

**T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**NON SENDROMİK HİRSCHSPRUNGLU OLGULARDA
KROMOZOMAL DEĞİŞİKLİKLERİN KROMOZOMAL
MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emine DEMİRAL

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

MALATYA-2017

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



**NON SENDROMİK HİRSCHSPRUNGLU OLGULARDA
KROMOZOMAL DEĞİŞİKLİKLERİN KROMOZOMAL
MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. EMİNE DEMİRAL

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. İBRAHİM TEKEDERELİ**

MALATYA-2017

İTHAF

To my better half; Tevfik...



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	3
TEŞEKKÜR.....	5
ÖZET	6
ABSTRACT.....	7
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	8
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	9
TABLolar DİZİNİ	10
1. GİRİŞ	11
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1. ALT TİPLER	13
2.2. SEMPTOMLAR	13
2.3. TANI.....	14
2.3.1. KLİNİK VE RADYOLOJİK TANI.....	14
2.3.2. HİSTOPATOLOJİK TANI.....	14
2.4. TEDAVİ.....	15
3. ETYOLOJİ.....	16
3.1. ÇEVRESEL NEDENLER	16
3.2. GENETİK NEDENLER	17
3.2.1. KROMOZOMAL NEDENLER.....	17
3.2.2. TEK GEN HASTALIKLARI	20
3.2.3. NEDENİ BİLİNMEYEN HSCR.....	25
4. MİKROARRAY YÖNTEMİ.....	27
5. AMAÇ.....	28
6. MATERYAL-METOD.....	29
6.1. OLGU GRUBU.....	29
6.2. LENFOSİT KÜLTÜRÜ VE G BANTLAMA İLE KROMOZOM ANALİZİ	29
6.3. MOLEKÜLER KARYOTİPLEME İLE GENOM ANALİZİ.....	30
6.3.1. DNA İZOLASYONU	30
6.3.2. CytoScan OPTIMA ARRAY ÇALIŞMA PROTOKOLÜ	31
6.3.3. YORUMLAMA VE ANALİZ.....	38
7. BULGULAR.....	39
7.1. OLGULARIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	40
7.2. OLGULARIN MİKROARRAY SONUÇLARI	42

8. TARTIŞMA	44
8.1. OLGU 5 (A.D)/ 17q12 DUPLİKASYONU SAPTANAN OLGUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ.....	44
8.1.1. 17q12 BÖLGESİ VE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR	45
8.2. OLGU 13 (C.Y.) / 2q22.3q23.3 DELESYONU SAPTANAN OLGUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ.....	48
8.2.1. 2q22.3q23.3 BÖLGESİ VE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR	48
8.3. OLGU 12 (H.M.S) / Xq21.31q21.32 DUPLİKASYONU SAPTANAN OLGUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	52
8.3.1. Xq21.31q21.32 BÖLGESİ VE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR.....	53
9. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	57



TEŞEKKÜR

Dört yıllık asistanlığımın ilk gününden itibaren bana bilgisi, motivasyonu ve kişiliği ile örnek olan Hocam, Abim, Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ'ye;

Gösterdikleri kolaylıklar ve destek için bölüm başkanımız Prof.Dr. Elif YEŞİLADA'ya ve bölümümüzün diğer öğretim üyeleri ile personeline, tüm çalışma arkadaşlarıma;

Klinik genetik, bilimsel çalışma ve etik gibi pek çok alanda bilgi ve tecrübesini paylaşma fırsatı bulduğum kıymetli Hocam Prof. Dr. Hülya KAYSERİLİ'ye ve Koç Üniversitesi Hastanesi Genetik Tanı Merkezi Ekibi'ne; bana eğlenceli kişiliği ile yol gösteren Uzm. Dr. Umut ALTUNOĞLU'na ve İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bölümü Ekibi'ne;

Maddi ve manevi desteklerini, dualarını ve iyi niyetlerini her daim yanımda hissettiğim ablam Ayten DEMİRAL ve Demiral Ailesi'nin bütün üyelerine; beni benden iyi anlayan kardeşim Fatma YAŞAR'a; manevi ablam sevgili Uzm. Dr. Ayça ASLANGER'e ve ailesine;

Tezin gözden geçirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Şenol ÇİTLİ'ye;

Buraya yazamadığım ancak benim için her daim dua eden sevenlerime ve sevdiklerime;

Koşulsuz sevgisi için hayat arkadaşım, eşim Tevfik DEMİRAL'a teşekkür ederim.

PS: I would like to thank every single member of Charite University Institute for Medical Genetics and Human Genetics, especially my mentor Prof.Dr. Uwe KORNAK for their friendship and support.

ÖZET

Non Sendromik Hirschsprung Olgularda Kromozomal Değişikliklerin Kromozomal Mikroarray Yöntemi ile Araştırılması

AMAÇ: Hirschsprung hastalığı, gastrointestinal sistemin distalinde değişken uzunlukta bağırsak segmentini etkileyen, enterik nöronal gangliyon hücrelerinin yokluğu ile karakterize kompleks, multifaktöriyel ve heterojen genetik bir hastalıktır. Etiyolojide multigenik herediter nedenler yanında kesinlik kazanmamış çevresel etkiler de sorumlu tutulmaktadır. Genetik etyolojide kromozomal nedenler (Down sendromu, 10q11 delesyonu, 17q21 delesyon ve duplikasyonu), sendromik monogenik nedenler (Mowat-Wilson sendromu, Waardenburg-Shah sendromu) ile non sendromik monogenik nedenler (*RET*, *EDNRB*, *PHOX2B*) sorumludur. Olguların bir kısmında HSCR etyolojisi halen aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, bilinen monogenik sendromik nedenlere uymayan çoklu konjenital anomalili HSCR'li olgulardaki saptanan kromozomal değişikliklerin değerlendirilmesi ve HSCR ilişkili yeni lokusların belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tedavi edilen ve/veya izlenen, eşlik eden çoklu konjenital anomaliler nedeniyle 2013-2017 yılları arasında Tıbbi Genetik Kliniği'ne konsülte edilen ve endikasyon nedeniyle Affymetrix CytoScan Optima assay kiti kullanılarak mikroarray ile değerlendirilen HSCR'li 13 olgunun dosyaları retrospektif olarak incelenmiştir. Olguların dosyası fizik muayene, fotoğraf görüntüleri, radyoloji ve laboratuvar testleri ve ilgili branş hekimlerinin değerlendirmeleri eşliğinde incelenmiştir. Sonuçlar PubMed yayınları öncelikli olmak üzere bilimsel-akademik kaynaklarla (literatürle) karşılaştırılarak sunulmuştur.

BULGULAR: 1 dişi olguda 2q22 delesyonu, 1 erkek olguda 17p12 duplikasyonu ve başka 1 erkek olguda Xq12 duplikasyonu saptanmıştır. 10 olguda ise mikroskobik ve submikroskobik kromozomal anomali saptanmamıştır.

SONUÇ: HSCR'li olguların tanı, tedavi ve izlem yönetiminin sağlanmasında ve eksiksiz genetik danışma için, etyolojinin saptanması önem kazanmaktadır. Bu çalışma ile daha önce HSCR ile ilişkisi bildirilmemiş yeni kromozomal değişiklikler (ve olası lokuslar) saptanmıştır. Kesin tanı konulan olgu ve ailelere tam genetik danışma verilmek istendiği ancak başarılı olunamadığı belirlenmiştir. Tanı konmamış olgularda tanısal testler planlanmıştır. Ayrıca ilgili klinik hekimlerine HSCR'li olguların yönetiminde yol göstermek amaçlanarak algoritma önerileri hazırlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: *Hirschsprung hastalığı, megakolon, etyoloji, genetik, mikroarray*

ABSTRACT

The Investigation of Chromosomal Abnormalities Via Chromosomal Microarray in Non-Syndromic Hirschsprung Cases

AIM: Hirschsprung disease is a complex, multifactorial and heterogenous genetic disease which characterised by absence of enteric neuronal ganglion cells and effects different length of distal gastrointestinal system. Besides multigenic hereditary causes some uncertain environmental factors have also been held on the etiology. On the genetic etiology chromosomal causes (such as Down syndrome, 10q11 deletion, 17q21 deletion and duplication syndrome), syndromic monogenic causes (Mowat-Wilson syndrome, Waardenburg-Shah syndrome) and non syndromic monogenic causes (*RET*, *EDNRB*, *PHOX2B*) are responsible. The etiology of some cases has not been identified yet. In this study we aim to evaluate the chromosomal abnormalities of HSCR cases which have multiple congenital anomaly but do not fit to known monogenic syndromic causes and determine HSCR related new locuses.

MATERIAL and METHOD: Patients are collected from Inonu University Medical Faculty which have been treated and/or followed and consulted to Medical Genetics Outpatient Clinic between 2013-2017 because of multiple congenital anomalies. 13 patients' files and microarray results have been evaluated retrospectively which Affymetrix CytoScan Optima assay were performed. Patients' files, physical examinations, photos, radiological and laboratory findings were evaluated in the light of related departments. The results have been compared with literature that primarily PubMed and other scientific- academic resources.

RESULTS: In a girl patient deletion of 2q22 and in a boy patient duplication of 17p12 and in another boy duplication of Xq12 have been established. Neither microscobic nor submicroscobic chromosomal abnormalities have been identified in ten cases.

CONCLUSION: The detection of etiology is important for management of diagnosis, treatment, following and genetic counseling. In this study we have identified new chromosomal rearrangements (and possible locuses) which have not been related with HSCR once. We have detected that genetic counseling can not be effective. We have planned diagnostic tests for undiagnostic patients. Additionally we have prepared algorithms for medical doctors to management of HSCR cases.

KEY WORDS: *Hirschsprung Disease, megacolon, etiology, genetic, microarray analysis*

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CCR5:	C-C Kemokin Reseptörü Tip 5
DEHB:	Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu
ENCC:	Enterik Nöral Krest Hücresi
F-Aktin:	Filamentöz yapıdaki Aktin molekülü
HIV:	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , AIDS etkeni
HSCR:	Hirschsprung hastalığı
MKA-MR:	Multipl Konjenital Anomali, Mental Retardasyon
MODY:	<i>Maturity Onset Diabetes Mellitus of the Young</i> , Erken yaşta görülen erişkin tip diyabet
RNA:	Ribo-Nükleik Asit
SGA:	<i>Small for Gestational Age</i> , düşük doğum ağırlığı
SN:	Sensörinöral (işitme kaybı)
USG:	Ultrasonografi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 7.1: Olgu XX'e ait array görüntüsü	42
Şekil 7.2: Olgu XX'e ait array görüntüsü	43
Şekil 7.3: Olgu XX'e ait array görüntüsü	43
Şekil 9.1: HSCR tanı ve tedavi algoritması	55
Şekil 9.2: HSCR'ye klinik genetik yaklaşım	56



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1: HSCR’de ampirik tekrar riski	12
Tablo 6.1: <i>Digestion</i> karışımı hazırlanması	32
Tablo 6.2: <i>Digestion</i> sonrası inkübasyon süre-sıcaklık değerleri.....	32
Tablo 6.3: Ligasyon karışımının hazırlanması	32
Tablo 6.4: Ligasyon sonrası inkübasyon süre-sıcaklık değerleri	33
Tablo 6.5: PCR karışımının hazırlanması	33
Tablo 6.6: PCR koşulları.....	34
Tablo 6.7: Fragmentasyon karışımının hazırlanması	35
Tablo 6.8: Fragmentasyon inkübasyonu süre-sıcaklık değerleri.....	36
Tablo 6.9: İşaretleme karışımının hazırlanması	36
Tablo 6.10: İşaretleme basamağı inkübasyon süre-sıcaklık değerleri.....	37
Tablo 6.11: Hibridizasyon karışımının hazırlanması	37
Tablo 6.12: Hibridizasyon aşaması inkübasyon süre-sıcaklık değerleri	38
Tablo 6.13: Yıkama-boyama.....	38
Tablo 7.1: Olguların demografik özellikleri	39
Tablo 7.2: Olguların pre-op, operasyon ve post-op özellikleri	39
Tablo 7.3: Olgulara ait klinik ve genetik özellikler	40

1. GİRİŞ

Agangliyonik megakolon olarak bilinen Hirschsprung Hastalığı (HSCR, OMIM:142623), gastrointestinal sistemin (GİS) distalinde; myenterik ve submukozal pleksuslarda nöronal gangliyon hücrelerinin total yokluğu ile karakterize kompleks genetik bir hastalıktır (1). Hirschsprung Hastalığı, adını Danimarkalı çocuk hekimi Harald Hirschsprung tarafından 1888 yılında bildirilmiş makaleden almış olmasına rağmen, HSCR tarih öncesi dönemlerden bu yana bilinen çok eski bir hastalıktır. Hintli cerrahların bu hastalığı tanıyıp tedavi etmeye çalıştıkları, 17.yy'da diğer klasik karın ağrısı-kabızlık tedavilerinin yetersiz kaldığı ve hastaların kaybedildiği olgular bildirilmiştir (2,3). 19.yy'da ciddi kabızlığı olan, erken çocuklukla kaybedilen olguların otopsisinde dilate kolon saptandığı da bilinmektedir. Ancak Harald Hirschsprung, pilorik *stenoz*, *intusepsiyon* gibi pek çok hastalığı çok detaylı ve çok yönlü olarak tanımladığı, günümüzde halen kullanılan tanı-tedavi seçeneklerini kapsamlı şekilde derlediği için HSCR bu hekimin adı ile anılmaktadır (4).

Konjenital intestinal agangliyoz olarak da isimlendirilen Hirschsprung Hastalığı'nın patogenezinde, nöral krest kökenli intramural enterik sinir sistemi hücrelerinin, embriyolojik gelişim sırasında kraniyo-kaudal göç ve kolonizasyonunda, çoğalmasında, farklılaşmasında veya hücre canlılığının devamlılığının sağlanmasında yetersizlik rol oynamaktadır (5-8). Sakral nöral krestin de enterik nöral öncül hücreler için ikinci kaynak olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur (5). HSCR, insanda en sık görülen tümör dışı nörokristopatidir (9).

Hirschsprung hastalığı, ortalama 5000 canlı doğumda 1 görülür. Farklı etnik gruplarda prevalansı farklıdır ve 1:3571 oranıyla en sık Asya kökenlilerde görülür. Beyaz ve siyah ırk arasında da sıklık farkı vardır (sırasıyla 1:6667 ve 1:4761). En düşük prevalans 1:10000 oranı ile Hispaniklerde saptanmıştır. (10). Etnik gruplar arası sıklık farkı, akraba evliliği oranlarının farklı olması ve HSCR ilişkili mutasyonların farklı populasyonlarda farklı frekansta olmasıyla ilişkilendirilmiştir (11). HSCR'de erkek predominansı belirgindir. Erkeklerde HSCR oranı dişilerden 4 kat daha sıktır (12,13). Ancak agangliyonik segmentin uzunluğu arttıkça, Erkek:Dişi oranı düşer. Kısa segment HSCR'de Erkek:Dişi oranı 4.2-4.4:1 oranındayken, uzun segment HSCR'de bu oran 1.2-1.9:1'e düşer. (14-16). *SRY* geninin *RET* geni üzerindeki negatif düzenleyici etkisi, erkek baskınlığını açıklamada önemlidir (17). Erkek ve dişi fare bağırsak kültürlerinde yapılan çalışmalarda ECE-1 ve endotelin-3 mRNA düzeylerinin erkek farelerde dişi farelerden daha düşük olduğu saptanmış ve bunun erkek baskınlığında etkili olduğu düşünülmüştür (18). Eksik penetransın izlendiği ailevi olgular olmakla birlikte (%5-20), HSCR olguları sıklıkla sporadiktir (%80-95)(1). Ailevi HSCR'li olguların %15'inde ikiden den fazla kuşakta (*multiple generations*) HSCR gözlenmiştir (19). %22'sinde ebeveynlerden çocuğa geçiş ve %16'sında başka bir akrabada ortaya çıktığı saptanmıştır. Ailevi olgularda en yüksek risk, indeks olguların kardeşleri içindir (ailevi olguların %62'si) ve olguların kardeşleri, genel popülasyona göre 200 kat daha yüksek riske sahiptir (%0,02-%4)(15). İndeks olgu cinsiyetine ve kardeş cinsiyetine bağlı olarak hesaplanan ampirik tekrar riskleri tablo 1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 0.1: HSCR’de ampirik tekrar riski

İndeks Olgu Cinsiyeti	Olası Kardeş Cinsiyeti	İndeks olgu HSCR alt tipi	
		Uzun Segment	Kısa Segment
Dişi	Dişi	%9	%3
	Erkek	%33	%5
Erkek	Dişi	%13	%1
	Erkek	%17	%5

HSCR, olguların %70’inde izole olarak saptanır. Olguların %12’sini çoğunluğu Down sendromu olmak üzere kromozomal anomaliler oluşturmaktadır. %18 olguda ise eşlik eden farklı bir nörokristopati veya ek konjenital anomali mevcuttur (1,20,21). Moleküler tanı, indeks olguya bütüncül yaklaşabilmeyi, riskli bireylerin taranmasını ve tam genetik danışma verebilmeye olanak sağlamaktadır. Olguların izole-eşlik eden anomalili ayrımının yapılması, genetik yaklaşımın temelini oluşturmaktadır. İzole olguların bir kısmında bazı tek gen varyantları (*RET*, *EDNRB*) ile bazı CNV-SNP’ler suçlanırken, sendromik olgularda tek gen hastalıkları (Waardenburg-Shah, Mowat-Wilson sendromu) sorumludur. Tüm HSCR’li olguların %18’inde eşlik eden konjenital anomali olmasına rağmen bu olgularda genetik etyoloji tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada HSCR’ye eşlik eden konjenital anomalisi olan, ancak bilinen sendromik tek gen hastalıklarına uymayan olgular mikroskobik ve submikroskobik kromozomal anomaliler açısından değerlendirilmiştir. Böylece HSCR etyolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlamak ve HSCR ilişkili yeni lokuslar tanımlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.ALT TİPLER

HSCR’de agangliyonik segment rektumun distalinden başlar ve değişik boyutlarda proksimal bağırsak boyunca devam eder. En sık görülen HSCR tipi %80 olguda saptanan kısa segment Hirschsprungdur (S-HSCR). S-HSCR’de agangliyonik segment internal anal sfinkterden başlar ve rektosigmoid bölgeye sınırlıdır. Olguların %15-20’sinde agangliyonik segment sigmoid kolon proksimaline kadar uzanır ve uzun segment Hirschsprung olarak adlandırılır (L-HSCR). %5 olguda tüm kolon agangliyoniktir ve total kolonik agangliyoz olarak isimlendirilir. Nadir durumlarda (<%1) agangliyoz kolona sınırlı değildir ve ince bağırsakları da kapsar. Bu durumda total intestinal agangliyozisten (TCA) söz edilir (14,15). Bazı yazarlar tarafından, klasik sınıflamaya dâhil edilmeyen ultra-kısa segment (agangliyonik segmentin sadece rektumun distalini etkilediği olgular) ile agangliyonik segmentin, normal bağırsak segmenti üzerinde olduğu olgular (*suspended* HSCR)da bildirmiştir.

2.2.SEMPTOMLAR

HSCR, yeni doğan ve çocukluk döneminde fonksiyonel intestinal obstrüksiyonun en sık nedenidir (8). HSCR, sıklıkla üç klinikle ortaya çıkar:

1. Obstrüksiyon: Neonatal distal obstrüksiyon HSCR’nin en yaygın klinik bulgusudur. İlk 24 saatte mekonyum çıkışının olmaması HSCR için karakteristiktir ve olguların %50-90’ında gözlenir. HSCR’li olguların büyük çoğunluğu beslenme intoleransı, kusma ve abdominal distansiyon ile karakterize obstrüksiyon bulguları gösterir. Bazı olgularda çekal- apendiksiyal perforasyon ilk bulgu olabilir (15).

İlk 24 saatte mekonyum çıkışının olmadığı durumlarda tanı ve tedavi stratejisi HSCR’den farklı olan HSCR dışı medikal problemlerin de değerlendirilmesi gerekir. Mekonyum çıkışının olmadığı olgularda Hirschsprung hastalığının ön tanıda düşünülmesi için maternal enfeksiyon, intrauterin alkol-toksin maruziyeti gibi çevresel faktörler ile konjenital hipotiroidi, GİS malformasyonları (atrezi, malrotasyon, duplikasyon), kistik fibrozise sekonder mekonyum ileusu, nöronal intestinal displazi gibi diğer konjenital nedenler de dışlanmış olmalıdır (15,22-25).

2. Konstipasyon: HSCR’li olguların bir bölümü geç çocukluk hatta erişkin dönemde, daha önce tetkik edilmemiş kronik konstipasyon ile başvurabilir. Geç bulgu veren bu olgular sıklıkla anne sütü ile beslenme sürecinde belirti göstermez ancak süttan kesilme dönemini takiben ciddi kabızlık şikâyetleri başlar. Çocukluk döneminde konstipasyon sık görüldüğünden, ileri tetkik edilmesi gereken olgular ile basit konstipasyonlu olguların ayırt edilmesi gerekir. Basit olgular sıklıkla diyet, laksatif ve davranış modifikasyonu ile tedavi edilebilir. HSCR’li olgularda ise mekonyum çıkışının ilk 48 saatte olmaması, büyüme geriliği, abdominal distansiyon veya enema bağımlı dışkılama gibi eşlik

eden özellikler saptanır. Erişkin döneme kadar tetkik edilmemiş kronik konstipasyon şikayeti olan olgular, HSCR açısından değerlendirilmelidir.

3. Enterokolit: HSCR'nin mortalite oranı en yüksek kliniğidir. Olguların %10'u ateş, sepsisemi, ciddi abdominal distansiyon ve diyarenin görüldüğü HSCR-ilişkili enterokolit tablosu ile başvurur. HSCR, sıklıkla konstipasyon ile seyrettiğinden, diareli olgularda HSCR tanısı gecikebilir ve bu nedenle mortalite oranı yükselebilir. HSCR'li olguların tanınması amacıyla hastalar, mekonyum çıkışı ve geçici-tekrarlayıcı obstrüktif epizodlar açısından dikkatli sorgulanmalıdır (25,26).

2.3.TANI

2.3.1. KLİNİK VE RADYOLOJİK TANI

HSCR'nin tanısı farklı yöntemlerle konulabilir. Direkt grafide, rektal gazın izlenmediği boş rektum ve proksimal dilate bağırsak segmentleri HSCR için tipiktir (15). Obstrüksiyon derecesine göre hava-sıvı seviyeleri eşlik edebilir (27). Anorektal manometride rektal distansiyona bağlı olarak internal anal sfinkterde relaksasyonun olmaması önemlidir. Ancak testin güvenilirliği, rektoenterik refleksin olgunlaşması nedeni ile postnatal 12.günde en iyi sonucu vermektedir (15). Kontrastlı enemada gecikmiş boşalma süresi ve dilate gangliyonik bağırsak segmenti ile dar agangliyonik segment arasındaki geçiş zonunun (*transition zone*) görülmesi tanıda önemlidir. Geçiş zonu tüm HSCR'li olguların %70-90'ında izlenir (28-30).

2.3.2. HİSTOPATOLOJİK TANI

HSCR tanısında altın standart yöntem rektal biyopsidir. Histopatolojik incelemede dentat çizginin 1.5 cm proksimalinde, aperistaltik bölgeden alınmış örneklerde, submukozal ve myenterik plexuslarda ganglion hücrelerin total yokluğu ve hipertrofik sinir demetlerinin izlenmesi tanıyı kesinleştirir (Dentat çizginin 1.5 cm üzerinde fizyolojik olarak gangliyon hücreleri bulunmaz) (31). Rektal biyopsiye göre daha az invaziv olması, genel anestezi gerektirmemesi, komplikasyon riskinin düşük olması, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması nedeni ile bazı merkezlerde submukozal rektal *suction* biyopsi, tam kat rektal biyopsi yerine tercih edilmektedir (32). Bazı yazarlar, HSCR tanısında asetilkolinesteraz (AChE) boyaması ile birlikte değerlendirilen *suction* biyopsiyi HSCR tanısında altın standart olarak kabul etmektedir (32,33). Ancak frozen kesitlerde başarı kısıtlamaları olması nedeni ile AChE yerine farklı teknikler geliştirilmiştir (34).

Cerrahi sırasında agangliyonik bölgenin tamamen rezeksiyonunu sağlamak için çoklu seromusküler biyopsi gerekebilir. Frozen yorumu, cerrahi başarı şansını etkilemektedir (35).

Hematoksilen&eozen boyası (H&E) yanında HSCR tanısında kullanılan ek boyama yöntemleri de mevcuttur. Kalretinin ve nöron spesifik enolaz, H&E'ye ek olarak kullanılan boya çeşitleridir. H&E'nin immatür gangliyon hücrelerini

gösteriminde ve submukozal bölgede yetersiz kaldığı olgularda bu teknikler tanıda yardımcı olmaktadır (36).

2.4.TEDAVİ

Hirschsprung hastalığının kesin tedavisi cerrahidir ancak cerrahi öncesi ve sonrasında olguların genel durumunun iyileşmesi, dekompresyonun sağlanması, olası komplikasyonların önlenmesi amacıyla ek medikal destek ve tedavi gereklidir. Cerrahi yapılmayan olgularda mortalite oranı %80 civarındadır (37). Sıvı-besin desteğinin sağlanması, rektal irigasyon, profilaktik ve/veya tedavi amaçlı antibiyotik kullanımı gibi destekler ile eşlik eden hastalıkların tedavisi (konjenital kalp hastalığı, hipotiroidi gibi) yapılmalıdır. Cerrahi müdahalede, agangliyonik segmentin ve geçiş zonunun rezeksiyonu, normal innervasyona sahip proksimal ucun anüse anastomozu ve normal sfinkter fonksiyonunun korunması tedavide altın standarttır (5). Bu ameliyatın Swenson, Duhamel, Soave gibi farklı yöntemleri olmakla birlikte bu yöntemlerden herhangi birinin diğerlerinden daha iyi olduğu kanıtlanmamıştır (38). Son gelişmelerle beraber, daha az invaziv yöntemler de geliştirilmiştir. Laparoskopik ya da trans-anal *pull through* yöntemleri ile (seçilmiş olgularda) neredeyse skarsız cerrahi girişim mümkündür (39,40). Ancak karşılaştırmalı uzun dönem sonuçlar henüz kesinlik kazanmamıştır(38,41,42).

Erken tanı alan, kısa segment HSCR'li olgularda tek basamaklı cerrahi genellikle küratiftir. Uzun segmentli olgularda, TCA'da, komplikasyon gelişmiş olgularda kolostomi açılması gündeme gelebilir.

Anastomoz bölgesinin fistülü veya stenozu ile enterokolit, cerrahi girişimin en sık erken komplikasyonlarıdır (43). %10-15'lik oranla en sık rastlanan uzun dönem komplikasyonu kronik konstipasyondur. Yaşam kalitesinin düşüren ciddi komplikasyon ise enkoprezisdir (fokal inkontinans). Bazı olgularda lekelenme şeklinde bulgu verirken, özellikle TCA'lı olgularda ciddi inkontinans görülebilir. Cerrahi mortalite riski %6'nın altındadır ve sıklıkla kısa dönem komplikasyonlara ya da eşlik eden hastalıklara bağlıdır (44).

Nöronal prekürsör hücrelerin izolasyonu ile yapılan kök hücre tedavileri halen araştırma aşamasındadır (45,46).

3. ETYOLOJİ

HSCR multifaktöriyel bir hastalıktır; genetik ve çevresel etmenler hastalığın ortaya çıkışında ve klinik ağırlığın değişkenliğinde rol oynar(47). Daha sonra detaylı olarak tartışılacağı üzere, HSCR etyolojisinde genetik faktörler önemli yer tutmaktadır. Ancak HSCR’li tüm olgular değerlendirildiğinde mevcut bilgilerle, genetik faktörler HSCR fenotipinin ortaya çıkışını tek başına açıklamamaktadır (10). Örneğin izole HSCR’li olgularda en sık saptanan ve en çok çalışılan *RET* geni varyantları, ailevi olguların %50’sinde, sporadik olguların %10-35’inde saptanmaktadır (48-50). Mendelyen kalıtım kalıplarına uyan sendromik olgularda da HSCR fenotipi farklılık gösterebilmektedir. Örneğin dismorfik bulguları ve klinik bulguları ile ayırt edici fenotipe sahip Mowat-Wilson’lu olgularda HSCR saptanma oranı %41-71’dir(51,52). Olgular, aynı patojenik varyantı taşımalarına rağmen yaklaşık 1:2-2:3’ünde HSCR ortaya çıkmaktadır. Bazı olgular ise HSCR tanı kriterlerini karşılamadığı halde kronik kabızlık şikâyeti bildirmektedir. Bunun yanında herhangi GİS semptom-bulgusu olmayan olgular da mevcuttur. Bu farklılık, patojenik mutasyonun farklı olması (genotip-fenotip korelasyonu), henüz saptanmamış gen ve/veya varyantla ilişkili olması, bilinen mutasyona ek olarak olası düzenleyici (*modifier*) genlerde varyant taşınması, hastalıkla ilişkili benign varyantların etkisi (*disease associated polymorphism*) yanında çevresel faktörlerin de yer aldığı düşünülmektedir. Tek yumurta ikizlerinde HSCR görülme yönünden farklılıklar saptanması, HSCR etyolojisinin kompleks olduğunu ve çevresel nedenlerin rol alabileceğini düşündürmektedir(47,53). Etyopatogeneizde etkili tüm faktörler net olarak ortaya konmamıştır ancak bağlantı (*association*) çalışmaları halen sürmektedir.

3.1.ÇEVRESEL NEDENLER

HSCR etyolojisinde suçlanan çevresel etkiler tam kesinlik kazanmamıştır. Ancak bazı prenatal-perinatal özellikler ile ilaç-madde maruziyenin HSCR gelişimi açısından risk faktörü olabileceği bildirilmiştir(54). Örneğin tek merkezde doğan HSCR’li olgular ile kontrol grubu sağlıklı bireylerin ileriye dönük (*prospektif*) olarak perinatal-prenatal olası risk faktörleri açısından karşılaştırılmasına dayanan detaylı bir çalışmada anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada HSCR’li olguların (600 olgu) kontrol grubuna (3000 birey) göre daha erken haftada doğma eğiliminde olduğu saptanmıştır (OR: 1.6 kat). Ayrıca 3 ya da daha fazla sayıda gebeliği olan kadınların da (parite) HSCR’li çocuk sahibi olma riskleri, 1-2 gebeliği olan kadınlardan 1.25 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada maternal obezitenin HSCR’li çocuk sahibi olmada 1.74 kat risk oluşturduğu da bildirilmiştir. Annede tedavi edilmemiş hipotirodi varlığının da HSCR üzerindeki etkisi, obeziteye yol açması olarak yorumlanmıştır. Bir diğer yorum da, obezitede yetersiz beslenmenin neden olduğu vitamin eksikleri ile maternal ilaç kullanımının olası etkileridir. Bu çalışmada tek yumurta ikizleri arasındaki *diskordans* tekrar gösterilmiştir (53).

Bir başka karşılaştırmalı çalışmada birinci trimester maternal hiperterminin HSCR için risk faktörü olabileceği bildirilmiştir. Maternal hiperterminin, embiyolojik

gelişimde gangliyon hücrelerinin bağırsaklara göçü üzerindeki olumsuz etkileri nedeni ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (55).

Vitamin A ve aktif formu olan retinoik asit, embriyonik gelişimde önemli rol almaktadır. Retinoik asitin hem yetersizliği hem aşırı alımı, konjenital anomalilere ve perinatal ölüme neden olabilir. ENCC kolonizasyonunda retinoik asitin rol oynayabileceği, bu nedenle vitamin A eksikliğinin HSCR ekspresyonunu değiştiren bir etken olabileceği bildirilmiştir (56).

Maternal ilaç kullanımının pek çok konjenital anomaliye neden olduğu bilinmektedir. Gebeler üzerinde ilaç deneyleri yapılmadığından (etik nedenlerle), bilgiler, zorunlu maruziyet sonrası olgu sunumu olarak bildirilen olgulardan öğrenilmektedir. Örneğin bir selektif serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) türü antidepresan olan sitalopram ile tedavi edilmiş bir annenin, HSCR'li çocuk sahibi olduğu bildirilmiştir(57).

Nöronal gelişim kusuru olarak sınıflandırılacak HSCR'nin de özellikle sinir sistemi gelişimde rol oynayan yollarla ilişkili olabilecek ilaç, toksin ve kimyasal maddelerden etkilenebileceği belirtilmektedir(54,58). Örneğin bir ağrı kesici (analjezik) olan ibuprofenin hayvan modellerinde ENCC kolonizasyonunu inhibe ettiği, nöronal göçü yavaşlattığı saptanmıştır(58). Bir başka çalışmada bağışıklık baskılayıcı (immunsupresan) etkili mikofenolik asitin GMP sentezi üzerinden ENCC kolonizasyonunu baskıladığı ve böylece HSCR oluşumunda kolaylaştırıcı rol oynayabileceği belirtilmiştir(54).

3.2.GENETİK NEDENLER

Hirschsprung hastalığı multigenik, kompleks mekanizmaya sahip bir hastalıktır. Sporadik kromozomal nedenler, Mendelyen kalıtım kalıpları (otozomal dominant, otozomal resesif, X'e bağlı), azalmış penetrans, değişken ekspresyon, kopya sayısı değişiklikleri (copy number variation, CNV), tek nükleotid polimorfizmleri (single nucleotid polymorphism, SNP), modifiye edici faktörler gibi genetik nedenler ile DNA modifikasyonu (epigenetik mekanizmalar) HSCR patogeneğinde etkilidir. Ailevi olguların yarısında, sporadik olguların ise %15-20'sinde etyolojik genetik neden bulunmakla birlikte, HSCR genetiğinde halen açıklığa kavuşmamış pek çok yön bulunmaktadır (15,59).

3.2.1. KROMOZOMAL NEDENLER

HSCR'li olguların yaklaşık %12'sinde kromozomal anomali saptanmaktadır. HSCR ile ilişkilendirilmiş en sık görülen kromozom anomalisi Trizomi 21 yani Down sendromu olmakla birlikte çeşitli parsiyel trizomi ve monozomiler ile mikrodelesyon/duplikasyonlar gibi çeşitli kromozomal değişiklikler saptanmıştır. Down sendromu dışındaki kromozomal anomalilerin HSCR'li olgularda sıklığı bilinmemektedir.

HSCR ilişkili olduğu bildirilen değişikliklerin yer aldığı kromozomal bölgeler genellikle HSCR ile ilişkilendirilmiş genleri içeren lokuslardır. Örneğin *RET* genini

içeren 10q11 bölge delesyonları bilişsel gerilik, hipotoni ve HSCR fenotipi ile ortaya çıkabilir. Benzer şekilde 13q delesyonu *EDNRB* genini, 10q23 delesyonu *NRG3* bölgesini içermekte ve diğer konjenital anomalilere ek olarak HSCR fenotipini oluşturmaktadır (12).

Down sendromu (Trizomi 21): Tüm HSCR'li olguların %2-10'unu, kromozomal anomalili HSCR'li olguların %90'ını Down sendromlu olgular oluşturmaktadır. Öte yandan Down sendromlu olguların %0.6-3'ünde HSCR ortaya çıkmaktadır (15,25). Bu yüksek sıklık göz önüne alınarak, konstipasyonlu her Down sendromlu olgu potansiyel HSCR adayı olarak değerlendirilmelidir (60). Down sendromlu olgularda HSCR riski, popülasyona göre 300 kat artmıştır. Artmış riskin nedeni tam olarak ortaya konmamış olmakla birlikte HSCR-Down ilişkisini açıklayabilmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. 21. kromozomda yerleşik *DSCAM* geni intronik SNP'lerin doz bağımlı ilişkisi olduğu düşünülmüştür. Nöral hücre adezyonunda rol alan bu gen, hem merkezi sinir sisteminde hem enterik sinir sisteminde yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Down sendromundaki bilişsel gerilikten ve intestinal atrezi, HSCR gibi visseral anomalilerden sorumlu olduğu düşünülmektedir (1,61). Down sendromunda dikkati çeken bir özellik de erkek-dişi olgular arasında HSCR görülme sıklığı açısından fark olmamasıdır (1).

10q11 Delesyonu (10q11Del): *RET* genini içeren bu kromozomal bölgenin delesyonunda HSCR meydana gelebildiği ilk kez 1994 yılında Fewtrell ve ark tarafından bildirilmiştir. Olguda total kolonik agangliyoz, SGA doğum ve 30.ayda yapılan değerlendirmede motor gerilik saptandığı bildirilmiştir. Ancak yazarlar, uzun süreli hastane yatışının motor geriliği açıklayabileceğini düşünmüş ve olguyu non-sendromik olarak değerlendirmiştir (62). 2010 yılında yayınlanan bir çalışmada ise kromozomal ve moleküler anomaliler açısından araştırılan 21 HSCR'li olgunun altısında 10q delesyonu saptanmıştır (37). 10qDel sendromunun, HSCR içerisindeki sıklığı bilinmemektedir (25).

10q23 Delesyonu (10q23Del): Bu bölgede yerleşik olan *NRG3* geni, izole HSCR etyolojisinde rol alan *NRG1* geninin paralogudur (Nöroglin ailesinin bir üyesi). 2012 yılında yayınlanan bir çalışmada, 10q23.1 bölgesi ile HSCR arasında ilişki olduğu ilk kez bildirilmiştir. Bu çalışmada 3 izole ve 2 sendromik HSCR'li olguda 10q23 delesyonu saptanmış, kontrol grubundaki hiçbir bireyde delesyon gözlenmemiştir (63). Tüm HSCR'li olguların %1'inden azında etyolojiden sorumlu olduğu düşünülen 10q23 delesyonunun kesin sıklığı bilinmemektedir (25).

13q Delesyon Sendromu (Orbeli Sendromu,13qDel): HSCR'nin sıklıkla eşlik ettiği, fenotipik yelpazesi geniş olan 13q delesyonu psikomotor gerilik, büyüme geriliği, fasial dismorfizm (yüzde asimetri, geniş burun köprüsü, hipertelorizm, mikrognat, düşük ve malforme kulaklar) ve göz bulguları (mikroftalmi, epikantus, ptozis, iris kolobomu, retinitis pigmentosa, retinoblastoma) ile karakterizedir (64,65). 13q delesyonunda bildirilen konjenital anomaliler çeşitlidir (66). Santral sinir sistemi yapısal anomalileri (Dandy-Walker malformasyonu, ensefalosel, mikrosefali, korpus kallozum

agenezisi, hemilobar holoprozensefali, hidrosefali), kardiyovasküler malformasyonlar (hipoplastik sol kalp, pulmoner sekestrasyon), anogenital malformasyonlar (imperfore anüs, hipospadyas, epispadyas, inmemiş testis, bifid skrotum), GİS anomalileri (duodenal atrezi, jejunal atrezi, malrotasyon, Meckel divertikülümü), distal ekstremité anomalileri (4.-5.parmak kısalığı, başparmak yokluğu) bildirilmiştir (64-67). 13qDel olgularında HSCR sıklığının yüksek olmasında 13q22.2'de yerleşik *EDNRB* geni suçlanmıştır. *EDNRB* geni patojenik varyantlarının Waardenburg-Shah ya da izole HSCR'ye neden olduğu bilinmektedir ancak *EDNRB* genini içermeyen distal delesyone olgulara da HSCR bildirilmiş olması, *EDNRB* dışında HSCR ilişkili ek kritik bölge olduğunu düşündürmektedir (65,68,69).

2q22-q23 Delesyonu: Ciddi nörolojik bulgular (mikrosefali, bilişsel gerilik, epilepsi) ile birlikte büyüme geriliği, dismorfizm ve HSCR'nin eşlik ettiği nadir bir delesyon sendromudur (15). 2q23.1 bölgesinde yerleşik *ZEB2* (*SIP1*, *SMADIP1*) geni patojenik varyantlarının neden olduğu Mowat-Wilson sendromundan (MWS) farklı bir klinik olup ardışık gen sendromu olarak kabul edilmektedir (70). Günümüze değin 2q22-q23 delesyonlu 10'dan fazla olguda HSCR birlikteliği bildirilmiştir. Etyolojiden, MWS'de etkilenmiş olan *ZEB2* geni delesyonu sorumlu tutulmuştur (71,72).

20p Delesyon Sendromu (20pDel): Nadir bir delesyon sendromu olan 20pDel'li 35'e yakın olgu bildirilmiştir (73,74). Sıklıkla Alagille sendromu ile ilişkili olan bu kromozomal bölgede, Alagille kliniğine uymayan ancak HSCR ve ek konjenital anomalili olgular bildirilmiştir. HSCR bildirilen ilk 20p interstisyel delesyonu 1994 yılına aittir ve paternal UPD saptanan olguda saptanmıştır (75). 1997 yılında ise otizmin eşlik ettiği dismorfik bir olguda işitme kaybı ve HSCR saptandığı bildirilmiştir (76). 2009 yılında 20pDel'li 21 olgunun klinik özellikleri ve SNP array analizlerinin yayınlandığı bir çalışmada iki olguda Hirschsprung olduğu bildirilmiştir (74).

Chr22 Anomalisi: 22.kromozom anomalileri komplet non mozaik trizomi 22, ekstra derivatif 22.kromozom sendromu (Emanuel sendromu), 22q11 parsiyel tetrazomisi (Cat eye sendromu), 22q11 delesyon sendromu ve mozaik trizomi 22 durumlarını kapsayan, canlı doğumlarda nadir görülen değişikliklerdir (60,77). Genellikle çoklu konjenital anomalilerle karakterize bu sendromlarda, HSCR eşlik eden olgular bildirilmiştir. Rastlantıdan daha sık HSCR birlikteliği olduğu düşünülen bu sendromlardaki HSCR etyolojisi kesinlik kazanmamıştır (77). Ekstra derivatif 22.kromozom (Emanuel) sendromu prenatal ve postnatal büyüme geriliği, nörolojik bulgular (mikrosefali, hipotoni), kulak anomalileri (*preauricular pit*, *preauricular tag*, küçük kulaklar), yarı damak-dudak, konjenital kalp hastalığı ve ürogenital anomalilerle karakterizedir (78). Emanuel sendromlu olgulara GİS anomalileri de gözlenmektedir ve 2 farklı olguda HSCR bildirilmiştir (79,80). Benzer şekilde çoklu anomalilerle karakterize Cat eye sendromunda, mozaik trizomi 22'de ve 22q11 delesyonunda HSCR ve diğer anorektal malformasyonların birlikteliği bildirilmiş, ancak patogeneze sorumlu gen tanımlanamamıştır (15,77,81,82).

UPD (Uniparental Dizomi): UPD mekanizması Prader-Willi, Angelman, Russel-Silver gibi genetik sendromlarla ilişkilendirildiği bilinmektedir. HSCR etyolojisindeki etkisi tam olarak bilinmeyen bu mekanizma, kompleks kromozomal anomaliye eşlik eden bir olguda bildirilmiştir. Venditti ve ark, tarafından 2004 yılında yayınlanan makalede üçgen yüz, mikrognati, mikrostomi, bilateral mikroti/anoti gibi dismorfik bulgularla birlikte konjenital kalp hastalığı, gelişim geriliği ve HSCR (total kolonik agangliyoz) tesbit edilen, postmortem incelemede oksipital lob formasyonunda gerilik, subependimal nöronal heterotopi ve yaygın gliosis saptanan bir erkek olgu sunulmuştur(83). Kemik iliği ve periferik kanda 45,XX,psu dic (20;20)(p13;p13) karyotip kuruluşuna sahip olgunun 20.kromozom açısından sadece parental kopyayı (2 adet) taşıdığı bildirilmiştir. Fibroblast kültüründe ise mozaik karyotip taşıyan olgunun 20.kromozom açısından mozaik trizomik (2 psödodisentrik, 1 normal) olduğu saptanmıştır. Yazarlar, translokasyon oluşumunda 20.kromozom distalinde bir kaybın veya 20.kromozom UPD'sinin ya da mozaik trizomi 20'nin anomalilerden sorumlu olabileceğini düşünmüştür.

Bahsedilen kromozomal anomaliler dışında olgu sunumu olarak yayınlanan pek çok kromozom anomalisinde de HSCR birlikteliği bildirilmiştir. 4p12 delesyonu (84), 4q triplikasyonu (85), mozaik trizomi 2 (86), 18p delesyonu (87,88), parsiyel 4q27 trizomisi (89) gibi pek çok kromozomal anomalide, sıklıkla MKA-MR'ye eşlik eden HSCR tanımlanmıştır. İlgili lokuslardaki kesin etyolojinin belirlenebilmesi için, ileri çalışmalar ihtiyaç duyulmaktadır.

3.2.2. TEK GEN HASTALIKLARI

HSCR etyolojisinde monogenik nedenler önemli yer tutmaktadır. Olgularda etkilenecek gene bağlı olarak OD, OR ya da X'e bağlı kalıtım paterni izlenebilir (25). Monogenik nedenler sendromik ya da non sendromik HSCR ile ortaya çıkabilmektedir. Olguların %70'inde çoğunluğunda *RET* gibi tek gen varyantlarının neden olduğu non sendromik HSCR, %18'inde ise eşlik eden konjenital anomalilerin izlendiği HSCR izlenmektedir. Non sendromik olgularda erkek baskınlığının belirgin olduğu, değişken ekspresyon ve eksik penetransın izlendiği kalıtım kalıbı izlenmektedir. Eşlik eden anomalilere, ailevi olgularda sporadik olgulardan belirgin derecede daha sık rastlanmaktadır (%39-%21) ve olası Mendelyen kalıtımı düşündürmektedir. Bu nedenle eşlik eden anomali varlığında, olgular olası tek gen sendromları ve dismorfoloji açısından Tıbbi Genetik uzmanlarınca dikkatle değerlendirilmelidir (25).

A. SENDROMİK HSCR

Tüm HSCR'li olgular içerisindeki sıklıkları düşük olan, ancak dikkatli dismorfik ve detaylı değerlendirme ile klinik olarak kolaylıkla tanımlanabilecek sendromik HSCR'de etyoloji değişkendir. Olgulara sendromik tanının konması önemlidir çünkü ancak bu şekilde tam genetik danışma vermek mümkün olacaktır. Olguların olası komorbid durumlar açısından izlemi ve/veya tedavisi de planlanabilmektedir.

Waardenburg Sendromu Tip 4 (WS4, Waardenburg- Shah Sendromu): WS4, piebaldizm (beyaz perçem) ve iris heterokromatizi gibi pigmenter anomaliler ve

sensörinöral işitme kaybı ile karakterize jeneralize kristopatidir. Olguların hemen tamamında HSCR eşlik eder. *RET* geninin WS4 ile ilişkisi gösterilmemiştir (25). Ancak *EDN3*, *EDNRB* ve *SOX10* gen varyantlarının WS4'e neden olduğu bilinmektedir. *EDN3* ve *EDNRB* varyantları homozigot durumda WS4 fenotipine neden olurken heterozigot varyantlar sıklıkla izole HSCR'ye yol açar, yani diğer sendromik- sistemik bulgular eşlik etmez. Ancak bu korelasyon her zaman doğru olmayabilir (90-92). Patojenik *SOX10* varyantları ise otozomal dominant kalıtım kalıbına uyar. Bildirilen olguların tamamında ek nörolojik bulgular saptanmıştır. İzole HSCR'li olgularda ise *SOX10* varyantı bildirilmemiştir (93).

Mowat- Wilson Sendromu (MWS): Hipertelorizm, geniş dağınık kaşlar, eyer şekilli burun kemeri, küçük ve kalkık kulak lobları ve belirgin çene ile karakterize dismorfik olgulardır. Mikrosefali, bilişsel gerilik ve nöbet saptanabilir (94). Olguların %41-71'inde HSCR eşlik etmektedir. MWS etyolojisinde heterozigot *ZEB2* varyantları ile 2q22 delesyonları rol almaktadır (12,94).

Konjenital Santral Hipoventilasyon Sendromu (CCHS): Olgularda uyanıklık döneminde yeterli ventilasyona rağmen uyku sırasında yüzeysel solunumla karakterize hipoventilasyonun izlendiği nörolojik-genetik bir tablodur. Ağır olgularda uyanıklık döneminde de hipoventilasyon saptanabilir. CCHS'li olguların %90'ında *de novo* heterozigot *PHOX2B* (*PMX2B*) varyantlarının sorumlu olduğu saptanmıştır (95). Daha az sayıda CCHS'li olguda ise *GDNF*, *BDNF*, *EDN3* ve *RET* gibi izole HSCR etyolojisinde rol alan genlerde mutasyon saptanmıştır. CCHS'li olguların %20'sinde HSCR eşlik etmekte ve bu klinik tablo **Haddad sendromu** olarak isimlendirilmektedir (25). *ASCL1* geninin heterozigot mutasyonlarının Haddad sendromuna yol açtığı bildirilmiştir (96).

Berdet-Biedl Sendromu (BBS): Obezite, ilerleyici pigmenter retinopati, postaksiyal polidaktili, renal anomaliler ve hipogenitalizm ile karakterize, nadir görülen otozomal resesif ve/veya digenik genetik bir hastalıktır. Olguların %2-10'unda HSCR eşlik etmektedir (97). OMIM'de BBS'ye neden olduğu bilinen 24 gen ve 21 BBS tipi tanımlanmıştır ancak bu BBS-HSCR birlikteliği ile ilgili genotip-fenotip korelasyonu yapılamamıştır(25).

Kıkırdak-Saç Hipoplazisi: Otozomal resesif kalıtılan bir iskelet displazisi olan Kıkırdak-saç hipoplazisinde ciddi boy ve ekstremiteler kısılgına ince-dağınık saçlar ile hipoplastik anemi ve immün defektler eşlik eder. Olguların yaklaşık %7-9'unda sendroma HSCR eşlik eder ve bu olgularda sendroma özgü bulgular genellikle daha ciddi seyreder (25). Olguların hemen tamamında dizi analizi ile gösterilebilen *RMRP* mutasyonları sorumludur.

Goldberg-Shprintzen Sendromu: Mikrosefali, fasial dismorfik bulgular, bilişsel gerilik ve eşlik eden HSCR nedeni ile Mowat-Wilson sendromuyla benzerlik gösteren, ancak otozomal resesif kalıtılan bir sendromdur. Bu sendromda ek olarak polimikrogri, kolobom, megalokornea, yarı damak gibi bulgular saptanabilir (98). Goldberg-Shprintzen sendromu *KIAA1279* homozigot varyantları nedeni ile oluşur (99).

Bu sendrom, isim olarak benzerlik gösteren fakat farklı klinik özelliklere sahip Shprintzen-Goldberg kraniyosinostoz sendromundan ayırt edilmelidir.

L1 Sendromu: HSAS (Akuaduktus Slyvius Stenoza ve Hidrosefali), MASA (Mental retardasyon, Afazi, Spastik parapleji ve Adduksiyon pozisyonunda başparmak), SPG1 (X'e bağılı komplike hereditör Spastik Parapleji tip 1) ve X'e bağılı parsiyel korpus kallozum agenezisi gibi nörolojik tablolar ile HSCR'nin birlikte görüldüğü genetik hastalıktır. HSCR etyolojisinde X'e bağılı kalıtılan, bilinen, tek sendromdur. Nöronal adezyonda önemli rol oynayan ve bağırsak gangliyon hücreleri için önemli olduğu düşünülen *LICAM* geni patojenik varyantları patogeneizde sorumludur (100-102).

Fryns Sendromu: Kalıtım kalıbı otozomal resesif modele uyan bu sendromun genetik etyolojisi tam olarak saptanamamıştır. Tanı kaba yüz, hipertelorizm, makrozomi, mikrognatı gibi dismorfik özelliklerin eşlik ettiği diyafragmatik defekt ve distal falangeal hipoplazi yardımı ile klinik olarak konur (103). Olguların çoğunluğu yeni doğan döneminde kaybedildiğinden, ileri yaşlara ait yeterli veri bulunmamaktadır. Ancak Fryns sendromlu olgularda HSCR birlikteliği 9'dan fazla olguda bildirilmiştir (104,105).

Pitt-Hopkins Sendromu: Hiperventilasyon-nefes tutma epizodları gibi solunum problemleri yanında bilişsel gerilik, dismorfik bulgular ve nöbetlerin izlendiği otozomal dominant bir hastalıktır. Etiyolojiden sorumlu gen *PHOX-RET* yolağında görev alan *TCF4* genidir. HSCR bildirilen Pitt-Hopkinsli olgu sayısı sınırlıdır ancak RET yolağı ilişkisi ve çoğu olguda ciddi kabızlık saptanması olası etyopatogeneze için ipucu vermektedir (106).

Smith-Lemli-Opitz Sendromu (SLOS): Ayırt edici yüz bulguları ile ayak 2. ve 3. parmak sindaktilisi varlığında klinik olarak tanınabilen, mikrosefali ve bilişsel geriliğin eşlik ettiği otozomal resesif bir sendromdur. Daha hafif fenotipe sahip SLOS'lu olgular ile HSCR arasında ilişki olabileceği bildirilmiştir (107). Ancak 2003 öncesi yayınlarda, tersine, HSCR'nin genellikle ağır klinik özellik gösteren SLOS'lu olgularda bildirildiği bilinmektedir (108,109).

İktiyozis Folikülaris, Atrişi, Fotofobi Sendromu / Beyin Anomalisi, Retardasyon, Ektodermal Displazi, İskelet Anomalileri, Hirschsprung, Göz-Kulak Anomalileri, Yarı Damak, Kriptoörşidizm ve Renal Displazi (IFAP/BRESHECK): Çoklu konjenital anomaliler yanında cilt bulgularının da izlendiği bu nadir X'e bağılı resesif sendromda, bazı olgularda Hirschsprung saptanmaktadır (110).

Yukarıda bahsedilen sendromlar dışında Hirschsprung hastalığı ile birliktelik gösteren pek çok klinik durum vardır. Örneğin Hirschsprung'a eşlik eden iskelet anomalileri tanımlanmış-bilinen sendromlar olabileceği gibi (Werner mezomelik displazi), polidaktili, brakidaktili, distal falank hipoplazisi ile saptanan ancak henüz genetik etyolojisi tanımlanmamış olgular da (Hirschsprung, polidaktili, renal anomali ve

sağırılık, OMIM:235740) olabilir. Hirschsprung'un eşlik ettiği diğer bazı genetik hastalıklar McKusick-Kauffman sendromu, Clayton-Smith sendromu, Pallister-Hall sendromu, Aarskog sendromu, Frontonazal displazi, Goldenhar sendromu, Rubinstein Taybi sendromu ve Toriello-Carey sendromudur (15).

B. NON SENDROMİK HSCR

İzole HSCR, eşlik eden herediter ya da konjenital ek anomalinin olmadığı, olguların büyüme ve gelişme düzeylerinin yaşlarıyla uyumlu olduğu, kristopatinin sadece ince barsağın belirli bir alana sınırlı olduğu olgulardır. Agangliyonik segment uzunluğuna ve cinsiyete bağımlı düşük penetrans ve değişken ekspresyonun izlendiği, non-Mendelyen kalıtılan multigenik bir durumdur. Tüm olguların %70'inde HSCR izoledir (13,16,21,111-113)

RET Sinyal Yolağı: Bir proto-onkogen olan *RET* geni (Rearranged during Transfection), 10q11.2 bölgesinde yer alır ve bir tirozin kinaz reseptörünü kodlar. HSCR etyolojisinde en çok suçlanan gen olan *RET* geni ve bu reseptörün ligandı olan GDNF-GFR α 1 kompleksi (*glial cell line derived neurotrophic factor-glycosylphosphatidylinositol-linked receptor*), enterik sinir sistemi gelişiminde enterik nöral krest hücrelerinin (ENCC) hücre devamlılığının sağlanmasında, çoğalmasında, farklılaşmasında, migrasyon ve apoptozunda önemli rol oynar (8,114-116). GDNF-RET-GFR α 1 kompleksindeki formasyon bozukluğu, mutasyon olmasa bile, agangliyonoza neden olur (117-119). NRTN (*neurturin*) proteini, GFR α 2'ye bağlanarak RET aktivasyonunu ve bazı enterik nöron aksonlarının projeksiyonunu sağlayan bir diğer ligandır. *NRTN* homozigot mutant farelerde, myenterik ganglion hücrelerinin küçük olduğu, nöron dansitesinde azalma ve GİS motilitesinde anormallik saptanmıştır (120,121). İnsanlarda, HSCR'li olgularda *NRTN* mutasyonları bildirilmiştir ancak olguların tamamında *RET* ya da başka HSCR ilişkili gende de mutasyon saptanmıştır. Bu nedenle HSCR etyolojisinde, *NRTN*'nin modifiye edici olarak rol aldığı düşünülmektedir (23,122-124).

Sporadik HSCR'li olguların %3-10'undan, ailevi olguların %50'sinden RET sinyal yolağındaki mutasyonlar sorumludur (25). *RET* varyantları hem kısa hem uzun segment HSCR'de saptanabilir (125,126). *RET* varyantlarında penetransın %50-70 arasında olduğu, cinsiyet farklılığı ve HSCR'li segment uzunluğunda farklar olabileceği saptanmıştır (127). *RET* geninde büyük delesyonlar, insersiyonlar, anlamsız yanlış anlamlı ya da *splicing* mutasyonlar ve mikrolelesyonların oluşturduğu 100'den fazla mutasyon bildirilmiştir (48,49,128,129).

Enterik nöronların hücre devamlılığı, *RET* dozajına da duyarlıdır. Düşük *RET* dozajının, ENCC'lerde non-apoptotik hücre ölümünü arttırdığı saptanmıştır (130). Bazı yazarlar, izole HSCR etyolojisinde ENCC migrasyon anomalisinden ziyade, hücre ölümünün sorumlu olduğunu savunmaktadır (131).

RET geninin kodlamayan mutasyonları da HSCR etyolojisinde rol alır. Regulator (düzenleyici) elementlere etki ederek veya transkripsiyon, translasyon gibi

hücrel mekanizmaları değiştirerek gen ekspresyonunda değişikliğe yol açabilirler (11,122,132). Genellikle diğer *RET* mutasyonları ile sinerjistik etki göstererek fenotip üzerine etki ederler (124). İntron 1'de yerleşik olan tek nükleotid polimorfizmlerin *enhanceri* etkileyerek HSCR için kolaylaştırıcı etmen olduğu bilinmektedir [SNP1 (rs2506004), SNP2 (2435357)] (133,134). Sık görülen 3'UTR varyantının, mRNA transkripsiyonunda gecikmeye neden olduğu, böylece HSCR'den koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (132).

Ailevi HSCR olgularında 9q31 lokusunun, kodlamayan *RET* varyantları ile segregе olduğunu ve HSCR fenotipine yol açtığını gösteren çalışmalar mevcuttur (122,127).

RET geninin sadece germline mutasyonları değil, somatik mutasyonları da HSCR fenotipinde etkilidir (135). *RET* somatik mutasyonlarının tiroid ve paratiroid kansinimleri ile multipl endokrin neoplazilerde kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir (136). Benzer şekilde HSCR'li olgu ve kontrol grubu ile yapılan bir çalışmada agangliyonik bağırsak segmentlerinde SNP1 ve SNP2 homozigot varyantlarının anlamlı derecede varlığı saptanmıştır (135). Bu nedenle dokuya özgü genetik varyasyonların da patogeneizde etkili olabileceği göz önüne alınmalıdır.

- **Multiple Endokrin Neoplazi-2A (MEN2A)**, medüller tiroid kanseri, paratiroid hiperplazisi ve adrenal medüller tümörle karakterize otozomal dominant kalıtılan kanser birlikteliği sendromudur. MEN2A'nın diğer tutulumları olmadan, en az 4 kuşakta medüller tiroid kanseri görülmesi olarak bilinen **Familiyal Medüller Tiroid Kanseri (FMTC)** ile benzer genetik etyolojiye sahiptir. Etiyolojide, izole HSCR'de en sık suçlanan *RET* geni mutasyonları sorumludur. Aynı genden kaynaklanan HSCR ve MEN2/FMTC, birbiri ile kısmen ilişkilidir. HSCR'de *RET* geninde genellikle fonksiyon kaybettiren varyantlar saptanırken, MEN2'de sıklıkla fonksiyon kazandıran varyantlar sorumludur. MEN2'li olgu ve ailelerin çoğunda sistein rezidülerini etkileyerek reseptör aktivitesini değiştiren varyantlar saptanmaktadır. MEN2A'lı olguların çoğunun agangliyonik kolona sahip olmadıkları ve HSCR'li olgularda MEN2A'nın çok sık görülmediği bilinmekler birlikte, *RET* geni 609, 611, 618 ve 620 numaralı sistein kodonlarında meydana gelen mutasyonların, MEN2 ve FMTC'li olgularda HSCR ile ilişkili olduğu saptanmıştır (115,137,138). HSCR'li olguların %2.5-5'inin MEN2A ilişkili *RET* varyantı taşıdığı tahmin edilmektedir (12,139).
- **MEN2B**, GİS'te diffüz gangliyonöromlar, marfanoid iskelet anomalileri, medüller tiroid kanseri ve feokromasitoma ile karakterizedir. Olguların %90'dan fazlasında *RET* geni p.Met918Thr varyantı saptanmaktadır. Bazı olgularda diffüz gangliyonöromatöz nedeni ile yeni doğan döneminde intestinal obstrüksiyon oluşabilir (140). Bu durum klinik olarak HSCR ile karışabilir ancak olgularda agangliyonoz görülmez. HSCR ve MEN2B'nin birlikte görüldüğü bir olgu bildirilmiş olmasına rağmen bu iki klinik antite arasında bir ilişki olmadığı (artmış risk beklenmediği) düşünülmektedir (141).

Endotelin Yolağı: Endotelin sinyal yolağı, hem enterik progenitör hücrelerin proliferasyonunu sağlar hem de enterik nöral krest hücrelerinin migrasyonunda ve mikro çevrenin permabilitesinin sağlanmasında gereklidir (124). Bağırsak mezenşiminden peptid olarak salınan EDN3 (Endothelin 3, ET3), bir G protein kenetli reseptör olan EDNRB'ye bağlanır. İnaktif olarak salınan EDN3'ü aktif hale çeviren enzim ECE1 (Endothelin Converting Enzyme 1)'dir. EDN3'ün bir diğer etkisi, nöronal hücre farklılaşmasını inhibe etmesi-geciktirmesi ve böylece ENCC kolonizasyonu sağlamasıdır (124,142).

Farelerde, endotelin yolağını etkileyen mutasyonların, agangliyoz ve pigment bozukluklarına neden olduğu gösterilmiştir (143,144). İnsanda da benzer etkiler gözlenmekte ve *EDN3-EDNRB* mutasyonlarının pigmentasyon bozukluğu, işitme kaybı ve HSCR'nin görüldüğü Waardenburg-Shah fenotipine yol açtığı bilinmektedir (91). Bu yolak sadece sendromik değil, non-sendromik HSCR ile de ilişkilidir. Tüm HSCR'li olguların %5'inde *EDN3-EDNRB* yolağının sorumlu olduğu saptanmıştır (12). HSCR'nin eşlik ettiği otonomik disfonksiyon, kraniofasiyal anomali ve kardiyak defektli bir olguda, heterozigot *ECE1* mutasyonu saptandığı bildirilmiştir (145).

NRG Sinyal Yolağı: Nöroglin ailesi üyelerini bulunduran bu grup, epidermal büyüme faktörü ilişkili büyüme ve farklılaşma faktörleridir. Epitelyal, nöronal, gliyal, hücrelerin büyümesinde ve hücre-hücre etkileşiminde önemli rol oynar (146). Bu sinyal yolağında *NRG1* ve *NRG3* genleri ile HSCR arasında ilişki kurulmuştur. *NRG1* geni 8p12 bölgesinde yerleşiktir ve patojenik varyantlarının izole HSCR etyolojisinde rol aldığı saptanmıştır (147). Aynı genin benign varyantlarının ise özellikle *RET* ilişkili izole HSCR'de kümülatif etkisinin olduğu gösterilmiştir (148). *NRG3* geni 10q23 bölgesinde yerleşiktir ve 10q23 delesyonlu olgularda etyopatogeneze sorumlu olduğu düşünülmektedir (63). *NRG3* geni delesyone olan olgularda hem sendromik hem izole HSCR tanımlanmıştır.

SEMA Sinyal Yolağı: Semaphorin 3 sınıfı genler (*SEMA3*), enterik sinir sisteminde ifade edilen, nöronal migrasyon, çoğalm ve aksonal yönelimde önemli işlevler üstlenen proteinleri kodlar. *SEMA3C* ve *SEMA3D* tanımlanan olası patojenik varyantların, HSCR'li olgularda kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. *SEMA3* genlerindeki benign varyantların da, *RET* benign varyant taşıyan olgularda HSCR gelişimini indüklediği bilinmektedir (149).

3.2.3. NEDENİ BİLİNMEYEN HSCR

HSCR etyolojisinde yukarıda tanımlanan sendromik ve izole olgular dışında 'nedeni bilinmeyen' grup da yer almaktadır (25). Tanımlanan- bilinen monogenik sendromlara uymayan, ancak eşlik eden konjenital anomalilere sahip bu grup, etyolojisi tam olarak aydınlatılamamış veya neden-sonuç ilişkisi için daha fazla bilgi-kanıt gereken olgulardır. Bu olgular, tüm HSCR olgularının %5-30'unu oluşturmaktadır (12).

HSCR'ye eşlik eden konjenital anomaliler çeşitlidir. Olguların yaklaşık %5'inde kardiyak anomaliler (ASD, VSD), %4'ünde GİS malformasyonları (Meckel divertikülümü, malrotasyon, imperfore anüs, inguinal herni), %7'sinde genitoüriner

malformasyonlar (renal agenezi-displazi, ürolitiazis, inmemiş testis, hipospadyas) saptanmıştır. Bilişsel gerilik, yapısal beyin anomalileri ve fasiyal dismorfik bulgular da sık saptanan değişikliklerdir (14,15,23,150,151).

Bu olgulara yaklaşımda önerilen tanı şeması kesinlik kazanmamıştır ancak genel yaklaşım HSCR'ye eşlik eden en az bir anomali varlığında, sendromik nedenler dışlanmışsa, kromozom analizi ve/veya moleküler karyotipleme yapılmasıdır (15). Ayrıca tüm olguların direk grafi ve EKO ile değerlendirmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu gruptaki olgularda dismorfik bulgular oldukça sıktır ve mutlaka Tıbbi Genetik uzmanlarınca değerlendirme gerekmektedir (12)



4. MİKROARRAY YÖNTEMİ

Hızlı gelişen teknoloji ile genetik hastalıkların tanısında kullanılan klasik yöntemler yerini daha hızlı, daha ucuz ve daha etkin yöntemlere bırakmaya başlamıştır. Hem kromozomal anomalilerde hem tek gen hastalıklarında ve hatta epigenetik analizlerde, proteomik çalışmalarında yeni nesil yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle 1990'lu yıllardan itibaren kromozomal anomalilerin tanısında kullanılan etkin bir yöntem de kromozomal mikroyarraydir (152). Temel olarak referans DNA ile olgu DNA'sının eşleşmesine (hibritleşme) ve karşılaştırılmasına dayanan bu sistem, klasik kromozom analizlerinin saptayamadığı değişikliklerin saptanmasında, kırık noktalarının belirlenmesinde ve popülasyondaki polimorfizmlerin saptanmasında oldukça başarılıdır (74,152). Mikrodelesyon, mikroduplikasyon gibi submikroskopik anomalilerin tanısında; özellikle konjenital anomalili bilişsel geriliği olan olgularda (MKA-MR grubu) çoğu merkez tarafından ilk basamak test olarak uygulanmaktadır (153) ve tanı başarısı %15-20'dir (154).

Daha önce bahsedildiği üzere HSCR'li olguların tamamında genetik etyoloji aydınlatılmamıştır. Bu saklı genetik etyolojiden yapısal varyantların sorumlu olduğu ancak çalışmaların yetersiz olması nedeni insersiyon, delesyon, inversiyon, translokasyon ve kopya sayısı değişikliklerinin saptanamadığı düşünülmüştür (155).

Literatürde, HSCR'li olgulardaki kromozomal anomalilerin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Örneğin daha önce bahsedilen ve Broasca ve ark, tarafından yayınlanan bir çalışmada 21 olgu HSCR ilişkili kromozomal ve tek gen hastalıkları açısından incelenmiştir. Ancak bu çalışmanın kısıtlılığı, kromozomal anomalilerin sadece G bantlama ile araştırılmış olmasıdır (37). Olası submikroskopik değişiklikler atlanmış olabileceğinden olguların array ile de analiz edilmesinin uygun olacağı düşünüldü. Ayrıca bahsedilen çalışmada olguların detaylı klinikleri belirtilmemiş olduğundan, anomali saptanan olguların izole HSCR mi yoksa çoklu konjenital anomalili olgular mı olduğu anlaşılamamıştır. Bu iki nokta, çalışmanın eksik yönleri olarak değerlendirilmiştir.

2010 yılında yayınlanan bir çalışmada ise renal ve üriner anomalilere eşlik eden HSCR'li olguların SNP array analizi ile değerlendirildiği ve 16p11.2 bölgesinde mikrodelsyon saptandığı bildirilmiştir (156). Bu olgularda fenotipten delesyone olan *SH2B1* geninin (RET bağlayıcı proteine kopya verir) sorumlu tutulduğu saptanmıştır.

Jiang ve ark tarafından yayınlanan çalışmada ise 18 olgudan oluşan ve heterojen HSCR izlenen (izole, eşlik eden anomalili) grup CNV array ile taranmış ve üç lokus ile HSCR ilişkisi anlamlı bulunmuştur (*MAPK10*, *ZFHX1B*, *SOX2*) (155).

5. AMAÇ

Hirschsprung hastalığı, multifaktöriyel, multigenik, kompleks etyolojiye sahip konjenital bir anomalidir. Bu çalışmanın amacı, bilinen sendromik monogenik HSCR fenotipine uymayan ancak HSCR'ye eşlik eden ek anomaliler nedeniyle izole HSCR olarak kabul edilemeyen multipl konjenital anomalili HSCR'li olguların olası kromozomal değişiklikler açısından kromozomal mikroarray yöntemi ile araştırılmasıdır. Böylece olguların sonuçları HSCR açısından detaylı tartışılması ve HSCR etyolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlamak hedeflenmiştir. Bu çalışma ile HSCR ilişkili yeni lokuslar saptanması ve/veya mevcut literatür bilgilerinin yeni olgularla desteklenmesi mümkün olacaktır.



6. MATERYAL-METOD

6.1.OLGU GRUBU

Bu çalışmaya İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Çocuk Cerrahisi bölümünce HSCR tanısı ile takip edilen ve eşlik eden anomaliler nedeniyle 2013-2017 yılları arasında İÜ TÖTM Tıbbi Genetik Polikliniği'ne konsülte edilen olgular alınmıştır. Çalışmaya histopatolojik olarak HSCR tanısı kesinleşmiş olgular dâhil edilmiştir. Histopatolojik tanısı olmayan veya patoloji sonucu atipik HSCR ile uyumlu olgular çalışmaya dâhil edilmemiştir. HSCR ile ilişkilendirilmiş bilinen Mendelyen kalıtıma uyan olgular (Down sendromu, Mowat Wilson sendromu, Waardenburglu olgular) da çalışmaya alınmamıştır.

Çoklu konjenital anomali nedeni ile ilk olarak 550 bant seviyesinde kromozom analizi yapılan, sonrasında olası submikroskobik kromozomal değişiklikler açısından kromozomal mikroarray ile değerlendirilen HSCR'li olgular *retrospektif* (geriye dönük) olarak incelenmiştir. Olgular pedigrî, ayrıntılı sistem sorgusu, ayrıntılı fizik muayene ve görüntüleme&laboratuvar sonuçları ile değerlendirilerek derlenmiştir. Belirtilen sürelerde tarafımıza konsülte edilen 43 HSCR'li olgu incelenmiş, mikroarray endikasyonu olan ve sonucuna ulaşılabilen 13 olgu çalışmaya alınmıştır.

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma ve Yayın Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Oturma tarihi:06.06.2017, Karar sayısı:2017/12-10).

6.2.LENFOSİT KÜLTÜRÜ VE G BANTLAMA İLE KROMOZOM ANALİZİ

1. 10 ml Sodyum Heparinli tüplere 5ml periferik venöz kan örneği alınması
2. RPMI-1640 Medium 100 ml içerisine Fetal Bovine Serum (25 ml), Fitohemaglutinin (2 ml), L-Glutamin (2 ml), Gentamisin (0,2 ml) eklenerek oda sıcaklığına getirilmesi ve medyumunun konik tabanlı kültür tüplerine 10'ar cc konması
3. Her tüpe olgulara ait 0,6-0,8 cc (3-4 damla) kan örneği damlatılması ve 37 santigrat derecelik etüvde 45 derecelik açı ile 72 saat üremeye bırakılması
4. 70.5 saat sonra mitoz bölünmenin durdurulması ve iğ ipliklerinin yok olması için 100 µl kolşisin eklenmesi
5. 72 saat sonunda 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmesi. Süpernatanın tüpün altındaki çizgiye kadar atılması. Pipetaj yapılması ve hücre lizisi için 5-6 cc hipotonik solüsyon (10 ml KCl) eklenmesi ve sonrasında 15 dakika 37 santigrat derecelik etüvde bekletilmesi
6. 3 birim metanole 1 birim asetik asit oranıyla fiksatif hazırlanması. Her tüpe 7-8 damla fiksatif eklenmesi. 1000 rpm de 8 dakika santrifüj edilmesi. Süpernatanın tüpün altındaki çizgiye kadar atılması. Pipetaj yapılması ve tekrar 5-6 cc kadar fiksatif eklenmesi. 1000 rpm de 8 dakika santrifüj edilmesi. Aynı işlemin 3 kez tekrarlanması
7. Saf soğuk su içeren şalede bekletilen lamalar üzerine damlatma/ püskürtme yöntemi ile yayma yapılması
8. Preparatların hot platede 90 dakika bekletilmesi

9. 75 cc serum fizyolojik içersine 1,5 cc tripsin eklenmesi ve tripsin çözeltisi hazırlanması ve preparatların 45 saniye süreyle tripsin çözeltisi içeren şalede bırakılması. Preparatların fosfat tampon çözeltisi içersine batırılıp çıkarılması ve sonrasında Giemsa boyasında 7 dakika bekletilmesi
10. Kuruyan preparatların bant kalitesinin ışık mikroskobuyla kontrol edilmesi
11. Preparatlar kuruduktan sonra, üzerine birkaç damla Entellan damlatılarak lamel ile kapatılıp, yapıştırılması.
12. Işık mikroskobunda her olguya ait 20-50 metafaz alanının farklı zamanlarda farklı 2 araştırmacı tarafından değerlendirilmesi.

6.3.MOLEKÜLER KARYOTİPLEME İLE GENOM ANALİZİ

Çalışmaya dâhil edilen olgularda, tüm genomun analizini sağlayan, moleküler karyotipleme olarak da isimlendirilen mikroarray analizi yapılmıştır. Analiz edilen olguların tamamında, polimorfizm gösteren tek nükleotid (*single nucleotide polymorphism*; SNP) değişikliklerini tarama temeline dayanan Affymetrix® CytoScan Optima Array Kit ve Sarf Kitleri kullanılmıştır. Bu çiple genomda önceden tanımlanmış 250.000 tek nükleotid değişikliği taranabilmektedir. Array analizinde Affymetrix şirketinin sağladığı ve aşağıda ayrıntılı anlatılan protokol takip edilmiştir.

Array Analizinde Kullanılan Cihaz İsimleri ve Model

- Scanner 3000 7G
- Fluidics Station 450
- Hybridization Oven 645

Yazılım Adı ve Versiyonu

- Chromosome Analysis Suite (ChAS) Version 3.1.0.15

6.3.1. DNA İZOLASYONU

Periferik kan örneklerinden DNA elde edilmesinde Qiagen® Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır. DNA izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol aynen uygulanmıştır (157):

1. Su banyosunun 56 °C'ye getirilmesi, kan örnekleri ve diğer malzemelerin oda sıcaklığına getirilmesi
2. 1,5 ml endorf tüplerin strafora konulması, olgu etiketinin sağlanması
3. 20 µl proteinaz K'nın endorf tüpleri dibine konması
4. 100 µl olgu kan örneklerinin endorf tüpüne eklenmesi
5. PBS tamponunun çalkalanıp karıştırılması, her endorf tüpüne 120 µl eklenmesi. Karışımın vortekslenmesi
6. Karışımın 56 °C'de 10 dk. inkübe edilmesi
7. İnkübasyon sonrası 1 dk santrifüj yapılması
8. %96-100'lük etanolden 200 µl örneğe eklenip 15 sn. vortekslenmesi
9. Filtreli tüplerin olgulara göre etiketlenmesi
10. Endorf tüpündeki karışım dikkatlice filtreli tüpe aktarılması
11. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılması
12. Filtreli tüplerin yeni toplama tüplerine konulması, filtratlı tüpün atılması

13. 500 Buffer AW1 filtreli tüpe konulması 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmesi
14. Filtreli tüpün ikinci yeni toplama tüpüne konulması ve filtreli tüpün atılması
15. Filtreli tüpe 500 µl Buffer AW2 konulması
16. 14.000 rpm’de 3 dk santrifüj edilip filtratlı tüp atılması
17. Filtreli tüpün yeni ependorf tüplerine aktarılması, tam devirde 1 dk santrifüjlenmesi, ependorf tüpünün atılması
18. Filtreli tüpün yeni ependorf tüpüne aktarılması, üzerine 200 µl Buffer AE eklenmesi
19. 5 dk oda sıcaklığında bekletilip 8000 rpm’de 1 dk santrifüjlenmesi
20. Filtreli tüpün atılıp DNA içeren sıvının ependorf tüpüne alınması. DNA örneklerinin -20 °C’de saklanması

6.3.2. CytoScan OPTIMA ARRAY ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Genel Kurallar

1. Karışımlar (Master mix) hazırlanırken pipetaj kayıplarının göz önüne alınması %10 fazla hazırlanması
2. Enzimler hariç tüm bileşenlerin Spin/Vortex/Spin yapılarak çalışılması
3. Tek örnek çalışılacak olsa bile karışım (*master mix*) hazırlanması
4. İnkübasyon işlemlerinin tamamının *Thermal cycler* kullanılarak gerçekleştirilmesi

Protokol aşağıda listelenmiş 9 ana aşamadan oluşmaktadır:

1. Gün

- A. Restriksiyon enzim kesimi
- B. Ligasyon
- C. PCR

2. Gün

- D. PCR pürifikasyon
- E. PCR ürünlerinin ölçümü
- F. Fragmentasyon
- G. İşaretleme
- H. Hibridizasyon

3. Gün

- I. Yıkama, Boyama, Tarama

A. Restriksiyon enzim kesimi (Digestion) (2 saat 20 dakika)

1. Çalışılacak DNA örneklerinin 5 µL içerisinde 250-300 ng olacak şekilde dilüe edilmesi ve hazırlanan örneklerin buz üzerinde bekletilmesi
2. Tampon, enzim ve BSA ile Digestion karışımının tablodaki ölçülere göre buz üzerinde hazırlanması

Tablo 6.1: *Digestion* karışımı hazırlanması

BİLEŞENLER	(1 Örnek) - μL
Nuclease free-water	11.55
Nsp Buffer	2
BSA	0.2
Nsp Enzyme	1
Total	14.75

- Her 5 μL DNA örneği üzerine *Digestion* karışımından 14.75 μL eklenmesi (Toplam hacim 19.75 μL).
- İnkübasyon

Tablo 6.2: *Digestion* sonrası inkübasyon süre-sıcaklık değerleri

Sıcaklık	Süre
37°C	2 saat
65°C	20 dakika
4°C	5 dakika
4°C	Hold

- İnkübasyon sonrası *digestion* ürünlerinin buz üzerine alınması, beklemeden ligasyon basamağına geçilmesi

B. Ligasyon (3 saat 20 dakika)

- Tablodaki ölçülere göre tampon, enzim ve adaptor ile Ligasyon Karışımının buz üzerinde hazırlanması

Tablo 6.3: Ligasyon karışımının hazırlanması

BİLEŞENLER	(1 Örnek) - μL
T4 DNA Ligase Buffer	2.5
Adaptor Nsp I	0.75

T4 DNA Ligase	2
Total	5.25

2. Hazırlanan Ligasyon karışımından her Digestion ürünü (19.75µL) üzerine 5.25 µL eklenmesi (Toplam hacim 25µL).
3. Tabloda belirtilen süre ve sıcaklık değerlerine göre inkübasyon yapılması

Tablo 6.4: Ligasyon sonrası inkübasyon süre-sıcaklık değerleri

Sıcaklık	Süre
16°C (Pre-heat)	3 saat
70°C	20 dakika
4°C	5 dakika
4°C	Hold

4. İnkübasyon sonrası ligasyon ürünleri buz üzerine alınması ve 75µL nuclease free-water eklenerek dilüe edilmesi. İnkübasyon sonrası beklemeden PCR basamağına geçilmesi

C. PCR

1. Her örnek için 2 PCR reaksiyonu kurulacağından her örnek için buz üzerine 2 adet PCR tüpü (0.2mL) yerleştirilmesi
2. PCR tüpleri içerisine dilüe edilmiş ligasyon ürününden 10'ar µL konulması
3. Tablodaki değerlere göre PCR karışımı hazırlanması

Tablo 6.5: PCR karışımının hazırlanması

BİLEŞENLER	(1 Örnek) - µL
Nuclease free-water (Soğutulmuş)	50.3
CytoScan Taq Buffer	10
5M Betaine	20
dNTP	3.5

PCR Primer	4.2
CytoScan Taq DNA Polymerase	2
Total	90

4. Hazırlanan PCR karışımından her Ligasyon (dilüe) ürünü (10µL) üzerine 90 µL eklenmesi (Toplam hacim 100µL).
5. Tabloda belirtilen koşullara göre PCR yapılması

Tablo 6.6: PCR koşulları

Sıcaklık	Süre	Cycle
95°C	1 dakika	1X
95°C	30 saniye	30X
60°C	45 saniye	
68°C	60 saniye	
68°C	7 dakika	1X
4°C	Hold	

6. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde koşturularak (3µL PCR ürünü) kontrol edilir. 150-2200 bp aralığında ürün gözlemlenmelidir.

D. PCR pürifikasyonu

1. Oda sıcaklığında her örneğe ait 2 PCR ürününün tek bir tüpte toplanması (2mL'lik yuvarlak dipli tüp)
2. Pürifikasyon Bead'in dolaptan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesinin sağlanması
3. 360 µL Pürifikasyon Bead Solüsyonunun PCR ürünü üzerine eklenmesi. Birkaç kez yavaşça pipetaj yapılarak karışması sağlanması. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmesi
4. 16000xg'de 3 dakika santrifüj yapılması
5. Santrifüj sonunda Manyetik Stand üzerine alınarak, Bead'e değmeden sıvı faz pipet ile çekilerek atılması
6. Pürifikasyon Wash Buffer'dan 800µL Beadler üzerine eklenmesi
7. Pellet şeklinde Kalan DNA'ya bağlanmış haldeki bead dağılana kadar vorteks yapılması
8. 16000xg'de 3 dakika santrifüj yapılması

9. Santrifüj sonunda Manyetik Stand üzerine alınarak, Bead'e değmeden sıvı faz pipet ile çekilerek atılması
10. Tüplerin Manyetik Stand üzerinde, oda sıcaklığında kapakları açık şekilde 5 dakika kurumaya bırakılması
11. 27µL Elution Buffer tam olarak Beadlerin üzerine eklenerek, 2 dakika oda koşullarında inkübasyona bırakılması
12. Vorteks yapılarak Beadlerin Elution Buffer içinde tamamen dağılması sağlanması
13. 16000xg'de 3 dakika santrifüj yapılması
14. Santrifüj sonunda tüpler Manyetik Stand üzerine yerleştirilerek 5 dakika bekletilmesi
15. Tüpleri manyetik stand üzerinden almadan, sıvı (şeffaf) kısım dikkatlice pipetle çekilerek yeni tüpe aktarılması

(Bu aşamada elde edilen pürifiye haldeki PCR ürünü hemen kullanılmayacaksa - 20°C'de saklanabilir.)

E. PCR ürünlerinin ölçümü

1. Her örnek için 1 adet yeni tüp hazırlanması, her tüpe 18µL nuclease free-water ve 2µL pürifiye PCR ürünü eklenmesi
2. NanoFotometrede ölçüm yapılması, elde edilen sayının 10 ile çarpılması (çıkan sonucun 2500ng ve üstü olması beklenmektedir)
3. OD260/OD280 oranının 1.7 – 2.1 aralığında, OD320 ≤ 0.1 olması beklenmektedir.

F. Fragmentasyon (55 dakika)

1. Fragmentasyon basamağı zamana ve sıcaklığa aşırı duyarlı bir basamak olduğundan çalışma buz üzerinde ve hızlı şekilde gerçekleştirilmelidir.
2. Her örnek için yeni bir tüp alınarak 23µL pürifiye PCR ürünü eklenmesi
3. Tabloya göre fragmentasyon karışımı (master mix) hazırlanması

Tablo 6.7: Fragmentasyon karışımının hazırlanması

BİLEŞENLER	(1-8 Örnek) - µL
Soğutulmuş Nuclease free water	21.5
Fragmentation Buffer	27.5
Fragmentation Reagent	1
Total	50

4. Hazırlanan fragmentasyon karışımının her pürifiye PCR ürünü (23µL) üzerine 5µL olacak şekilde eklenmesi (Toplam hacim 28µL).
5. Tablodaki değerlere göre inkübasyon aşaması

Tablo 6.8: Fragmentasyon inkübasyonu süre-sıcaklık değerleri

Sıcaklık	Süre
37°C (Pre-heat)	35 dakika
95°C	15 dakika
4°C	5 dakika
4°C	Hold

6. İnkübasyon sonrası örneklerin buz üzerine alınması
7. 2 µL Fragmentasyon ürünü kullanılarak fragmentlerin %4'lük agaroz jelde koşturulması. Elde edilen fragmentlerin 25-125bp aralığında olması beklenmektedir.
8. Beklemeden bir sonraki aşamaya geçilmesi

G. Labeling-İşaretleme

1. Tablodaki değerlere göre ve buz üzerinde İşaretleme karışımının (labeling master mix) hazırlanması

Tablo 6.9: İşaretleme karışımının hazırlanması

BİLEŞENLER	(1 Örnek) - µL
TdT Buffer	7
DNA Labeling Reagent	1
TdT Enzyme	1.8
Total	9.8

2. Hazırlanan işaretleme karışımından her fragmentasyon ürünü (26µL) üzerine 9.8µL olacak şekilde eklenmesi (Toplam hacim 35.8 µ)
3. Tablodaki değerlere göre inkübasyonun sağlanması

Tablo 6.10: İşaretleme basamağı inkübasyon süre-sıcaklık değerleri

Sıcaklık	Süre
37°C	4 saat
95°C	15 dakika
4°C	5 dakika
4°C	Hold

4. Labeling basamağının bitimine 1 saat kala, hibridizasyon fırınının 50°C 60rpm olarak ayarlanması ve çalıştırılması
5. Beklenmeden bir sonraki basamağa geçilmesi

H. Hibridizasyon

1. Hibridizasyon basamağı için oda sıcaklığı koşullarının sağlanması, Arraylerin dolaptan çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesinin beklenmesi
2. Arrayler üzerine gerekli bilgilerin yazılması ve sisteme tanıtılması
3. Tablodaki değerlere göre hibridizasyon karışımının hazırlanması

Tablo 6.11: Hibridizasyon karışımının hazırlanması

BİLEŞENLER	(1 Örnek) - µL
Hyb Buffer Part 1	82.5
Hyb Buffer Part 2	7.5
Hyb Buffer Part 3	3.5
Hyb Buffer Part 4	0.5
OCR	1
Total	95

4. Hazırlanan karışımdan her örnek (35.8 µL) üzerine 95 µL eklenmesi
5. Tablodaki değerlere göre inkübasyonun sağlanması

Tablo 6.12: Hibridizasyon aşaması inkübasyon süre-sıcaklık değerleri

Sıcaklık	Süre
95°C	10 dakika
49°C	3 dakika
49°C	Hold

6. İnkübasyon sonunda örneklerin thermal cycler’den çıkarılmadan, her arraye 100 µL olacak şekilde yükleme yapılması
7. Yüklemenin yapıldığı arraylerin arkasındaki deliklerin tough-spot ile kapatılması ve beklenmeden hızlıca hibridizasyon fırınına yerleştirilmesi.

I. Yıkama-Boyama-Tarama

1. İlk olarak Fluidics System’in açılması “Prime” işlemi yapılması
2. Tablodaki değerlere göre yıkama-boyama işleminin yapılması

Tablo 6.13: Yıkama-boyama

TÜP	BİLEŞENLER	(1 Örnek) - µL
1	Stain Buffer 1	500
2	Stain Buffer 2	500
3	Array Holding Buffer	800

3. Daha önce sisteme tanıtılan örneklerin isimlerinin seçilmesi, böylece otomatik olarak array ile uyumlu scriptlerin aktive olması
4. Çiplerin GENEChip Scanner 3000 7G tarayıcısına yerleştirilmesi.
5. “.CEL” formatında otomatik olarak dosyalanmış sonuçların veri dosyalarının Genotyping Console yazılımına aktarılması ve “.CHP” dosyası haline çevrilmesi.
6. Tarama sonucunda mikrodizin elde edilen SNP sinyal alımı yüzdesinin hesaplanması. SNP call rate değerleri %80’in üzerindeyse analiz başarılı sonuç vermiştir ve yorumlanmaya hazırdır.

6.3.3. YORUMLAMA VE ANALİZ

XXX

7. BULGULAR

Çalışmaya alınan olguların üçü dişi, 10'u erkekti ve Tıbbi Genetik konsültasyon yaş ortalaması 6,3 idi (en küçük 1 yaş 11 ay, en büyük 18 yaş). Olguların 10'unda S-HSCR, 2'sinde L-HSCR, 1 olguda ise TCA varlığı belirlendi. Olguların çoğunluğunda (11:13) ilk 24 saatte mekonyum çıkışının olmaması, emmeme, kusma gibi tipik belirtiler mevcutken iki olguda çekum perforasyonu ilk bulgu olarak saptandı. Olgulara ait demografik ve klinik özellikler Tablo 7.1 ve Tablo 7.2'de gösterilmiştir.

Tablo 7.1: Olguların demografik özellikleri

Cinsiyet	Sayı	Yüzde
Dişi	3	%23,07
Erkek	10	%76,92
Toplam	13	%100

Tablo 7.2: Olguların pre-op, operasyon ve post-op özellikleri

Olgu No	HSCR Alt Tipi	İlk Bulgu	Ameliyat Yaşı	Ameliyat Prosedürü	Komplikasyon
1	Total kolonik agangliyoz?	Çekum Perforasyonu	3.gün	İleostomi açılması + çekum perforasyon primer onarım+ 20 cm segmental rezeksiyon pull through	Anal dilatasyon ihtiyacı
2	S-HSCR	Emme güçlüğü, mekonyum çıkışının olmaması	1.5 yaş	Transanal endorektal pull through, 19 cm rezeksiyon	Alt ekstremitte kateterizasyonuna bağlı DVT
3	S-HSCR	Kusma, mekonyum çıkışının olmaması	6.ay 1.5yaş	6.ayda anal dilatasyon, 1.5yaşta transanal pull through	-
4	S-HSCR	Kusma, mekonyum çıkışının olmaması	2.ay	Transanal endorektal pull through, 5.5cm rezeksiyon	-
5	L-HSCR	Skrotal ödem ve morarma, mekonyum çıkışının olmaması	4.gün 8.ay	4.gün Laparotomi, kolostomi açılması 8.ay Abdominal yardımlı transanal pull through	Enkoprezis
6	S-HSCR	Emmeme, safralı kusma, abdominal distansiyon	40.gün	Transanal endorektal pull through	-
7	L-HSCR	Mekonyum çıkışı olmaması, Çekum	3.gün 6.ay 15.ay	3.gün Laparotomi, kolostomi açılması 15.ay Abdominal	Opere çekum perforasyonu, roperasyon ihtiyacı

		perforasyonu		yardımlı transanal pull through	
8	S-HSCR	Emmeme, mekonyum çıkışının olmaması	2.5 yaş	Transanal endorektal pull through	Lekelenme
9	S-HSCR	Mekonyum çıkışının olmaması, hipertermi	1.ay	Abdominal yardımlı transanal pull through	-
10	S-HSCR	Mekonyum çıkışının olmaması	1.ay	Transanal endorektal pull through	-
11	S-HSCR	Mekonyum çıkışının olmaması, kabızlık atakları	14 yaş	Abdominal yardımlı transanal pull through	Enkoprezis, sosyal sorun oluşturuyor. Rektokutanöz fistül
12	S-HSCR	Kusma, mekonyum çıkışının olmaması	25.gün	Transanal endorektal pull through	Anastomozda darlık, kabızlık atakları
13	S-HSCR	Mekonyum çıkışının olmaması, kabızlık atakları	20.gün 3 yaş	Transanal endorektal pull through Reoperasyon	Reoperasyon, kabızlık atakları

7.1. OLGULARIN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Olgulara ait ayrıntılı HSCR tanımı, dismorfik bulgular, eşlik eden konjenital anomaliler ile genetik test sonuçları Tablo 7.3'te gösterilmiştir.

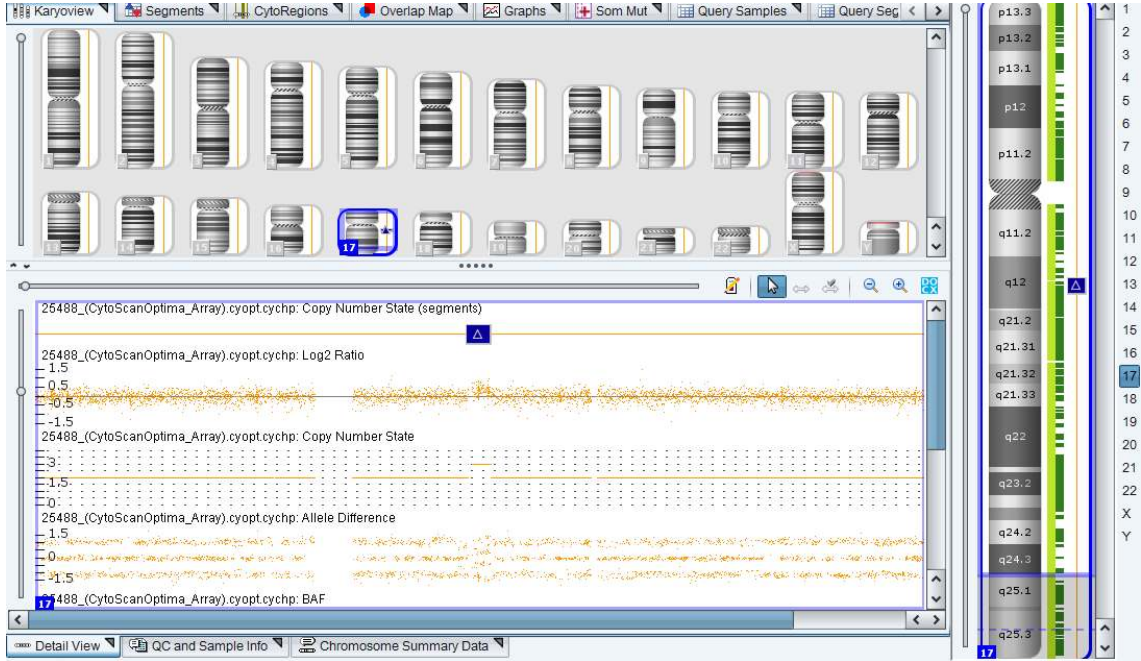
Tablo 7.3: Olgulara ait klinik ve genetik özellikler

Olgu No	Yaş Cinsiyet	HSCR tipi	Eşlik Eden Konjenital Anomali(ler)	Kromozom Analizi	Array Analizi
1	4 yaş 9 ay Erkek	Total kolonik agangliyonoz?	SGA doğum, mikrosefali, hafif dismorfizm, gelişim geriliği (belirgin dil geriliği). Febril konv+	46,XY	Normal
2	6 yaş 2 ay Dişi	S-HSCR	Büyüme geriliği, boy kısalığı	46,XX	Normal
3	6 yaş 1 ay Erkek	Ultra S-HSCR	Dismorfizm (hafif <i>downslanting</i> , <i>uptilted</i> üstdudak, kulaklar düşük	46,XY	Normal

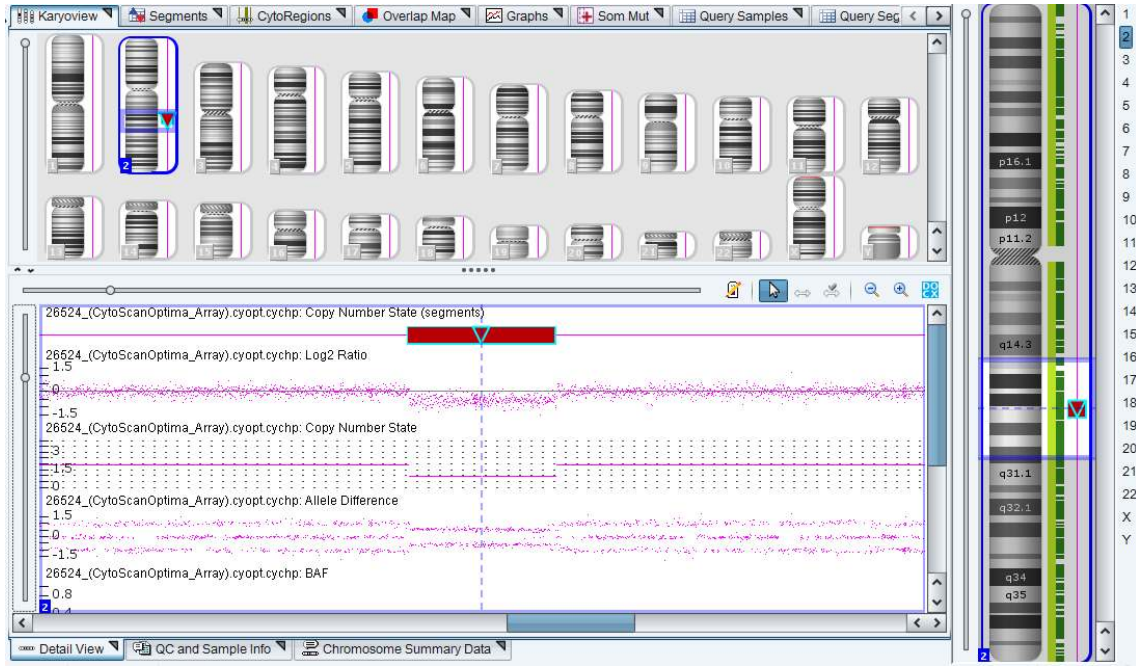
			ve kalın, kulak kıvrımları azalmış. Bilateral el 5.parmakta klinodaktili). Dil geriliği		
4	3 yaş 9 ay Erkek	S-HSCR	Bilateral el 5.parmaklarda klinodaktili, gövdede 3 adet cafe au lait	46,XY	Normal
5	7 yaş Erkek	L-HSCR	Nefrolitiyazis, pektus ekskavatum, bilişsel gerilik, hafif dismorfizm (prominent kulaklar)	Kültürde üreme olmadı	arr[hg19]17q12(834,461,488-36,300,466)x3
6	7 yaş 6 ay Erkek	S-HSCR	Nefrolitiyazis, DEHB	46,XY	Normal
7	6 yaş 4 ay Erkek	L-HSCR	Hafif dismorfizm	46,XY	Normal
8	7 yaş 4 ay Erkek	S-HSCR	Unilateral renal agenezi	46,XY	Normal
9	2 yaş Dişi	S-HSCR	Frontal bossing, badem şekilli gözler	46,XX	Normal
10	2 yaş 1 ay Erkek	S-HSCR	Hipertrikoz, lingual frenulum, unilateral renal kist ve dilatasyon	46,XY	Normal
11	18 yaş Erkek	S-HSCR	Unilateral işitme kaybı(SN? İletim?), pektus deformitesi	46,XY	Normal
12	1 yaş 11 ay Erkek	S-HSCR	Hafif dismorfizm, dil geriliği	46,XY	arr[hg19]Xq21.31q21.32 (91,662,749-92,412,507)x2
13	7 yaş 9 ay Dişi	S-HSCR	Büyüme geriliği, mikrosefali, sık geçirilmiş İYE,	Kültürde üreme olmadı	arr[hg19]2q22.3q23.3 (146,779,242-152,741,984)x1

splenomagali,
gelişim
geriliği,
hipoaljezi, saç
çekme- ağzına
saç alma
davranışı

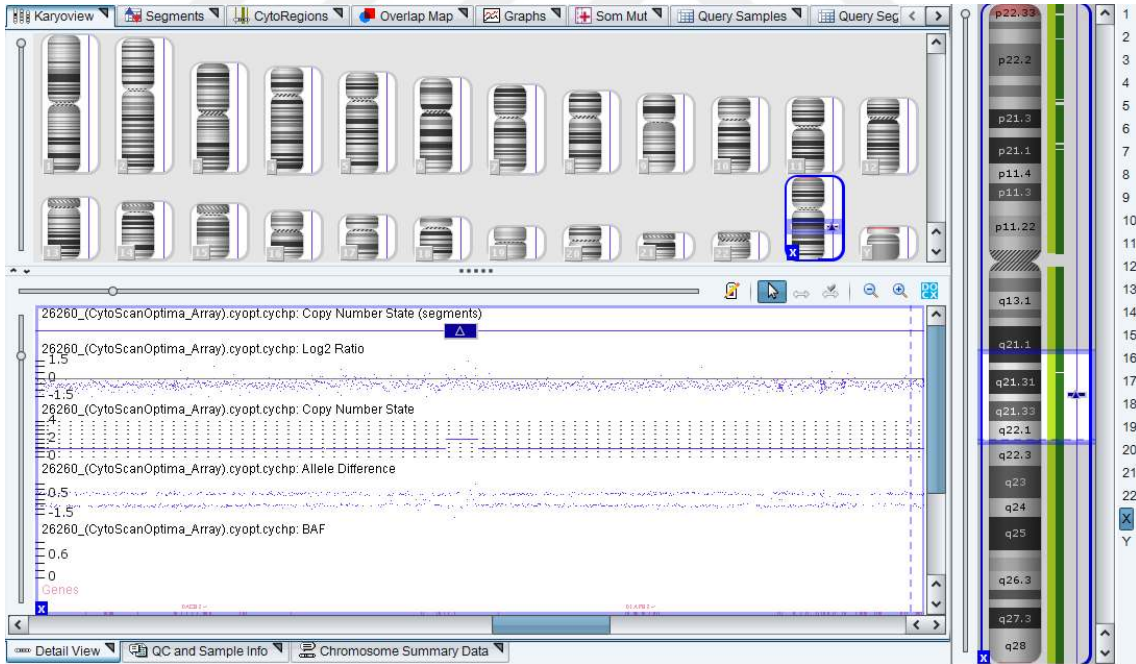
7.2. OLGULARIN MİKROARRAY SONUÇLARI



Şekil 7.1: Olgu XX'e ait array görüntüsü



Şekil 7.2: Olgu XX'e ait array görüntüsü



Şekil 7.3: Olgu XX'e ait array görüntüsü

8. TARTIŞMA

Kromozomal mikroarray, delesyon ve duplikasyonlar başta olmak üzere submikroskobik dengesiz kromozomal anomalilerin tanısında yaygın kullanılan avantajlı bir yöntemdir. Mikroarrayin yaygın kullanımı ile hem bilinen kromozomal anomalilerde fenotip-genotip korelasyonu yapabilmek hem de yeni mikrodelesyon-mikroduplikasyon sendromlarını tanımlamak mümkün olmuştur (153). Ayrıca polimorfizm olarak değerlendirilen değişiklikler ile multifaktöriyel hastalıklar arasındaki ilişkiler de saptanabilmektedir.

Mikroarray yöntemi günümüzde özellikle çoklu konjenital anomalili olgularda, bilişsel geriliklerde pek çok merkez tarafından ilk basamak test olarak uygulanmaktadır (154). Ayrıca mikroskobik kromozomal anomalilerin konfirmasyonu, kırık bölgelerinin (etkilenmiş genlerin) daha net anlaşılması, yeni nesil dizileme seçenekleri öncesi uygulanması gibi yaygın kullanım alanı bulunmaktadır. Endikasyona göre tanı başarısı farklılık göstermekle birlikte ortalama tanı başarısı %10-20 arasındadır (158,159).

Çalışmamızda, günümüze değin pek çok genotip-fenotip araştırmalarına konu olmuş Hirschsprung hastalığı taşıyan çoklu konjenital anomalili olgularda mikroarrayin rolü araştırılmaya çalışılmıştır. Çalışmaya alınan 13 olgunun 2'sinde submikroskobik kromozomal anomali, 1 erkek olguda X kromozomunda önemi bilinmeyen mikroduplikasyon saptanmıştır. Saptanan kromozomal değişiklikler ve literatür karşılaştırması aşağıda tartışılmıştır.

8.1. OLGU 5 (A.D)/ 17q12 DUPLİKASYONU SAPTANAN OLGUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Olguya ait gebeliğin düzenli antenatal izleminin sağlanamadığı ancak annenin jinekolojik hikâyesinde uterin miyom varlığı öğrenildi. Ayrıntılı sorgulamaya rağmen perinatal öyküye net olarak ulaşılamadı ancak gebeliğin miadında tamamlandığı ve doğum tartısının 2000 gr olduğu öğrenildi (<3 p). Doğumun hastane dışında gerçekleştiği, doğum boyu ve baş çevresinin bilinmediği, olası doğum komplikasyonları hakkında ailenin bilgisi olmadığı görüldü. Olgunun postnatal 1. günde mekonyum çıkışı olmaması ve skrotal şişlik nedeni ile değerlendirildiği, HSCR tanısı aldığı ve abdominal *pull through* uygulandığı öğrenildi. Ayrıca bu dönemde ileri tetkiklerde bilateral nefrolitiazis saptandığı ancak ailenin izlemlere düzenli devam etmediği anlaşıldı. Olgunun kaba ve ince motor becerileri ile dil gelişimi aşamalarının kazanım zamanı tam olarak bilinmediğinden olası nöromotor retardasyon şüphesinin giderilemediği görüldü. Soy geçmişte anne-babanın aynı küçük yerleşim biriminden olduğu ancak bilinen akrabalık ilişkisi olmadığı öğrenildi. Babanın 7 yaşındaki erkek kuzeninde ağır bilişsel gerilik, ağır nörolojik hastalık olduğu; 35 yaşındaki dişi kuzeninde ise nedeni bilinmeyen non-sendromik işitme kaybı olduğu öğrenildi. Olgunun birimimizde ilk kez 7 yaşında değerlendirildiği, bu dönemde boy, tartı ve baş çevresinin yaşıyla uyumlu olduğu saptandı. Hafif dismorfizm (geniş burun kemeri, ince üst dudak, büyük kulaklar) saptandığı ancak spesifik fenotipe benzetilemediği anlaşıldı. Bilateral el 5. parmaklarda klinodaktili, bilateral ayak 1. 2. parmak arası mesafede artış saptandığı ayrıca belirgin pektus ekskavatum saptandığı görüldü. Olgunun muayene sırasında komutlara uyduğu,

sorulara kısmen uyumlu cevaplar verdiği not edilmiştir. Çekingen davranış paterni nedeniyle psiko-sosyo-motor becerilerin net değerlendirilemediği anlaşıldı. Ancak 1. sınıfta okuduğu, 1.dönem sonunda okuma yazmayı tam olarak öğrenemediği saptandığı ve olası gelişim geriliği ile uyumlu olabileceği düşünüldü. Detaylı sorgulamada olgunun gündüz ve gece idrar kontinansını tam olarak sağlayamadığı öğrenildi.

Olgunun tam kan sayımı, temel biyokimya testleri, tam idrar tetkiki ve idrar kültürünün normal olarak değerlendirildiği anlaşıldı. Pektus ekskavatumu eşlik eden kardiyo- pulmoner anomali saptanmadığı belirlendi. Üriner USG'de bilateral hafif renal hiperekojenite saptandığından Çocuk Nefroloji Birimince izleme alındığı görüldü.

Olgunun klinik özelliklerinin bilinen monogenik HSCR ilişkili sendromlara uymaması nedeni ile kromozom analizi ve mikroarray analizi ile değerlendirildiği görüldü. Mikroarray analizinde 17q12 bölgesinde yaklaşık 1,8 MB'lık bir kazanım saptandığı belirlendi. Aileye sonuç hakkında genetik danışmanlık için randevu verildiği ancak ailenin gelmediği saptandı. Bu nedenle ebeveynlere önerilecek kromozom analizi, gerekirse array ile dengeli veya dengesiz değişiklikler açısından taramanın yapılamadığı belirlendi.

8.1.1. 17q12 BÖLGESİ VE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR

Çeşitli olgularda array analizi ile delesyon ve duplikasyon saptanan bu bölgede yerleşik genlerin tüm fonksiyonları hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Ancak bu bölgenin kayıp ve kazanımlarında (delesyon-duplikasyon) OMIM'de tanımlanmış 2 sendrom vardır. **17q12 Delesyon Sendromu** 1:14.500 sıklıkta görülen bir ardışık gen sendromudur (160). Renal ve üriner malformasyonlar, müllerien aplazi, endokrin patoloji (MODY), nörobilişsel ve psikiyatrik bulgular (bilişsel gerilik, otizm spektrum bozukluğu, şizofreni, anksiyete, bipolar bozukluk) saptanabilir. Olguların %70'i *de novo* meydana gelirken %30 olguda delesyon ebeveynlerden kalıtılmaktadır (161). Sendromun penetransı yüksektir ancak ekspresivite değişkendir. Delesyon boyutu ebeveyn ile çocuklarda aynı olmasında rağmen klinik bulgular farklılık gösterebilir (162).

Ardışık gen sendromlarından olan **17q12 Duplikasyonu** ilk kez 2006 yılında Sharp ve ark. tarafından bilişsel gerilik nedeni ile array yapılan 290 olguluk seride 1 olguda bildirilmiştir. Olgunun benzer etkilenmiş kardeşinde de aynı bölgenin duplike olduğu saptanmıştır (163). Günümüze değin 17q12 bölgesini içeren duplikasyonlu 100 civarında olgu bildirilmiştir (164). Aynı genomik bölge etkilenmiş olmasına rağmen olgular arasında (aynı aile bireyleri arasında dahi) klinik farklılıklar görülebilir. Azalmış penetrans ve değişken ekspresiviteye sahip bu sendromda olgular asemptomatikten ciddi nörolojik hastalık tablosuna kadar değişen klinik yelpazede prezente olabilir. Değişken derecede öğrenme güçlüğü, motor becerilerde ve dil gelişiminde gerilik, yapısal beyin anomalileri, epilepsi, şizofreni, davranış problemleri, otizm spektrum bozukluğu görülebilir. Renal anomaliler, endokrin problemler, özefagial atrezi- anal atrezi gibi gastrointestinal patolojiler eşlik edebilir. Olgularda değişken derecede fasiyal dismorfizm de bildirilmiştir (165-171). Olguların duplikasyonu sıklıkla etkilenmemiş ya

da minimal klinik bulgular taşıyan ebeveynlerden kalıttıkları saptanmıştır. 17q12 duplikasyonunda penetrans, %21 olarak tahmin edilmiştir (172).

17q12 Duplikasyon Sendromu duplikasyonları genellikle 1.4-1.8 Mb boyutunda olup 20 civarı gen içermektedir. Ancak değişken ekspresyon ve gen fonksiyonlarının tam olarak anlaşılamamış olması nedeni ile klinik bulgular için genotip-fenotip korelasyonu yapılamamıştır.

Olgumuzda duplike olan bu bölgede yerleşik olan genler *TBC1D3B*, *CCL3L3*, *CCL3L1*, *CCL4L2*, *CCL4L1*, *TBC1D3C*, *TBC1D3H*, *TBC1D3G*, *ZNHIT3*, *PIGW*, *GGNBP2*, *LHX1*, *AATF*, *ACACA*, *TADA2A*, *DUSP14*, *SYNRG*, *DDX52*, *HNF1B*, *TBC1D3F*, *TBC1D3* olup aşağıda detaylı tartışılmıştır.

***HNF1B (TCF2)*:** Hepatosit Nükleer Faktör 1 Beta geni bir transkripsiyon faktörünü kodlar ve böbrek, karaciğer, timüs, genitoüriner sistem ve bağırsakta eksprese olur. İnsülin Bağımsız Diabet (OMIM:125853) ile ilişkili olan bu gen aynı zamanda Renal Kist ve Diyabet Sendromundan (OMIM:137920) da sorumludur. Çocuklarda hiperekojenik/ kistik böbrek olgularının üçte birinde (1:3) etyolojide *HNF1B* geni nokta mutasyonlarının sorumlu olduğu saptanmıştır (173). Renal anomaliler ile 17q12 delesyon sendromu arasında belirgin ilişki yanında, 17q12 duplikasyonlu olgularda, *HNF1B* geni duplike olgularda renal anomali görülme riskinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu genin otizmle ilişkili olabileceği, özefagiyal atrezi nedeni olabileceği bildirilmiştir (167,173). Olgumuzda saptanan renal hiperekojeniteden *HNF1B* geni duplikasyonunun sorumlu olabileceği düşünüldü.

***LHX1*:** İnsanda beyin, timüs ve tonsil dokularında eksprese olan bu gen, nöral ve lenfoid hücrelerde transkripsiyon regülasyonundan sorumludur. Erken mezodermal gelişim ve geç dönem lateral mezoderm diferansiasyon (farklılaşma) ve nörogenezde etkili olduğu düşünülmektedir. 17q12 duplikasyon sendromundaki nöro-bilişsel bulgulardan sorumlu olduğu sanılmaktadır (166).

***ZNHIT3*:** Protein, metal iyonu ve tiroid hormon reseptör bağlayıcı fonksiyonları olan bu gen ürünü, preribozomal RNA sürecinde etkin rol alır (174). Homozigot patojenik varyantları sonucu PEHO Sendromu (Progresif Ensefalopati, Ödem, Hipsaritmi, Optik Atrofi) meydana gelmektedir (175). Otozomal resesif kalıtıldığından, heterozigot mutasyonlu kişiler asemptomatik taşıyıcıdırlar. *ZNHIT3* gen duplikasyonunun olgumuzda fenotipik etkisi olmadığı düşünülmüştür.

***AATF*:** Apoptozis Antagonize edici Transkripsiyon Faktörü olarak bilinen bu genin, histon deasetilaz için genel inhibe edici özellik gösterdiği düşünülmektedir. Hücre siklusu inhibisyonu yapmaktadır (176). Alzheimer hastalığı, plasenta previa ve ensefalit ile de ilişkili olduğu bilinmektedir (177). Bu gen duplikasyonunun, olgumuz üzerindeki fenotipik etkisi bilinmemektedir.

***PIGW*:** Glikozil fosfatidil inozitol (GPI) biyosentezi üçüncü basamağında görev alır. Homozigot- birleşik heterozigot mutasyonlarında ciddi hipotoni, epileptik nöbetler,

psikomotor gerilik, kardiyak, üriner ve gastrointestinal çoklu konjenital anomalilerle seyreden Bilişsel Geriliğin Eşlik Ettiği Hipofosfatazya Tip 5 (OMIM:616025) meydana gelir (178). Heterozigot varyasyon durumunda bilinen fenotipik etkisi yoktur. Bu gen duplikasyonu ile olgumuz arasında fenotipik ilişki kurulamamıştır.

GGNBP2 (LCRG-1): Gametogenin Bağlayıcı Protein 2'yi kodlayan bu genin ekspresyonu primer laringeal karsinomda belirgin derecede artmaktadır. Tümör büyümesini süprese ettiği (baskıladığı) düşünülmektedir. Ancak 30 primer laringeal karsinomlu olguda dizi analizi ile herhangi patojenik varyant saptanmamıştır (179). Bu gen duplikasyonunun bilinen fenotipik etkisi yoktur. Ancak spermatogenezde rol aldığı sanılmaktadır (180).

ACACA: Uzun zincirli yağ asidi biyosentezinde görevli Asetil KoA Karboksilaz enzimi alfa formunu kodlayan bu gen, beyinde yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Homozigot mutasyonlarında metabolik hastalık tablosu olan Asetil KoA Karboksilaz Eksikliği meydana gelmektedir. 1981 yılında bildirilmiş olan bu gen-hastalık ilişkisi hakkında detaylı bilgi mevcut değildir (181). Hayvan modellerinde heterozigot taşıyıcıların normal olduğu bildirilmiştir. Bu gen duplikasyonunun olgumuz üzerinde etkisi olmadığı düşünülmüştür.

TADA2A: Histon asetil transferaz kompleksinin (ATAC) alt ünitesi olan bu protein transkripsiyon düzenleyicisi olarak rol almaktadır (182). Bu gen duplikasyonunun bildirilmiş fenotipik etkisi yoktur. Olgumuz üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

DDX52: Bu gen fonksiyonu hakkında yeterli bilgi bulunmamakla birlikte nükleik asit bağlayıcı, RNA bağlayıcı görevleri olduğu sanılmaktadır (183). Bu gen ile bilinen fenotip korelasyonu yoktur. *DDX52* gen duplikasyonunun olgumuz üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

DUSP14: MAP Kinaz yolağında inaktive edici rol oynayan bu gen ürünü aynı zamanda RNA ve protein bağlayıcı özelliğe de sahiptir (184). İnflamasyon yolağında etkileri nedeni ile *DUSP14* polimorfizminin tüberkülozla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (185).

SYNRG: AP1 klaterin-adaptör kompleksi gama alt ünitesi ile ilişkili bir proteini kodlamaktadır. Bu nedenle endositoz, trans-Golgi trafiğinde rol aldığı düşünülmektedir. Gen duplikasyon ürününün bildirilmiş fenotipik etkisi yoktur. Olgumuz üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

CCL Ailesi (CCL3L3, CCL3L1, CCL4L2, CCL4L1): Lenfosit ve monositler için kemoatraktan (kemotaksi indükleyicisi) olarak görev yaparlar. HIV enfeksiyonunda CCR5 salınımı ile viral replikasyonu azaltma potansiyelleri vardır. Bu genlerin bir kısmında febril enfeksiyonlarla ilişki kurulmuş olsa da, 17q12 duplikasyon sendromunda bildirilen etkileri yoktur (186). Olgumuzda, bu gen duplikasyonlarının fenotipe etkisi olmadığı düşünülmüştür.

TBC1 Ailesi (*TBC1D3B*, *TBC1D3C*, *TBC1D3H*, *TBC1D3G*, *TBC1D3F*, *TBC1D3*): RAB5 için GTP aktive edici protein olarak görev alan bu gen ürünleri ile hastalık ilişkisi kurulmamıştır (187). Bu gen duplikasyonlarının olgumuzda fenotipik etkiye neden olduğu düşünülmemiştir.

8.2. OLGU 13 (C.Y.) / 2q22.3q23.3 DELESYONU SAPTANAN OLGUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Prenatal ve perinatal öyküde özellik bildirilmeyen olgunun postnatal mekonyum çıkışının olmadığı, klinik tanı ve histopatolojik incelemenin HSCR ile uyumlu olması nedeni transanal pull through uygulandığı öğrenildi. Olgunun ameliyat sonrası dönemde febril nöbet geçirdiği ve pediatrik nöroloji birimince ilaçsız izlendiği saptandı. Olgunun 2.5-3 yaşında, pediatri hekimi tarafından motor becerilerde gerilik saptandığı öğrenildi. Erken çocukluk döneminde 5 kez idrar yolu enfeksiyonu (İYE) nedeni ile hastane yatışı gerektiği öğrenildi. İYE nedeni tetkik edilirken splenomegali saptandığı ve izlem önerildiği ancak ailenin izlemlere devam etmediği öğrenildi. Olgunun soy geçmişinde anne-baba arasında 1.derece kuzen evliliği olduğu (teyze çocukları) görüldü. Olgunun birimimizde ilk kez 7 yaş 9 aylıkken değerlendirildiği, dişi olgunun birimimizde yapılan muayenesinde ciddi büyüme geriliği (boy:-4,-5 SD; tartı:-3,-4 SD), mikrosefali (BÇ:-4,-5 SD), *alopesi areata*, dismorfizm (*sinofiri*, uzun kirpikler, yüksek ve dar damak, çürük dişler, makroglossi) saptandığı görüldü. Olgunun ekstremitelerinde ve sırtta hipertrikoz dikkat çektiği saptandı. Bilateral ayakların içe dönük olduğu (Pes Ekino Varus) ve 1.2 ayak parmakları arası mesafede artışın not edildiği görüldü. Motor ve dil gelişiminde belirgin gerilik saptandığı belirlendi (Olguda sıralama ve yürümenin olmadığı ancak desteksiz oturabildiği görülmüştü. Anlamlı kelime kullanımının olmadığı, anlamsız sesler çıkardığı saptandı. Komutlara kısmen uyduğu saptanmıştı). Olgunun davranış paterni dikkatli sorgulandığında acıya-ağrıya karşı azalmış duyarlılık, saç çekme ve ağza saç alma davranışı, çevresindeki insanlara sarılmaya eğilimli olduğu öğrenildi. Olgu halen haftada iki gün fizik tedavi desteği ve özel eğitim almaktaydı.

Olgunun tam kan sayımı, temel biyokimya testleri, abdominopelvik USG incelemesinin normal olarak değerlendirildiği saptandı. 3 yaş civarında değerlendirilen kraniyal MR görüntülemesinde yapısal anomali saptanmadığı belirlendi.

Olgunun dismorfik bulguları ile diğer klinik özelliklerinin bilinen HSCR ilişkili monogenik sendromlara uymaması nedeni ile kromozom analizi ve mikroarray analizi ile değerlendirildiği görüldü. Mikroarray analizinde 2q22.3q23.3 bölgesinde yaklaşık 5,96 MB'lık bir kayıp saptandığı ve aileye anne- babak romozom analizi, gerekirse array ile dengeli veya dengesiz değişiklikler açısından tarama önerildiği görüldü. Ancak ailenin izlem önerilerine kompiyansının düşük olduğu ve Tıbbi Genetik kontrollerine gelmediği bilgisine ulaşıldı.

8.2.1. 2q22.3q23.3 BÖLGESİ VE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR

Bu bölge, hem kromozom analizi hem array testi ile MKA-MR grubu fenotiple ilişkilendirilmiş bir kromozom bölgesidir (188). Bu bölgenin özellikle 2q23.1 bandı, iyi tanımlanmış bir sendromla (**2q23.1 Mikrodelesyon Sendromu**) ilişkilidir. 2q23.1

bölgesini içeren delesyonlar 2009 yılından itibaren literatürde yer almış ve günümüze değin 100'ü aşkın olgu bildirilmiştir (Kaynak). Bu mikrolelesyon sendromu Angelman sendromu, Smith-Magenis sendromu ve Rett sendromu ile benzer bazı bulgulara sahiptir. Bildirilmiş olgularda, olgumuza benzer şekilde belirgin psikomotor gerilik, özellikle ifade edici dil alanında gerilik, büyüme geriliği ve nöbetler izlenmiştir. Olgulara değişken derecede fasiyal dismorfizm eşlik edebildiği saptanmıştır. Olgularda uygunsuz mutlu yüz ifadesi bildirilmiş ve bu nedenle psödo-Angelman sendromu olarak da isimlendirilmiştir. Detaylı bildirilen olgularda ataksi, uyku problemleri, hipotoni, agresif tutum, diş gıcırdatma (bruksizm) tanımlanmıştır. Bu geniş klinik yelpazeye rağmen 2013 yılına kadar bildirilen hiçbir olguda 2q22.3-q23.3 delesyonu ile HSCR birlikteliği bildirilmemiştir. 2013 yılında Bravo-Oro ve ark tarafından, olgumuzla çok benzer klinik özellikler gösteren erkek bir olgu bildirilmiştir. 2q22.3q23.3 bölgesi delesyona uğrayan bu olguda 18 genin etkilendiği saptanmıştır. Gelişim geriliği, hipotoni, epileptik nöbetler ve dismorfik bulgular yönünden olgumuzla benzeşen bu olguda da HSCR saptandığı bildirilmiştir. Yazarlar, chr2:146,509,221-146,510,330 (hg19) bölgesinde yer alan *ZEB2* potansiyel düzenleyici bölgesinin (*regulatory region, RRI*) delesyondan etkilendiğini ve HSCR patogenezinde muhtemel etkileri olduğu yorumunu yapmıştır. Ancak bizim olgumuzda delesyone olan bölge chr2:146,779,242-152,741,984 (hg19) bölgesi olup literatürdeki olgudan daha küçük delesyona sahiptir. Ayrıca ilgili *ZEB2* düzenleyici bölgesi olgumuzda delesyone olmamasına rağmen olgumuzda HSCR ortaya çıkması, bu bölgede HSCR ilişkili olası yeni lokusların olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca bu olguda farklı olarak kırmızı hücre aplazisi saptandığı ve *RIF1* geni delesyonunun patogenezinde sorumlu olabileceği yorumu yapılmıştır (153). Olgumuzda *RIF1* geni delesyonu saptanmış, ancak herhangi periferik kan hücre etkilenmesi görülmemiştir.

Olgumuzda delesyone olan bu kromozomal bölgede 14 gen yer almaktadır. Bunlar; *ACVR2A* (102581), *ORC4* (603056), *MBD5* (611472), *EPC2* (611000), *KIF5C* (604593), *LYPD6* (613359), *MMADHC* (611935), *RND3* (602924), *NMI* (603525), *TNFAIP6* (600410), *RIF1* (608952), *NEB* (161650), *ARL5A* (608960), *CACNB4* (601949) olup aşağıda irdelenmiştir.

MBD5 (KIAA1461): 2q23.1 bölgesinde yerleşik olan bu gen, metil-CpG bağlayıcı gen ailesinin bir üyesidir. Rett sendromundan sorumlu *MECP2* geni ile yakın ilişkilidir ve kromatin modifikasyonunda rol almaktadır. Ayrıca gen ekspresyon düzenlenmesinde de önemlidir (189). *MBD5*, erişkin beyin dokusundan en yüksek ekspresyon düzeyine sahiptir. Serebellumda değişik düzeylerde eksprese olan bu gen fetal beyinde ve spinal kordda da düşük oranlı eksprese olmaktadır. *MBD5* geni, 2q23.1 mikrolelesyon sendromunda olguların hemen tamamında ortak delesyone olan gendir. Ayrıca *MBD5* geninde nokta mutasyonu saptanan olgularda, 2q23.1 mikrolelesyonu ile fenotipik bulguların benzerliği de *MBD5*'in 2q23.1 mikrolelesyonu sendromunda esas sorumlu gen(*master gene*) olduğu fikrini güçlendirmektedir (189,190). Williams ve ark, tarafından bildirilen 2 olguda 2q23.1 delesyon bölgesi detaylı incelenmiş, *minimal critical region*'ın *MBD5* gen bölgesi olduğu saptanmıştır (191). *MBD5* genini içeren

delesyonlu olgularda ciddi gelişim geriliği, ciddi dil geriliği (özellikle ifade edici dil alanında gerilik belirgindir), davranış problemleri (otizm spektrum bozukluğu, uygunsuz gülme-mutlu ifade, dış gıcırdatma), mikrosefali, epileptik nöbetler, büyüme geriliği ve değişken derecelerde fasiyal dismorfizm eşlik etmektedir (192-195). *MBD5* geni, Otozomal Dominant Bilişsel Gerilik (OMIM: 156200)' ten sorumludur. Farklı olgularda *MBD5* çerçeve kayması mutasyonuna sahip (*frameshift*) ya da delesyonlu olgularda sosyal becerilerde kısıtlılık, bilişsel gerilik, epilepsi, uyku ve davranış problemleri bildirilmiştir (190,196,197). Olgumuzda saptanan büyüme geriliği, gelişim geriliği, mikrosefali, nöbet öyküsü ile ağza saç alma, çevredeki insanlara sarılma, uygunsuz mutlu yüz ifadesi, ağrıya duyarsızlık gibi davranış paterninin *MBD5* geni ilişkili olduğu düşünüldü. Daha önce bildirilen olgular gibi Angelman sendromu ve Smith-Magenis sendromu ile benzer bulgulara sahipti. Olgumuzun 7 yaş 9 aylık olmasına rağmen tek kelime kullanma yetisinin olmaması da, literatürle uyumlu olup *MBD5* geni fenotipine uymaktaydı.

EPC2: *MBD5* ile komşu olan ve benzer fenotipik etkileri olan bu gen heterokromatin formasyonunda görev alır. Transkripsiyon aktivasyonunda düzenleyici ve bazı *represe* edici (baskılayıcı) fonksiyonları da bilinmekle birlikte DNA tamir mekanizmasında da rol almaktadır. Williams ve ark, tarafından bildirilen olgularda, *MBD5* ve *EPC2* gen ekspresyonunun, kontrol grubuna göre %50 daha az olduğu bildirilmiştir (191). *MBD5*'in neden olduğu 2q23.1 mikrodelsiyonu sendromlu olgularda, bulguların şiddetini ağırlaştırdığı düşünülmektedir. Genotip-fenotip korelasyonu yapabilmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KIF5C: (*NKHC2*): Nöron Spesifik Kinezin Ağır Zincir 2): Mikrotübül ilişkili hücre içi taşınımında rol alan Kinezin ailesine ait proteini kodlayan bu gen, insanda en çok beyinde eksprese olmaktadır. Prostat, testis, ovaryum, böbrek ve ince bağırsaklarda da ifade edildiği bilinmektedir. 2013 yılından itibaren *KIF5C* ilişkili fenotipler bildirilmiş, bu genin kompleks kortikal displazilerle ilişkili olduğu saptanmıştır (198). *KIF5C* heterozigot patojenik varyant taşıyan bazı olgularda erken başlangıçlı epilepsi, mikrosefali, saptatik tetrapleji, artrogripoz gibi ağır nörolojik bulgular saptanmış olup erken yaşta (neonatal dönemde) ölümle sonuçlanmıştır. Neonatal ölüme neden olmayan olgularda ciddi dil gelişim geriliği, mikrosefali, hipertoni, stereotipik el hareketleri ve kendine zarar verme davranışları bildirilmiştir (199,200). Olgumuzda saptanan mikrosefali ve sarılma davranışının hem *MBD5* geni hem *KIF5C* ilişkili olabileceği düşünüldü. Ancak kraniyal MR görüntülemesinin normal olması nedeni ile olgumuzda kortikal displazi dışlanmıştır.

CACNB4: Voltaj kapılı kalsiyum kanalı genlerinden biridir. Serebellumda, böbrek, testis, retina ve lenfoblastlarda eksprese olmaktadır. Merkezi sinir sisteminde önemli görevleri vardır. *CACNB4* geni inaktive edilmiş farelerde absans epilepsi, letarji, ataksi gibi çok çeşitli nörolojik tablo ortaya çıkmıştır . Bu genin heterozigot patojenik mutasyonları insanda Epizodik Ataksi Tip 5 (OMIM:613855) ve Juvenil Myoklonik Epilepsi Tip 6 (OMIM:607682) tablolarına neden olur. Bildirilen olgularda bilişsel gerilik ve/veya motor retardasyon saptanmamıştır. Bu gen delesyonunun olgumuzdaki

erken başlangıçlı epilepsiye neden olduğu ya da *MBD5* geni birlikteliği ile epileptik tabloyu kötüleştirmiş olabileceği düşünülmüştür. Fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

LYPD6: Şempanze ve insanda %100 benzerlik gösteren bu gen, insanda pek çok dokuda eksprese olmaktadır. En çok ifade edildiği dokular beyin ve kalptir (201). Gen fonksiyonu ve olası patojenik varyantların fenotipik etkileri bilinmemektedir ve belirleyebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

ORC4: Origin Recognition Complex (ORC) ailesinin bir üyesi olan bu gen, mayalarda, fare ve insanlarda homoloji göstermektedir (202). Diğer ORC grubu proteinleriyle yakın ilişkilidir ve özellikle *ORC2* ile G1 fazı ve DNA replikasyonu geçişinde rol aldığı düşünülmektedir (203). Olgumuzun fenotipik bulgularını açıklayacak işlevi bilinmemektedir.

RND3 (RHOE): RAS ilişkili Rho ailesinin bir üyesi olan bu gen, aktin hücre iskeletinin, hücre dışı büyüme faktörlerine (*ekstracelular growth factors*) vereceği yanıtı organize etmektedir. *RND3* geni ilişkili (bilinen) hastalık yoktur. Bu gen delesyonunun olgumuz üzerinde fenotipik etkisi olduğu düşünülmemiştir.

NMI (N-Myc and STAT Interactor):Hücre büyüme sinyalleri, özellikle *MYC* ve N-MYC ilişkili olan bu gen hakkında bilgilerimiz kısıtlıdır. Ancak beyin dokusu hariç hemen tüm fetal ve erişkin dokularda eksprese olduğu bilinmektedir. Özellikle *MYC* ekspresyonunun arttığı myeloid lösemilerde, *NMI* ekspresyonu da artmış olduğu saptanmıştır (204). Bu gen delesyonunun olgumuz üzerinde fenotipik etkiye yol açtığı düşünülmemiştir. Ancak yeni çalışmalar ile yeni bilgiler eklenmesi durumunda olgunun olası myeloid maligniteler açısından takibe alınması gerekli olabilir.

TNFAIP6 (TNFα İndükleyici Protein 6): TNF Stimüle Edici Gen 6 (*TSG6*) olarak da bilinen bu gen, Hyalüronat bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir (205). Normal fibroblastlarda ve sinoviyal sıvıda bulunmuştur ve bu nedenle romatoid artrit gibi bağ doku hastalıklarında olası rolü olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca tularemide, kronik aktif EBV enfeksiyonunda da etkilidir (206). OMIM’de tanımlanmış fenotip ilişkisi olmayan bu gen delesyonunun olgumuz üzerinde fenotipik etkisi olduğu düşünülmemiştir.

RIF1: Maya, fare ve insan arasında homoloji gösteren bu gen, telomerler ve telomer uzunluğu ile ilişkilidir (207). 2004 yılında yayınlanan bir çalışmaya göre, *RIF1* normal fonksiyon gösteren telomerlerden ziyade disfonksiyone telomerlerde aktiftir. Bu nedenle *RIF1* aktivitesinin DNA hasarına bir cevap olduğu düşünülmüştür (208). Ayrıca hücre bölünmesinin S fazında, replikasyon zamanlamasında da anahtar rol aldığı bilinmektedir (208,209). Bu gen delesyonunun olgumuz üzerinde fenotipik etkisi olup olmadığı bilinmemektedir. Nitekim günümüze değin *RIF1* ilişkili hastalık ya da fenotip bildirilmemiştir. Ancak yukarıda bahsedilen 2q22.3q23q3 delesyonlu olgu sunumunda, saf kırmızı hücre aplazisi geliştiği ve bunun *RIF1* geni ilişkili olabileceği yorumu yapılmıştır (153).

NEB: Hücre iskeletinde çok önemli görevler üstlenen Nebulin proteinini kodlar. Sarkomer ve miyofibrillerin integrasyonunu sağlar. F-Aktine bağlanarak stabilizasyonunda görev alır (210). Bu genin homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonlarında Nemalin miyopatisi (OMIM: 256030) oluşur. Heterozigot taşıyıcılar etkilenmemiştir ve bilinen fenotipik etki yoktur. Bu gen delesyonunun olgumuz üzerinde etkisi olduğu düşünülmemiştir.

ARL5A: Veziküler transpotta görev alan nükleotit bağlayıcı ADP-Ribozilasyon Bağlayıcı Protein ailesindendir. En yüksek ekspresyon düzeyi kalptedir. Ayrıca hepatik tümöral dokularda bu gen ifadesinin 5-12 kat arttığı saptanmıştır (211). Bilinen gen-fenotip ilişkisi yoktur. Olgumuzda fenotipi açıklayacak özelliği olduğu düşünülmemiştir.

ACVR2A: İlk kez 1991 yılında tanımlanan ve 1992’de cDNA’sı belirlenen bu gen Tip 2 Aktivin A reseptörünü kodlamaktadır (212,213). İnsan trofoblast hücrelerinden izole edilen bu genin plasentada otokrin/parakrin etki ile *reguluar* (düzenleyici) rol aldığı saptanmıştır. Ayrıca insan beyinde ve ovaryumda da ekprese olduğu bilinmektedir. 2005 yılında yayınlanan çalışmada ise miyostatin gibi bazı ligandlar aracılığı ile in vivo ortamda kas büyümesi üzerine önemli etkileri olduğu saptanmıştır (214). Olgumuz üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir.

MMADHC (C2ORF25): Kobalamin (vitamin B12) metabolizması erken basamaklarında görevli bir proteine kopya verir. Bu genin heterozigot mutasyon taşıyıcılığında bilinene fenotipik etki beklenmez. Ancak homozigot patojenik varyant durumunda Homosistinüri ve Metilmalonik asidüri cblD Tipi oluşur. Bu gen delesyonunun olgumuz üzerinde fenotipik etkisi olduğu düşünülmemiştir.

8.3. OLGU 12 (H.M.S) / Xq21.31q21.32 DUPLİKASYONU SAPTANAN OLGUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Antenatal izlemi yapılmadığı öğrenilen olgunun perinatal ve erken postnatal bulguları hakkında da net bilgiye ulaşılamadı. Ancak gebeliğin miadında tamamlandığı ve doğum tartısının 3500 gr olduğu öğrenildi. Doğum evde gerçekleştiğinden doğum boyu ve baş çevresinin bilinmediği saptandı. Olgunun postnatal 1.günde mekonyum çıkışının olmaması ve kusma nedeni ile tetkik edildiği, 9. günde HSCR tanısı aldığı ve yeni doğan döneminde transanal *pull through* uygulandığı bilgisine ulaşıldı.

Olgunun kaba-ince motor ve dil becerileri kazanma zamanı tam olarak öğrenilemedi. Soy geçmişte anne-babanın aynı küçük yerleşim biriminden olduğu ancak bilinen akrabalık ilişkisi olmadığı öğrenildi. Babanın akraba evliliği yapmış olan teyzesinin 4 çocuğunda ve etkilenmiş kızından olan 3 torununda sinir-kas hastalığı olduğu öğrenildi. Hastalığın adına ulaşılamadığından ve bu olgular tarafımızca değerlendirilemediğinden SMA ve DMD/BMD grubu hastalıklar dışlanamadığı ve olgunun bu hastalık yönünden (taşıyıcılık açısından) taranamadığı anlaşıldı.

Olgu ilk kez 2 yaşında birimimizde değerlendirildiğinde fizik muayenede boy, tartı ve baş çevresinin yaşıyla uyumlu olduğu saptandı. Hafif fasiyal dismorfizm ile

motor becerilerde gerilik saptandığı anlaşıldı. Olgunun anneyi tanıdığı, göz kontağı kurduğu, baş kontrolünü sağlayabildiği ve destekle oturabildiği belirlendi. Ancak adımlama-sıralama olmadığı saptandığı anlaşıldı. Olgunun heceleme yapabildiği ancak tek kelime kullanamadığı, cümle yapısı oluşturamadığı belirlenmişti. Olgunun Gelişimsel Pediatri ya da Çocuk Nöroloji hekimlerince gelişim geriliği açısından değerlendirilmediği öğrenildiği, ailenin ilgili branşlara konsülte edildiği ancak ailenin önerilere uymadığı anlaşıldı.

Olgunun tam kan sayımı, temel biyokimya testleri, tam idrar tetkiki normal olarak değerlendirilmişti.

Olgunun klinik özelliklerinin bilinen monogenik HSCR ilişkili sendromlara uymaması nedeni ile kromozom analizi ve mikroarray analizi ile değerlendirildiği, mikroarray analizinde Xq21.31q21.32 bölgesinde yaklaşık 0,74 MB'lık bir kazanım saptandığı anlaşıldı. Anne-babaya önerilen kromozom analizi ve mikroarray analizinin, aile kompiyansının düşük olması nedeni ile yapılamadığı görüldü.

8.3.1. Xq21.31q21.32 BÖLGESİ VE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR

Olgumuzda duplike olan bu bölgede OMIM'de tanımlanmış *PCDH11X* geni yer almaktadır.

***PCDH11X* (X'e Bağlı Protokaderin 11):** Bu gen X ve Y kromozomları üzerinde bulunan homolog genlerden biridir. Xq21.2/Yp11.2 bölgelerinde yerleşiktir. *PCDH11X* ve *PCDH11Y* genleri kaderin süper ailesi üyesidir ve kalsiyum bağımlı hücre adezyonunda potansiyel rolleri vardır. Hücreler arası iletişimde, aksonal yönelimde ve serebral korteks iletişimde rol alan *PCDH11X* geni aynı zamanda dil gelişiminde ve serebral asimetride de etkilidir (215,216). 2010 yılında *PCDH11X* gen duplikasyonun bilişsel gerilik nedeni ile tetkik edilen bir ailede *segrege* olduğu ancak patojenik etkisinin tam olarak bilinmediği bildirilmiştir (217). 2013 yılında disleksi nedeni ile araştırılan 11 aile üzerinde yapılan bir çalışmada, etkilenmiş bireylerde *PCDH11X* geni parsiyel duplikasyon ve delesyonunun saptandığı ve bu genin disleksi açısından yeni aday gen olabileceği düşünülmüştür (218). Olgumuzda saptanan nöromotor geriliğin özellikle dil geriliğinin bu gen duplikasyonu ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Ek olarak bu genin nöronal migrasyonda da olası etkileri olabileceği ve bu nedenle Hirschsprung hastalığı ve motor gelişim ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Ancak bu bölge duplikasyonunun Türk popülasyonunda polimorfik olarak izlendiğini belirten bir çalışmanın da olduğu göz önüne alınması gerektiği düşünüldü. Özyılmaz ve ark, tarafından 2017'de yayınlanan bu çalışmada gelişim geriliği, otizm spektrum bozukluğu ve konjenital anomalili 971olgu ile 301 ebeveyn mikroarray ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 12 kişide Xq21.31q21.32 bölgesinde kazanım (duplikasyon) saptandığı ve bu değişikliğin polimorfizm olarak değerlendirildiği bildirilmiştir (219). Tüm bu çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde bu duplikasyonun patojenik etkisinin net anlaşılabilmesi için daha fazla olgu çalışması gerektiği düşünüldü.

9. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada multifaktöriyel ve multigenik bir nörokristopati olan Hirschsprung hastalığına eşlik eden konjenital anomalili olgularda, mikroyarray analizi ile saptanan ve etyolojide rol aldığı düşünülen kromozomal değişikliklerin değerlendirilmesi planlanmıştı. Böylece HSCR etyolojisinde rol alan ve morbiditeye neden olabilecek yeni lokusların saptanması ve/veya literatürdeki olgularla benzer sonuçları olan olguların klinik özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştı. Olgu grubu görece küçük olmasına rağmen (13 olgu), olguların dahil edilme kriteri içinde HSCR'ye eşlik eden ek anomali olması gerekliliği, çalışmanın gücünü ve array başarısını artırdığı görülmüştür. Bu yöntem ile HSCR'nin eşlik ettiği çoklu konjenital anomalili 13 olgunun 3'ünde (%23) kromozomal değişiklik saptanmıştır. Oranın, literatürde bildirilen %15-20 oranına yakın olduğu görülmüştür. Çalışmamızda HSCR etyolojisinde olgu sunumu olarak bilinen bildirilmiş submikroskobik kromozomal anomaliler yanında (2q22 delesyonu, 17q12 duplikasyonu) daha önce HSCR ilişkisi olabileceği bildirilmemiş yeni lokus saptandı (Xq21 duplikasyonu). Bu kromozomal bölgelerin HSCR ile ilişkisinin kesinlik kazanması için ek fonksiyonel çalışmaların gerekliliği ve/veya benzer klinik bulgulara sahip bağımsız olgularda aynı değişikliklerin tekrar gösterilmesi gerektiği düşünüldü. Çalışmamızın bir kısıtlılığı da, iki bağımsız genetik nedenin aynı anda görülmüş olma ihtimalini göz ardı etmemizdir. Olgularda eşlik eden bilişsel gerilik ve diğer konjenital anomalilere yol açan submikroskobik değişiklikler yanında, HSCR etyolojisinde rol alan tek gen hastalıkları da eşlik etmiş olabilir. Ancak *RET* gibi monogenik HSCR nedenleri araştırılmadığından, bias olarak HSCR ile delesyon-duplikasyon arasında ilişki kurulmuş olabilir.

Array analizi normal sonuçlanan 10 olgu için ise tanı konma gerekliliğinin sürdüğü görülmüş olup ek değerlendirme gerektiği düşünülmüştür. Olgularda monogenik sendromik nedenler klinik olarak dışlanmıştı ancak HSCR ile ilişkisi kesin olarak bilinmeyen monogenik nedenlerin araştırılması, ya da bağımsız iki genetik etyolojinin saptanabileceği (OR monogenik sendrom ve eşlik eden patojenik *RET* mutasyonu gibi) düşünülerek yeni nesil dizileme yöntemleri (*Next generation sequencing*, NGS) ile değerlendirilmesi planlanmıştır. İleri çalışma olarak olguların tüm ekzon dizileme (*Whole Exome Sequencing*, WES) analizi ile değerlendirilmesi, böylece hem sendromik hem izole HSCR genlerinin analizi hedeflenmiştir. 167 HSCR'li olgu ve ebeveynleri ile 900 kişilik kontrol grubunda yapılan ekzom boyu ilişki çalışmasında (*exome-wide association study*) HSCR ilişkili yeni lokuslar tanımlanmıştır (220). Ancak bu çalışmada HSCR'li olguların izole mi ek konjenital anomalili mi olduğu belirtilmemiştir. NGS yönteminin HSCR'li olgularda kullanıldığı bir diğer çalışma ise 2014 yılında yayınlanan ve 20 HSCR'li olgu ile 20 kişilik kontrol grubunu, ENS gelişimi ile ilgili olduğu bilinen 62 gen açısından analiz eden araştırmadır (221).

Çalışmamızın sonuç ve yorumları şu şekilde özetlenebilir:

Hirschsprung hastalığı, klinik ve genetik olarak heterojen, kompleks konjenital bir anomalidir. Erken ve hızlı tanı, morbidite ve mortalitenin azaltılması için hayati öneme sahiptir.

Hızlı tanı ve erken tedaviye ek olarak, HSCR etyolojisinin aydınlatılması, komorbid durumların tanı ve tedavisi için gereklidir.

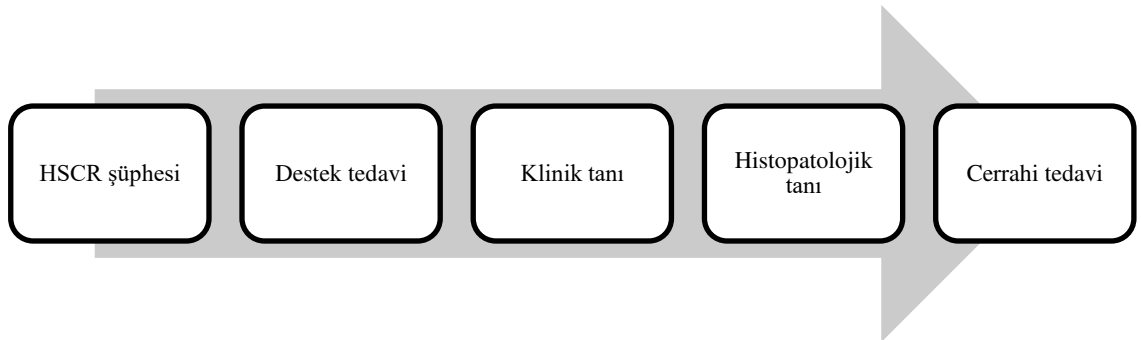
HSCR bazı olgularda bir tanıdan ziyade bulgudur. Bu nedenle HSCR'li tüm olgular eşlik edebilecek olası anomaliler açısından detaylı değerlendirilmelidir. Özellikle HSCR'li olgularla sık karşılaşan Çocuk Sağlığı-Hastalıkları ve Çocuk Cerrahisi hekimleri olası komorbid durumları sorgulamalı, ve hemen her zaman Tıbbi Genetik konsültasyonu istemelidir.

Konsültasyon nedeni GİS bulguları olmasa da, konjenital anomali nedeni ile Tıbbi Genetik hekimlerine konsülte edilen her olgu, HSCR açısından ek olarak sorgulanmalıdır. Böylece HSCR'nin eşlik ettiği sendrom ve durumlar spesifiye edilebilir ve daha hızlı tanı konması sağlanabilir.

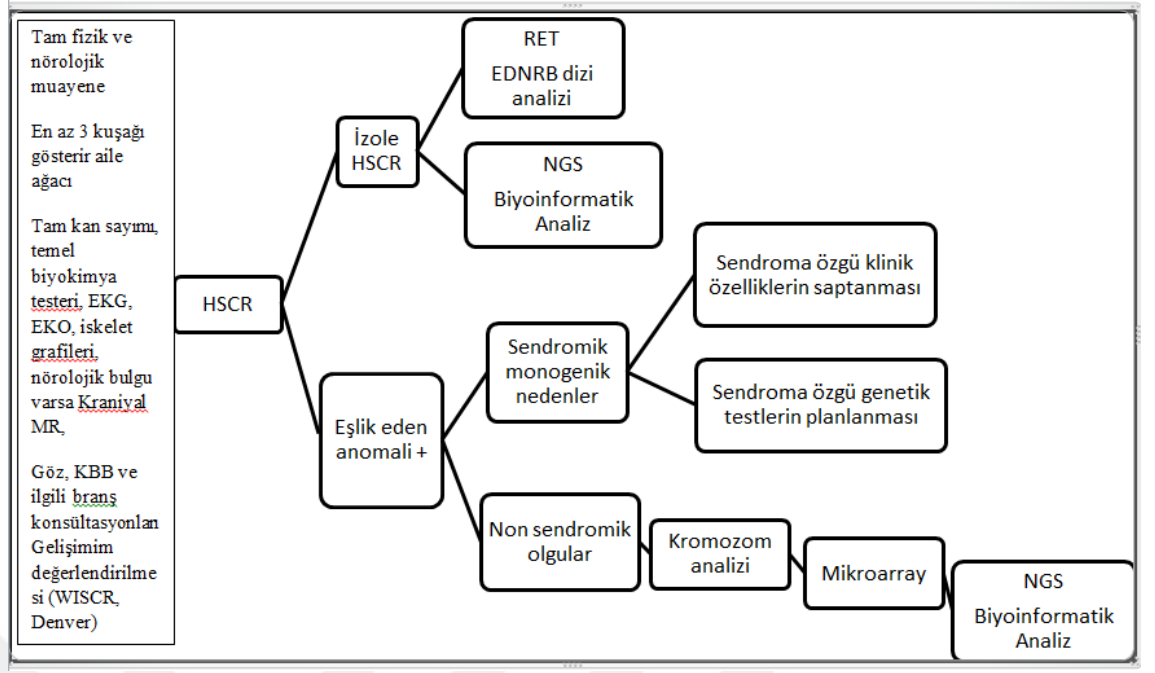
HSCR etyolojisinde bilinen ve bilinmeyen kromozomal anomalileri saptamak ve olgu yönetimini başarıyla yapmak amacıyla array yöntemi her Tıbbi Genetik hekiminin gündeminde olmalıdır. Ancak kromozom analizi ve array sonrası halen tanı konulmamış olgular olacağı da göz önüne alınmalıdır.

Tüm ailelere ayrıntılı genetik danışma verilmesinin amaçlandığı ancak ailelerin kompliyansının düşük olduğu, izlemlere düzenli olarak katılmadıkları saptanmıştır. Bu nedenle birim içi etkili genetik danışma konusuna eğilme gerekliliği görülmüştür

HSCR'ye klinik genetik yaklaşım henüz standardize edilmemiş ve *guideline* düzenlenmemiştir. Pratisyen hekimlere ve ilgili branş hekimlerine yol göstermek, Tıbbi Genetik konsültasyonlarının doğru ve etkin yapılması sağlamak, Tıbbi Genetik Hekimlerinin HSCR tanı ve izlemine yardımcı olmak amacıyla aşağıdaki akış şeması hazırlanmıştır. Bu şema öneri niteliğinde olup tartışma ve önerilere açıktır. Bu akış, genel olarak enterik sinir sistemi patolojilerine yönelik 2012 yılında Panza ve ark, tarafından hazırlanan rehber ile Amiel ve ark, derleme çalışmaları temel alınarak hazırlanmıştır.



Şekil 9.1: HSCR tanı ve tedavi algoritması



Şekil 9.2: HSCR'ye klinik genetik yaklaşım

KAYNAKLAR

1. Holschneider AM, Puri P. Hirschsprung's Disease and Allied Disorders. Third ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2008. 63-73 p.
2. Raveenthiran V. Knowledge of ancient Hindu surgeons on Hirschsprung disease: evidence from Sushruta Samhita of circa 1200-600 BC. *Journal of pediatric surgery*. 2011;46(11):2204-8.
3. Ruysch F. Observationum anatomico-chirurgicarum centuria *Amstelodami*. 1691.
4. Sergi C. Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of the 100(th) anniversary of Dr. Harald Hirschsprung's death. *World journal of clinical pediatrics*. 2015;4(4):120-5.
5. Tam PK. Hirschsprung's disease: A bridge for science and surgery. *Journal of pediatric surgery*. 2016;51(1):18-22.
6. Schappi MG, Staiano A, Milla PJ, Smith VV, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, Mearin ML, Papadopoulou A, Ruemmele FM, Vandenplas Y, Koletzko S. A practical guide for the diagnosis of primary enteric nervous system disorders. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2013;57(5):677-86.
7. Gershon MD, Ratcliffe EM. Developmental biology of the enteric nervous system: pathogenesis of Hirschsprung's disease and other congenital dysmotilities. *Seminars in pediatric surgery*. 2004;13(4):224-35.
8. Borrego S, Ruiz-Ferrer M, Fernandez RM, Antinolo G. Hirschsprung's disease as a model of complex genetic etiology. *Histology and histopathology*. 2013;28(9):1117-36.
9. Nagashimada M, Ohta H, Li C, Nakao K, Uesaka T, Brunet JF, Amiel J, Trochet D, Wakayama T, Enomoto H. Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(9):3145-58.
10. Kenny SE, Tam PK, Garcia-Barcelo M. Hirschsprung's disease. *Seminars in pediatric surgery*. 2010;19(3):194-200.
11. Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S, Portnoy ME, Cutler DJ, Green ED, Chakravarti A. A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature*. 2005;434(7035):857-63.
12. Amiel J, Lyonnet S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *Journal of medical genetics*. 2001;38(11):729-39.
13. Spouge D, Baird PA. Hirschsprung disease in a large birth cohort. *Teratology*. 1985;32(2):171-7.
14. Badner JA, Sieber WK, Garver KL, Chakravarti A. A genetic study of Hirschsprung disease. *American journal of human genetics*. 1990;46(3):568-80.
15. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R, Hirschsprung Disease C. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *Journal of medical genetics*. 2008;45(1):1-14.
16. Torfs C, editor An epidemiological study of Hirschsprung disease in a multiracial California population. The Third International Meetings: Hirschsprung disease and related neurocristopathies Evian, France; 1998.
17. Li Y, Kido T, Garcia-Barcelo MM, Tam PK, Tabatabai ZL, Lau YF. SRY interference of normal regulation of the RET gene suggests a potential role of the Y-chromosome gene in sexual dimorphism in Hirschsprung disease. *Human molecular genetics*. 2015;24(3):685-97.
18. Vohra BP, Planer W, Armon J, Fu M, Jain S, Heuckeroth RO. Reduced endothelin converting enzyme-1 and endothelin-3 mRNA in the developing bowel of male mice may increase expressivity and penetrance of Hirschsprung disease-like distal intestinal aganglionosis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2007;236(1):106-17.

19. Mc Laughlin D, Puri P. Familial Hirschsprung's disease: a systematic review. *Pediatric surgery international*. 2015,31(8):695-700.
20. Russell MB, Russell CA, Niebuhr E. An epidemiological study of Hirschsprung's disease and additional anomalies. *Acta paediatrica*. 1994,83(1):68-71.
21. Passarge E. The genetics of Hirschsprung's disease. Evidence for heterogeneous etiology and a study of sixty-three families. *The New England journal of medicine*. 1967,276(3):138-43.
22. Kessmann J. Hirschsprung's disease: diagnosis and management. *American family physician*. 2006,74(8):1319-22.
23. Parisi MA, Kapur RP. Genetics of Hirschsprung disease. *Current opinion in pediatrics*. 2000,12(6):610-7.
24. Loening-Baucke V, Kimura K. Failure to pass meconium: diagnosing neonatal intestinal obstruction. *American family physician*. 1999,60(7):2043-50.
25. Parisi MA. Hirschsprung Disease Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LH, Mefford HC, Stephens K, Amemiya A, Ledbetter N, editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
26. Langer JC. Hirschsprung disease. *Current opinion in pediatrics*. 2013,25(3):368-74.
27. Swenson O. Partial Internal Sphincterectomy in the Treatment of Hirschsprung's Disease. *Annals of surgery*. 1964,160:540-50.
28. Rosenfield NS, Ablow RC, Markowitz RI, DiPietro M, Seashore JH, Touloukian RJ, Cicchetti DV. Hirschsprung disease: accuracy of the barium enema examination. *Radiology*. 1984,150(2):393-400.
29. Taxman TL, Yulish BS, Rothstein FC. How useful is the barium enema in the diagnosis of infantile Hirschsprung's disease? *American journal of diseases of children*. 1986,140(9):881-4.
30. Smith GHH, Cass D. Infantile Hirschsprung's disease- is a barium enema useful? *Pediatric surgery international*. 1991,6:318-21.
31. Waseem SH, Idrees MT, Croffie JM. Neuroenteric staining as a tool in the evaluation of pediatric motility disorders. *Curr Gastroenterol Rep*. 2015.
32. Friedmacher F, Puri P. Rectal suction biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease: a systematic review of diagnostic accuracy and complications. *Pediatric surgery international*. 2015,31(9):821-30.
33. Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B, Morger R, Moser R, Scharli A. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*. 1972,7(1):11-7.
34. Hing Lim K, Keat Wan W, Kiat Hon Lim T, Loh A, A Nah S, Chang KT-E. Primary Diagnosis of Hirschsprung Disease – Calretinin Immunohistochemistry in Rectal Suction Biopsies, With Emphasis on Diagnostic Pitfalls2014. 14-22 p.
35. Rouzrokh M, Jadali F, Gharib A, Khaleghnejad-Tabari A, Tavassoli A, Mohajerzadeh L. Can We Rely on Frozen Sections of a Rectal Biopsy for One-stage Trans-anal Pull-through Operation in Hirschsprung's Disease? *Iranian journal of pediatrics*. 2011,21(1):72-6.
36. Musa ZA, Qasim BJ, Ghazi HF, Al Shaikhly AW. Diagnostic roles of calretinin in hirschsprung disease: A comparison to neuron-specific enolase. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2017,23(1):60-6.
37. Broasca V, Ciobotaru C, Dimofte I, Aschie M, Pruna A, Severin B. The correlation of genetic markers with anatomoclinical and histopathological forms in Hirschsprung's disease. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2010,51(2):283-8.
38. Committe IG. IPEG Guidelines for surgical treatment of Hirschsprung's disease. *Journal of laparoendoscopic & advanced surgical techniques Part A*. 2005,15(1):89-91.
39. Georgeson KE, Fuenfer MM, Hardin WD. Primary laparoscopic pull-through for Hirschsprung's disease in infants and children. *Journal of pediatric surgery*. 1995,30(7):1017-21; discussion 21-2.

40. De la Torre-Mondragon L, Ortega-Salgado JA. Transanal endorectal pull-through for Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*. 1998,33(8):1283-6.
41. Langer JC, Durrant AC, de la Torre L, Teitelbaum DH, Minkes RK, Caty MG, Wildhaber BE, Ortega SJ, Hirose S, Albanese CT. One-stage transanal Soave pullthrough for Hirschsprung disease: a multicenter experience with 141 children. *Annals of surgery*. 2003,238(4):569-83; discussion 83-5.
42. El-Sawaf MI, Drongowski RA, Chamberlain JN, Coran AG, Teitelbaum DH. Are the long-term results of the transanal pull-through equal to those of the transabdominal pull-through? A comparison of the 2 approaches for Hirschsprung disease. *Journal of pediatric surgery*. 2007,42(1):41-7; discussion 7.
43. Hackam DJ, Filler RM, Pearl RH. Enterocolitis after the surgical treatment of Hirschsprung's disease: risk factors and financial impact. *Journal of pediatric surgery*. 1998,33(6):830-3.
44. Yanchar NL, Soucy P. Long-term outcome after Hirschsprung's disease: patients' perspectives. *Journal of pediatric surgery*. 1999,34(7):1152-60.
45. Rauch U, Hansgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schafer KH. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *International journal of colorectal disease*. 2006,21(6):554-9.
46. Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nature reviews Neuroscience*. 2007,8(6):466-79.
47. Moore TC, Landers DB, Lachman RS, Ament ME. Hirschsprung's disease discordant in monozygotic twins: a study of possible environmental factors in the production of colonic aganglionosis. *Journal of pediatric surgery*. 1979,14(2):158-61.
48. Angrist M, Bolk S, Thiel B, Puffenberger EG, Hofstra RM, Buys CH, Cass DT, Chakravarti A. Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung disease. *Human molecular genetics*. 1995,4(5):821-30.
49. Seri M, Yin L, Barone V, Bolino A, Celli I, Bocciardi R, Pasini B, Ceccherini I, Lerone M, Kristoffersson U, Larsson LT, Casasa JM, Cass DT, Abramowicz MJ, Vanderwinden JM, Kravcenkiene I, Baric I, Silengo M, Martucciello G, Romeo G. Frequency of RET mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease. *Human mutation*. 1997,9(3):243-9.
50. Sancandi M, Ceccherini I, Costa M, Fava M, Chen B, Wu Y, Hofstra R, Laurie T, Griffiths M, Burge D, Tam PK. Incidence of RET mutations in patients with Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*. 2000,35(1):139-42; discussion 42-3.
51. Mowat DR, Wilson MJ, Goossens M. Mowat-Wilson syndrome. *Journal of medical genetics*. 2003,40(5):305-10.
52. Zweier C, Thiel CT, Dufke A, Crow YJ, Meinecke P, Suri M, Ala-Mello S, Beemer F, Bernasconi S, Bianchi P, Bier A, Devriendt K, Dimitrov B, Firth H, Gallagher RC, Garavelli L, Gillissen-Kaesbach G, Hudgins L, Kaariainen H, Karstens S, Krantz I, Mannhardt A, Medne L, Mucke J, Kibaek M, Krogh LN, Peippo M, Rittinger O, Schulz S, Schelley SL, Temple IK, Dennis NR, Van der Knaap MS, Wheeler P, Yerushalmi B, Zenker M, Seidel H, Lachmeijer A, Prescott T, Kraus C, Lowry RB, Rauch A. Clinical and mutational spectrum of Mowat-Wilson syndrome. *European journal of medical genetics*. 2005,48(2):97-111.
53. Lof Granstrom A, Svenningsson A, Hagel E, Oddsberg J, Nordenskjold A, Wester T. Maternal Risk Factors and Perinatal Characteristics for Hirschsprung Disease. *Pediatrics*. 2016,138(1).
54. Lake JI, Tusheva OA, Graham BL, Heuckeroth RO. Hirschsprung-like disease is exacerbated by reduced de novo GMP synthesis. *The Journal of clinical investigation*. 2013,123(11):4875-87.
55. Lipson A. Hirschsprung disease in the offspring of mothers exposed to hyperthermia during pregnancy. *American journal of medical genetics*. 1988,29(1):117-24.

56. Fu M, Sato Y, Lyons-Warren A, Zhang B, Kane MA, Napoli JL, Heuckeroth RO. Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation. *Development*. 2010;137(4):631-40.
57. Nielsen SW, Qvist N. [Citalopram taken during pregnancy and the child born with Hirschsprung's disease]. *Ugeskrift for læger*. 2013;175(50A):V03130178.
58. Schill EM, Lake JI, Tusheva OA, Nagy N, Bery SK, Foster L, Avetisyan M, Johnson SL, Stenson WF, Goldstein AM, Heuckeroth RO. Ibuprofen slows migration and inhibits bowel colonization by enteric nervous system precursors in zebrafish, chick and mouse. *Developmental biology*. 2016;409(2):473-88.
59. Torroglosa A, Alves MM, Fernandez RM, Antinolo G, Hofstra RM, Borrego S. Epigenetics in ENS development and Hirschsprung disease. *Developmental biology*. 2016;417(2):209-16.
60. Moore SW. Chromosomal and related Mendelian syndromes associated with Hirschsprung's disease. *Pediatric surgery international*. 2012;28(11):1045-58.
61. Jannot AS, Pelet A, Henrion-Caude A, Chaoui A, Masse-Morel M, Arnold S, Sanlaville D, Ceccherini I, Borrego S, Hofstra RM, Munnich A, Bondurand N, Chakravarti A, Clerget-Darpoux F, Amiel J, Lyonnet S. Chromosome 21 scan in Down syndrome reveals DSCAM as a predisposing locus in Hirschsprung disease. *PloS one*. 2013;8(5):e62519.
62. Fewtrell MS, Tam PK, Thomson AH, Fitchett M, Currie J, Huson SM, Mulligan LM. Hirschsprung's disease associated with a deletion of chromosome 10 (q11.2q21.2): a further link with the neurocristopathies? *Journal of medical genetics*. 1994;31(4):325-7.
63. Tang CS, Cheng G, So MT, Yip BH, Miao XP, Wong EH, Ngan ES, Lui VC, Song YQ, Chan D, Cheung K, Yuan ZW, Lei L, Chung PH, Liu XL, Wong KK, Marshall CR, Scherer SW, Cherny SS, Sham PC, Tam PK, Garcia-Barcelo MM. Genome-wide copy number analysis uncovers a new HSCR gene: NRG3. *PLoS genetics*. 2012;8(5):e1002687.
64. Garcia-Rodriguez E, Garcia-Garcia E, Perez-Sanchez A, Pavon-Delgado A. A NEW OBSERVATION OF 13q DELETION SYNDROME: SEVERE UNDESCRIBED FEATURES. *Genetic counseling*. 2015;26(2):213-7.
65. Alp MY, Cebi AH, Seyhan S, Cansu A, Aydin H, Ikbali M. 22.5 Mb deletion of 13q31.1-q34 associated with HPE, DWM, and HSCR: A case report and redefining the smallest deleted regions. *Genetic counseling*. 2016;27(1):43-9.
66. Grace E, Drennan J, Colver D, Gordon RR. The 13q- deletion syndrome. *Journal of medical genetics*. 1971;8(3):351-7.
67. Aguilera ZP, Belin PJ, Cavuoto KM, Jayakar P, McKeown CA. Acquired retinal pigmentary degeneration in a child with 13q deletion syndrome. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. 2015;19(5):482-4.
68. Lamont MA, Fitchett M, Dennis NR. Interstitial deletion of distal 13q associated with Hirschsprung's disease. *Journal of medical genetics*. 1989;26(2):100-4.
69. Shanske A, Ferreira JC, Leonard JC, Fuller P, Marion RW. Hirschsprung disease in an infant with a contiguous gene syndrome of chromosome 13. *American journal of medical genetics*. 2001;102(3):231-6.
70. Mulatinho MV, de Carvalho Seroa CL, Scalco F, Hardekopf D, Pekova S, Mrasek K, Liehr T, Weise A, Rao N, Llerena JC, Jr. Severe intellectual disability, omphalocele, hypospadias and high blood pressure associated to a deletion at 2q22.1q22.3: case report. *Molecular cytogenetics*. 2012;5(1):30.
71. Wakamatsu N, Yamada Y, Yamada K, Ono T, Nomura N, Taniguchi H, Kitoh H, Mutoh N, Yamanaka T, Mushiaki K, Kato K, Sonta S, Nagaya M. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nature genetics*. 2001;27(4):369-70.
72. McMillin KD, Reiss JA, Brown MG, Black MH, Buckmaster DA, Durum CT, Gunter KA, Lawce HJ, Berry TL, Lamb OA, Olson CL, Weeks FF, Yoshitomi MJ, Jacky PB, Olson SB, Magenis

- RE. Clinical outcomes of four patients with microdeletion in the long arm of chromosome 2. *American journal of medical genetics*. 1998,78(1):36-43.
73. Garcia-Heras J, Kilani RA, Martin RA, Lamp S. A deletion of proximal 20p inherited from a normal mosaic carrier mother in a newborn with panhypopituitarism and craniofacial dysmorphism. *Clinical dysmorphology*. 2005,14(3):137-40.
74. Kamath BM, Thiel BD, Gai X, Conlin LK, Munoz PS, Glessner J, Clark D, Warthen DM, Shaikh TH, Mihci E, Piccoli DA, Grant SF, Hakonarson H, Krantz ID, Spinner NB. SNP array mapping of chromosome 20p deletions: genotypes, phenotypes, and copy number variation. *Human mutation*. 2009,30(3):371-8.
75. Spinner NB, Rand E, Bucan M, Jirik F, Gogolin-Ewens C, Riethman HC, McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Paternal uniparental isodisomy for human chromosome 20 and absence of external ears. *American Journal of Human Genetics* 1994,55:674.
76. Michaelis RC, Skinner SA, Deason R, Skinner C, Moore CL, Phelan MC. Interstitial deletion of 20p: new candidate region for Hirschsprung disease and autism? *American journal of medical genetics*. 1997,71(3):298-304.
77. Hall T, Samuel M, Brain J. Mosaic trisomy 22 associated with total colonic aganglionosis and malrotation. *Journal of pediatric surgery*. 2009,44(1):e9-e11.
78. Emanuel BS, Zackai EH, Medne L. Emanuel Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mefford HC, Stephens K, Amemiya A, Ledbetter N, editors. GeneReviews(R). Seattle (WA)1993.
79. Prieto JC, Garcia NM, Elder FF, Zinn AR, Baker LA. Phenotypic expansion of the supernumerary derivative (22) chromosome syndrome: VACTERL and Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*. 2007,42(11):1928-32.
80. Beedgen B, Nutzenadel W, Querfeld U, Weiss-Wichert P. "Partial trisomy 22 and 11" due to a paternal 11;22 translocation associated with Hirschsprung disease. *European journal of pediatrics*. 1986,145(3):229-32.
81. Mahboubi S, Templeton JM, Jr. Association of Hirschsprung's disease and imperforate anus in a patient with "cat-eye" syndrome. A report of one case and review of the literature. *Pediatric radiology*. 1984,14(6):441-2.
82. Kerstjens-Frederikse WS, Hofstra RM, van Essen AJ, Meijers JH, Buys CH. A Hirschsprung disease locus at 22q11? *Journal of medical genetics*. 1999,36(3):221-4.
83. Venditti CP, Hunt P, Donnenfeld A, Zackai E, Spinner NB. Mosaic paternal uniparental (iso)disomy for chromosome 20 associated with multiple anomalies. *American journal of medical genetics Part A*. 2004,124A(3):274-9.
84. Benailly HK, Lapierre JM, Laudier B, Amiel J, Attie T, De Blois MC, Vekemans M, Romana SP. PMX2B, a new candidate gene for Hirschsprung's disease. *Clinical genetics*. 2003,64(3):204-9.
85. Wang JC, Fisker T, Dang L, Teshima I, Nowaczyk MJ. 4.3-Mb triplication of 4q32.1-q32.2: report of a family through two generations. *American journal of medical genetics Part A*. 2009,149A(10):2274-9.
86. Prontera P, Stangoni G, Ardisia C, Rogaia D, Mencarelli A, Donti E. Trisomy 2 mosaicism with caudal dysgenesis, Hirschsprung disease, and micro-anophthalmia. *American journal of medical genetics Part A*. 2011,155A(4):928-30.
87. Nishikawa M, Ito S, Sano K, Nishioeda Y, Nasako Y. A case of familial cystathioninuria with goiter and some anomalies. *Endocrinologia japonica*. 1970,17(1):57-63.
88. Prabhakara K, Wyandt HE, Huang XL, Prasad KS, Ramadevi AR. Recurrent proximal 18p monosomy and 18q trisomy in a family with a maternal pericentric inversion of chromosome 18. *Annales de genetique*. 2004,47(3):297-303.
89. Arayici S, Topcu V, Simsek GK, Kutman GK, Oguz SS, Dilmen U. Case report: partial trisomy 4q27q35 syndrome. *Genetic counseling*. 2014,25(4):413-6.

90. Edery P, Attie T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A, Lyonnet S. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nature genetics*. 1996,12(4):442-4.
91. Hofstra RM, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, van Ravenswaaij-Arts C, Majoor-Krakauer D, Angrist M, Chakravarti A, Meijers C, Buys CH. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nature genetics*. 1996,12(4):445-7.
92. Syrris P, Carter ND, Patton MA. Novel nonsense mutation of the endothelin-B receptor gene in a family with Waardenburg-Hirschsprung disease. *American journal of medical genetics*. 1999,87(1):69-71.
93. Sham MH, Lui VC, Chen BL, Fu M, Tam PK. Novel mutations of SOX10 suggest a dominant negative role in Waardenburg-Shah syndrome. *Journal of medical genetics*. 2001,38(9):E30.
94. Mowat DR, Croaker GD, Cass DT, Kerr BA, Chaitow J, Ades LC, Chia NL, Wilson MJ. Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *Journal of medical genetics*. 1998,35(8):617-23.
95. Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nature genetics*. 2003,33(4):459-61.
96. de Pontual L, Nepote V, Attie-Bitach T, Al Halabiah H, Trang H, Elghouzzi V, Levacher B, Benihoud K, Auge J, Faure C, Laudier B, Vekemans M, Munnich A, Perricaudet M, Guillemot F, Gaultier C, Lyonnet S, Simonneau M, Amiel J. Noradrenergic neuronal development is impaired by mutation of the proneural HASH-1 gene in congenital central hypoventilation syndrome (Ondine's curse). *Human molecular genetics*. 2003,12(23):3173-80.
97. Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *Journal of medical genetics*. 1999,36(6):437-46.
98. Brooks AS, Breuning MH, Osinga J, vd Smagt JJ, Catsman CE, Buys CH, Meijers C, Hofstra RM. A consanguineous family with Hirschsprung disease, microcephaly, and mental retardation (Goldberg-Shprintzen syndrome). *Journal of medical genetics*. 1999,36(6):485-9.
99. Drevillon L, Megarbane A, Demeer B, Matar C, Benit P, Briand-Suleau A, Bodereau V, Ghoumid J, Nasser M, Decrouy X, Doco-Fenzy M, Rustin P, Gaillard D, Goossens M, Giurgea I. KBP-cytoskeleton interactions underlie developmental anomalies in Goldberg-Shprintzen syndrome. *Human molecular genetics*. 2013,22(12):2387-99.
100. Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y, Yamasaki M. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of L1CAM. *Journal of human genetics*. 2004,49(6):334-7.
101. Nakakimura S, Sasaki F, Okada T, Arisue A, Cho K, Yoshino M, Kanemura Y, Yamasaki M, Todo S. Hirschsprung's disease, acrocallosal syndrome, and congenital hydrocephalus: report of 2 patients and literature review. *Journal of pediatric surgery*. 2008,43(5):E13-7.
102. Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Friez MJ, Inbar D, Korenreich L, Shohat M, Schwartz CE. Expanding the phenotypic spectrum of L1CAM-associated disease. *Clinical genetics*. 2006,69(5):414-9.
103. Slavotinek AM. Fryns syndrome: a review of the phenotype and diagnostic guidelines. *American journal of medical genetics Part A*. 2004,124A(4):427-33.
104. Alkuraya FS, Lin AE, Irons MB, Kimonis VE. Fryns syndrome with Hirschsprung disease: support for possible neural crest involvement. *American journal of medical genetics Part A*. 2005,132A(2):226-30.

105. Dentici ML, Brancati F, Mingarelli R, Dallapiccola B. A 6-year-old child with Fryns syndrome: further delineation of the natural history of the condition in survivors. *European journal of medical genetics*. 2009,52(6):421-5.
106. Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, Sousa S, Bottani A, Clayton-Smith J, Reardon W, Saraiva J, Cabral A, Gohring I, Devriendt K, de Ravel T, Bijlsma EK, Hennekam RC, Orrico A, Cohen M, Dreweke A, Reis A, Nurnberg P, Rauch A. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *American journal of human genetics*. 2007,80(5):994-1001.
107. Mueller C, Patel S, Irons M, Antshel K, Salen G, Tint GS, Bay C. Normal cognition and behavior in a Smith-Lemli-Opitz syndrome patient who presented with Hirschsprung disease. *American journal of medical genetics Part A*. 2003,123A(1):100-6.
108. Curry CJ, Carey JC, Holland JS, Chopra D, Fineman R, Golabi M, Sherman S, Pagon RA, Allanson J, Shulman S, et al. Smith-Lemli-Opitz syndrome-type II: multiple congenital anomalies with male pseudohermaphroditism and frequent early lethality. *American journal of medical genetics*. 1987,26(1):45-57.
109. Cass D. Aganglionosis: associated anomalies. *Journal of paediatrics and child health*. 1990,26(6):351-4.
110. Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N. MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2012,158A(1):97-102.
111. Goldberg EL. An epidemiological study of Hirschsprung's disease. *International journal of epidemiology*. 1984,13(4):479-85.
112. Garver KL, Law JC, Garver B. Hirschsprung disease: a genetic study. *Clinical genetics*. 1985,28(6):503-8.
113. Brooks AS, Breuning MH, Meijers C, editors. Spectrum of phenotypes associated with Hirschsprung disease: an evaluation of 239 patients from a single institution. . Third International Meeting: Hirschsprung disease and related neurocristopathies; 1998; Evian, France.
114. Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development*. 2002,129(22):5151-60.
115. Eng C. RET proto-oncogene in the development of human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999,17(1):380-93.
116. Tansey MG, Baloh RH, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron*. 2000,25(3):611-23.
117. Nishiyama C, Uesaka T, Manabe T, Yonekura Y, Nagasawa T, Newgreen DF, Young HM, Enomoto H. Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nature neuroscience*. 2012,15(9):1211-8.
118. Shepherd IT, Pietsch J, Elworthy S, Kelsh RN, Raible DW. Roles for GFRalpha1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development*. 2004,131(1):241-9.
119. Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*. 1996,382(6586):70-3.
120. Gianino S, Grider JR, Cresswell J, Enomoto H, Heuckeroth RO. GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development*. 2003,130(10):2187-98.
121. Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, Golden JP, Hanke JA, Jackman A, Molliver DC, Bardgett ME, Snider WD, Johnson EM, Jr., Milbrandt J. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron*. 1999,22(2):253-63.
122. Brooks AS, Oostra BA, Hofstra RM. Studying the genetics of Hirschsprung's disease: unraveling an oligogenic disorder. *Clinical genetics*. 2005,67(1):6-14.

123. Doray B, Salomon R, Amiel J, Pelet A, Touraine R, Billaud M, Attie T, Bachy B, Munnich A, Lyonnet S. Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Human molecular genetics*. 1998,7(9):1449-52.
124. Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2013,162(1):1-15.
125. Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, Holder S, Nihoul-Fekete C, Ponder BA, Munnich A. Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*. 1994,367(6461):378-80.
126. Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, Pasini B, Bocciardi R, Lerone M, Kaariainen H, et al. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*. 1994,367(6461):377-8.
127. Bolk S, Pelet A, Hofstra RM, Angrist M, Salomon R, Croaker D, Buys CH, Lyonnet S, Chakravarti A. A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000,97(1):268-73.
128. Attie T, Pelet A, Edery P, Eng C, Mulligan LM, Amiel J, Boutrand L, Beldjord C, Nihoul-Fekete C, Munnich A, et al. Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Human molecular genetics*. 1995,4(8):1381-6.
129. Hofstra RM, Wu Y, Stulp RP, Elfferich P, Osinga J, Maas SM, Siderius L, Brooks AS, vd Ende JJ, Heydendael VM, Severijnen RS, Bax KM, Meijers C, Buys CH. RET and GDNF gene scanning in Hirschsprung patients using two dual denaturing gel systems. *Human mutation*. 2000,15(5):418-29.
130. Uesaka T, Nagashimada M, Yonemura S, Enomoto H. Diminished Ret expression compromises neuronal survival in the colon and causes intestinal aganglionosis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008,118(5):1890-8.
131. Uesaka T, Enomoto H. Neural precursor death is central to the pathogenesis of intestinal aganglionosis in Ret hypomorphic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010,30(15):5211-8.
132. Griseri P, Lantieri F, Puppo F, Bachetti T, Di Duca M, Ravazzolo R, Ceccherini I. A common variant located in the 3'UTR of the RET gene is associated with protection from Hirschsprung disease. *Human mutation*. 2007,28(2):168-76.
133. Grice EA, Rochelle ES, Green ED, Chakravarti A, McCallion AS. Evaluation of the RET regulatory landscape reveals the biological relevance of a HSCR-implicated enhancer. *Human molecular genetics*. 2005,14(24):3837-45.
134. Arnold S, Pelet A, Amiel J, Borrego S, Hofstra R, Tam P, Ceccherini I, Lyonnet S, Sherman S, Chakravarti A. Interaction between a chromosome 10 RET enhancer and chromosome 21 in the Down syndrome-Hirschsprung disease association. *Human mutation*. 2009,30(5):771-5.
135. Moore SW, Zaahl MG. Tissue specific somatic mutations and aganglionosis in Hirschsprung's disease. *Journal of pediatric surgery*. 2014,49(2):258-61; discussion 61.
136. Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Leary R, Bettegowda C, Roberts NJ, Bhan S, Ho AS, Khan Z, Bishop J, Westra WH, Wood LD, Hruban RH, Tufano RP, Robinson B, Dralle H, Toledo SP, Toledo RA, Morris LG, Ghossein RA, Fagin JA, Chan TA, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW, Papadopoulos N, Nelkin BD, Ball DW. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013,98(2):E364-9.
137. Sijmons RH, Hofstra RM, Wijburg FA, Links TP, Zwierstra RP, Vermey A, Aronson DC, Tan-Sindhunata G, Brouwers-Smalbraak GJ, Maas SM, Buys CH. Oncological implications of RET gene mutations in Hirschsprung's disease. *Gut*. 1998,43(4):542-7.
138. Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *Journal of medical genetics*. 2000,37(11):817-27.

139. Virtanen VB, Pukkala E, Kivisaari R, Salo PP, Koivusalo A, Arola J, Miettinen PJ, Rintala RJ, Perola M, Pakarinen MP. Thyroid cancer and co-occurring RET mutations in Hirschsprung disease. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(4):595-602.
140. Smith VV, Eng C, Milla PJ. Intestinal ganglioneuromatosis and multiple endocrine neoplasia type 2B: implications for treatment. *Gut*. 1999;45(1):143-6.
141. Romeo G, Ceccherini I, Celli J, Priolo M, Betsos N, Bonardi G, Seri M, Yin L, Lerone M, Jasonni V, Martucciello G. Association of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung disease. *Journal of internal medicine*. 1998;243(6):515-20.
142. Nagy N, Goldstein AM. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Developmental biology*. 2006;293(1):203-17.
143. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*. 1994;79(7):1277-85.
144. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*. 1994;79(7):1267-76.
145. Hofstra RM, Valdenaire O, Arch E, Osinga J, Kroes H, Loffler BM, Hamosh A, Meijers C, Buys CH. A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *American journal of human genetics*. 1999;64(1):304-8.
146. Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*. 1997;18(6):847-55.
147. Tang CS, Ngan ES, Tang WK, So MT, Cheng G, Miao XP, Leon TY, Leung BM, Hui KJ, Lui VH, Chen Y, Chan IH, Chung PH, Liu XL, Wong KK, Sham PC, Cherny SS, Tam PK, Garcia-Barcelo MM. Mutations in the NRG1 gene are associated with Hirschsprung disease. *Human genetics*. 2012;131(1):67-76.
148. Garcia-Barcelo MM, Tang CS, Ngan ES, Lui VC, Chen Y, So MT, Leon TY, Miao XP, Shum CK, Liu FQ, Yeung MY, Yuan ZW, Guo WH, Liu L, Sun XB, Huang LM, Tou JF, Song YQ, Chan D, Cheung KM, Wong KK, Cherny SS, Sham PC, Tam PK. Genome-wide association study identifies NRG1 as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(8):2694-9.
149. Jiang Q, Arnold S, Heanue T, Kilambi KP, Doan B, Kapoor A, Ling AY, Sosa MX, Guy M, Jiang Q, Burzynski G, West K, Bessling S, Griseri P, Amiel J, Fernandez RM, Verheij JB, Hofstra RM, Borrego S, Lyonnet S, Ceccherini I, Gray JJ, Pachnis V, McCallion AS, Chakravarti A. Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with ret are critical to Hirschsprung disease liability. *American journal of human genetics*. 2015;96(4):581-96.
150. Ryan ET, Ecker JL, Christakis NA, Folkman J. Hirschsprung's disease: associated abnormalities and demography. *Journal of pediatric surgery*. 1992;27(1):76-81.
151. Sarioglu A, Tanyel FC, Buyukpamukcu N, Hicsonmez A. Urolithiasis in patients with Hirschsprung's disease. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie*. 1997;7(3):149-51.
152. Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Theisen A, Kashork CD, Shaffer LG. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *American journal of medical genetics Part A*. 2005;134(3):259-67.
153. Bravo-Oro A, Lurie IW, Elizondo-Cardenas G, Pena-Zepeda C, Salazar-Martinez A, Correa-Gonzalez C, Castrillo JL, Avila S, Esmer C. A novel interstitial deletion of 2q22.3 q23.3 in a patient with dysmorphic features, epilepsy, aganglionosis, pure red cell aplasia, and skeletal malformations. *American journal of medical genetics Part A*. 2015;167A(8):1865-71.
154. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L,

- Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American journal of human genetics*. 2010;86(5):749-64.
155. Jiang Q, Ho YY, Hao L, Nichols Berrios C, Chakravarti A. Copy number variants in candidate genes are genetic modifiers of Hirschsprung disease. *PloS one*. 2011;6(6):e21219.
156. Sampson MG, Coughlin CR, 2nd, Kaplan P, Conlin LK, Meyers KE, Zackai EH, Spinner NB, Copelovitch L. Evidence for a recurrent microdeletion at chromosome 16p11.2 associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) and Hirschsprung disease. *American journal of medical genetics Part A*. 2010;152A(10):2618-22.
157. Yüksel Z. Otizm bulgusu gösteren bireylerdeki genetik değişikliklerin array CGH yöntemi ile ortaya konması. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi 2012.
158. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *Journal of medical genetics*. 2006;43(8):625-33.
159. Lockwood WW, Chari R, Chi B, Lam WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *European journal of human genetics : EJHG*. 2006;14(2):139-48.
160. Stefansson H, Meyer-Lindenberg A, Steinberg S, Magnusdottir B, Morgen K, Arnarsdottir S, Bjornsdottir G, Walters GB, Jonsdottir GA, Doyle OM, Tost H, Grimm O, Kristjansdottir S, Snorrason H, Davidsdottir SR, Gudmundsson LJ, Jonsson GF, Stefansdottir B, Helgadóttir I, Haraldsson M, Jonsdottir B, Thygesen JH, Schwarz AJ, Didriksen M, Stensbol TB, Brammer M, Kapur S, Halldorsson JG, Hreidarsson S, Saemundsen E, Sigurdsson E, Stefansson K. CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature*. 2014;505(7483):361-6.
161. Dixit A, Patel C, Harrison R, Jarvis J, Hulton S, Smith N, Yates K, Silcock L, McMullan DJ, Suri M. 17q12 microdeletion syndrome: three patients illustrating the phenotypic spectrum. *American journal of medical genetics Part A*. 2012;158A(9):2317-21.
162. Clissold RL, Shaw-Smith C, Turnpenny P, Bunce B, Bockenhauer D, Kerecuk L, Waller S, Bowman P, Ford T, Ellard S, Hattersley AT, Bingham C. Chromosome 17q12 microdeletions but not intragenic HNF1B mutations link developmental kidney disease and psychiatric disorder. *Kidney international*. 2016;90(1):203-11.
163. Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennekam RC, Fitzpatrick CA, Segraves R, Richmond TA, Guiver C, Albertson DG, Pinkel D, Eis PS, Schwartz S, Knight SJ, Eichler EE. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nature genetics*. 2006;38(9):1038-42.
164. Rasmussen M, Vestergaard EM, Graakjaer J, Petkov Y, Bache I, Fagerberg C, Kibaek M, Svaneby D, Petersen OB, Brasch-Andersen C, Sunde L. 17q12 deletion and duplication syndrome in Denmark-A clinical cohort of 38 patients and review of the literature. *American journal of medical genetics Part A*. 2016;170(11):2934-42.
165. Mefford HC, Clauin S, Sharp AJ, Moller RS, Ullmann R, Kapur R, Pinkel D, Cooper GM, Ventura M, Ropers HH, Tommerup N, Eichler EE, Bellanne-Chantelot C. Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *American journal of human genetics*. 2007;81(5):1057-69.
166. Nagamani SC, Erez A, Shen J, Li C, Roeder E, Cox S, Karaviti L, Pearson M, Kang SH, Sahoo T, Lalani SR, Stankiewicz P, Sutton VR, Cheung SW. Clinical spectrum associated with recurrent genomic rearrangements in chromosome 17q12. *European journal of human genetics : EJHG*. 2010;18(3):278-84.

167. Faguer S, Chassaing N, Bandin F, Prouheze C, Arveiler B, Rooryck C, Nogier MB, Chauveau D, Calvas P, Decramer S. A 17q12 chromosomal duplication associated with renal disease and esophageal atresia. *European journal of medical genetics*. 2011,54(4):e437-40.
168. Brandt T, Desai K, Grodberg D, Mehta L, Cohen N, Tryfon A, Kolevzon A, Soorya L, Buxbaum JD, Edelmann L. Complex autism spectrum disorder in a patient with a 17q12 microduplication. *American journal of medical genetics Part A*. 2012,158A(5):1170-7.
169. Bierhals T, Maddukuri SB, Kutsche K, Girisha KM. Expanding the phenotype associated with 17q12 duplication: case report and review of the literature. *American journal of medical genetics Part A*. 2013,161A(2):352-9.
170. Hardies K, Weckhuysen S, Peeters E, Holmgren P, Van Esch H, De Jonghe P, Van Paesschen W, Suls A. Duplications of 17q12 can cause familial fever-related epilepsy syndromes. *Neurology*. 2013,81(16):1434-40.
171. Mitchell E, Douglas A, Kjaegaard S, Callewaert B, Vanlander A, Janssens S, Yuen AL, Skinner C, Failla P, Alberti A, Avola E, Fichera M, Kibaek M, Digilio MC, Hannibal MC, den Hollander NS, Bizzarri V, Renieri A, Mencarelli MA, Fitzgerald T, Piazzolla S, van Oudenhove E, Romano C, Schwartz C, Eichler EE, Slavotinek A, Escobar L, Rajan D, Crolla J, Carter N, Hodge JC, Mefford HC. Recurrent duplications of 17q12 associated with variable phenotypes. *American journal of medical genetics Part A*. 2015,167A(12):3038-45.
172. Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, Cuckle H, Shaffer LG. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2013,15(6):478-81.
173. Loirat C, Bellanne-Chantelot C, Husson I, Deschenes G, Guignon V, Chabane N. Autism in three patients with cystic or hyperechogenic kidneys and chromosome 17q12 deletion. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2010,25(10):3430-3.
174. Lee JW, Choi HS, Gyuris J, Brent R, Moore DD. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Molecular endocrinology*. 1995,9(2):243-54.
175. Anttonen AK, Laari A, Kousi M, Yang YJ, Jaaskelainen T, Somer M, Siintola E, Jakkula E, Muona M, Tegelberg S, Lonnqvist T, Pihko H, Valanne L, Paetau A, Lun MP, Hastbacka J, Kopra O, Joensuu T, Katsanis N, Lehtinen MK, Palvimo JJ, Lehesjoki AE. ZNHIT3 is defective in PEHO syndrome, a severe encephalopathy with cerebellar granule neuron loss. *Brain : a journal of neurology*. 2017.
176. Fanciulli M, Bruno T, Di Padova M, De Angelis R, Iezzi S, Iacobini C, Floridi A, Passananti C. Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000,14(7):904-12.
177. Xie J, Guo Q. AATF protects neural cells against oxidative damage induced by amyloid beta-peptide. *Neurobiology of disease*. 2004,16(1):150-7.
178. Chiyonobu T, Inoue N, Morimoto M, Kinoshita T, Murakami Y. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency caused by mutations in PIGW is associated with West syndrome and hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *Journal of medical genetics*. 2014,51(3):203-7.
179. Li Y, Chen Z. Molecular cloning and characterization of LCRG1 a novel gene localized to the tumor suppressor locus D17S800-D17S930. *Cancer letters*. 2004,209(1):75-85.
180. Ohbayashi T, Oikawa K, Iwata R, Kameta A, Evine K, Isobe T, Matsuda Y, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Kuroda M, Mukai K. Dioxin induces a novel nuclear factor, DIF-3, that is implicated in spermatogenesis. *FEBS letters*. 2001,508(3):341-4.
181. Blom W, de Muinck Keizer SM, Scholte HR. Acetyl-CoA carboxylase deficiency: an inborn error of de novo fatty acid synthesis. *The New England journal of medicine*. 1981,305(8):465-6.

182. Candau R, Moore PA, Wang L, Barlev N, Ying CY, Rosen CA, Berger SL. Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Molecular and cellular biology*. 1996,16(2):593-602.
183. Stanchi F, Bertocco E, Toppo S, Dioguardi R, Simionati B, Cannata N, Zimbello R, Lanfranchi G, Valle G. Characterization of 16 novel human genes showing high similarity to yeast sequences. *Yeast*. 2001,18(1):69-80.
184. Lountos GT, Tropea JE, Cherry S, Waugh DS. Overproduction, purification and structure determination of human dual-specificity phosphatase 14. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2009,65(Pt 10):1013-20.
185. Hijikata M, Matsushita I, Le Hang NT, Thuong PH, Tam DB, Maeda S, Sakurada S, Cuong VC, Lien LT, Keicho N. Influence of the polymorphism of the DUSP14 gene on the expression of immune-related genes and development of pulmonary tuberculosis. *Genes and immunity*. 2016,17(4):207-12.
186. Modi WS. CCL3L1 and CCL4L1 chemokine genes are located in a segmental duplication at chromosome 17q12. *Genomics*. 2004,83(4):735-8.
187. Hodzic D, Kong C, Wainszelbaum MJ, Charron AJ, Su X, Stahl PD. TBC1D3, a hominoid oncoprotein, is encoded by a cluster of paralogues located on chromosome 17q12. *Genomics*. 2006,88(6):731-6.
188. Maas SM, Hoovers JM, van Seggelen ME, Menzel DM, Hennekam RC. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 2: a clinically recognizable microdeletion syndrome? *Clinical dysmorphology*. 2000,9(1):47-53.
189. Jaillard S, Dubourg C, Gerard-Blanluet M, Delahaye A, Pasquier L, Dupont C, Henry C, Tabet AC, Lucas J, Aboura A, David V, Benzacken B, Odent S, Pipiras E. 2q23.1 microdeletion identified by array comparative genomic hybridisation: an emerging phenotype with Angelman-like features? *Journal of medical genetics*. 2009,46(12):847-55.
190. Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, Heye B, Glaser D, Liebscher V, Meitinger T, Strom TM. Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *American journal of human genetics*. 2007,81(4):768-79.
191. Williams SR, Mullegama SV, Rosenfeld JA, Dagli AI, Hatchwell E, Allen WP, Williams CA, Elsea SH. Haploinsufficiency of MBD5 associated with a syndrome involving microcephaly, intellectual disabilities, severe speech impairment, and seizures. *European journal of human genetics : EJHG*. 2010,18(4):436-41.
192. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A, Smeets D, van Ravenswaaij-Arts CM, Knoers NV, van der Burgt I, de Jong PJ, Brunner HG, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *American journal of human genetics*. 2003,73(6):1261-70.
193. de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N, Smeets D, Sistermans EA, Feuth T, van Ravenswaaij-Arts CM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *American journal of human genetics*. 2005,77(4):606-16.
194. Koolen DA, Vissers LE, Nillesen W, Smeets D, van Ravenswaaij CM, Sistermans EA, Veltman JA, de Vries BB. A novel microdeletion, del(2)(q22.3q23.3) in a mentally retarded patient, detected by array-based comparative genomic hybridization. *Clinical genetics*. 2004,65(5):429-32.
195. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previdere C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and

complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *Journal of medical genetics*. 2007,44(12):750-62.

196. Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, McMahon JM, O'Roak BJ, Cook J, Khan A, Dorschner MO, Weaver M, Calvert S, Malone S, Wallace G, Stanley T, Bye AM, Bleasel A, Howell KB, Kivity S, Mackay MT, Rodriguez-Casero V, Webster R, Korczyn A, Afawi Z, Zelnick N, Lerman-Sagie T, Lev D, Moller RS, Gill D, Andrade DM, Freeman JL, Sadleir LG, Shendure J, Berkovic SF, Scheffer IE, Mefford HC. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nature genetics*. 2013,45(7):825-30.

197. Kleefstra T, Kramer JM, Neveling K, Willemsen MH, Koemans TS, Vissers LE, Wissink-Lindhout W, Fenckova M, van den Akker WM, Kasri NN, Nillesen WM, Prescott T, Clark RD, Devriendt K, van Reeuwijk J, de Brouwer AP, Gilissen C, Zhou H, Brunner HG, Veltman JA, Schenck A, van Bokhoven H. Disruption of an EHMT1-associated chromatin-modification module causes intellectual disability. *American journal of human genetics*. 2012,91(1):73-82.

198. Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, Parrini E, Valence S, Pierre BS, Oger M, Lacombe D, Genevieve D, Fontana E, Darra F, Cances C, Barth M, Bonneau D, Bernadina BD, N'Guyen S, Gitiaux C, Parent P, des Portes V, Pedespan JM, Legrez V, Castelnau-Ptakine L, Nitschke P, Hieu T, Masson C, Zelenika D, Andrieux A, Francis F, Guerrini R, Cowan NJ, Bahi-Buisson N, Chelly J. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nature genetics*. 2013,45(6):639-47.

199. Willemsen MH, Ba W, Wissink-Lindhout WM, de Brouwer AP, Haas SA, Bienek M, Hu H, Vissers LE, van Bokhoven H, Kalscheuer V, Nadif Kasri N, Kleefstra T. Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function. *Journal of medical genetics*. 2014,51(7):487-94.

200. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, Gilissen C, del Rosario M, Hoischen A, Scheffer H, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA, Vissers LE. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *The New England journal of medicine*. 2012,367(20):1921-9.

201. Zhang Y, Lang Q, Li J, Xie F, Wan B, Yu L. Identification and characterization of human LYPD6, a new member of the Ly-6 superfamily. *Molecular biology reports*. 2010,37(4):2055-62.

202. Quintana DG, Hou Z, Thome KC, Hendricks M, Saha P, Dutta A. Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex. *The Journal of biological chemistry*. 1997,272(45):28247-51.

203. Takahara K, Bong M, Brevard R, Eddy RL, Haley LL, Sait SJ, Shows TB, Hoffman GG, Greenspan DS. Mouse and human homologues of the yeast origin of replication recognition complex subunit ORC2 and chromosomal localization of the cognate human gene ORC2L. *Genomics*. 1996,31(1):119-22.

204. Bao J, Zervos AS. Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene*. 1996,12(10):2171-6.

205. Lee TH, Wisniewski HG, Vilcek J. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *The Journal of cell biology*. 1992,116(2):545-57.

206. Paranaivitana C, Pittman PR, Velauthapillai M, Zelazowska E, Dasilva L. Transcriptional profiling of Francisella tularensis infected peripheral blood mononuclear cells: a predictive tool for tularemia. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008,54(1):92-103.

207. Kanoh J, Ishikawa F. spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Current biology : CB*. 2001,11(20):1624-30.

208. Silverman J, Takai H, Buonomo SB, Eisenhaber F, de Lange T. Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint. *Genes & development*. 2004,18(17):2108-19.

209. Cornacchia D, Dileep V, Quivy JP, Foti R, Tili F, Santarella-Mellwig R, Antony C, Almouzni G, Gilbert DM, Buonomo SB. Mouse Rif1 is a key regulator of the replication-timing programme in mammalian cells. *The EMBO journal*. 2012,31(18):3678-90.

210. Pelin K, Hilpela P, Donner K, Sewry C, Akkari PA, Wilton SD, Wattanasirichaigoon D, Bang ML, Centner T, Hanefeld F, Odent S, Fardeau M, Urtizberea JA, Muntoni F, Dubowitz V, Beggs AH, Laing NG, Labeit S, de la Chapelle A, Wallgren-Pettersson C. Mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(5):2305-10.
211. He H, Dai F, Yu L, She X, Zhao Y, Jiang J, Chen X, Zhao S. Identification and characterization of nine novel human small GTPases showing variable expressions in liver cancer tissues. *Gene expression*. 2002;10(5-6):231-42.
212. Donaldson CJ, Mathews LS, Vale WW. Molecular cloning and binding properties of the human type II activin receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;184(1):310-6.
213. Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*. 1991;65(6):973-82.
214. Lee SJ, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, Wright JF, Barker C, Ehrmantraut G, Holmstrom J, Trowell B, Gertz B, Jiang MS, Sebald SM, Matzuk M, Li E, Liang LF, Quattlebaum E, Stotish RL, Wolfman NM. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(50):18117-22.
215. Yoshida K, Sugano S. Identification of a novel protocadherin gene (PCDH11) on the human XY homology region in Xq21.3. *Genomics*. 1999;62(3):540-3.
216. Leonard CM, Eckert MA. Asymmetry and dyslexia. *Developmental neuropsychology*. 2008;33(6):663-81.
217. Whibley AC, Plagnol V, Tarpey PS, Abidi F, Fullston T, Choma MK, Boucher CA, Shepherd L, Willatt L, Parkin G, Smith R, Futreal PA, Shaw M, Boyle J, Licata A, Skinner C, Stevenson RE, Turner G, Field M, Hackett A, Schwartz CE, Gecz J, Stratton MR, Raymond FL. Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. *American journal of human genetics*. 2010;87(2):173-88.
218. Veerappa AM, Saldanha M, Padakannaya P, Ramachandra NB. Genome-wide copy number scan identifies disruption of PCDH11X in developmental dyslexia. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2013;162B(8):889-97.
219. Ozyilmaz B, Kirbiyik O, Koc A, Ozdemir TR, Kaya OO, Guvenc MS, Erdogan KM, Kutbay YB. Experiences in microarray-based evaluation of developmental disabilities and congenital anomalies. *Clinical genetics*. 2017;92(4):372-9.
220. Tang W, Tang J, Zhao Y, Qin Y, Jin G, Xu X, Zhu H, Shen H, Wang X, Hu Z, Xia Y. Exome-Wide Association Study Identified New Risk Loci for Hirschsprung's Disease. *Molecular neurobiology*. 2017;54(3):1777-85.
221. Gui H, Bao JY, Tang CS, So MT, Ngo DN, Tran AQ, Bui DH, Pham DH, Nguyen TL, Tong A, Lok S, Sham PC, Tam PK, Cherny SS, Garcia-Barcelo MM. Targeted next-generation sequencing on Hirschsprung disease: a pilot study exploits DNA pooling. *Annals of human genetics*. 2014;78(5):381-7.