ünitelerin fonksiyonel olması, AChR alt birimlerinin doğru birleşmesi, reseptörün membranda doğru yere tutunması ve uygun uyarı ile aktive olabilmesi gerekmektedir.

RAPSN ilişkili FADS açısından yapılan literatür taramasında sadece 8 olgunun bildirildiği görülmüştür. Burke ve ark.'nın (2003) bildirdiği *RAPSN* ilişkili erken başlangıçlı KMS tanılı 13 aileden 2'sinin daha önce FADS bulguları ile kaybedilen gebelik ürünü öyküsü olduğu ifade edilmiş; ancak biri p.(N88K) değişimi olmakla birlikte diğer varyant/lar belirtilmemiştir (263). Müller ve ark. (2006), biri birleşik heterozigot c.848T>C (p.(L283P)) ve IVS1-15C>A değişimlerini, biri homozigot c.490>T (p.(R164C)) varyantını taşıyan iki “*RAPSN* ilişkili fetal akinezi” olgusu bildirmiştir (264). Michalk ve ark. (2008) 63 FADS ailesinde genetik etyopatogenezi araştırmış; bir olguda birleşik heterozigot c.416T>C (p.(F139S)) ve c.566C>T (p.(A189V)) varyantları olduğunu göstermiştir (58). Daha sonra, Vogt ve ark. (2008) tarafından *CHRNA* varyantları dışlanmış 15 letal MPS/fetal akinezi olgusunun dahil edildiği çalışmada, benzer etkilenmiş ve kaybedilmiş kardeş öyküsü olan bir olguda *RAPSN* geninde çerçeve kayması ile sonuçlanan homozigot c.1177-1178delAA değişimi saptanmıştır (265). En yakın benzer araştırma 2017 yılında Winters ve ark. tarafından gerçekleştirilmiş, hidropsun da eşlik ettiği tipik letal fetal akinezi bulguları tariflenen bir olguda *RAPSN* geninde homozigot c.484G>A (p.(E162K)) değişimi gösterilmiştir. Son olarak, detaylı klinik bilgi olmamakla birlikte Clinvar veritabanında FADS tanılı bir olguda birleşik heterozigot konumda c.829A>G (p.(T277A)) ve c.524A>G (p.(Q175R)) varyantları bildirilmiştir. *RAPSN* ilişkili FADS'ı benzer fenotiplerden ayıran özgün bir anomali mevcut olmamakla birlikte, yüksek damak ve belirgin mandibula

bulgularının FADS kohortlarında sıklıkla *RAPSN* varyantlarında gözlenmesi dikkat çekmiştir. Olgularımızda da yüksek damağın tabloya eşlik etmesi literatür verilerini desteklemektedir.

Çalışmamızda gösterilen *RAPSN* varyantları, daha önce farklı birer ikinci varyant ile birleşik heterozigot formda bulunmak üzere, KMS tanılı olgularda gösterilmiş; ancak şimdiye kadar FADS olgularında bildirilmemiştir. 2003 yılında *RAPSN* ilişkili beş KMS olgusunun sunulduğu bir çalışmada bir olguda heterozigot p.(N88K) ve olgumuzda da saptanan p.(V165M) varyantı saptanmış; hastada neonatal hipotoni, emme-yutma güçlüğü, PN ilk 5 ay içerisinde aspirasyon, vagal episodlar, kardiyak arrest ve trakeostomi endikasyonu nedeniyle çoklu hastane yatışı olduğu ve 5. aydaki muayenede fasiyal diparezi ve kas güçsüzlüğü geliştiği ifade edilmiştir (266). Aynı iki varyantı taşıyan başka bir olguda da benzer bir neonatal prezantasyon izlendiği ve erişkin dönemde (yaş ve etyoloji bildirilmemiş) eks olduğu bildirilmiştir (196). 2007 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada, neonatal hipotoni ve mekanik ventilasyon desteği ihtiyacı olan 16 aylık bir dişi olguda *RAPSN* geninde p.(E162K) ile olgumuzda saptanan p.(V45M) varyantlarının birleşik heterozigot konumunda olduğu gösterilmiş, bu varyantların protein fonksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir (195). GFP ile işaretlenmiş yabanıl *RAPSN*, bu 2 mutasyon ile karşılaştırıldıktan sonra HEK hücrelerine transfekte edilmiş, her iki mutant proteinin de AChR'leri ile kümelenme özelliğinin belirgin azaldığı gösterilmiştir. İlginç bir nokta, bu çalışmada etkilenmiş birey yaşamla bağdaşan bir fenotip olan KMS tanılı iken, p.(E162K) homozigot varyantı letal fetal akinezi tanılı bir olguda saptanmış, yine daha önce başka varyantlar ile KMS olgularında gösterilmiş olan p.(V45M) değişiminin çalışmamızda fetal akinezi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar, genotip-fenotip korelasyonu açısından literatür verilerinden anlamlı bir çıkarım yapılamayacağına işaret etmektedir. Ancak öte yandan, FADS olgusunda Mendeliom ile gösterilmiş olan ve homozigot saptandığı ifade edilen p.(E162K) varyantının; aslında heterozigot olup trans allelde delesyona eşlik etme ihtimali, korelasyon bulunmadığına dair net bir çıkarım yapmaya engel olmaktadır.

Bu araştırma kapsamında, *RAPSN* ilişkili FADS tanılı yeni iki olgu tanımlanmış ve olası bir genotip-fenotip korelasyonu kurulabilmesi yönünde literatüre veri sağlanmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen **Aile MCC#6** – IV:3 ve IV:4'ün klinik muayene bulgularının Alkuraya-Kucinkas sendromu (AKS, MIM#617822) ile uyumlu olabileceği düşünülmüştü. Olgu IV:3'ün TED analizinde, ön tanıya uyumlu olarak *KIAA1109* geninde homozigot c.12733G>A (p.(A4245T)) değişimi saptandı ve benzer etkilenmiş kardeşin de bu varyantı

homozigot formda taşıdığı gösterildi. *KIAA1109* (MIM*611565), 4q27 bölgesinde yer alan ve düz zincirden transkribe olan 86 ekzonlu bir gen olup 15.896 bp uzunluğunda ve 5.005 aa'den oluşan bir polipeptidi kodlamaktadır.

2010 yılında *KIAA1109*'un meyve sineği ortoloğu olan *Tweek* geninin çoklu yollar üzerinden nöromusküler sinapsların gelişimi, büyüklüğü ve morfolojisinde rol aldığı gösterilmiş; genin memelilerdeki fonksiyonu ise çok yakın zamanda aydınlatılmıştır (267). 2022 yılında *Kiaa1109*^{-/-} fare çalışmaları ile mutant modellerde NMK boyutlarının küçüldüğü, embriyoların perinatal evrelerde eks olduğu ve nöromusküler sinaptik iletinin bozulduğu bildirilmiştir. İlginç olarak, fizyolojik çalışmalar ile bu farelerde spontan nörotransmitter salınım frekansının belirgin arttığı; ancak uyarılmış/kuantal salınımın azaldığı ve nöromusküler sinapsların repetatif düşük frekans uyarımına yanıt vermediği gösterilmiştir. Bütün bu bulgular *KIAA1109*'un memelilerde hayati ve NMK gelişimi/işlevi için kritik olduğunu kanıtlamıştır (268).

HGMD veritabanında 20 adet *KIAA1109* varyantı bildirilmiş, bu varyantların 17'si AKS ile ilişkili yayınlara atıflanmıştır. Öte yandan, geri kalan üç varyantın Dandy Walker malformasyonu (DWM), hidrosefali ve FADS gibi bulgu/tanımları olan hastalarda, bunların ikisinin ise sendromun isimlendirilmesinden önce bildirilmiş olması, bu değişimlerin de AKS ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir (269-271). Biallelik *KIAA1109* varyantları günümüze kadar 24 ailede bildirilmiş olup etkilenmiş olguların klinik ve moleküler bulguları aşağıda detaylandırılacaktır.

KIAA1109 değişimlerinin insanda hastalık yapıcı olabileceği ilk kez 2015 yılında öne sürülmüştür (270). Bu çalışmada, tanı konulamamış ve otozomal resesif kalıtım ile uyumlu nörolojik hastalığı olan 143 ailede TED analizi gerçekleştirilmiş; DWM, hidrosefali, distal kontraktürler ve plevral efüzyonu olan bir olguda *KIAA1109*'da homozigot c.1557T>A (p.(Y519*)) değişimi saptanmıştır. Daha önce gerçekleştirilen *Drosophila* çalışmalarında homozigot *KIAA1109* delesyonunun letal seyretmesi ve nadiren hayatta kalabilen modellerde ağır nörolojik tutulum izlenmiş olması, *KIAA1109*'un fenotipten sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (272). 2017 yılında Monies ve ark.'nın 1000 olguluk TED serilerine dahil ettiği artrogripozis bulguları olan 3 yaşında bir kız çocuğunda homozigot c.5194T>C (p.(C1732R)) saptanmış, ancak çalışmada ek klinik detay belirtilmemiştir (271). 2015 yılında ilk kez *KIAA1109* fenotip ilişkisini öne süren araştırma grubu, 2018'de letal seyirli hastalık öyküsü olan 44 ailede TED analizi planlamış, hidrosefali/serebellar hipoplazi ve artrogripozis

bulguları olan iki bağımsız fetusta c.12067G>T (p.(E4023*)) ve c.11250-1G>A varyantlarını göstermiştir (273). Bu dört olgu bildirildikten kısa bir süre sonra, SSS malformasyonları (serebral atrofi/lizensefali, serebellar hipoplazi, beyin sapı disgenezi), kardiyak anomaliler, oftalmolojik tutulum (mikroftalmi ve katarakt) ve artrogripozis bulguları olan 13 bireyde daha bialellik *KIAA1109* varyantları saptanmış ve hastalık 2018 yılında “Alkuraya-Kucinskas sendromu” olarak literatüre geçmiştir (274). Çalışmada fonksiyon kaybı ile sonuçlanan varyantların letal seyrettiği, daha hafif mutasyonların ise yaşamla bağdaşmakla birlikte ağır global gelişme geriliği, ağır hipotoni, ayaklarda 2-3. parmaklar arasında sindaktili gibi bulgulara neden olduğu bildirilmiştir. Bu genotip-fenotip ilişkisi model organizma deneyleri ile de desteklenmiştir. Zebra balığındaki ortolog genin *knockdown* edildiği modellerde embriyolarda hidrosefali ve anormal notokord morfolojisi gözlenmişken *knockout* meyve sineği ve fare modellerinde fenotipin letal veya çok ağır nörolojik defektler ile karakterize olduğu bildirilmiştir.

AKS'nin tanımlanmasını takiben literatürde art arda benzer olgular ve *KIAA1109* varyantları bildirilmiştir. Tanı konulamamış hastalardan oluşan 20 olguluk bir kohortta FADS tanısı ile çalışmaya dahil edilen fetusun, *KIAA1109* geni ekzon 28-56 arasında homozigot delesyon taşıdığı belirlenmiştir. Fetal olguda kontraktürlere aksiller pterijiyumun eşlik ettiği dikkat çekmiştir. Bu çalışmada tanı AKS olarak belirtilmemiş olmakla birlikte olgunun bulguları AKS'nin ağır formları ile uyumlu gibi görünmektedir (269). Prenatal dönemde tanı alan bir diğer olgu, ilk trimesterde çoklu düşük öyküsü olan bir çiftin süregelen gebeliğinde nukal fold kalınlığında artış, ağır VM, yaygın eklem kontraktürleri ve interventriküler septal defekt saptanan 14 haftalık bir fetus olup TED analizinde *KIAA1109*'da iki farklı kırılma bölgesi varyantı saptanmıştır (c.1932-3A>G p.(S645Gfs*32), c.2613+1G>A p.(V825_Q872del)) (275). Gestasyonel yaşı 14 ila 27 hafta arasında değişen yedi AKS tanılı fetusun dahil edildiği bir diğer çalışmada, olgular kompleks beyin anomalileri yönünden prenatal US ve postmortem otopsi ile detaylıca incelenmiş ve sendromun SSS tutulum paterni karakterize edilmiştir (276). Prenatal US'de bütün olgularda CCA olduğu dikkat çekmiş; supratentorial (VM, geniş germinal matriks, parankimal/kortikal incelmeye, lizensefali, bazal gangliada hipointens görünüm) ve infratentorial anomalilerin (retroserebellar bölgede genişleme, Z-şeklinde beyinsapı, pontoserebellar hipoplazi, vermiyan a/disgenezi) sıklıkla izlendiği belirtilmiştir. Histopatolojik incelemede olgularda hidrosefali, disgenetik pons, serebellar hipoplazi, ponsta elonge görünüme eşlik eden Z-şeklinde beyin sapı, inferior vermiyan aplazi, migrasyon anomalileri (ventral beyin sapı ve leptomeninkslerde nöroglial

ektopi, akmaddede yaygın fokal ektopi alanları), dentat nukleus hipoplazisi/oliver displazi, korteks ve kranial sinirlerde nöron kaybı gibi kompleks SSS malformasyonları saptanmıştır. Eşlik eden ek anomaliler incelendiğinde, olguların ikisinde konjenital katarakt ve dördünde mikroftalmi, birinde çift aortik ark ve birinde hipoplastik sol kalp olduğu belirtilmiş; dört olguda yele boyun da dahil olmak üzere bütün olgularda konjenital eklem kontraktürleri ve bir olguda hidrops geliştiği bildirilmiştir (276). Bu kapsamlı araştırma, olgularımızda saptanan SSS malformasyonlarının tamamının sendromun komponenti olduğunu desteklemektedir.

2020 yılında Kumar ve ark., aynı aileye mensup olan ve yaşları 23-38 arasında değişen dört bireyde *KIAA1109* geninde homozigot c.2431A>G (p.(T811A)) değişimini tanımlamış; olgularda AKS'de beklenen bulgulara ek olarak alt ekstremitelerde kas atrofisi ve kafa sallama stereotipleri olduğunu bildirmiştir (277). Literatürde yer alan bütün olgular incelendiğinde, kas atrofisinin sadece bu aile dahilinde bildirilmiş olması dikkat çekmiş; bu durumun yaşayan olguların sayıca az olması ile ilişkili olabileceğini akla getirmiştir. Ancak, çalışmamızda yer alan MCC #6 – IV:3'ün prenatal US'de dahi alt ekstremitelerde distalde atrofik görünüm saptanması, bu bulgunun erişkin yaşa özgü olmasından ziyade özellikle fetal veya neonatal olguların muayenesinde gözden kaçabilmiş olma ihtimalini de beraberinde getirmektedir.

Konuya ilişkin en son aile çalışması 2020 yılı sonunda bildirilmiş; neonatal dönemde eks olan 2 kardeş olguda c.359-1G>A ve c.14564_14565del (p.(V4855Dfs*5)) varyantları saptanmıştır. Kardeşlerden birinde sendrom dahilinde daha önce bildirilmemiş olan adrenal hipoplazi ve renal infarkt bulguları olduğu ifade edilmiştir (278).

Çalışmamızda yer alan iki fetusun da muayenesinde fetal akinezi bulgularına açık ağız postürünün eşlik etmesi, klinik muayeneyi takiben ayırıcı tanıda ikinci sırada biri restriktif dermopati olmak üzere SSS bulguları ve kataraktı da açıklayabilecek iki ayrı hastalık olasılığını düşündürmüştür. Bu muayene bulgusu, restriktif dermopatide cilt bulgularının 22-24. GH'dan sonra başladığı da göz önünde bulundurulduğunda, üçüncü trimesterden önce iki antitenin birbirlerinin ayırıcı tanısında yer alabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca, postmortem muayenede sendrom dahilinde bildirilmemiş olan sekonder yarı damak, skrotal aplazi ve anal stenoz birlikteliğini açıklayabilecek genitopatellar sendrom açısından ekzom verisi tekrar değerlendirilmiş; *KAT6B* geninin tamamının kapsandığı teyit edilmiştir.

Araştırmamız kapsamında *KIAA1109* geninde AKS ilişkili yeni bir varyant tanımlanarak moleküler etyopatogenez genişletilmiş; yeni klinik bulgular ile fenotipik spektrumun genişletilmesine katkı sağlanmıştır.

Çalışmamız dahilinde **Aile MCC #7 – III:2’nin** TED analizinde *NEB* geninde heterozigot c.169_183dup CTGGCACAGCCAGCA (p.A61_S62insLAQPA) ve c.14911G>A (p.(A4971T)) değişimleri; *DNAH9* geninde heterozigot c.4030C>T (p.(R1344*)) ve c.4719T>G (p.(Y1573*)) değişimleri saptandı. Segregasyon analizleri ile fetal olgunun her iki gende yer alan varyantları birleşik heterozigot formda taşıdığı gösterildi. Olgumuzda saptanan kompleks kardiyak anomaliler *DNAH9*; artrogripozis bulguları *NEB* ilişkili fenotip ile uyumlu bulundu.

NEB (MIM*161650), 2q23.3 bölgesinde yer alan ve ters zincirden transkribe olan 183 ekzonlu bir gendir. Bu gen, 26.191 bç uzunluğunda ve 8.525 aa’dan oluşan, omurgalılardaki en büyük proteinlerden biri (600 – 900 kDa) olan nebulin proteinini kodlar. *NEB*’in santral bölgesinde 8 ekzonu içeren yaklaşık 8.2 kb’lık bir alan, gen boyunca üç kopya halinde bulunmakta (ekzon 82-89, ekzon 90-97, ekzon 98-105) ve bu alanlar birbirleri ile %99’un üzerinde benzerlik göstermektedir (279). Olgumuzda saptanan c.14911G>A (p.(A4971T)) değişiminin bu triplike alanda yer alması nedeniyle varyantın net olarak hangi ekzonda lokalize olduğu çalışmamız kapsamındaki yöntemler ile net olarak belirlenememiştir; her ne kadar bir doz ölçümü yapabilen bir yöntem olmasa da Sanger dizi analizinde bu heterozigot değişimin amplitüdü değerlendirildiğinde birden fazla alanın amplifiye olduğu çıkarımına varılmıştır (Şekil 4-35, B). *NEB* genindeki patojenik varyantlar, OMIM veritabanında Artrogripozis Multipleks Konjenita tip 6 (MIM#619334) ve OR Nemalin Miyopati tip 2 (MIM#256030) ile ilişkilendirilmiştir.

Nebulin proteini; kasılma ünitesinin anahtar bileşenlerinden biri olup aktin-miyozin etkileşimlerinde, aktin filamanlarının minimum uzunluğunun belirlenmesinde ve kalsiyum duyarlılığı regülasyonunda görev alan bir iskelet kası proteinidir (280, 281). Bir diğer deyiş ile, *NEB* genindeki patojenik varyantlar, fonksiyon kaybına neden olarak protein ekspresyonunun azalması ve ince filamanların uzunluk kontrolünün düzenlenememesi ile sonuçlanır. 200’den fazla aktin monomerini bağlayabilme kapasitesine sahip bu proteinin büyük kısmı, her biri 30-35 rezidülek yedi basit tekrar bölgesinin meydana getirdiği “süper tekrar bölgeleri”nden oluşmaktadır. Her basit tekrar bölgesinde bir adet aktin bağlayıcı SDXXYK motifi, her “süper tekrar” bölgesinde ise bir adet tropomiyozin bağlayıcı

WLKGIGW motifi bulunmaktadır (282, 283). Proteinin hem N- hem de C-terminal uçları kendine özgü domainler içermektedir. C-terminal, sarkomer biriminde yer alan Z diskine sabitlenmiş olup en uç kısımda serinden zengin bir bölgeyi takip eden korunmuş “src homoloji domaini” (SH3) barındırır (284). Bu domain; α -aktinin, miyopalladin, xin, xirp2 ve bir fokal adezyon proteini olan zyxin gibi çok sayıda Z-disk proteini ile etkileşim halindedir (279). Miyopalladin, nebulini Z diskindeki α -aktinin'e bağlarken; C-terminal, iki farklı bölge aracılığıyla ince filaman *capping* proteini CapZ (β -aktinin) molekülünü Z diskine tutturur. Proteinin 163-170 tekrar bölgesi, ara filaman sistem elemanlarından biri olan “desmin” ile etkileşir. Bu etkileşim, bitişik Z-disklerinin lateral organizasyonunda görev alan ara filament sisteminin miyofibrile bağlanmasını sağlar. Nebulin, 185-SH3 tekrar bölgesi ve SH3 domainleri aracılığıyla dev bir kas proteini olan titine ait Zis1 bölgesi ve PEVK segmentleri ile de etkileşim halindedir (279). Proteinin N-terminali ise ince filamanın sivri ucuna yakın pozisyonda yerleşiktir. Buradaki ilk 77 rezidü, glutamik asit kodlayan zengin bir diziyi takip eden ve diğer tekrar bölgelerinden farklı olan M1-M8 tekrarını içermekte ve ince filamandaki tropomodulin ile etkileşime aracılık etmektedir (283). Z disklerinin yapısı ve genişliği, çeşitli kas dokuları ve lif tiplerinde değişkenlik göstermektedir. İnsan nebulin proteinin farklı dokulara özgü birden fazla izoformu mevcut olup bu izoformların embriyolojik gelişim sırasında da önemi olduğu bilinmektedir. Nebulinin bu geniş izoform çeşitliliği, genin 3' ucu ve santral bölgesindeki alternatif kırılma mekanizması ile açıklanmaktadır (284).

HGMD veritabanında, başta nemalin miyopati olmak üzere distal nebulin/nemalin miyopati, kon-rod miyopati, musküler distrofi, FADS/LMPS kliniğine atıf yapan literatür kaydı ile 371 *NEB* varyantı bildirilmiş olup patojenik değişimlerin genin tamamına yayılmış olması ve net bir genotip-fenotip korelasyonunun bulunmaması dikkat çekmektedir (285). Olgumuzda saptanan 15 bazlık duplikasyon, daha önce c.24209_24212dupTGTT (p.L8071Ffs*30) varyantı ile birleşik heterozigot formda olmak üzere, 3 yaşında konjenital nemalin miyopati tanılı bir erkek çocukta bildirilmiştir (198).

Literatürde, *NEB* ilişkili ağır fenotiplerde en erken US bulgusu 11⁺ GH'de gözlenmiş olup bu bulgular kistik higroma, fetal akinezi, kısa kotlar ve cilt ödemi olarak tariflenmiştir (286). Bununla birlikte, olguların yaklaşık yarısında 13. GH'den önce ense kalınlığı artışı/kistik higroma gözlenmemektedir. On iki olguluk *NEB* ilişkili FADS kohortuna dahil edilmiş ve bu grupta ilk trimesterde NT değerleri belirtilmiş yedi olgunun üçünün ölçümü, olgumuza benzer şekilde normal sonuçlanmıştır. Benzer olgularda, prenatal US izleminde konjenital kontraktürler ve ense kalınlığı artışına ek olarak; makrosefali,

polihidramniyos/nadiren oligohidramniyos, hidrops, pulmoner hipoplazi, gebelik haftasına göre düşük doğum ağırlığı, kısa kotlar ve kırılğan/ince tübüler kemikler bildirilmiştir (286-289). Ayrıca, ağır nemalin miyopatinin de FADS fenotipi ile prezante olabildiği düşünüldüğünde, histopatolojik değerlendirme yapılmadığı takdirde, tanısal açıdan hem klinik hem moleküler yöntemlerin yetersiz kalabileceği akılda tutulmalıdır (286).

Olgumuzun literatürde yer alan *NEB* fenotiplerine benzer bazı yüz özelliklerini (hipertelorizm, kısa palpebral fissürler, mikrognati) taşıması ile birlikte daha belirgin fasiyal dismorfizme sahip olması; modifiye edici faktörler, ekspresivite değerşkenliği veya henüz tanısı konulamamış 3. bir antitenin varlığı olasılıklarını akla getirmektedir. Öte yandan, literatürde sınırlı sayıda bulunan *NEB* ilişkili FADS yayınlarında, olguların “dismorfik” olduğu ifade edilmesine rağmen etkilenmiş fetuslara ait klinik fotoğrafların paylaşılmamış olması, bu yönde net bir çıkarım yapmaya engel olmaktadır (286, 290, 291).

Fetusun prenatal takiplerinde izlenen ve *NEB* ilişkili fenotiplerde beklenmeyen kompleks kardiyak anomali; *DNAH9* geninde yerleşik ve daha önce bildirilmemiş birleşik heterozigot konumdaki iki anlamsız varyant ile açıklanmaktadır.

DNAH9 (MIM*603330), 17p12 bölgesinde yer alan ve düz zincirden transkribe olan 69 ekzonlu bir gen olup 13.711 b  uzunluğunda ve 4.486 aa'den oluşan bir polipeptidi kodlar. Aksonemal ağır zincir dinein tip 9 (*DNAH9*) isimli bu protein, bir dış dinein kolu proteindir. Dineinler, myozin ve kinezin içeren mekanokimyasal ATPazlar ailesinin bir  yesi olup aksonemal ve sitoplazmik dinein olmak üzere iki gruba ayrılır. Aksonemal dineinler, ATPaz aktivitesi yardımıyla flagella ve silianın vuruş hareketinde; sitoplazmik dineinler ise yönlendirilmiş hücre hareketi, transport, mitoz bölünme ve hücre polarizasyonunda görev alırlar. Dinein kolları; farklı büyüklüklerdeki ağır, orta ve hafif zincir polipeptidlerin birleşmesiyle oluşur ve moleküler motor fonksiyonu gösterir. Bu birimler merkezi mikrot b lle olan ilişkilerine göre i  ya da dış dinein kolu olarak adlandırılır. İ  ve/veya dış dinein kolu yokluğu/sayıca azalması, radyal veya neksin bağlantı eksikliği, mikrotübül çifti transpozisyonu ve siliyer oryantasyon bozukluğu “primer silier diskinezi (PSD)” adı verilen bir grup kalıtsal siliyer hastalık ile sonuçlanır (292-297). Bu hastalıklarda etyopatogenezin %80'ini total ya da parsiyel dinein kolu yokluğu oluşurmaktadır (298).

Biallelik *DNAH9* varyantları, ilk kez 2018 yılında situs inversus ve/veya kompleks kardiyak anomalisi olan 5 bireyde gösterilmiş; bu olgulardan birinde septooptik displazi, birinde ise hidrosefalinin tabloya eşlik ettiği bildirilmiştir. Diğer PSD-ilişkili genler ile benzer

şekilde, bu çalışmada da saptanan sekiz varyantın yedisinin fonksiyon kaybı ile sonuçlanan anlamsız, çerçeve kayması veya kırılma bölgesi varyantı; birinin ise yanlış anlamlı bir değişim olmakla birlikte evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer aldığı ve anlamsız bir varyant ile birleşik heterozigot formda bulunduğu belirtilmiştir (299). Eş zamanlı yayınlanan bir diğer çalışmada, situs inversus ve rinosinüzit öyküsü olan, üç farklı aileden dört bireyde biallelik *DNAH9* varyantları saptanmış; bir olguda lateralite defektine ek olarak protein kaybettiren enteropati ve kompleks konjenital kalp hastalığı, bir erkek olguda ise infertilite olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, çalışma kapsamında saptanan varyantların tamamının protein düzeylerini belirgin azalttığı veya yok ettiği fonksiyonel olarak gösterilmiştir (300). 2022 yılında, yedisinde lateralite defekti olan sekiz olguluk bir *DNAH9* kohortunda, beş olguda kompleks kalp anomalisi, bir olguda ise VSD ve pulmoner stenoz izlenmiş; ancak diğer çalışmalardan farklı olarak olguların hiçbirinde üst solunum yolu semptomları bildirilmemiştir. Aynı çalışmada, *Dnah9*^{-/-} fare ve zebra balığı modelleri oluşturulmuş, her iki modelde de hidrocefali geliştiği; zebra balığında lateralite defekti olduğu gözlenmiştir. İlginç olarak, fare modelinde sağ-sol patern oluşumunun normal olduğu bildirilmiş; bununla birlikte elektrokardiyografide sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonunun belirgin azalmış olması kardiyak fonksiyonun etkilendiğini ve bu genin kalp gelişimindeki rolünü desteklemiştir. İnsan ve zebra balığından farklı olarak, mutant farede lateralizasyonun normal gelişiminin, fare embriyosunda *Dnah9*'un nodal ekspresyonunun olmaması ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (301). Yakın zamanda, Zhang ve ark. (2022), 27. GH'de yapılan US'de tek ventrikül, pulmoner stenoz, viseral inversiyon ve hafif atriyoventriküler regürjitasyon bulguları olan bir fetusta *DNAH9* ekzon 1–15'i kapsayan 81 kb'lık bir delesyon ve trans konumda c.10975C>T (p.(Q3659*)) değişimini bildirmiş; fetal kardiyak anomalilerde *DNAH9*'un rolünü ve CNV-seq ve TED analizinin birlikte kullanımının prenatal dönemdeki önemini vurgulamıştır (302).

Araştırmamız ile, totalde 19. olmak üzere, fetal dönemde *DNAH9* ilişkili kardiyak fenotipe sahip 2. olgu bildirilmiş ve bu gende iki yeni anlamsız varyant tanımlanmıştır.

NEB varyantlarının çok geniş bir klinik spektrumu olduğu bilinmektedir. Çalışmamız dahilinde LMPS klinik tanılı **Aile MCC #8 – V:5**'in TED analizinde *NEB* geninde homozigot c.22041_22045delAGAAA (p.(I7347fsM*2)) varyantı saptanmıştır.

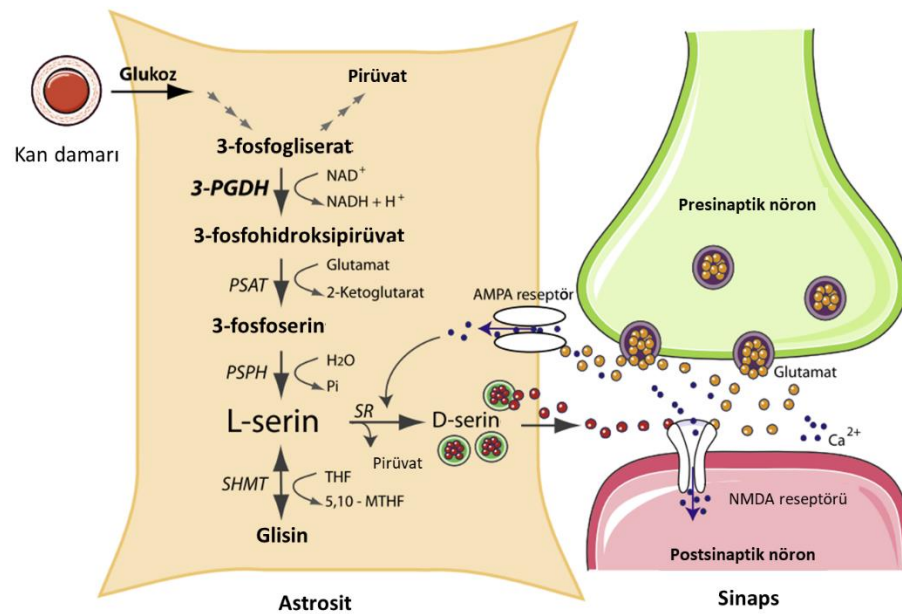
NEB varyantlarının insanda hastalık yapıcı etkisi olduğu ilk kez 1999 yılında nemalin miyopati olgularında tanımlanmıştır. Öte yandan, genin LMPS kliniğinin etyopatogenezindeki

rolü çok daha yakın zamanda gösterilmiş olup literatürde *NEB* ilişkili LMPS tanılı sadece sekiz aile bildirilmiştir. 2014 yılında, 159 ailede saptanmış 212 *NEB* varyantının bildirildiği bir çalışmada üç indeks olgunun LMPS/fetal akinezi bulguları olduğu ifade edilmiş, ancak olguların klinik muayeneleri ve kaçında pterijiyumların tabloya eşlik ettiği belirtilmemiştir. Bu olgularda saptanan tüm varyantların anlamsız veya kırpılma bölgesinde lokalize olması dikkat çekicidir (303). Aynı yıl, 38 olgulu bir MCC kohortuna dahil edilmiş iki olguda *NEB* geninde protein trunkasyonu ile sonuçlanan homozigot c.4858_4866del (p.(A1620_K1622del)) c.9832-1G (p.(Y3278Mfs*22)) varyantları; 2015 yılında 38 FADS/LMPS olgusunun dahil edildiği başka bir çalışmada LMPS tanılı ikiz fetuslarda homozigot c.2920C>T (p.(R974*)) değişimi gösterilmiştir (287, 304). Olgumuzla fenotipik olarak en çok benzerlik gösteren vaka 2017 yılında 18. GH'nda dev kistik higroma, fetal akinezi ve hidrops bulguları ile sonlandırılan fetal olgu olup TED analizinde *NEB* geninde homozigot c.10872+1G>T varyantı saptanmıştır (261). Aynı yıl FADS kliniği olan dört fetusun dahil edildiği bir çalışmada, pterijiyumları olan iki kardeş olguda *NEB* geninde birleşik heterozigot konumda c.18786C>G (p.(Y6262*)) ve c.18981C>G (p.(Y6327*)) değişimleri bildirilmiştir (4).

Çalışmamızda MCC #7 – III:2 ve MCC #8 – V:5 olmak üzere iki ailede biallelik *NEB* varyantları saptanmış; bu olgulardan birinde kontraktürler distale sınırlı iken diğerinde şiddetli LMPS tablosu gözlenmiştir. Saptanan üç varyantın ikisinin daha önce bildirilmemiş olması, farklı varyantların farklı iki fenotiple sonuçlandığının gösterilmesi ve literatürde *NEB* ilişkili LMPS kliniği olan dokuzuncu ailenin tanımlanması ile genotip-fenotip korelasyonuna katkı sağlanması beklenmektedir.

Aile MCC #9 – IV:1'de gerçekleştirilen TED analizinde, *PSAT1* geninde (*phosphoserine aminotransferase 1*) homozigot c.740G>C (p.(S247T)) değişimi ve *VPS13B* geninde (*vacuolar protein sorting 13 homolog B*) homozigot c.3427C>T (p.(R1143*)) değişimi saptandı. *PSAT1* ve *VPS13B* geninde yer alan biallelik patojenik varyantlar sırasıyla Neu-Laxova sendromu tip 2 (NLS2, MIM#616038) ve Cohen sendromu (MIM#216550) ile ilişkilendirilmiştir. Olgumuzda saptanan IUGG, fasiyal dismorfik bulgular, intrauterin başlangıçlı mikrosefali, cilt tutulumu ve eklem kontraktürleri Neu-Laxova; dar eller/ayaklar ve uzun görünen el parmakları ise Cohen sendromu ile uyumlu bulundu. Prenatal US'de izlenen serebellar hipoplazi ve kallozal disgenezi her iki antite dahilinde de bildirilmiş bulgulardır.

PSAT1 (MIM*610936), 9q21.2 bölgesinde yer alan ve düz zincirden transkribe olan 9 ekzonlu bir gen olup 2.206 bç uzunluğunda ve 370 aa'den oluşan bir enzimi kodlamaktadır. Fosfoserin aminotransferaz adı verilen bu enzim, üç aşamada gerçekleşen L-serin biyosentez yolağında görev alır. Yolağın ilk basamağında 3-fosfoglisarat, 3-fosfoglisarat dehidrogenaz (3-PGDH) enziminin katalizlediği bir reaksiyonla 3-fosfohidroksipiruvata; 3-fosfohidroksipiruvat bir sonraki basamakta 3-fosfoserin aminotransferaz (PSAT) enzimi ile 3-fosfoserine dönüştürülür. Üçüncü basamakta fosfoserin fosfataz (PSPH) enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile bu substrattan L-serin sentezi tamamlanır (Şekil 5-2). Bu aminoasitin *de novo* sentezi, SSS gelişimi ve işlevinde etkin bir rol oynamaktadır. Aminoasit/protein sentezi, L-serin türevli lipidler/nükleotid sentezi ve nörotransmitter sentezi için prekürsör görevi gören L-serin, gelişimin farklı evrelerinde gerçekleşen birçok metabolik süreçte kritik öneme sahiptir (305).



Şekil 5-2: Serin biyosentez yolağı

Astrositlerde glikoz molekülünden üç basamakta sentezlenen L-Serin, serin hidroksimetiltransferaz (SHMT) ile glisine veya serin rasemaz (SR) ile D-serine dönüştürülür. Presinaptik nöron tarafından salınan glutamat, postsinaptik nöron üzerindeki etkisinin yanı sıra komşu astrosit üzerindeki glutamat reseptörü için de substrat görevi görür. AMPA aktivasyonu, D-serin sentezi ve salınımı ile sonuçlanır. Ortamda bulunan D-serin, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörünün “glisin bağlama bölgesine” bağlanarak glutamat ile birlikte bu kanalın açılmasını sağlar. 3-PGDH: 3-fosfoglisarat dehidrogenaz (PHGDH), PSAT: fosfoserin aminotransferaz, PSPH: fosfoserin fosfataz, THF: tetrahidrofolat; 5,10-MTHF: 5,10-metilentetrahidrofolat. *Tabatabaie ve ark., (2010) çalışmasından uyarlanmıştır (305).*

L-serin biyosentetik yolağında rolü olan enzimlerin eksikliği “Serin biyosentez kusurları” adı verilen bir grup doğumsal metabolik hastalık ile sonuçlanır. Non-letal serin eksikliği olan olgularda, normalin %12-35’i düzeyinde rezidüel enzim aktivitesi gösterilmesi, bu hastalıklar arasında izlenen belirgin fenotipik varyabilitenin enzim eksikliğinin düzeyi ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (306). Çok nadir görülen bu hastalıklar içerisinde klinik olarak en şiddetli seyreden antite pre/perinatal letal seyreden Neu-Laxova sendromudur (307).

Neu-Laxova sendromu; ağır IUGG, mikrosefali, kutanöz anomaliler ve tipik fasiyal dismorfik bulgular (geriye eğimli alın, hipertelorizm, belirgin gözler, ektropion, deprese burun kemeri, açık ağız, mikrognati, kısa boyun ve düşük yerleşimli dismorfik kulaklar) ile karakterize olan otozomal resesif bir hastalıktır. Mikrosefali, lizensefali, serebellar hipoplazi, kallozal a/disgenezi ve DWM gibi çeşitli SSS anomalileri; değişken derecelerde iktiyozis, el/ayak sırtında ödem ve epidermis altındaki yağ dokusu artışı gibi cilt anomalileri ve fetal akinezi ilişkili eklem kontraktürleri/pterjiyumlar tabloya sıklıkla eşlik etmektedir. Sendrom dahilinde daha nadir olarak bildirilen ek anomaliler; yarı damak/dudak, spina bifida, genitoüriner anomaliler (kriptorşidizm, hipoplastik genitalya, renal agenezi), pulmoner ve gastrik hipoplazi olarak sıralanabilir. Hastalık hemen her zaman pre/perinatal dönemde letal seyretmekle birlikte, literatürde postnatal birkaç aya kadar hayatta kalan olgular bildirilmiştir (308, 309).

Literatürde moleküler tanı 35 NLS ailesi mevcut olup bu ailelerin 18’inde *PSAT1* (%51), 16’sında *PHDGH* (%46) ve 1’inde *PSPH* (%3) mutasyonu gösterilmiş; şimdiye kadar saptanan 25 patojenik varyantın 12’sinin *PSAT1*, 12’sinin *PHDGH* ve 1’inin *PSPH* geninde lokalize olduğu bildirilmiştir (310). Olgumuzda saptanan ve daha önce bildirilmemiş olan *PSAT1* değişiminin ekzonun son bazında lokalize olması nedeniyle yapılan Human Splicing Finder *in-silico* incelemesi, varyantın kırılmayı bozduğunu öngörmekte; bu durum olgudaki klinik bulguların L-serin defektleri spektrumunun şiddetli ucu ile uyumlu olmasını desteklemektedir.

Fetusun TED analizinde, *PSAT1* varyantına ek olarak *VPS13B*’de daha önce Cohen sendromu ile ilişkilendirilmiş ve dur kodonuna yol açan homozigot bir varyant saptanarak olgunun ikinci bir antiteden etkilenmiş olduğu gösterildi. *VPS13B* (MIM*607817), 8q22.2 bölgesinde yer alan ve düz zincirden transkribe olan 62 ekzonlu bir gen olup 14.011 bp uzunluğunda ve 3.997 aa’dan oluşan bir transmembran proteinini kodlamaktadır. *VPS13B*;

golgi aparatının bütünlüğünün ve işlevinin korunması, protein glikozilasyonu ve vezikül aracılı/endozomal transport gibi çeşitli hücresel faaliyetlerde ve göz, hematolojik sistem ve sinir sistemi gelişimi ve fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır. Genin fonksiyonu üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, mutant proteinin Cohen sendromu fenotipine yol açma mekanizması net olarak aydınlatılamamıştır. Literatürde 200'den fazla etkilenmiş olgu ve 150'den fazla *VPS13B* patojenik varyantı bildirilmiş; çalışmamızda saptanan varyant daha önce birden fazla tipik Cohen sendromu kliniğine sahip olguda gösterilmiştir (199, 311, 312).

Cohen sendromu, miyop/retinal distrofi, nötropeni, boy kısalığı, postnatal başlangıçlı mikrosefali, perzistan hipotoni, bilişsel gerilik, trunkal obezite, eklem hiperekstansiyonu, tipik yüz görünümü ve neşeli kişilik yapısıyla karakterize olan OR bir hastalıktır. Olguların büyük bir kısmında sendromun kardinal özelliklerinin okul çağında başlaması ve fasiyal fenotipin yaş ile belirginleşmesi erken tanıyı güçleştirmektedir. Fetal akinezi olguların yaklaşık yarısında, değişken derecelerde dil/motor gerilik olguların hemen hepsinde, neşeli/arkadaş canlısı kişilik yapısı ise olguların büyük bir kısmında tabloya eşlik eder. Etkilenmiş olgularda tipik olarak dar el/ayaklar ve ince parmaklar mevcut olup eşlik eden brakidaktiliye rağmen parmaklar rölatif olarak uzun görünümündedir. Nörolojik açıdan motor inkoordinasyon/sakarlık, canlı derin tendon refleksleri ve musküler hipotoni, yapısal santral sinir sistemi anomalileri (serebellar hipoplazi, atipik büyük korpus kallozum), nöbetler ve patolojik elektroensefalografi (EEG) gibi bulgular bildirilmiştir.

Olgumuzun tipik Neu-Laxova dismorfizmi, Cohen sendromunun yenidoğan döneminde gözlemlenebilecek hafif dismorfik bulgularını maskeleymiş; uzun görünen parmaklar ve dar el/ayaklar ise Cohen sendromu ile uyumlu bulunmuştur. Ayaklardaki *tree-frog* görünümü ve tırnak hipoplazisi iki antitede de beklenmediği için bu bulguların hangi hastalığın atipik prezantasyonu olabileceği net olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, literatürde NLS çok nadir iken Cohen sendromu fenotipinin rölatif sık bildirilmiş olması, bu bulguların NLS ilişkili olma olasılığının daha baskın olduğunu düşündürmektedir.

Bu araştırma kapsamında, dünyada NLS2 tanısı alan 19. olgu bildirilmiş; saptadığımız yeni *PSAT1* patojenik varyantı ile literatürde NLS2 ilişkili *PSAT1* mutasyon sayısı 13'e yükselmiştir. Buna ek olarak, Cohen sendromu ile komplike fenotipe sahip fetusta her iki sendromda da bildirilmemiş akrall bulgular (*tree-frog* görünümü, tırnak hipoplazisi) saptanmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen **Aile MCC #10** – IV:3'te özgün klinik tanı konulamamıştı. Solo-TED analizinde *PIEZO2* geninde saptanan heterozigot c.4958G>C, (p.(R1653P)) varyantı, annenin de bu değişimi taşıması nedeniyle ailevi nadir bir polimorfizm olarak değerlendirildi. Bununla birlikte hem *de novo* hem biallelik *PIEZO2* varyantlarının artrogripozis ile seyreden çeşitli antiteler (DA3 (Gordon sendromu, MIM#114300), DA5 (Okulomelik amyoplazi, MIM#108145), MWS (MIM#248700), Propriyosepsiyon ve dokunma duyusunun bozulduğu distal artrogripozis (DAIPT, MIM#617146)) ile ilişkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda, *PIEZO2*'de TED yöntemi ile belirlenemeyecek bir pozisyonda (promoter bölge, derin intronik vb.) yer alan ikinci bir değişim varlığı da ihtimaller dahilindedir. TED analizi ile kesin tanı koyamadığımız bu olguda öncelikle miyotonik distrofinin dışlanması, daha sonra olgunun TGD açısından değerlendirilmesi planlandı.

Çalışmamız dahilinde distal artrogripozis ve SSS bulguları olan **Aile MCC #11** – VI:4'te gerçekleştirilen solo-TED analizinde ilk aşamada artrogripozis ile ilişkisi bilinen genlerde kliniği açıklayabilecek bir varyant saptanmamıştı. Mevcut bulgular ile ayırıcı tanıda onlarca hastalığın olduğu bilinmekle beraber; kallozal disgenezi, VM, artrogripozis ve kortikal malformasyon şüphesi ile ön planda düşünülen Zain sendromu (MIM#618766), Fowler sendromu (MIM#225790, *SMPD4*-ilişkili nörogelişimsel hastalık (MIM#618622), *SLC6A9*-ilişkili glisin ensefalopatisi (MIM#617301) ve Alkuraya-Kucinskas sendromu (MIM#617822) ilişkili genlerde kapsanmayan bölge olmadığı teyit edildi. Ekzom verisinin tekrar irdelenmesi neticesinde *USP14* geni ekzon 4'te saptanan homozigot c.233_236delTTCC (p.(L78Qfs*11)) değişiminin fenotipten sorumlu olabileceği düşünüldü. Sanger dizi analizi ile benzer etkilenmiş üç fetal olgunun da bu değişimi homozigot, ebeveynlerin heterozigot, sağlıklı kardeşlerin ise yabanıl veya heterozigot formda taşıdığı gösterilerek varyantın aile içinde segregasyonu olduğu gösterildi. Detaylı literatür taraması ile mutant *USP14* veya homologlarını taşıyan maya, HEK293, H4 hücre çalışmaları ve fare modelleri incelendi. *Usp14*-mutant hayvan modellerinde gözlenen bulguların olgularımızın klinikleri ile örtüşmesi ve tarafımızca gerçekleştirilen RT-qPCR sonuçları ile *USP14*'te yer alan homozigot dört bazlık delesyonun fenotipten sorumlu olduğu güçlü şekilde desteklenmiş oldu.

USP14 (MIM*607274), 18p11.3 bölgesinde yer alan ve düz zincirden transkribe olan 16 ekzonlu bir gendir. Bu gen, 4.972 bp uzunluğunda ve 494 aa'den oluşan, ubiquitin-spesifik sistein peptidaz enzimlerinden birini kodlar. Peptidin *Ubiquitin-like (Ubl)* domain'i 26S

proteazom ile etkileşen; USP domain'i ise ubiquitin-protein konjugatları arasındaki izopeptid bağının hidrolizinde görev alan katalitik bölgedir (203, 313).

Ubikitin-spesifik sistein peptidazlar, deubikitine edici enzim (DUB) altında sınıflandırılan özelleşmiş bir enzim ailesidir (314). DUB'lar ubiquitin-proteazom sisteminin (UPS) majör elemanları olup hücresel geri dönüşüm yoluyla serbest ubiquitin düzeylerinin korunmasında işlev görür. Bütün ökaryotik hücrelerin çekirdek ve sitozolünde yer alan UPS, temel olarak katlanamamış veya yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasında görev alarak hücre içi protein dengesinin sürdürülmesini sağlar. Bu ana proteolitik sistem; hücre döngüsü, apoptoz, DNA hasar yanıtı ve tamiri, inflamatuvar yanıt oluşumu gibi birçok yaşamsal biyolojik süreçte de rol oynamaktadır (315). Genel itibariyle DUB'lar, proteolize uğrayacak molekülün 26S proteazoma transloke olmasından önce ubiquitin ve substrat protein arasındaki izopeptid bağının hidrolizini katalizler. Yani, bu enzimler genellikle bozunma sürecinin indükleyicisi iken, ilginç bir şekilde, *Usp14*'ün fasilitatör etkisiyle eş zamanlı olarak UPS'in negatif düzenleyicisi olduğu da deneysel olarak kanıtlanmıştır (316). *USP14*'ün maya homologu olan *Ubp6*'nın fonksiyon kaybında 26S'in proteolitik etkisinin %20-30 artması, benzer şekilde insan böbrek hücrelerinde (HEK293) *USP14* inhibisyonunun proteazomal aktivitenin hızlanması ile sonuçlanması, *USP14*'ün negatif regülatör etkisini ortaya koymuştur (317). Bu deneysel çalışmalar ile inhibitör mekanizmanın daha baskın olduğunun anlaşılması, *USP14*'ü farmakolojik bir hedef haline getirmiş ve bu yönde çalışmaların yoğunlaşmasını sağlamıştır (318). Proteinin katalitik domainin inhibisyonu ile proteazomal aktivasyonunun artırılmasının etyopatogeneizde protein agregatlarının rol aldığı nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüş; ancak *in-vivo* çalışmalar bu hipotezi desteklememiştir. Bu durum, *USP14*'ün protein homeostazisi yollarındaki rolünün dokular arasında değişken olabileceğine işaret etmektedir.

USP14'ün UPS sistemi üzerine pozitif ve negatif regülatör etkisinin dışında dahil olduğu bir başka mekanizma da Akt (serin/treonin bir spesifik protein kinaz) aracılı fosforilasyondur. Fosforillenen, yani aktive olan *USP14*'ün, otofaji-lizozom sisteminin ve proteazomal aktivitenin kontrolünde görev aldığı H4 hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmalar ile de desteklenmiştir (319). Akt sinyal yolağının MCC fenotipleri patofizyolojisindeki rolünün daha önce başka hastalıklarda da gösterilmiş olması, *USP14* ve eklem kontraktürleri arasındaki ilişkide bu sinyal yolağının etkin olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, bir PI3K/Akt aktivatörü olan *ERBB3*'ün biallelik fonksiyon kaybı letal konjenital kontraktür sendromu tip 2 (LCCS2, MIM # 607598) fenotipi ile sonuçlanmaktadır (320). LCCS2'yi

diğer LCCS formlarından ayıran hidrops yokluğu, multipl pterijiyum – kırıkların eşlik etmemesi ve gebeliğin sıklıkla term döneme kadar ilerlemesi, çalışmamıza dahil edilen fetusların fenotipi ile benzerlik göstermektedir. Her üç fetusa olan gebelik de tıbbi tahliye ile sonlandırılmış olmakla birlikte, ailenin daha önce benzer etkilenmiş ve terme yakın doğup postnatal 52. günde eks olan kız çocuklarının varlığı gebelik süresi hakkında fikir vermektedir. Mikrognati, hidronefroz/renal pelviyektazi ve konjenital kalp defektleri diğer ortak bulgular olarak sıralanabilir. LCCS2 için spesifik bir bulgu olan distandü mesane, sıklıkla 3. trimesterden itibaren gözle görünür hale gelmekte; olgularımıza olan gebeliklerin üçünün de 2. trimesterda sonlandırılmış olması, bu bulgu açısından bir karşılaştırma yapılmasını olanaksız kılmaktadır. İki fenotipi ayıran temel klinik özellik kontraktür paterni olup çalışmamıza dahil edilen her üç fetusun da distal artrogripozis bulguları mevcut iken LCCS2’de büyük eklem kontraktürlerinin de tabloya eşlik ettiği bilinmektedir. Bunun dışında, fizik muayene ile fetal olgularımızda ortak gözlenen bir bulgu da kulak dismorfizmi idi. Benzer katlantı paterninin yanı sıra, MCC #11 – VI:3 ve VI:10’da saptanan anterior lobüler çizgilenme ve VI:4’te gözlenen tek taraflı helikal pit varlığının USP14 ilişkili fenotipe eşlik eden nadir minör anomaliler olabileceği düşünüldü.

ER için stres oluşturan katlanmamış proteinlerin klirensi protein homeostazisi için büyük önem taşımaktadır. Protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK) sistemi, ER stresine yanıt olarak translasyonu global olarak kısıtlar. Son zamanlarda, PERK’e benzer şekilde IRE1 α aktivasyonunun da *USP14* ile etkileşerek ER stresini inhibe ettiği gösterilmiştir (321). Bu mekanizma göz önünde bulundurulduğunda, *ERBB3* ve *USP14* fonksiyon kaybı durumunda hücrelerin içinde bulunduğu “yapay ER stresi” nedeniyle protein sentezini durdurabileceği ve proteazom ve otofajinin tetiklenmesine neden olarak nöronal hücre ölümünün gerçekleşebileceği çıkarımına varılabilir. LCCS-2 olgularında saptanan omurilik ön boynuz hücrelerinde jeneralize azalma ve olgularımızdaki SSS bulgularının bir kısmının bu tablo ile açıklanabileceğini düşünüyoruz.

USP14; daha önce bir insan fenotipi ile ilişkilendirilmemiş olması ve literatürde sınırlı sayıda gen-fenotip çalışmalarının varlığı nedeniyle GUS (gene of unknown significance) statüsünde değerlendirilmektedir. Öte yandan, fare çalışmaları ile oluşturulan mutant modellerin olgularımız ile belirgin benzerlik göstermesi, olası klinik prezantasyon hakkında yön gösterici özelliktedir. *Usp14* geni intron 5 yerleşimli hipomorfik bir allel olan *ax^J* mutant C57BL/6J fare modeli (*Usp14^{ax-J}*, *ax^J*) çalışmasında, yabanıl tip *Usp14*-mRNA’nın yaklaşık %95 oranında azaldığı ve immünohistokimyasal analizde SSS’de ubikitine protein agregatları

veya belirgin nöronal hücre kaybı izlenmediği bildirilmiş; bununla birlikte, bu farelerde Purkinje hücre aksonal distrofisi ve hipokampüste sinaptik disfonksiyon geliştiği, korpus kallozumun oluşmadığı, 4-6. haftalar arasında özellikle arka bacaklarda kas kitlesinin belirgin azaldığı ve postnatal 2. ayda eks oldukları gözlenmiştir (202). Çalışmada heterozigot ax^J farelerin fenotipik olarak normal olduğu ifade edilmiştir (200). İleri araştırmalar, homozigot mutant farelerde serbest ubikitin havuzunun azalmasının NMK'daki sinaptik iletiyi bozduğunu ortaya çıkarmıştır. Kuadripedal bir memelinin arka bacaklarının evrimsel olarak insanın alt ekstremitede distalini yansıttığı düşünüldüğünde, olgularımızda saptanan musküler atrofinin alt ekstremitede belirgin olması, kallozal disgenezi, letal seyir ve OR kalıtım paterni fare fenotipi ile örtüşmektedir (202). Ayrıca, MCC etyopatogenezinde en büyük paylardan birini NMK hastalıklarının oluşturduğu göz önünde bulundurulduğunda, mutant farelerde temel patogenezin sinaptik disfonksiyon olduğunun gösterilmesi fetusların eklem bulguları ile uyumlu bulunmuştur. Bir başka fare çalışması BALB/c $Usp14^{nmf375}$ ($nmf375$) modelinde gerçekleştirilmiştir (322). Benzer şekilde, bu modelde de $Usp14$ mRNA düzeyinin %95 azaldığı saptanmış; ancak bu farelerin hafif bir sensorimotor disfonksiyon ile erişkin döneme gelebildikleri gözlenmiştir. Monomerik ubikitin depleksiyonuna bağlı NMK bozukluğu ve motor son plak bulguları ancak 10-12. haftadan sonra ortaya çıkmıştır. $nmf375$ 'in ax^J 'ye kıyasla daha hipomorf bir allel olması, bu beklenmedik klinik varyabilitenin olası bir “genetik arkaplan” farklılığından kaynaklanabileceğini düşündürmüş ve 3. bir model oluşturulmuştur. $C57BL/6J$ ırkında $nmf375$ alleli ile oluşturulmuş bu modelde, $Usp14^{ax-J}$ farelere kıyasla daha düşük ubikitin düzeyleri saptanması ve homozigot mutant modellerin embriyonik dönemde letal seyretme eğiliminde olması, genetik arkaplanın fenotip üzerine etkinliğinin oldukça baskın olduğunu göstermiştir (201).

Saptadığımız c.233_236delTTCC varyantının, USP14 proteinine ait N-terminal 26S bağlanma bölgesi ve C-terminal katalitik domaini tamamen işlevsiz hale getirmesi beklenmektedir. Çerçeve kaymasının etkisiyle meydana gelen erken sonlandırma kodonunun 89 amino asitlik güdük bir protein oluşumuna neden olduğu *in-silico* olarak tespit edildikten sonra, saptadığımız varyantın transkript düzeyinde kantitatif etkisini araştırmak için MCC #11 – VI:10'un annesi (V:5) ile yaş ve cinsiyet uyumlu sağlıklı kontrol bireye ait periferik kan örneğinden elde edilen materyalde allel-spesifik RT-qPCR çalışması gerçekleştirildi. Bu deney sonucunda, tanımladığımız varyantın “NMD (*nonsense-mediated decay*) mekanizmasından kaçış” kurallarına uymamasına rağmen, heterozigot bireyin lökositlerinde mutant ve yabancıl tip USP14 mRNA'nın eşit oranda ifade edildiği gözlemlendi (323). Mutant

transkriptin aberran bir peptid oluşumuna neden olup olmadığı bu deney ile kesin olarak belirlenememekle birlikte, delesyonlu transkriptin ortadan kaldırılamamasının hücre üzerinde ekstra bir toksik etki oluşturması beklenen bir durumdur.

Model organizmalarda Usp14 kaybına sekonder gelişen hücre içi olaylar ve/veya klinik prezantasyonun, çalışmamıza dahil edilen fetal olguların klinik ve moleküler sonuçları ile örtüşmesi, *USP14* genindeki homozigot bir çerçeve kayması varyantının intrauterin başlangıçlı distal artrogripozis, kas atrofisi ve SSS tutulumu ile seyreden yeni bir insan fenotipine neden olduğunu desteklemektedir. Zamanla, USP14-ilişkili benzer etkilenmiş başka olguların bildirilmesi ve destekleyici deneysel kanıtların artması ile genin insan fenotipindeki yerinin netleşmesi ve GUS statüsünden çıkması beklenmektedir.

Bu tez çalışmasında, intrauterin başlangıçlı çoklu konjenital kontraktürleri olan 15 fetal olgunun detaylı klinik bulguları ve kohort dahilinde indeks olarak değerlendirilen 11 olgunun TED analizi sonuçları sunulmuştur. Elde edilen veriler genotip-fenotip korelasyonu yapılarak yorumlanmıştır. Çalışmamızda TED analizinin tanı başarısı 9/11 olarak hesaplanmış; ek incelemeler ile dokuz farklı aileden 13 fetusta etiyolojiyi açıklayabileceği düşünülen moleküler bir sonuç elde edilmiştir. İnsanda MCC ilişkili yeni bir genin de tanımlandığı bu çalışma, intrauterin kontraktürler ile seyreden sendromların ayırıcı tanısında TED analizinin katkısını bir kez daha gözler önüne sermiştir.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamız kapsamında; gros ve submikroskopik kromozom anomalileri dışlanmış, prenatal US ve postmortem fizik muayene bulguları letal MCC fenotipleri ile uyumlu olan fetuslarda moleküler genetik etiyojinin TED analizi ile belirlenmesi, nadir fenotiplerin genotip-fenotip ilişkisine katkı sağlanması, klinik bulguları açıklayabilecek bir varyant saptanamayan olgularda ise olası aday genlerin araştırılması amaçlandı.
2. Araştırmamıza 11 aileden 15 fetal olgu dahil edildi. Bu olguların %40'ı dişi, %60'ı erkekti. Grubumuzda akraba evliliği oranı %72,7 olup 11 aileden 4'ünün en az iki benzer etkilenmiş gebelik ürünü öyküsü mevcuttu. Konsepsiyon sırasında ortalama anne yaşı 27,6 olarak hesaplandı.
3. Gebelik takipleri sırasında ilk patolojik US bulgusu ortalama 20. GH'de; fetal akinezi/artrogripozis bulguları ise ortalama 22. GH'de gözlemlendi. En erken sonografik bulgu 11-14 GH'de NT artışı (%62,5); MCC'ye eşlik eden en sık ek majör anomali santral sinir sistemi malformasyonları (n=10, %66,6) idi. Teorik olarak olguların %100'ünde saptanması beklenen fetal hareket azlığı olguların sadece %40'ında kaydedildi. Postmortem fetal değerlendirme ortalama 25. GH'de gerçekleştirildi ve muayene ile US'de saptanan malformasyonlara ek olarak genital hipoplazi (%20), yarı damak (%20), femur fraktürü (%6,6) ve tübüler kemiklerde hafif *bowing* (%6,6) saptandı. US ile değerlendirilmesi mümkün olmayan tırnak hipoplazisi ve fasiyal dismorfik bulgular sırasıyla %6,6 ve %100 oranında izlendi.
4. Çalışma grubumuzda TED çalışmaları ile 11 ailenin 9'unda tanınal genetik varyant saptandı. 11 farklı gende (*HSPG2*, *COG6*, *DOK7*, *RAPSN*, *KIAA1109*, *NEB*, *PSAT1*, *DNAH9*, *VPS13B*, *USH2A*, *USP14*), 9'u ilk kez bu çalışmada gösterilen *novel* nitelikteki değişimler olmak üzere, hastalık ilişkili veya ilişkili olduğu düşünülen toplam 15 varyant tanımlandı. Bu varyantların 6'sı yanlış anlamlı, 5'i anlamsız, 4'ü ise küçük delesyon/insersiyon tipinde idi.
5. Araştırmamızda TED analizinin tanıdaki rolü %81,8 olarak hesaplanmış olup literatür verilerinin üzerinde bir başarı elde edilmiştir. Bu durum letal seyirli MCC fenotiplerinde genetik etiopatogenezin baskın olması ve titiz olgu seçim kriterlerimiz ile açıklanabilir. Ayrıca beş indeks olguda saptadığımız sorumlu genlerin fenotip ile ilişkisinin 2010 yılından sonra gösterilmiş olması, test verimliliğinde zamanlama faktörünün de önemini vurgulamıştır.

6. Bilinen genlerde kliniği açıklayabilecek bir varyantın saptanmadığı bir ailede, *USP14*'te yer alan çerçeve kayması varyantının, fonksiyonel çalışmalar ile fetal olgulardaki klinik bulguları açıkladığı güçlü biçimde desteklenmiş; *USP14* varyantlarının insandaki fenotipik manifestasyonu ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. SSS malformasyonları ve distal artrogripozisle seyreden bu yeni OR letal fenotipin *USP14* ile ilişkisi yakın zamanda tarafımızca yayınlanmış ve uluslararası literatürde yerini almıştır.
7. Çalışmamızda TED analizi ile ultra nadir ve nadir MCC fenotiplerinin tanısı konulmuş ve bu antiteler ile ilişkili yeni klinik bulgular tanımlanarak klinik spektrum genişletilmiştir. Ayrıca olguların detaylı klinik ve moleküler verileri birlikte değerlendirilerek genotip-fenotip korelasyonu açısından da katkı sağlanmıştır.
8. 2 olguda hastalığın moleküler etyopatogenezi TED analizi ile aydınlatılamamıştır. Bu durum fenotipten sorumlu genin henüz tanımlanmamış olma ihtimali, mozaicism olasılığı, kopya sayısı değişiklikleri veya dinamik mutasyonların varlığı, sorumlu varyantın TED ile saptanamayacak bölgelerde yer alması (promoter, derin intronik bölgeler vb.) gibi faktörlere bağlı olabilir. Bir sonraki aşamada özgün ön tanısı olmayan bu olgularda öncelikle miyotonik distrofinin dışlanması, daha sonra tüm genom dizi analizi açısından değerlendirilmesi planlanmıştır.
9. 11 indeks olgunun moleküler sonuçları primer etiyolojik açıdan sınıflandırıldığında kohortun %37'sinde; genlerin ikincil fonksiyonları etiyolojik sınıflamaya dahil edildiğinde ise %45'inde nöromusküler sinaptogenez, sinaptik transmisyon veya NMJ gelişimi/fonksiyonunda görev alan genlerin saptanması dikkat çekmiştir. Sinaptopatilerin çalışma grubumuzun yaklaşık yarısını oluşturması, literatür verilerine kıyasla bir hayli yüksek görünmektedir. Bu durum, MCC ilişkili genlerin kompleks fonksiyonlarının anlaşılması ile bazı hastalıkların birden fazla etiyolojik sınıfa dahil olduğunun ortaya çıkması ve OR kalıtım gösteren sinaptopatilerin toplum sıklıklarının coğrafi konuma göre değişkenlik göstermesi ile açıklanabilir.
10. MCC kohortlarında YND teknolojilerinin tanısal etkinliğini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup bu çalışmaların hiçbirinde pre/postnatal vaka ayrımı yapılmamıştır. Çalışmamız, literatürde letal MCC fenotiplerinin tanısında TED analizinin etkinliğinin gösterildiği ilk çalışma olduğu için bilimsel katkısı yüksek veriler elde edilmiştir.
11. Literatürde MCC etyolojisinde yer alan tek gen hastalıklarında her türlü Mendeliyen kalıtım bildirilmiş olmakla birlikte olgularımızda klinik fenotipten sorumlu olduğunu

tespit ettiğimiz varyantların tamamı OR hastalıklara neden olmaktadır. Bu durum letal seyreden grupta OR hastalıkların sık gözlenmesi ve bununla paralel olarak ülkemizdeki görece yüksek akraba evliliği oranları (%21,3) ile uyumlu bulunmuştur.

12. Kohortumuzda harman fenotiplerin sıklığı %27 olup literatür verilerinin çok üzerinde bir oran gözlenmiştir. 3 indeks olguda *DNAH9*, *VPS13B* ve *USH2A* genlerinde ikisi *novel* nitelikte dört farklı patojenik varyant saptanmış ve olguların MCC'den bağımsız ikinci bir hastalıktan etkilendiği ortaya konmuştur. Ancak bu veriler kohortumuzun küçük olmasının yanında dahil edilen ailelerde akraba evliliği sıklığının toplum ortalamasının üzerinde olması nedeniyle yanıltıcı bir oranı yansıtır olabilir. Bununla birlikte, harman fenotiplerin literatürdeki sıklığı da göz önünde bulundurulduğunda analizler sırasında kliniği açıklayıcı bir patojenik varyantın saptanması durumunda dahi ekzom verisinin kapsamlı şekilde analiz edilmesinin önemi anlaşılmaktadır.
13. Çalışmamızda, HGMD/Clinvar'da bildirilmiş veya ACMG kriterlerine göre patojenik varyantları içeren taşıyıcılık analizi yapıldığında birey başına patojenik allel oranı 0,9 olarak hesaplanmış; literatürle uyumlu bir veri elde edilmiştir. Aile öyküsünde sağırılık bulunmayan iki bağımsız fetusun, Türk popülasyon çalışmalarında taşıyıcılık sıklığı %1,17 olarak bildirilen *GJB2* – c.35delG varyantını heterozigot formda taşıması dikkat çekmiştir.
14. MCC bulguları olan olgularda gerçekleştirilen TED araştırmaları, son yıllarda artan bir ivmeyle yeni gen-fenotip ilişkilerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca, güncel literatürde çok sayıda model organizma çalışmalarından elde edilen veriler, insan fenotipi henüz gösterilememiş yeni genlerin varlığına işaret etmektedir. Bu bilgiler ışığında, çalışmamıza benzer araştırmaların artışı ile MCC ilişkili daha birçok aday genin, yolakların ve mekanizmaların keşfedileceği öngörülebilir.

KAYNAKLAR

1. Filges I, Hall JG. Failure to identify antenatal multiple congenital contractures and fetal akinesia--proposal of guidelines to improve diagnosis. *Prenat Diagn* 2013;33(1):61-74.
2. Niles KM, Blaser S, Shannon P, Chitayat D. Fetal arthrogryposis multiplex congenita/fetal akinesia deformation sequence (FADS)-Aetiology, diagnosis, and management. *Prenat Diagn* 2019;39(9):720-31.
3. de Vries JI, Fong BF. Changes in fetal motility as a result of congenital disorders: an overview. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29(5):590-9.
4. Ahmed AA, Skaria P, Safina NP, Thiffault I, Kats A, Taboada E, et al. Arthrogryposis and pterygia as lethal end manifestations of genetically defined congenital myopathies. *Am J Med Genet A* 2018;176(2):359-67.
5. Skaria P, Dahl A, Ahmed A. Arthrogryposis multiplex congenita in utero: radiologic and pathologic findings. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019;32(3):502-11.
6. Kowalczyk B, Felus J. Arthrogryposis: an update on clinical aspects, etiology, and treatment strategies. *Arch Med Sci* 2016;12(1):10-24.
7. Hall JG. Arthrogryposis (multiple congenital contractures): diagnostic approach to etiology, classification, genetics, and general principles. *Eur J Med Genet* 2014;57(8):464-72.
8. Hall JG. Pena-Shokeir phenotype (fetal akinesia deformation sequence) revisited. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009;85(8):677-94.
9. Laquerriere A, Jaber D, Abiusi E, Maluenda J, Mejlachowicz D, Vivanti A, et al. Phenotypic spectrum and genomics of undiagnosed arthrogryposis multiplex congenita. *J Med Genet* 2021.
10. Hall JG, Kimber E, Dieterich K. Classification of arthrogryposis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2019;181(3):300-3.
11. Beecroft SJ, Lombard M, Mowat D, McLean C, Cairns A, Davis M, et al. Genetics of neuromuscular fetal akinesia in the genomics era. *J Med Genet* 2018;55(8):505-14.
12. Pergande M, Motameny S, Ozdemir O, Kreutzer M, Wang H, Daimaguler HS, et al. The genomic and clinical landscape of fetal akinesia. *Genet Med* 2020;22(3):511-23.
13. Pehlivan D, Bayram Y, Gunes N, Coban Akdemir Z, Shukla A, Bierhals T, et al. The Genomics of Arthrogryposis, a Complex Trait: Candidate Genes and Further Evidence for Oligogenic Inheritance. *Am J Hum Genet* 2019;105(1):132-50.
14. Ravenscroft G, Clayton JS, Faiz F, Sivadorai P, Milnes D, Cincotta R, et al. Neurogenetic fetal akinesia and arthrogryposis: genetics, expanding genotype-phenotypes and functional genomics. *J Med Genet* 2021;58(9):609-18.
15. Kiefer J, Hall JG. Gene ontology analysis of arthrogryposis (multiple congenital contractures). *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2019;181(3):310-26.
16. Filges I, Tercanli S, Hall JG. Fetal arthrogryposis: Challenges and perspectives for prenatal detection and management. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2019;181(3):327-36.

17. Otto AW. A human monster with inwardly curved extremities (the classic) *Journal of Pediatric Orthopaedics* 1985;5(5):625.
18. Hall JG, Reed SD, Driscoll EP. Part I. Amyoplasia: a common, sporadic condition with congenital contractures. *Am J Med Genet* 1983;15(4):571-90.
19. Drachman DB, Coulombre AJ. Experimental clubfoot and arthrogryposis multiplex congenita. *Lancet* 1962;2(7255):523-6.
20. Moessinger AC. Fetal akinesia deformation sequence: an animal model. *Pediatrics* 1983;72(6):857-63.
21. Banker BQ. Arthrogryposis multiplex congenita: spectrum of pathologic changes. *Hum Pathol* 1986;17(7):656-72.
22. Hall JG. Genetic aspects of arthrogryposis. *Clin Orthop Relat Res* 1985(194):44-53.
23. Hall JG. Diagnostic approaches and prognosis in arthrogryposis (congenital contractures). *Pathologica* 1986;78(1058):701-8.
24. Gordon EC. Arthrogryposis multiplex congenita, AD 1156. *Dev Med Child Neurol* 1996;38(1):80-3.
25. Staheli LT, Hall JG, Jaffe KM, Paholke DO. *Arthrogryposis: a text atlas*: Cambridge university press; 1998.
26. Otto A. Monstrum himanum extremitatibus incurvatus. Monstrorum sexcentorum descriptio anatomica in Vratislaviae Museum: Anatomico-Pathologium Breslau 1841. *Clinical orthopaedics and related research* 1985;321-2.
27. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*: Wolters Kluwer; 2018.
28. Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* 2003;113(2):235-48.
29. Hutcheson DA, Zhao J, Merrell A, Halder M, Kardon G. Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin. *Genes Dev* 2009;23(8):997-1013.
30. Murray PD, Drachman DB. The role of movement in the development of joints and related structures: the head and neck in the chick embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1969;22(3):349-71.
31. Pena SD, Shokeir M. Syndrome of camptodactyly, multiple ankyloses, facial anomalies, and pulmonary hypoplasia: a lethal condition. *The Journal of pediatrics* 1974;85(3):373-5.
32. Piontelli A. *Conclusions: Movement is Life*. 1st ed. ed: Springer-Verlag Mailand; 2010. 107-13 p.
33. Luchinger AB, Hadders-Algra M, van Kan CM, de Vries JJ. Fetal onset of general movements. *Pediatr Res* 2008;63(2):191-5.
34. Ruano-Gil D, Nardi-Villardaga J, Teixidor-Johe A. Embryonic mobility and joint development. *Folia Morphol (Praha)* 1980;28(3):221-3.
35. Kahn J, Schwartz Y, Blitz E, Krief S, Sharir A, Breitel DA, et al. Muscle contraction is necessary to maintain joint progenitor cell fate. *Developmental cell* 2009;16(5):734-43.

36. Nowlan NC, Bourdon C, Dumas G, Tajbakhsh S, Prendergast PJ, Murphy P. Developing bones are differentially affected by compromised skeletal muscle formation. *Bone* 2010;46(5):1275-85.
37. Baguma-Nibasheka M, Gugic D, Saraga-Babic M, Kablar B. Role of skeletal muscle in lung development. 2012.
38. Laitinen O, Hirvensalo M. Arthrogryposis multiplex congenita. *Ann Paediatr Fenn* 1966;12(2):133-8.
39. Wynne-Davies R, Lloyd-Roberts GC. Arthrogryposis multiplex congenita. Search for prenatal factors in 66 sporadic cases. *Arch Dis Child* 1976;51(8):618-23.
40. Silberstein EP, Kakulas BA. Arthrogryposis multiplex congenita in Western Australia. *J Paediatr Child Health* 1998;34(6):518-23.
41. Darin N, Kimber E, Kroksmark AK, Tulinius M. Multiple congenital contractures: birth prevalence, etiology, and outcome. *J Pediatr* 2002;140(1):61-7.
42. Vuopala K, Herva R. Lethal congenital contracture syndrome: further delineation and genetic aspects. *J Med Genet* 1994;31(7):521-7.
43. Pakkasjarvi N, Ritvanen A, Herva R, Peltonen L, Kestila M, Ignatius J. Lethal congenital contracture syndrome (LCCS) and other lethal arthrogryposes in Finland--an epidemiological study. *Am J Med Genet A* 2006;140A(17):1834-9.
44. Lowry RB, Sibbald B, Bedard T, Hall JG. Prevalence of multiple congenital contractures including arthrogryposis multiplex congenita in Alberta, Canada, and a strategy for classification and coding. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88(12):1057-61.
45. Hall JG, Kimber E, van Bosse HJP. Genetics and Classifications. *J Pediatr Orthop* 2017;37 Suppl 1S4-S8.
46. Mennen U. Arthrogryposis multiplex congenita: functional classification and the AMC disc-o-gram. *J Hand Surg Br* 2004;29(4):363-7.
47. Aroojis AJ, King MM, Donohoe M, Riddle EC, Kumar SJ. Congenital vertical talus in arthrogryposis and other contractural syndromes. *Clin Orthop Relat Res* 2005(434):26-32.
48. Hall JG. Arthrogryposis multiplex congenita: etiology, genetics, classification, diagnostic approach, and general aspects. *J Pediatr Orthop B* 1997;6(3):159-66.
49. Sung SS, Brassington AM, Grannatt K, Rutherford A, Whitby FG, Krakowiak PA, et al. Mutations in genes encoding fast-twitch contractile proteins cause distal arthrogryposis syndromes. *Am J Hum Genet* 2003;72(3):681-90.
50. Lawal TA, Todd JJ, Witherspoon JW, Bonnemann CG, Dowling JJ, Hamilton SL, et al. Ryanodine receptor 1-related disorders: an historical perspective and proposal for a unified nomenclature. *Skelet Muscle* 2020;10(1):32.
51. Brislin RP, Theroux MC. Core myopathies and malignant hyperthermia susceptibility: a review. *Paediatr Anaesth* 2013;23(9):834-41.
52. Rosenberg H, Sambuughin N, Riazi S, Dirksen R. Malignant Hyperthermia Susceptibility. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)1993.

53. Storbeck M, Horsberg Eriksen B, Unger A, Holker I, Aukrust I, Martinez-Carrera LA, et al. Phenotypic extremes of BICD2-opathies: from lethal, congenital muscular atrophy with arthrogryposis to asymptomatic with subclinical features. *Eur J Hum Genet* 2017;25(9):1040-8.
54. Bonnemann CG, Wang CH, Quijano-Roy S, Deconinck N, Bertini E, Ferreiro A, et al. Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2014;24(4):289-311.
55. Adam S, Coetzee M, Honey EM. Pena-Shokeir syndrome: current management strategies and palliative care. *Appl Clin Genet* 2018;11111-20.
56. Banker BQ. Neuropathologic aspects of arthrogryposis multiplex congenita. *Clin Orthop Relat Res* 1985(194):30-43.
57. Grotto S, Cuisset J-M, Marret S, Drunat S, Faure P, Audebert-Bellanger S, et al. Type 0 spinal muscular atrophy: further delineation of prenatal and postnatal features in 16 patients. *Journal of neuromuscular diseases* 2016;3(4):487-95.
58. Michalk A, Stricker S, Becker J, Rupps R, Pantzar T, Miertus J, et al. Acetylcholine receptor pathway mutations explain various fetal akinesia deformation sequence disorders. *Am J Hum Genet* 2008;82(2):464-76.
59. Ravenscroft G, Sollis E, Charles AK, North KN, Baynam G, Laing NG. Fetal akinesia: review of the genetics of the neuromuscular causes. *J Med Genet* 2011;48(12):793-801.
60. Zou Y, Donkervoort S, Salo AM, Foley AR, Barnes AM, Hu Y, et al. P4HA1 mutations cause a unique congenital disorder of connective tissue involving tendon, bone, muscle and the eye. *Hum Mol Genet* 2017;26(12):2207-17.
61. Midelfart Hoff J, Midelfart A. Maternal myasthenia gravis: a cause for arthrogryposis multiplex congenita. *J Child Orthop* 2015;9(6):433-5.
62. Paria P, Halder RC, Ghosh S. Arthrogryposis multiplex congenita: a rare association of infant of diabetic mother. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences* 2015;412610+.
63. Rudnik-Schöneborn S, Zerres K. Outcome in pregnancies complicated by myotonic dystrophy: a study of 31 patients and review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;114(1):44-53.
64. Livingstone IR, Sack GH. Arthrogryposis multiplex congenita occurring with maternal multiple sclerosis. *Archives of neurology* 1984;41(11):1216-7.
65. Riemersma S, Vincent A, Beeson D, Newland C, Hawke S, Vernet-der Garabedian B, et al. Association of arthrogryposis multiplex congenita with maternal antibodies inhibiting fetal acetylcholine receptor function. *J Clin Invest* 1996;98(10):2358-63.
66. Hall JG, Reed SD. Teratogens associated with congenital contractures in humans and in animals. *Teratology* 1982;25(2):173-91.
67. Melo AS, Aguiar RS, Amorim MM, Arruda MB, Melo FO, Ribeiro ST, et al. Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. *JAMA Neurol* 2016;73(12):1407-16.

68. Pashaei Z, SeyedAlinaghi S, Qaderi K, Barzegary A, Karimi A, Mirghaderi SP, et al. Prenatal and neonatal complications of COVID-19: A systematic review. *Health Sci Rep* 2022;5(2):e510.
69. Hall J, Vincent, A. Infantile Hypotonia and Arthrogryposis. In: Darras BT, Jones Jr HR, Ryan MM, Darryl C, editors. *Neuromuscular disorders of infancy, childhood, and adolescence: a clinician's approach*. 2nd ed: Elsevier; 2014.
70. Hall JG, Aldinger KA, Tanaka KI. Amyoplasia revisited. *Am J Med Genet A* 2014;164A(3):700-30.
71. Brás R, Veloso H, Moleiro M, Rodrigues S, Inocencio G, Mota C, et al. Arthrogryposis multiplex congenita affecting a monochorionic diamniotic twin pregnancy. *Nascer E Crescer-Birth and Growth Medical Journal* 2018;27(4):253-7.
72. Hall J, Reed S, Greene G. The distal arthrogryposes: delineation of new entities—review and nosologic discussion. *American journal of medical genetics* 1982;11(2):185-239.
73. Bamshad M, Jorde LB, Carey JC. A revised and extended classification of the distal arthrogryposes. *American journal of medical genetics* 1996;65(4):277-81.
74. Hall JG. Arthrogryposes (Multiple congenital contractures). In: Rimoin DL, Pyeritz RE, Korf B, editors. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. sixth ed. New York: Churchill Livingstone: Elsevier Science; 2013.
75. Hall JG, Kiefer J. Arthrogryposis as a Syndrome: Gene Ontology Analysis. *Mol Syndromol* 2016;7(3):101-9.
76. McMillin MJ, Beck AE, Chong JX, Shively KM, Buckingham KJ, Gildersleeve HI, et al. Mutations in *PIEZO2* cause Gordon syndrome, Marden-Walker syndrome, and distal arthrogryposis type 5. *Am J Hum Genet* 2014;94(5):734-44.
77. Kloth K, Neu A, Rau I, Hulsemann W, Kutsche K, Volk AE. Severe congenital contractural arachnodactyly caused by biallelic pathogenic variants in *FBN2*. *Eur J Med Genet* 2021;64(3):104161.
78. Wong V. The spectrum of arthrogryposis in 33 chinese children. *Brain Dev* 1997;19(3):187-96.
79. Kurjak A, Carrera J, Medic M, Azumendi G, Andonotopo W, Stanojevic M. The antenatal development of fetal behavioral patterns assessed by four-dimensional sonography. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005;17(6):401-16.
80. Newman PG, Rozycki GS. The history of ultrasound. *Surg Clin North Am* 1998;78(2):179-95.
81. Salomon LJ, Alfirevic Z, Bilardo CM, Chalouhi GE, Ghi T, Kagan KO, et al. ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41(1):102-13.
82. Rossi AC, Prefumo F. Accuracy of ultrasonography at 11-14 weeks of gestation for detection of fetal structural anomalies: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2013;122(6):1160-7.
83. Kenkhuis MJA, Bakker M, Bardi F, Fontanella F, Bakker MK, Fleurke-Rozema JH, et al. Effectiveness of 12-13-week scan for early diagnosis of fetal congenital anomalies in the cell-free DNA era. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018;51(4):463-9.

84. Dicke JM, Piper SL, Goldfarb CA. The utility of ultrasound for the detection of fetal limb abnormalities--a 20-year single-center experience. *Prenat Diagn* 2015;35(4):348-53.
85. Liao YM, Li SL, Luo GY, Wen HX, Ouyang SY, Chen CY, et al. Routine screening for fetal limb abnormalities in the first trimester. *Prenat Diagn* 2016;36(2):117-26.
86. Edwards L, Hui L. First and second trimester screening for fetal structural anomalies. *Semin Fetal Neonatal Med* 2018;23(2):102-11.
87. Nowlan NC. Biomechanics of foetal movement. *Eur Cell Mater* 2015;291-21; discussion
88. Tjon JK, Tan-Sindhunata GM, Bugiani M, Witbreuk MM, van der Sluijs JA, Weiss MM, et al. Fetal akinesia deformation sequence, arthrogryposis multiplex congenita, and bilateral clubfeet: Is motor assessment of additional value for in utero diagnosis? A 10-year cohort study. *Prenat Diagn* 2019;39(3):219-31.
89. de Vries JI, Fong BF. Normal fetal motility: an overview. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006;27(6):701-11.
90. Dimitraki M, Tsikouras P, Bouchlariotou S, Dafopoulos A, Konstantou E, Liberis V. Prenatal assessment of arthrogryposis. A review of the literature. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24(1):32-6.
91. Lin IW, Chueh HY, Chang SD, Cheng PJ. The application of three-dimensional ultrasonography in the prenatal diagnosis of arthrogryposis. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2008;47(1):75-8.
92. Vimercati A, Scioscia M, Burattini MG, Pontrelli G, Selvaggi LE. Prenatal diagnosis of Freeman-Sheldon syndrome and usefulness of an ultrasound fetal lip width normogram. *Prenat Diagn* 2006;26(8):679-83.
93. Smith FW, Adam AH, Phillips WD. NMR imaging in pregnancy. *Lancet* 1983;1(8314-5):61-2.
94. Nemec SF, Hoftberger R, Nemec U, Bettelheim D, Brugger PC, Kasprian G, et al. Fetal akinesia and associated abnormalities on prenatal MRI. *Prenat Diagn* 2011;31(5):484-90.
95. Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet* 2019;393(10173):747-57.
96. Petrovski S, Aggarwal V, Giordano JL, Stosic M, Wou K, Bier L, et al. Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet* 2019;393(10173):758-67.
97. Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL. Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias. *Genet Med* 2009;11(2):127-33.
98. Baumann M, Steichen-Gersdorf E, Krabichler B, Muller T, Janecke AR. A recognizable type of syndromic short stature with arthrogryposis caused by bi-allelic SEMA3A loss-of-function variants. *Clin Genet* 2017;92(1):86-90.
99. Hegde SS, Shetty MS, Rama Murthy BS. Freeman-Sheldon syndrome--prenatal and postnatal diagnosis. *Indian J Pediatr* 2010;77(2):196-7.

100. Venkata Mahipathy SRR, Durairaj AR, Sundaramurthy N, Ramachandran M. Popliteal pterygium syndrome: A rare syndrome. *Indian J Plast Surg* 2018;51(2):248-50.
101. Dieterich K, Quijano-Roy S, Monnier N, Zhou J, Faure J, Smirnow DA, et al. The neuronal endopeptidase ECEL1 is associated with a distinct form of recessive distal arthrogryposis. *Hum Mol Genet* 2013;22(8):1483-92.
102. Russell B, Johnston JJ, Biesecker LG, Kramer N, Pickart A, Rhead W, et al. Clinical management of patients with ASXL1 mutations and Bohring-Opitz syndrome, emphasizing the need for Wilms tumor surveillance. *Am J Med Genet A* 2015;167A(9):2122-31.
103. Allanson JE, Cunniff C, Hoyme HE, McGaughan J, Muenke M, Neri G. Elements of morphology: standard terminology for the head and face. *Am J Med Genet A* 2009;149A(1):6-28.
104. Biesecker LG, Aase JM, Clericuzio C, Gurrieri F, Temple IK, Toriello H. Elements of morphology: standard terminology for the hands and feet. *Am J Med Genet A* 2009;149A(1):93-127.
105. Carey JC, Cohen MM, Jr., Curry CJ, Devriendt K, Holmes LB, Verloes A. Elements of morphology: standard terminology for the lips, mouth, and oral region. *Am J Med Genet A* 2009;149A(1):77-92.
106. Hall BD, Graham JM, Jr., Cassidy SB, Opitz JM. Elements of morphology: standard terminology for the periorbital region. *Am J Med Genet A* 2009;149A(1):29-39.
107. Hennekam RC, Allanson JE, Biesecker LG, Carey JC, Opitz JM, Vilain E. Elements of morphology: standard terminology for the external genitalia. *Am J Med Genet A* 2013;161A(6):1238-63.
108. Calder AD, Offiah AC. Foetal radiography for suspected skeletal dysplasia: technique, normal appearances, diagnostic approach. *Pediatr Radiol* 2015;45(4):536-48.
109. Shruthi M, Gupta N, Jana M, Mridha AR, Kumar A, Agarwal R, et al. Conventional vs virtual autopsy with postmortem MRI in phenotypic characterization of stillbirths and fetal malformations. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018;51(2):236-45.
110. Lombardi S, Scola E, Ippolito D, Zambelli V, Botta G, Cuttin S, et al. Micro-computed tomography: a new diagnostic tool in postmortem assessment of brain anatomy in small fetuses. *Neuroradiology* 2019;61(7):737-46.
111. Boyd PA, Tondi F, Hicks NR, Chamberlain PF. Autopsy after termination of pregnancy for fetal anomaly: retrospective cohort study. *BMJ* 2004;328(7432):137.
112. Manton N. Skeletal Muscle and Peripheral Nerves. Keeling's fetal and neonatal pathology. New York: Springer; 2015. p. 767-85.
113. Laubscher B, Janzer RC, Krahenbuhl S, Hirt L, Deonna T. Ragged-red fibers and complex I deficiency in a neonate with arthrogryposis congenita. *Pediatr Neurol* 1997;17(3):249-51.
114. Dieterich K, Le Tanno P, Kimber E, Jouk PS, Hall J, Giampietro P. The diagnostic workup in a patient with AMC: Overview of the clinical evaluation and paraclinical analyses with review of the literature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2019;181(3):337-44.

115. Nayak SS, Kadavigere R, Mathew M, Kumar P, Hall JG, Girisha KM. Fetal akinesia deformation sequence: expanding the phenotypic spectrum. *Am J Med Genet A* 2014;164A(10):2643-8.
116. Fardeau M, Desguerre I. Diagnostic workup for neuromuscular diseases. *Handbook of clinical neurology* 2013;113:1291-7.
117. Hunter JM, Ahearn ME, Balak CD, Liang WS, Kurdoglu A, Corneveaux JJ, et al. Novel pathogenic variants and genes for myopathies identified by whole exome sequencing. *Mol Genet Genomic Med* 2015;3(4):283-301.
118. Astrea G, Romano A, Angelini C, Antozzi CG, Barresi R, Battini R, et al. Broad phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations in GMPPB-related dystroglycanopathies: an Italian cross-sectional study. *Orphanet J Rare Dis* 2018;13(1):170.
119. Yoshioka M, Morisada N, Toyoshima D, Yoshimura H, Nishio H, Iijima K, et al. Novel BICD2 mutation in a Japanese family with autosomal dominant lower extremity-predominant spinal muscular atrophy-2. *Brain Dev* 2018;40(4):343-7.
120. Janecke AR, Li B, Boehm M, Krabichler B, Rohrbach M, Muller T, et al. The phenotype of the musculocontractural type of Ehlers-Danlos syndrome due to CHST14 mutations. *Am J Med Genet A* 2016;170A(1):103-15.
121. Echaniz-Laguna A, Dubourg O, Carlier P, Carlier RY, Sabouraud P, Pereon Y, et al. Phenotypic spectrum and incidence of TRPV4 mutations in patients with inherited axonal neuropathy. *Neurology* 2014;82(21):1919-26.
122. Chauveau C, Bonnemann CG, Julien C, Kho AL, Marks H, Talim B, et al. Recessive TTN truncating mutations define novel forms of core myopathy with heart disease. *Hum Mol Genet* 2014;23(4):980-91.
123. Kimber E, Tajsharghi H, Kroksmark AK, Oldfors A, Tulinius M. A mutation in the fast skeletal muscle troponin I gene causes myopathy and distal arthrogryposis. *Neurology* 2006;67(4):597-601.
124. Kurolap A, Armbruster A, HersHKovitz T, Hauf K, Mory A, Paperna T, et al. Loss of Glycine Transporter 1 Causes a Subtype of Glycine Encephalopathy with Arthrogryposis and Mildly Elevated Cerebrospinal Fluid Glycine. *Am J Hum Genet* 2016;99(5):1172-80.
125. Rabie M, Jossiphov J, Nevo Y. Electromyography (EMG) accuracy compared to muscle biopsy in childhood. *J Child Neurol* 2007;22(7):803-8.
126. Gibreel WO, Selcen D, Zeidan MM, Ishitani MB, Moir CR, Zarroug AE. Safety and yield of muscle biopsy in pediatric patients in the modern era. *J Pediatr Surg* 2014;49(9):1429-32.
127. ThavornTanaburt S, Tanboon J, Likasitwattanakul S, Sangruchi T, Nishino I, NgerNcham M, et al. Impact of muscle biopsy on diagnosis and management of children with neuromuscular diseases: A 10-year retrospective critical review. *J Pediatr Surg* 2018;53(3):489-92.
128. Davidson AE, Siddiqui FM, Lopez MA, Lunt P, Carlson HA, Moore BE, et al. Novel deletion of lysine 7 expands the clinical, histopathological and genetic spectrum of TPM2-related myopathies. *Brain* 2013;136(Pt 2):508-21.

129. Sandaradura SA, Bournazos A, Mallawaarachchi A, Cummings BB, Waddell LB, Jones KJ, et al. Nemaline myopathy and distal arthrogryposis associated with an autosomal recessive TNNT3 splice variant. *Hum Mutat* 2018;39(3):383-8.
130. Kim SM, Chang HK, Song JW, Koh H, Han SJ, Severance Pediatric Liver Disease Research G. Agranular platelets as a cardinal feature of ARC syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32(4):253-8.
131. Martinelli S, Krumbach OHF, Pantaleoni F, Coppola S, Amin E, Pannone L, et al. Functional Dysregulation of CDC42 Causes Diverse Developmental Phenotypes. *Am J Hum Genet* 2018;102(2):309-20.
132. Turgut GT, Gulec C, Sarac Sivrikoz T, Kale H, Karaman B, Nishimura G, et al. Antenatal diagnostic dilemma in a pseudodominant pedigree with lamin-B receptor (LBR)-related regressive spondylometaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet A* 2021.
133. Wattjes MP, Kley RA, Fischer D. Neuromuscular imaging in inherited muscle diseases. *Eur Radiol* 2010;20(10):2447-60.
134. Ozsarlak O, Schepens E, Parizel PM, Van Goethem JW, Vanhoenacker F, De Schepper AM, et al. Hereditary neuromuscular diseases. *Eur J Radiol* 2001;40(3):184-97.
135. Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology* 2008;71(10):758-65.
136. Fischer D, Walter MC, Kesper K, Petersen JA, Aurino S, Nigro V, et al. Diagnostic value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *J Neurol* 2005;252(5):538-47.
137. Fischer D, Herasse M, Ferreiro A, Barragan-Campos HM, Chiras J, Viollet L, et al. Muscle imaging in dominant core myopathies linked or unlinked to the ryanodine receptor 1 gene. *Neurology* 2006;67(12):2217-20.
138. Emy Dorfman L, Leite JC, Giugliani R, Riegel M. Microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances. *J Pediatr (Rio J)* 2015;91(1):59-67.
139. Otake K, Uchida K, Inoue M, Koike Y, Matsushita K, Miki C, et al. Congenital diaphragmatic hernia with a pure duplication of chromosome 1q: report of the first surviving case. *Pediatric surgery international* 2009;25(9):827-31.
140. Thevenon J, Monnier N, Callier P, Dieterich K, Francoise M, Montgomery T, et al. Delineation of the 3p14.1p13 microdeletion associated with syndromic distal limb contractures. *Am J Med Genet A* 2014;164A(12):3027-34.
141. Ramieri V, Tarani L, Costantino F, Basile E, Liberati N, Rinna C, et al. Microdeletion 3q syndrome. *J Craniofac Surg* 2011;22(6):2124-8.
142. Chen CP, Chang YL, Chern SR, Wu PS, Su JW, Chen WL, et al. Prenatal diagnosis of partial trisomy 3q (3q27.3→qter) and partial monosomy 14q (14q31.3→qter) of paternal origin associated with fetal hypotonia, arthrogryposis, scoliosis and hyperextensible joints. *Gene* 2013;516(1):132-7.
143. Balta B, Erdogan M, Ergul AB, Sahin Y, Ozcan A. Interstitial deletion 5p14.1-p15.2 and 5q14.3-q23.2 in a patient with clubfoot, blepharophimosis, arthrogryposis, and multiple congenital abnormalities. *Am J Med Genet A* 2017;173(10):2798-802.

144. Ansari M, Rainger JK, Murray JE, Hanson I, Firth HV, Mehendale F, et al. A syndromic form of Pierre Robin sequence is caused by 5q23 deletions encompassing FBN2 and PHAX. *Eur J Med Genet* 2014;57(10):587-95.
145. Destree A, Fourneau C, Dugauquier C, Rombout S, Sartenaer D, Gillerot Y. Prenatal diagnosis of trisomy 6 mosaicism. *Prenat Diagn* 2005;25(5):354-7.
146. Tabet AC, Aboura A, Gerard M, Pilorge M, Dupont C, Gadisseux JF, et al. Molecular characterization of a de novo 6q24.2q25.3 duplication interrupting UTRN in a patient with arthrogryposis. *Am J Med Genet A* 2010;152A(7):1781-8.
147. Au PB, Chernos JE, Thomas MA. Review of the recurrent 8q13.2q13.3 branchio-oto-renal related microdeletion, and report of an additional case with associated distal arthrogryposis. *Am J Med Genet A* 2016;170(11):2984-7.
148. Busche A, Klopocki E, Ullmann R, Mundlos S, Horn D. A cryptic unbalanced translocation t(2;9)(p25.2;q34.3) causes the phenotype of 9q subtelomeric deletion syndrome and additional exophthalmos and joint contractures. *Eur J Med Genet* 2008;51(6):615-21.
149. Kosaki R, Hanai S, Kakishima H, Okada MA, Hayashi S, Ito Y, et al. Discrepancies in cytogenetic results between amniocytes and postnatally obtained blood: trisomy 9 mosaicism. *Congenit Anom (Kyoto)* 2006;46(2):115-7.
150. Nakamura-Pereira M, Cima LC, Llerena JC, Jr., Guerra FA, Peixoto-Filho FM. Sonographic findings in a case of tetrasomy 9p associated with increased nuchal translucency and Dandy-Walker malformation. *J Clin Ultrasound* 2009;37(8):471-4.
151. Hagen A, Bigl A, Wand D, Klopocki E, Heller R, Siekmeyer M, et al. Combined partial trisomy 11q and partial monosomy 10p in a 19-year-old female patient: phenotypic and genotypic findings. *Am J Med Genet A* 2011;155A(12):3075-81.
152. Jonsson DI, Ludvigsson P, Aradhya S, Sigurdardottir S, Steinarsdottir M, Hauksdottir H, et al. A de novo 1.13 Mb microdeletion in 12q13.13 associated with congenital distal arthrogryposis, intellectual disability and mild dysmorphism. *Eur J Med Genet* 2012;55(6-7):437-40.
153. Peng HH, Wang TH, Hsueh DW, Chang SD, Soong YK. Prenatal diagnosis of partial trisomy 12q: clinical presentations and outcome. *Prenat Diagn* 2005;25(6):470-4.
154. Mohamed AM, Kamel A, Mahmoud W, Abdelraouf E, Meguid N. Intellectual disability secondary to a 16p13 duplication in a 1;16 translocation. Extended phenotype in a four-generation family. *Am J Med Genet A* 2015;167A(1):128-36.
155. Li Z, Liu J, Li H, Peng Y, Lv W, Long Z, et al. Phenotypic expansion of the interstitial 16p13.3 duplication: a case report and review of the literature. *Gene* 2013;531(2):502-5.
156. Kim YJ, Byun SY, Jo SA, Shin YB, Cho EH, Lee EY, et al. Miller-Dieker syndrome with der(17)t(12;17)(q24.33;p13.3)pat presenting with a potential risk of mis-identification as a de novo submicroscopic deletion of 17p13.3. *Korean J Lab Med* 2011;31(1):49-53.
157. Chen CP, Chern SR, Chen CY, Wu PC, Chen LF, Pan CW, et al. Double aneuploidy with Edwards-Klinefelter syndromes (48,XXY,+18) of maternal origin: prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization in a fetus with arthrogryposis of the left wrist and aplasia of the left thumb. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2011;50(4):479-84.

158. Chen CP, Weng SS, Chern SR, Chen SW, Wu FT, Wang W. Rapid diagnosis of trisomy 18 of maternal origin by quantitative fluorescent polymerase chain reaction analysis following tissue culture failure for conventional cytogenetic analysis in a fetus with holoprosencephaly, ventricular septal defect, arthrogryposis of bilateral wrists and aplasia of the thumbs. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2021;60(3):549-50.
159. Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, et al. A de novo deletion of 20q11.2–q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2011;155(2):409-14.
160. Devriendt K, Swillen A, Gewillig M, Fryns JP, Moens P, De Smet L. Velocardiofacial syndrome presenting as distal arthrogryposis. *Eur J Pediatr* 2004;163(6):329-30.
161. Liewluck T, Sacharow SJ, Fan Y, Lopez-Alberola R. A novel sporadic 614-Kb duplication of the 22q11.2 chromosome in a child with amyoplasia. *J Child Neurol* 2011;26(8):1005-8.
162. Okubo Y, Endo W, Inui T, Suzuki-Muromoto S, Miyabayashi T, Togashi N, et al. A severe female case of arthrogryposis multiplex congenita with brain atrophy, spastic quadriplegia and intellectual disability caused by ZC4H2 mutation. *Brain Dev* 2018;40(4):334-8.
163. Wu YC, Yu MT, Chen LC, Chen CL, Yang ML. Prenatal diagnosis of mosaic tetrasomy 10p associated with megacisterna magna, echogenic focus of left ventricle, umbilical cord cysts and distal arthrogryposis. *Am J Med Genet A* 2003;117A(3):278-81.
164. Chen CP. Detection of mosaic isochromosome 20q in amniotic fluid in a pregnancy with fetal arthrogryposis multiplex congenita and normal karyotype in fetal blood and postnatal samples of placenta, skin, and liver. *Prenat Diagn* 2003;23(1):85-7.
165. Denizot S, Boscher C, Le Vaillant C, Roze JC, Gras Le Guen C. Distal arthrogryposis and neonatal hypotonia: an unusual presentation of Prader-Willi syndrome (PWS). *J Perinatol* 2004;24(11):733-4.
166. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
167. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Biosci Rep* 1981;1(1):3-18.
168. Coffa J, Van Den Berg J. Analysis of MLPA data using novel software Coffalyser.NET by MRC-Holland. Modern approaches to quality control Rijeka, Croatia: InTech 2011:125-50.
169. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005;437(7057):376-80.
170. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431(7011):931-45.
171. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet* 2009;85(2):142-54.
172. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics* 2009;93(2):105-11.

173. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013;340(2):284-95.
174. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17(6):333-51.
175. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 2016;107(1):1-8.
176. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014;30(9):418-26.
177. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012251364.
178. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(4):335-41.
179. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009;461(7261):272-6.
180. Monteiro FP, Curry CJ, Hevner R, Elliott S, Fisher JH, Turocy J, et al. Biallelic loss of function variants in *ATP1A2* cause hydrops fetalis, microcephaly, arthrogryposis and extensive cortical malformations. *Eur J Med Genet* 2020;63(1):103624.
181. Turgut GT, Altunoglu U, Sarac Sivriköz T, Toksoy G, Kalayci T, Avci S, et al. Functional loss of ubiquitin-specific protease 14 may lead to a novel distal arthrogryposis phenotype. *Clin Genet* 2022.
182. Tamhankar V, Tamhankar P, Chaubal R, Chaubal J, Chaubal N. Novel Consensus Splice Site Pathogenic Variation in *THOC2* Gene Leads to Recurrent Arthrogryposis Multiplex Congenita Phenotype: A Case Report. *Cureus* 2021;13(11):e19682.
183. Bayram Y, Karaca E, Coban Akdemir Z, Yilmaz EO, Tayfun GA, Aydin H, et al. Molecular etiology of arthrogryposis in multiple families of mostly Turkish origin. *J Clin Invest* 2016;126(2):762-78.
184. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-24.
185. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020;581(7809):434-43.
186. Phan L, Jin Y, Zhang H, Qiang W, Shekhtman E, Shao D, et al. ALFA: Allele Frequency Aggregator (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine). 2020.
187. Fuller ZL, Berg JJ, Mostafavi H, Sella G, Przeworski M. Measuring intolerance to mutation in human genetics. *Nat Genet* 2019;51(5):772-6.
188. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002;12(6):996-1006.

189. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 2015;12(1):7-8.
190. Schrödinger L, DeLano, W. PyMOL. 2020; Available from: <http://www.pymol.org/pymol>.
191. Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M, Salazar GA, Sonnhammer ELL, et al. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res* 2021;49(D1):D412-D9.
192. Ben Ammar A, Petit F, Alexandri N, Gaudon K, Bauche S, Rouche A, et al. Phenotype genotype analysis in 15 patients presenting a congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *J Neurol* 2010;257(5):754-66.
193. Selcen D, Milone M, Shen XM, Harper CM, Stans AA, Wieben ED, et al. Dok-7 myasthenia: phenotypic and molecular genetic studies in 16 patients. *Ann Neurol* 2008;64(1):71-87.
194. Burke G, Hiscock A, Klein A, Niks EH, Main M, Manzur AY, et al. Salbutamol benefits children with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. *Neuromuscul Disord* 2013;23(2):170-5.
195. Maselli R, Dris H, Schnier J, Cockrell J, Wollmann R. Congenital myasthenic syndrome caused by two non-N88K rapsyn mutations. *Clin Genet* 2007;72(1):63-5.
196. Natera-de Benito D, Topf A, Vilchez JJ, Gonzalez-Quereda L, Dominguez-Carral J, Diaz-Manera J, et al. Molecular characterization of congenital myasthenic syndromes in Spain. *Neuromuscul Disord* 2017;27(12):1087-98.
197. Colombo L, Maltese PE, Romano D, Fogagnolo P, Castori M, Marceddu G, et al. SD-OCT analysis in syndromic and non-syndromic forms of retinitis pigmentosa due to USH2A gene mutations. *Ophthalmic Res* 2021.
198. Wang Q, Hu Z, Chang X, Yu M, Xie Z, Lv H, et al. Mutational and clinical spectrum in a cohort of Chinese patients with hereditary nemaline myopathy. *Clin Genet* 2020;97(6):878-89.
199. Katzaki E, Pescucci C, Uliana V, Papa FT, Ariani F, Meloni I, et al. Clinical and molecular characterization of Italian patients affected by Cohen syndrome. *J Hum Genet* 2007;52(12):1011-7.
200. Anderson C, Crimmins S, Wilson JA, Korbel GA, Ploegh HL, Wilson SM. Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice. *J Neurochem* 2005;95(3):724-31.
201. Marshall AG, Watson JA, Hallengren JJ, Walters BJ, Dobrunz LE, Francillon L, et al. Genetic background alters the severity and onset of neuromuscular disease caused by the loss of ubiquitin-specific protease 14 (usp14). *PLoS One* 2013;8(12):e84042.
202. Wilson SM, Bhattacharyya B, Rachel RA, Coppola V, Tessarollo L, Householder DB, et al. Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nat Genet* 2002;32(3):420-5.
203. Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, et al. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 2006;34(Database issue):D227-30.
204. Beşpınar FU, Beşpınar LZ. Türkiye’de hane halkı yapıları ve evlilik pratiklerinde ikili resim: geleneklerin yanı sıra değişimin yansımaları. *Nüfusbilim Dergisi* 2017;39(1):109-49.

205. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med* 2013;369(16):1502-11.
206. Posey JE, Rosenfeld JA, James RA, Bainbridge M, Niu Z, Wang X, et al. Molecular diagnostic experience of whole-exome sequencing in adult patients. *Genet Med* 2016;18(7):678-85.
207. Rossi M, El-Khechen D, Black MH, Farwell Hagman KD, Tang S, Powis Z. Outcomes of Diagnostic Exome Sequencing in Patients With Diagnosed or Suspected Autism Spectrum Disorders. *Pediatr Neurol* 2017;7034-43 e2.
208. Smith ED, Blanco K, Sajan SA, Hunter JM, Shinde DN, Wayburn B, et al. A retrospective review of multiple findings in diagnostic exome sequencing: half are distinct and half are overlapping diagnoses. *Genet Med* 2019;21(10):2199-207.
209. Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Hateley SL, Ganusova EE, Mudge J, et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med* 2011;3(65):65ra4.
210. Tabor HK, Auer PL, Jamal SM, Chong JX, Yu JH, Gordon AS, et al. Pathogenic variants for Mendelian and complex traits in exomes of 6,517 European and African Americans: implications for the return of incidental results. *Am J Hum Genet* 2014;95(2):183-93.
211. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, et al. Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. *Clin Genet* 2003;64(1):65-9.
212. Yang WD, Gomes RR, Jr., Alicknavitch M, Farach-Carson MC, Carson DD. Perlecan domain I promotes fibroblast growth factor 2 delivery in collagen I fibril scaffolds. *Tissue Eng* 2005;11(1-2):76-89.
213. Martinez JR, Dhawan A, Farach-Carson MC. Modular Proteoglycan Perlecan/HSPG2: Mutations, Phenotypes, and Functions. *Genes (Basel)* 2018;9(11).
214. Pei S, Parthasarathy S, Parajuli A, Martinez J, Lv M, Jiang S, et al. Perlecan/Hspg2 deficiency impairs bone's calcium signaling and associated transcriptome in response to mechanical loading. *Bone* 2020;131115078.
215. Lin PY, Hung JH, Hsu CK, Chang YT, Sun YT. A Novel Pathogenic HSPG2 Mutation in Schwartz-Jampel Syndrome. *Front Neurol* 2021;12632336.
216. Iwata S, Ito M, Nakata T, Noguchi Y, Okuno T, Ohkawara B, et al. A missense mutation in domain III in HSPG2 in Schwartz-Jampel syndrome compromises secretion of perlecan into the extracellular space. *Neuromuscul Disord* 2015;25(8):667-71.
217. Rodgers KD, Sasaki T, Aszodi A, Jacenko O. Reduced perlecan in mice results in chondrodysplasia resembling Schwartz-Jampel syndrome. *Hum Mol Genet* 2007;16(5):515-28.
218. Farach-Carson MC, Brown AJ, Lynam M, Safran JB, Carson DD. A novel peptide sequence in perlecan domain IV supports cell adhesion, spreading and FAK activation. *Matrix Biol* 2008;27(2):150-60.

219. Melrose J. Perlecan, a modular instructive proteoglycan with diverse functional properties. *Int J Biochem Cell Biol* 2020;128105849.
220. Farach-Carson MC, Carson DD. Perlecan--a multifunctional extracellular proteoglycan scaffold. *Glycobiology* 2007;17(9):897-905.
221. Brown AJ, Alicknavitch M, D'Souza SS, Daikoku T, Kirn-Safran CB, Marchetti D, et al. Heparanase expression and activity influences chondrogenic and osteogenic processes during endochondral bone formation. *Bone* 2008;43(4):689-99.
222. Costell M, Gustafsson E, Aszodi A, Morgelin M, Bloch W, Hunziker E, et al. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* 1999;147(5):1109-22.
223. Arikawa-Hirasawa E, Le AH, Nishino I, Nonaka I, Ho NC, Francomano CA, et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* 2002;70(5):1368-75.
224. Nicole S, Davoine CS, Topaloglu H, Cattolico L, Barral D, Beighton P, et al. Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet* 2000;26(4):480-3.
225. Abdel-Aziz M, Azab NA. A case of Schwartz-Jampel syndrome with cleft palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73(11):1601-3.
226. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006;126(5):855-67.
227. Chang IJ, He M, Lam CT. Congenital disorders of glycosylation. *Ann Transl Med* 2018;6(24):477.
228. Morava E, Wevers RA, Cantagrel V, Hoefsloot LH, Al-Gazali L, Schoots J, et al. A novel cerebello-ocular syndrome with abnormal glycosylation due to abnormalities in dolichol metabolism. *Brain* 2010;133(11):3210-20.
229. Cirnigliaro L, Bianchi P, Sturiale L, Garozzo D, Mangili G, Keldermans L, et al. COG6-CDG: Novel variants and novel malformation. *Birth Defects Res* 2022;114(5-6):165-74.
230. Wu X, Steet RA, Bohorov O, Bakker J, Newell J, Krieger M, et al. Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat Med* 2004;10(5):518-23.
231. Reynders E, Foulquier F, Annaert W, Matthijs G. How Golgi glycosylation meets and needs trafficking: the case of the COG complex. *Glycobiology* 2011;21(7):853-63.
232. Lubbehusen J, Thiel C, Rind N, Ungar D, Prinsen BH, de Koning TJ, et al. Fatal outcome due to deficiency of subunit 6 of the conserved oligomeric Golgi complex leading to a new type of congenital disorders of glycosylation. *Hum Mol Genet* 2010;19(18):3623-33.
233. Alsubhi S, Alhashem A, Fageih E, Alfadhel M, Alfaifi A, Altuwaijri W, et al. Congenital disorders of glycosylation: The Saudi experience. *Am J Med Genet A* 2017;173(10):2614-21.
234. Althonaian N, Alsultan A, Morava E, Alfadhel M. Secondary Hemophagocytic Syndrome Associated with COG6 Gene Defect: Report and Review. *JIMD Rep* 2018;42105-11.

235. Huybrechts S, De Laet C, Bontems P, Rooze S, Souayah H, Sznajer Y, et al. Deficiency of Subunit 6 of the Conserved Oligomeric Golgi Complex (COG6-CDG): Second Patient, Different Phenotype. *JIMD Rep* 2012;4103-8.
236. Komlosi K, Glaser S, Kopp J, Hotz A, Alter S, Zimmer AD, et al. Neonatal presentation of COG6-CDG with prominent skin phenotype. *JIMD Rep* 2020;55(1):51-8.
237. Li G, Xu Y, Hu X, Li N, Yao R, Yu T, et al. Compound heterozygous variants of the COG6 gene in a Chinese patient with deficiency of subunit 6 of the conserved oligomeric Golgi complex (COG6-CDG). *Eur J Med Genet* 2019;62(1):44-6.
238. Lugli L, Bariola MC, Ferri L, Lucaccioni L, Bertucci E, Cattini U, et al. Disorder of sex development associated with a novel homozygous nonsense mutation in COG6 expands the phenotypic spectrum of COG6-CDG. *Am J Med Genet A* 2021;185(4):1187-94.
239. Spiegel R, Khayat M, Shalev SA, Horovitz Y, Mandel H, HersHKovitz E, et al. TMEM70 mutations are a common cause of nuclear encoded ATP synthase assembly defect: further delineation of a new syndrome. *J Med Genet* 2011;48(3):177-82.
240. Rymen D, Winter J, Van Hasselt PM, Jaeken J, Kasapkara C, Gokcay G, et al. Key features and clinical variability of COG6-CDG. *Mol Genet Metab* 2015;116(3):163-70.
241. Zhao P, Zhang L, Tan L, Luo S, Huang Y, Peng H, et al. Genetic analysis and prenatal diagnosis in a Chinese with growth retardation, abnormal liver function, and microcephaly. *Mol Genet Genomic Med* 2021;9(9):e1751.
242. Ververi A, Stathopoulou T, Kontou A, Farini M, Vlahou G, Demiris N, et al. Lethal COG6-CDG in neonatal patient with arachnodactyly, joint contractures, and skin manifestations: Founder mutation in the Southeastern European population? *Pediatr Dermatol* 2022.
243. Mandel H, Cohen Kfir N, Fedida A, Shuster Biton E, Odeh M, Kalfon L, et al. COG6-CDG: Expanding the phenotype with emphasis on glycosylation defects involved in the causation of male disorders of sex development. *Clin Genet* 2020;98(4):402-7.
244. Vogt J, Morgan NV, Marton T, Maxwell S, Harrison BJ, Beeson D, et al. Germline mutation in DOK7 associated with fetal akinesia deformation sequence. *J Med Genet* 2009;46(5):338-40.
245. Radhakrishnan P, Shukla A, Girisha KM, Nayak SS. Biallelic c.1263dupC in DOK7 results in fetal akinesia deformation sequence. *Am J Med Genet A* 2020;182(4):804-7.
246. Okada K, Inoue A, Okada M, Murata Y, Kakuta S, Jigami T, et al. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 2006;312(5781):1802-5.
247. Hamuro J, Higuchi O, Okada K, Ueno M, Iemura S, Natsume T, et al. Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J Biol Chem* 2008;283(9):5518-24.
248. Arimura S, Okada T, Tezuka T, Chiyo T, Kasahara Y, Yoshimura T, et al. Neuromuscular disease. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science* 2014;345(6203):1505-8.
249. Cossins J, Liu WW, Belaya K, Maxwell S, Oldridge M, Lester T, et al. The spectrum of mutations that underlie the neuromuscular junction synaptopathy in DOK7 congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2012;21(17):3765-75.

250. Lashley D, Palace J, Jayawant S, Robb S, Beeson D. Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *Neurology* 2010;74(19):1517-23.
251. Ueta R, Sugita S, Minegishi Y, Shimotoyodome A, Ota N, Ogiso N, et al. DOK7 Gene Therapy Enhances Neuromuscular Junction Innervation and Motor Function in Aged Mice. *iScience* 2020;23(8):101385.
252. Miyoshi S, Tezuka T, Arimura S, Tomono T, Okada T, Yamanashi Y. DOK7 gene therapy enhances motor activity and life span in ALS model mice. *EMBO Mol Med* 2017;9(7):880-9.
253. Kaifer KA, Villalon E, Smith CE, Simon ME, Marquez J, Hopkins AE, et al. AAV9-DOK7 gene therapy reduces disease severity in *Smn*(2B^{-/-}) SMA model mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;530(1):107-14.
254. Baynam G, Smith N, Goldblatt J. A c.1019A > G mutation in *FGFR2*, which predicts p.Tyr340Cys, in a lethally malformed fetus with Pfeiffer syndrome and multiple pterygia. *Am J Med Genet A* 2008;146A(17):2301-3.
255. Powell CM, Chandra RS, Saal HM. PHAVER syndrome: an autosomal recessive syndrome of limb pterygia, congenital heart anomalies, vertebral defects, ear anomalies, and radial defects. *Am J Med Genet* 1993;47(6):807-11.
256. Williams DK, McKeever P, Barrow M. Pterygia associated with otomandibular anomalies: a new autosomal recessive condition? *Clin Dysmorphol* 1997;6(2):123-8.
257. Meyer-Cohen J, Dillon A, Pai GS, Conradi S. Lethal multiple pterygium syndrome in four male fetuses in a family: evidence for an X-linked recessive subtype? *Am J Med Genet* 1999;82(1):97-9.
258. Tolmie JL, Patrick A, Yates JR. A lethal multiple pterygium syndrome with apparent X-linked recessive inheritance. *Am J Med Genet* 1987;27(4):913-9.
259. McKie AB, Alsaedi A, Vogt J, Stuurman KE, Weiss MM, Shakeel H, et al. Germline mutations in *RYR1* are associated with foetal akinesia deformation sequence/lethal multiple pterygium syndrome. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2148.
260. Kariminejad A, Ghaderi-Sohi S, Hossein-Nejad Nedai H, Varasteh V, Moslemi AR, Tajsharghi H. Lethal multiple pterygium syndrome, the extreme end of the *RYR1* spectrum. *BMC Musculoskelet Disord* 2016;17109.
261. Abdalla E, Ravenscroft G, Zayed L, Beecroft SJ, Laing NG. Lethal multiple pterygium syndrome: A severe phenotype associated with a novel mutation in the *nebulin* gene. *Neuromuscul Disord* 2017;27(6):537-41.
262. Massalska D, Zimowski JG, Bijok J, Kucinska-Chahwan A, Lusakowska A, Jakiel G, et al. Prenatal diagnosis of congenital myopathies and muscular dystrophies. *Clin Genet* 2016;90(3):199-210.
263. Burke G, Cossins J, Maxwell S, Owens G, Vincent A, Robb S, et al. Rapsyn mutations in hereditary myasthenia: distinct early- and late-onset phenotypes. *Neurology* 2003;61(6):826-8.

264. Muller JS, Baumeister SK, Rasic VM, Krause S, Todorovic S, Kugler K, et al. Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations. *Neurology* 2006;67(7):1159-64.
265. Vogt J, Harrison BJ, Spearman H, Cossins J, Vermeer S, ten Cate LN, et al. Mutation analysis of CHRNA1, CHRNB1, CHRND, and RAPSN genes in multiple pterygium syndrome/fetal akinesia patients. *Am J Hum Genet* 2008;82(1):222-7.
266. Richard P, Gaudon K, Andreux F, Yasaki E, Prioleau C, Bauche S, et al. Possible founder effect of rapsyn N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes. *J Med Genet* 2003;40(6):e81.
267. Khuong TM, Habets RL, Slabbaert JR, Verstreken P. WASP is activated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to restrict synapse growth in a pathway parallel to bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(40):17379-84.
268. Liu Y, Lin W. Genetic deletion of Kiaa1109 in mice leads to developmental defects at the neuromuscular junction. *bioRxiv* 2022.
269. Kvarnung M, Taylan F, Nilsson D, Anderlid BM, Malmgren H, Lagerstedt-Robinson K, et al. Genomic screening in rare disorders: New mutations and phenotypes, highlighting ALG14 as a novel cause of severe intellectual disability. *Clinical Genetics* 2018;94(6):528-37.
270. Alazami AM, Patel N, Shamseldin HE, Anazi S, Al-Dosari MS, Alzahrani F, et al. Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell Rep* 2015;10(2):148-61.
271. Monies D, Abouelhoda M, AlSayed M, Alhassnan Z, Alotaibi M, Kayyali H, et al. The landscape of genetic diseases in Saudi Arabia based on the first 1000 diagnostic panels and exomes. *Hum Genet* 2017;136(8):921-39.
272. Verstreken P, Ohyama T, Haueter C, Habets RL, Lin YQ, Swan LE, et al. Tweek, an evolutionarily conserved protein, is required for synaptic vesicle recycling. *Neuron* 2009;63(2):203-15.
273. Shamseldin HE, Kurdi W, Almusafri F, Alnemer M, Alkaff A, Babay Z, et al. Molecular autopsy in maternal-fetal medicine. *Genet Med* 2018;20(4):420-7.
274. Gueneau L, Fish RJ, Shamseldin HE, Voisin N, Tran Mau-Them F, Preiksaitiene E, et al. KIAA1109 Variants Are Associated with a Severe Disorder of Brain Development and Arthrogryposis. *Am J Hum Genet* 2018;102(1):116-32.
275. Filatova A, Freire V, Lozier E, Konovalov F, Bessonova L, Iudina E, et al. Novel KIAA1109 variants affecting splicing in a Russian family with ALKURAYA-KUCINSKAS syndrome. *Clin Genet* 2019;95(3):440-1.
276. Cabet S, Putoux A, Buenerd A, Gueneau L, Reymond A, Thia EWH, et al. Prenatal cerebral imaging features of a new syndromic entity related to KIAA1109 pathogenic variants mimicking tubulinopathy. *Prenat Diagn* 2020;40(2):276-81.
277. Kumar K, Bellad A, Prasad P, Girimaji SC, Muthusamy B. KIAA1109 gene mutation in surviving patients with Alkuraya-Kucinskas syndrome: a review of literature. *BMC Med Genet* 2020;21(1):136.

278. Meszarosova AU, Lastuvkova J, Rennerova L, Hitka P, Cihlar F, Seeman P, et al. Two novel pathogenic variants in KIAA1109 causing Alkuraya-Kucinskas syndrome in two Czech Roma brothers. *Clin Dysmorphol* 2020;29(4):197-201.
279. Yuen M, Ottenheijm CAC. Nebulin: big protein with big responsibilities. *J Muscle Res Cell Motil* 2020;41(1):103-24.
280. Bang ML, Li X, Littlefield R, Bremner S, Thor A, Knowlton KU, et al. Nebulin-deficient mice exhibit shorter thin filament lengths and reduced contractile function in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2006;173(6):905-16.
281. Chandra M, Mamidi R, Ford S, Hidalgo C, Witt C, Ottenheijm C, et al. Nebulin alters cross-bridge cycling kinetics and increases thin filament activation: a novel mechanism for increasing tension and reducing tension cost. *J Biol Chem* 2009;284(45):30889-96.
282. Laitila J, Lehtonen J, Lehtokari VL, Sagath L, Wallgren-Pettersson C, Gronholm M, et al. A nebulin super-repeat panel reveals stronger actin binding toward the ends of the super-repeat region. *Muscle Nerve* 2019;59(1):116-21.
283. Labeit S, Kolmerer B. The complete primary structure of human nebulin and its correlation to muscle structure. *J Mol Biol* 1995;248(2):308-15.
284. Pelin K. Nebulin: Size matters for optimal muscle function. *J Gen Physiol* 2021;153(3).
285. Laitila JM, McNamara EL, Wingate CD, Goullee H, Ross JA, Taylor RL, et al. Nebulin nemaline myopathy recapitulated in a compound heterozygous mouse model with both a missense and a nonsense mutation in Neb. *Acta Neuropathol Commun* 2020;8(1):18.
286. Feingold-Zadok M, Chitayat D, Chong K, Injeyan M, Shannon P, Chapmann D, et al. Mutations in the NEB gene cause fetal akinesia/arthrogryposis multiplex congenita. *Prenat Diagn* 2017;37(2):144-50.
287. Todd EJ, Yau KS, Ong R, Slee J, McGillivray G, Barnett CP, et al. Next generation sequencing in a large cohort of patients presenting with neuromuscular disease before or at birth. *Orphanet J Rare Dis* 2015;10:148.
288. Rocha ML, Dittmayer C, Uruha A, Korinth D, Chaoui R, Schlembach D, et al. A novel mutation in NEB causing foetal nemaline myopathy with arthrogryposis during early gestation. *Neuromuscul Disord* 2021;31(3):239-45.
289. Wallgren-Pettersson C, Donner K, Sewry C, Bijlsma E, Lammens M, Bushby K, et al. Mutations in the nebulin gene can cause severe congenital nemaline myopathy. *Neuromuscular Disorders* 2002;12(7-8):674-9.
290. Bohm J, Vasli N, Malfatti E, Le Gras S, Feger C, Jost B, et al. An integrated diagnosis strategy for congenital myopathies. *PLoS One* 2013;8(6):e67527.
291. Lawlor MW, Ottenheijm CA, Lehtokari VL, Cho K, Pelin K, Wallgren-Pettersson C, et al. Novel mutations in NEB cause abnormal nebulin expression and markedly impaired muscle force generation in severe nemaline myopathy. *Skelet Muscle* 2011;1(1):23.
292. Pedersen H, Mygind N. Absence of axonemal arms in nasal mucosa cilia in Kartagener's syndrome. *Nature* 1976;262(5568):494-5.

293. Schneeberger EE, McCormack J, Issenberg HJ, Schuster SR, Gerald PS. Heterogeneity of ciliary morphology in the immotile-cilia syndrome in man. *J Ultrastruct Res* 1980;73(1):34-43.
294. Sturgess JM, Chao J, Turner JA. Transposition of ciliary microtubules: another cause of impaired ciliary motility. *N Engl J Med* 1980;303(6):318-22.
295. Moreau MF, Chretien MF, Dubin J, Rebel A, Malkani K. Transposed ciliary microtubules in Kartagener's syndrome. A case report with electron microscopy of bronchial and nasal brushings. *Acta Cytol* 1985;29(3):248-53.
296. de Jongh RU, Rutland J. Ciliary defects in healthy subjects, bronchiectasis, and primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1559-67.
297. Biggart E, Pritchard K, Wilson R, Bush A. Primary ciliary dyskinesia syndrome associated with abnormal ciliary orientation in infants. *European Respiratory Journal* 2001;17(3):444-8.
298. Ibanez-Tallon I, Heintz N, Omran H. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 1R27-35.
299. Loges NT, Antony D, Maver A, Deardorff MA, Gulec EY, Gezdirici A, et al. Recessive DNAH9 Loss-of-Function Mutations Cause Laterality Defects and Subtle Respiratory Ciliary-Beating Defects. *Am J Hum Genet* 2018;103(6):995-1008.
300. Fassad MR, Shoemark A, Legendre M, Hirst RA, Koll F, le Borgne P, et al. Mutations in Outer Dynein Arm Heavy Chain DNAH9 Cause Motile Cilia Defects and Situs Inversus. *Am J Hum Genet* 2018;103(6):984-94.
301. Chen W, Zhang Y, Shen L, Zhu J, Cai K, Lu Z, et al. Biallelic DNAH9 mutations are identified in Chinese patients with defective left-right patterning and cilia-related complex congenital heart disease. *Hum Genet* 2022.
302. Zhang T, Yuan H, Zhu H, Ying Y, Ding J, Ding H, et al. Fetal Congenital Heart Disease Caused by Compound Heterozygous Mutations in the DNAH9 Gene: A Case Report. *Front Genet* 2021;12771756.
303. Lehtokari VL, Kiiski K, Sandaradura SA, Laporte J, Repo P, Frey JA, et al. Mutation update: the spectra of nebulin variants and associated myopathies. *Hum Mutat* 2014;35(12):1418-26.
304. Laquerriere A, Maluenda J, Camus A, Fontenas L, Dieterich K, Nolent F, et al. Mutations in CNTNAP1 and ADCY6 are responsible for severe arthrogryposis multiplex congenita with axoglial defects. *Hum Mol Genet* 2014;23(9):2279-89.
305. Tabatabaie L, Klomp LW, Berger R, de Koning TJ. L-serine synthesis in the central nervous system: a review on serine deficiency disorders. *Mol Genet Metab* 2010;99(3):256-62.
306. Tabatabaie L, Klomp LW, Rubio-Gozalbo ME, Spaapen LJ, Haagen AA, Dorland L, et al. Expanding the clinical spectrum of 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2011;34(1):181-4.
307. Acuna-Hidalgo R, Schanze D, Kariminejad A, Nordgren A, Kariminejad MH, Conner P, et al. Neu-Laxova syndrome is a heterogeneous metabolic disorder caused by defects in

enzymes of the L-serine biosynthesis pathway. *The American Journal of Human Genetics* 2014;95(3):285-93.

308. Neu RL, Kajii T, Gardner LI, Nagyfy SF. A lethal syndrome of microcephaly with multiple congenital anomalies in three siblings. *Pediatrics* 1971;47(3):610-2.

309. Ugras M, Kocak G, Ozcan H. Neu-Laxova syndrome: a case report and review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;20(9):1126-8.

310. Abdelfattah F, Kariminejad A, Kahlert AK, Morrison PJ, Gumus E, Mathews KD, et al. Expanding the genotypic and phenotypic spectrum of severe serine biosynthesis disorders. *Hum Mutat* 2020;41(9):1615-28.

311. El Chehadeh-Djebbar S, Blair E, Holder-Espinasse M, Moncla A, Frances AM, Rio M, et al. Changing facial phenotype in Cohen syndrome: towards clues for an earlier diagnosis. *Eur J Hum Genet* 2013;21(7):736-42.

312. Duplomb L, Duvet S, Picot D, Jegu G, El Chehadeh-Djebbar S, Marle N, et al. Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects. *Human Molecular Genetics* 2014;23(9):2391-9.

313. Hu M, Li P, Song L, Jeffrey PD, Chenova TA, Wilkinson KD, et al. Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J* 2005;24(21):3747-56.

314. Wertz IE, Murray JM. Structurally-defined deubiquitinase inhibitors provide opportunities to investigate disease mechanisms. *Drug Discov Today Technol* 2019;31:109-23.

315. Cruz L, Soares P, Correia M. Ubiquitin-Specific Proteases: Players in Cancer Cellular Processes. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021;14(9):848.

316. Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC, et al. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 2010;467(7312):179-84.

317. Kim HT, Goldberg AL. The deubiquitinating enzyme Usp14 allosterically inhibits multiple proteasomal activities and ubiquitin-independent proteolysis. *J Biol Chem* 2017;292(23):9830-9.

318. Tian T, McLean JW, Wilson JA, Wilson SM. Examination of genetic and pharmacological tools to study the proteasomal deubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 14 in the nervous system. *J Neurochem* 2021;156(3):309-23.

319. Xu D, Shan B, Lee BH, Zhu K, Zhang T, Sun H, et al. Phosphorylation and activation of ubiquitin-specific protease-14 by Akt regulates the ubiquitin-proteasome system. *Elife* 2015;4:e10510.

320. Narkis G, Ofir R, Manor E, Landau D, Elbedour K, Birk OS. Lethal congenital contractural syndrome type 2 (LCCS2) is caused by a mutation in ERBB3 (Her3), a modulator of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):589-95.

321. Qu J, Zou T, Lin Z. The Roles of the Ubiquitin-Proteasome System in the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Int J Mol Sci* 2021;22(4).

322. Chen PC, Bhattacharyya BJ, Hanna J, Minkel H, Wilson JA, Finley D, et al. Ubiquitin homeostasis is critical for synaptic development and function. *J Neurosci* 2011;31(48):17505-13.
323. Lindeboom RGH, Vermeulen M, Lehner B, Supek F. The impact of nonsense-mediated mRNA decay on genetic disease, gene editing and cancer immunotherapy. *Nat Genet* 2019;51(11):1645-51.



EK-2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067-32347)
MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Proje Adı: Fetal Dönemde Kontraktürler ile Seyreden Sendromların Moleküler Etiyopatogenezinin Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri ile Araştırılması

Bu proje kapsamında, kromozom anomalileri ve submikroskobik delesyon/duplikasyon sendromları dışlanmış, prenatal ultrasonografi ve postmortem fizik muayene ile çoklu eklem kontraktürleri saptanan fetal olgularda tüm ekzom dizileme yöntemi ile patogeneizde rol oynayan genlerin ve mutasyonların belirlenmesi hedeflenmektedir.

Fetal kontraktür tablosunun etiyopatogenezinde çok sayıda gen yer almakta olup etkilenmiş olgularda sorumlu gen ve mutasyonların belirlenmesi, ailelerin olası ileri gebeliklerinde benzer etkilenmiş gebelik ürünü riskinin netleştirilmesi ve bu yönde prenatal/preimplantasyon genetik tanı olanaklarına katkı sağlaması açısından önemlidir. Bu amaçla, çalışmamız kapsamında, intrauterin başlangıçlı kontraktürleri olan fetuslara ait dokulardan ve anne baba adaylarından alınacak periferik kan örneklerinden DNA eldesi yapılarak genetik tetkikler yapmayı planlıyoruz. Size ve ailenize yardımcı olmak amacıyla bu hastalıkların tanısında kullanılan ileri aşama laboratuvar tetkiklerini kendi laboratuvarımızda yaparak çalışmaya katılan ailelere kolaylıkla uygulanmasını sağlamak istiyoruz.

Bu çalışmaya katılmaya davet edildiniz; ancak karar vermeden önce çalışmanın riskleri ve yararları konusunda sizleri bilgilendirmek istiyoruz. **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu** okuduktan sonra katılmayı kabul ediyorsanız formu imzalamanız gerekmektedir.

1. Projeye Katılım için Gerekli Kriterler:

Projemize postmortem klinik muayene ile çoklu eklem kontraktürleri saptanan ve etiyopatogeneizde gros ve submikroskobik kromozom anomalilerin dışlanmış olduğu gebelik ürünlerinin dahil edilmesi planlanmıştır.

2. Yapılacak işlemin tanımı:

Tarafımızca yapılmış olan postmortem fetal klinik genetik değerlendirmede **intrauterin başlangıçlı kontraktürler saptanan olgularımızdan, 4mm çapında fetal deri örneklerinden DNA bankalama prosedürü daha önce onamanız dahilinde gerçekleştirilmiştir.** TED yapılabilmesi amacıyla biyolojik örnek olarak fetal deri örneklerinin kullanılması planlanmıştır. Moleküler analizlerde indekste bir varyant saptanması durumunda, aile içi segregasyon analizlerinin yapılabilmesi amacıyla, sizlerden 2 ml kan örneği alınması gerekecektir. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır

3. Örnek Alımının Olası riskleri:

Kan Örneği alımı sırasında oluşabilecek riskler: Kan örnekleri alınırken K₃EDTA'lı mor kapaklı tüpe alınan örnek bu çalışma amacıyla kullanılacaktır. Bu işleme bağlı; (1) İğne-batması sırasında hafif bir acı duyulabilir, (2) iğne batması sonrasında çok nadiren de olsa enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Yapılacak testler, sizin ve ailenizdeki diğer bireylerin, olası gebeliklerinde bu genetik hastalık açısından tekrar riski olduğunu ortaya çıkarabilir ve bu bilgi sizde psikolojik sorun yaratabilir. Elde edilen sonuçlar sizinle paylaşılacaktır. Bu bilgiyi öğrenmeyi tamamen reddedebilirsiniz. Bu çalışma ile elde edilecek genetik bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır ve başkaları ile paylaşılmayacaktır, bilginin paylaşımı sadece sizin izninize bağlı olacaktır.

Size ve gebelik ürünlerinize ait kan ve doku örnekleri sadece bu çalışma için kullanılacaktır.

Bu tip çalışmalarda, polimorfizm veya nadir genetik varyantlar ya da teknik sorunlar gibi yanlış tanıya yol açabilecek potansiyel tanı hatalarının olabileceği daima göz önünde tutulmalıdır. Ailelerin, bütün bu nedenlerle nadir de olsa tanı hatalarının olabileceğinin bilincinde olmaları önemlidir.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı, ailenizde görülen hastalığa neden olan genetik faktörlerin araştırılmasıdır. Biz bu aşamada henüz yapılacak testlerin, size ve ailenize doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını bilmiyoruz. Fakat bu çalışmalar tamamlandığında, testlerde sonuç elde edilebilmesi durumunda, olası gebeliklerinizde tekrar riski ve yönde prenatal/preimplantasyon genetik tanı seçeneklerinin sunulabilme ihtimali olduğunu belirtmek istiyoruz. Ayrıca, kesin olan bir diğer nokta da araştırma tamamlandıktan sonra bu klinik tablonun nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece hem sizlere hem de gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlı olup çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkınız bulunmaktadır.

Hastanın/Katılımcının Beyanı

Sayın Dr..... tarafından.....(kurum adı)..... (anabilim dalı adı, ünite adı vb.)’da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle oluşabilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi (bu tıbbi girişimler ile ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; mesai saatleri içinde, +902124142000/32564 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’ndan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda olmadığımı biliyorum. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yapılacak testlerin önerilme nedenleri, riskleri, testlerin anlamı ve doğruluk oranları hakkında ayrıntılı bilgi verildi.

Yapılması önerilen testler ile ilgili bilgileri okudum ve anladım.

- ☐ Testlerin yapılmasına izin veriyorum.
- ☐ Sonuçlarımın.....ile paylaşılmasına izin veriyorum.
- ☐ Sonuçların isim belirtilmeden bilimsel yayınlarda kullanılmasına izin veriyorum.

Hastalığımla ilgili yapılacak araştırma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

- ☐ Biyolojik örneklerimin sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum
- ☐ Biyolojik örneklerimin saklanarak, ileride yapılacak tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
- ☐ Biyolojik örneklerimin hiçbir koşulda saklanmasına ve kullanılmasına izin vermiyorum

Tarih:

Genetik Danışmanın adı ve imzası

İncelenecek kişi/kişilerin ad(lan) ve imza(lar)ı:

İncelenecek kişinin (18 yaş altı ise) velisinin adı ve imzası:

*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

EK-3: Hasta İzlem Formu

İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Çoklu Konjenital Kontraktür Fenotipleri, Letal Formlar POSTMORTEM MUAYENE RAPORU	
GH/Cinsiyet: Doğum Tarihi:	Muayene Tarihi: Prot No:
Anne Adı Soyadı: Akrabalık: Adres:	Annenin Doğum Tarihi: DNA No: Telefon:
Aile Ağacı	
Prenatal Öykü:	
Tarama testleri / Perinatoloji-Tıbbi Genetik konsey değerlendirme / II. düzey US bulguları:	
Postmortem fizik muayene:	
Postmortem radyolojik bulgular:	
Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik/Moleküler analiz sonuçları:	
Yorum: Tanı: Plan:	