

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

NÖRAL TÜP DEFEKTİ OLAN HASTALARDA GENETİK
VERİLERİN ARAŞTIRILMASI

Nermin AKÇALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ

Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 21.DOK.002 kodlu proje ile desteklenmiştir.

2022 – AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI



KABUL VE ONAY



TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın her aşamasında ve doktora tez projemin hazırlanması, yürütülmesi ve yazımında değerli bilgi ve önerileri ile beni yönlendirerek destek olan, yardımını esirgemeyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ'a ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarına destek veren Prof. Dr. Mustafa YILDIZ hocama, Doç. Dr. Muhsin ELMAS hocama ve Dr. Öğr. Üyesi Hakan TERZİ hocama teşekkür ederim. Akademik yolculuğumda her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Koşulsuz sevgi ve destekleriyle her zaman ve her durumda yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Nermin AKÇALI

Afyonkarahisar, Aralık 2022

NÖRAL TÜP DEFEKTİ OLAN HASTALARDA GENETİK VERİLERİN ARAŞTIRILMASI

Nermin AKÇALI

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora Tezi

Aralık 2022

Danışman: Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ

ÖZET

Santral sinir sisteminin kompleks ve heterojen anomalilerinden biri olan nöral tüp defektleri (NTD), merkezi sinir sisteminin bozulmuş gelişimi ile karakterize, embriyoda nöral tüpün tam olarak kapanmaması sebebiyle meydana gelen anomalilerdir. Bu çalışmada, NTD tanısı almış dokuz olguda WES (Whole Exome Sequencing) verilerinin analizi ile genetik etiyolojilerinin araştırılması amaçlandı. İncelenen dokuz olguda NTD ve eşlik eden diğer patolojik fenotiplere neden olabileceği düşünülen toplam 30 varyantın fenotip korelasyonu değerlendirildi. Bu çalışma, NTD'nin multifaktöriyel doğası gereği katkılı birden fazla genin nöral tüpün oluşumundaki yolaklardan herhangi birisinde kesinti oluşturmasıyla meydana geldiği yargısını destekledi.

Çalışmamız NTD'nin, ayırıcı tanısının geniş bir yelpazede değerlendirilmesi gerekliliğini ve TED (Tüm Ekzom Dizileme) gibi kapsamlı moleküler analizlerin ayırıcı tanıdaki katkısını gözler önüne sermektedir. NTD'nin etiyolojisini belirlemede TED analizinin etkinliğini değerlendirebilmek için daha büyük hasta gruplarında analizlerin ve fonksiyonel çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: NTD, spina bifida, konjenital malformasyon

INVESTIGATION OF GENETIC DATA IN PATIENTS WITH NEURAL TUBE DEFECTS

Nermin AKÇALI

Afyonkarahisar Health Sciences University

Institute of Graduate Education Department of Medicinal Genetics PhD Thesis

December 2022

Supervisor: Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ

ABSTRACT

Neural tube defects (NTD), one of the complex and heterogeneous anomalies of the central nervous system, are anomalies that are characterized by impaired development of the central nervous system and occur due to incomplete closure of the neural tube in the embryo. In this study, it was aimed to analyze the genetic etiologies of whole exome sequencing (WES) data in nine cases diagnosed with NTD. The phenotype correlation of a total of 30 variants thought to cause NTD and other accompanying pathological phenotypes was evaluated in nine cases. This study supported the conclusion that due to the multifactorial nature of NTDs, doped genes occur when more than one gene interrupts any of the pathways in neural tube formation.

Our study reveals the necessity of evaluating the differential diagnosis of NTD in a wide range and the contribution of comprehensive molecular analyzes such as WES in differential diagnosis. In order to evaluate the effectiveness of WES analysis in determining the etiology of NTD, analyzes and functional studies in larger patient groups are needed.

Key words: NTD, spina bifida, congenital malformation

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nöral tüp Defekti Tanım ve Tarihçe	3
2.1.1. Spesifik Bir Etiyolojiye Bağlı ve Diğer Malformasyonlarla Birlikte olan Nöral Tüp Defektleri	4
2.1.2. İzole (Gelişimsel) Nöral Tüp Defektleri	6
2.2. Embriyolojik Gelişim.....	7
2.2.1. Nöral Tüpün Kapanması	8
2.2.2. Sekonder Nörulasyon	9
2.3. Nöral Tüp Defektlerinin Klinik Tipleri.....	10
2.3.1. Kranial Defektler.....	11
2.3.2. Spinal Defektler	12
2.3.3. Nöral Tüp Defektine Eşlik Eden Anomaliler.....	15
2.4. Nöral Tüp Defektlerinin Genetiği	16
2.4.1. Hücre Biyolojik Fonksiyonları.....	22
2.4.2. Hücre İskelet Proteinleri	22
2.4.3. Hücre Döngüsü ve Nörogenez	23
2.4.4. Hücre Ölümü.....	24
2.4.5. Gen-Protein Düzenleyici Fonksiyonlar	25

2.4.6. Spesifik Sinyal Yolları	26
2.4.7. Retinoid Sinyali ve İnositol Metabolizması	28
2.5. Nöral Tüp Defektlerinin İnsan ve Fare Genleri İlişkisi.....	29
2.6. Nöral Tüp Defektlerinin Tanısında Kullanılan DNA Dizileme Yöntemleri.....	31
2.6.1. Sanger Dizileme	31
2.6.2. Yeni Nesil Dizileme	32
2.6.3. Tüm Ekzom Dizileme	33
2.7. Nöral Tüp Defektlerinde Tanı ve Genetik Danışmanlık	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Çalışma Grubunun Belirlenmesi	36
3.2. Etik Kurul Onayı	36
3.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	36
3.4. Genomik DNA Miktar ve Saflığının Ölçümü	37
3.5. Tüm Ekzom Dizileme	37
3.5.1. Enzimatik Parçalama ve Twist Evrensel Adaptör Sistemi ile Kütüphane Hazırlama	38
3.5.2. Twist Hibridizasyon ve Hedef Zenginleştirme	41
3.5.3. Twist Hedef Zenginleştirme Protokolü	43
3.5.4. Dizileme	48
3.6. Biyoinformatik Analiz	49
4. BULGULAR	50
4.1. Aile Öyküsü ve Klinik Bulgular	50
4.2. Moleküler Bulgular	58
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	87
7. KAYNAKLAR	89
EKLER.....	118

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AFP:	Alfa-fetoprotein
BOS:	Beyin omurilik sıvısı
BMP:	Kemik morfogenezik protein
BMHT:	Betain-homosistein metiltransferaz
CM:	Chiari malformasyonu
DNA Pol I:	Deoksiribonükleik asit polimeraz 1
dNTP:	Deoksiribonükleotid trifosfat
ddNTP:	Dideoksiribonükleotid
DLHP:	Dorsolateral meningeal noktaları
DNMT:	DNA metiltransferaz
LP:	Loop tail
MMC:	Myelomeningosel
MTHFR:	Metilen tetrahidrofolat
NGS:	Yeni nesil dizileme
NTD:	Nöral tüp defekti
OMIM:	Online Mendelian Inheritance in Man
PCP:	Düzlemsel hücre polaritesi
RA:	Retinoik asit
SB:	Spina bifida
SHMT:	Serin hidroksimetiltransferaz
SSS:	Santral sinir sistemi
SP:	Serebral palsi
TED:	Tam ekzom sekans
WES:	Whole exome sequencing
WGS:	Whole genome sequencing
YND:	Yeni nesil dizileme

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1: Nöral tüp defektlerinin sınıflandırılması	11
Tablo 2.2: Hücre iskeleti mekanizmasını bozarak NTD'lere neden olan fare genleri ...	23
Tablo 2.3: Hücre proliferasyonu veya nöronal farklılaşma mekanizmasını bozarak NTD'lere neden olan fare genleri	24
Tablo 2.4: Nöroepitelyal hücre ölümü derecesinde meydana gelen değişikliklerle NTD'lere neden olan fare genleri	25
Tablo 2.5: Transkripsiyonel düzenleme ve kromatin dinamiklerini içeren mekanizmalar yoluyla NTD'lere neden olan fare genleri	26
Tablo 2.6: Sonic hedgehog sinyal yolunun düzensizliğiyle NTD'lere neden olan fare genleri.....	27
Tablo 2.7: NTD hastalarında tanımlanan zararlı varyantların listesi	30
Tablo 3.1: Enzimatik parçalama ve kütüphane hazırlama basamakları	38
Tablo 3.2: Termal döngüleyici programı	38
Tablo 3.3: Enzimatik parçalanma karışımı için kullanılan reaktifler ve miktarları	38
Tablo 3.4: Üçüncü adım termal döngüleyici programı	40
Tablo 3.5: Hibridizasyon reaksiyonu için termal döngüleyici koşulları	42
Tablo 3.6: Hibridizasyon reaksiyonu kurulumu için reaktifler ve hacimler	43
Tablo 3.7: Hedef zenginleştirme iş akışı.....	43
Tablo 3.8: Hibridizasyon reaksiyonu için kullanılan hacimler	44
Tablo 3.9: Prob solüsyonunda kullanılan reaktifler ve hacimler	44
Tablo 3.10: Kütüphane havuzuna eklenen reaktifler ve hacimler.....	44
Tablo 3.11: PCR karışımına katılan reaktifler ve hacimleri.....	46
Tablo 3.12: PCR reaksiyonu kurulan termal döngüleyici programı	47
Tablo 4.1: Olgulara ait demografik ve fenotipik veriler	57
Tablo 4.2: Çalışılan NTD olgularının genotiplendirme sonuçları.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1: On sekiz günlük embriyonun ventral görünümü (A) ve 20. günde dorsal görünümü	8
Şekil 2.2: Nöral tüp defektleri	10
Şekil 2.3: Spina bifida türleri.....	12
Şekil 2.4: Fare nöral tüp kapanmasında dorsolateral bükülmenin moleküler düzenlenmesi.....	28
Şekil 2.5: Sanger dizileme yöntemi	32
Şekil 3.1: 37°C'de 20 dakikalık bir fragmantasyona 50 ng yüksek kaliteli gDNA girişi ve 6 döngü PCR ile oluşturulan saflaştırılmış bir kitaplığın temsili elektroferogramı ...	41
Şekil 3.2: Hazırlanan zenginleştirilmiş gDNA kitaplığı örneklerinin Agilent Yüksek Hassasiyetli DNA analiz kiti ile oluşturulan elektroferogram.	48

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir yaştan altındaki bebeklerde meydana gelen ölüm nedenlerinin en başında konjenital malformasyonlar gelmektedir (Detrait ve ark., 2005). Santral sinir sisteminin kompleks ve heterojen anomalilerinden biri olan nöral tüp defektleri (NTD), merkezi sinir sisteminin bozulmuş gelişimi ile karakterize, embriyoda nöral tüpün tam olarak kapanmaması sebebiyle meydana gelen anomalilerdir (Turhan ve Isik, 2019; Isaković ve ark., 2022). NTD'ler santral sinir sistemi anomalilerinin yaklaşık %60'ını oluşturur ve kardiyovasküler anormalliklerden sonra ikinci en sık görülen majör doğumsal kusurdur (Ronald S. Gibbs/Karlan/Haney/Nygaard, 2010). NTD'leri hasta ve ailesi ile bir bütün olarak toplum için ciddi bir sağlık sorunu ve mali yük oluşturduğundan, bu kategorideki bozuklukları önlemek için potansiyel risk faktörlerini araştırmak ve yeni yaklaşımlar geliştirmek çok önemlidir. Bu amaçla NTD'lerin arka planındaki genetik ve çevresel risk faktörlerinin tanımlanması için pek çok kapsamlı çalışma rapor edilmiştir.

NTD'leri, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı multifaktöryel bir kalıtım gösterir. Genetik faktörler tam tanımlanabilmiş olmamakla birlikte, maternal folik asit düzeyi, B12 vitamin seviyeleri, annede yetersiz beslenme, yüksek ateş, hipertansiyon, diabetes mellitus ve obezitenin de içinde bulunduğu sağlık sorunları, kullanılan ilaçlar, kimyasal ajanlar ve teratojenler gibi pek çok etkenin nöral tüpün hatalı kapanmasına neden olabildiği bildirilmektedir (Brock ve ark., 1975; Mitchell, 2005; Greene ve Copp, 2014).

Nöral tüp kusurları, genler ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanan konjenital malformasyonlardır ve %60'luk bir kalıtsallık ile iyi bilinen bir genetik bileşene sahiptir (Harris ve Juriloff, 2010). Kesin bir Mendel kalıtım modelini takip etmemelerine rağmen NTD'nin ailesel kümelenme göstermesi kalıtsallığına ikna edici bir kanıttır. İnsan NTD'sinin genetiğinin karmaşık ve yetersiz anlaşılmış olduğu kabul edilmektedir. Bunun nedenlerinden biri NTD'den etkilenen aile sayısının azlığıdır. NTD'li bireylerin perinatal mortalite ve morbiditesi önemlidir ve hayatta kalanların üredikleri nadir görülür. Kromozom anomalileri, konjenital kalp hastalıkları,

bazı iskelet displazilerine ek olarak, NTD anlamlı yenidoğan ölümlerinin önemli bir kısmına neden olur (Lemay ve ark., 2019).

TED yaklaşımları ile kompleks hastalıklardaki genetik varyasyonlardan sorumlu birçok gen keşfedilmiş ve keşfedilmeye devam etmektedir. Yapılan araştırmalar, nörolasyon başarısızlığından tek bir faktörün sorumlu olmadığını, NTD'lerin bozulmuş gen düzenleyici ağların, çevresel etkilerin ve epigenetik düzenlemenin karmaşık bir etkileşiminden kaynaklandığını göstermektedir. Bu dinamiklerin kapsamlı şekilde anlaşılması, NTD araştırmalarını ve NTD'yi önlemeyi sağlamak için kritik öneme sahiptir. Çalışmamızın amacı dünya çapında en yaygın ciddi doğum kusurları arasında yer alan nöral tüp kusurlarına katkıda bulunan genetik mekanizmalar hakkındaki ortak bilgimizi genişletmek ve NTD etiolojisinde etkili olabilecek varyantları, olası yeni genleri araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöral tüp Defekti Tanım ve Tarihçe

Nöral tüp defektləri (NTD) embriyogenezin 3. ve 4. haftaları arasında kapanması gereken nöral tüpün kapanma yetersizliğı yada kapanma hatası sonucu gelişen konjenital anomalilerdir (Chapman ve ark., 1989). Bu malformasyonlar arasında anensefali, ensefalosel, spina bifida, dermal sinus, diyastometamyeli, lipomeningomyelosel ve nöroenterik kist bulunmaktadır (Behrman ve Vaughan, 1983). NTD'lerin şiddeti ve tipleri, omurganın etkilenmiş bölgesine göre değişir. Beyni oluşturacak yapıların bulunduğu bölgede meydana gelen nöral tüp kapanma defektləri anensefaliye neden olurken omurilikte meydana gelen kapanma defektləri spina bifidanın oluşumu ile sonuçlanır (Kaufman, 2004; Greene ve Copp, 2014).

NTD'leri açık ve kapalı olarak iki gruba ayrılır. Açık NTD'de sinir dokusu açığa çıkmıştır ve serebral spinal sıvı (BOS) sürekli veya aralıklı olarak sızıntı yapmaktadır. Kapalı NTD'de ise görünen sinir dokusu ve BOS sızıntısı yoktur. Bu gruptaki malformasyonlar omurilikle sınırlı görülmektedir ve beyin nadiren malformedir (McComb, 2015). Spina bifida occulta'da olduğu gibi, kapalı spinal lezyonlar asemptomatik olabildiğı gibi omurilikteki gergin lumbosakral durum nedeniyle alt ekstremitelerde motor bozukluk ve duyu kayıpları, nörojenik mesane gibi durumlar oluşabilir (Copp ve Greene, 2013).

NTD'ye ilişkin bilgiler eski Mısır'a kadar dayanmaktadır ve tarihi belgelerde anensefalisi, myelomeningoseli ve kranioraşisizmi olan olgulara ait kayıtlara rastlanmıştır (Obladen, 2011). Von Recklinghausen'e göre (1886) açık NTD'nin mekanizması embriyonik nöral tüp kapanma aşamasında meydana gelen durmadan kaynaklanmaktadır. Morgagni (1769) ise artmış serebrospinal sıvı yapımından kaynaklı gelişen artmış intraventriküler basıncın, kapanmış olan nöral tüpe etki ederek tekrar açılmasına sebep olabileceğini öne sürer (Padmanabhan, 2006).

Record ve McKeown 1949 yılında NTD'lerin epidemiyolojik özellikleri ile ilgili literatüre giren ilk çalışmayı sunmuştur. Yayınlanan bu çalışmada santral sinir sisteminde konjenital malformasyonları olan 930 olgu değerlendirilmiştir (Record ve McKeown, 1949). NTD'nin bu çalışma ile coğrafi bölgeler ve etnik gruplar arasında değişen prevalans oranları, sosyoekonomik düzeylere göre değişen özellikleri, multipar kadınlarda gebelik sıraları ve anensefali yönünden kız cinsiyetin baskınlığı gibi farklı niteliklerin epidemiyolojik özellikleri oluşturduğuna dikkat çekilmiştir. Bu epidemiyolojik özelliklere dayalı olarak yapılan analizlerde NTD etiyojisinde multifaktöryel kalıtım özellikleri tespit edilmeye başlanmıştır (Carter, 1974).

Nöral tüp defektleri, konjenital anomaliler arasında en ağırlarından biri olmakla birlikte, epidemiyolojik bulgular, prevalansın bölgesel ve demografik özelliklere göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Dünya genelinde yapılan çalışmalara bakıldığında NTD görülme sıklığının %0.57 ile %13.87 arasında bir orana sahip olduğu görülmektedir (Li ve ark., 2006; Nikkilä ve ark., 2006). Zaganjor ve ark. (2016)'nın literatür taramasında dünyadaki nöral tüp sıklığı Afrika'da 10.000 doğumda 11.7, Doğu Akdeniz 10.000 doğum için 21.9, Avrupa 10.000 doğum için 9.0, Kuzey ve Güney Amerika'da 10.000 doğumda 11.5, Güneydoğu Asya'da 10.000 doğumda 15.8 ve Batı Pasifik 10.000 doğumda 6.9 olarak tespit edilmiştir.

2.1.1. Spesifik Bir Etiyolojiye Bağlı ve Diğer Malformasyonlarla Birlikte olan Nöral Tüp Defektleri

Bu grupta kromozomal anomaliler ve tek gen mutasyonları yer almaktadır. Her ne kadar birçok genin nöral tüpün oluşumu ve gelişiminde rol oynadığı düşünülse de pek az sayıdaki genin hücresel düzeyde etkin rolü olduğu ortaya konabilmiştir. Etkin rolü olduğu düşünülen söz konusu genlerden başlıcaları:

Sonik 'hedgehog' geni (SHH): Holoprosensefaliye sekonder hidrosefali olgularının bazılarında *sonik 'hedgehog'* geni mutasyonu saptanmıştır. Bu genin nöral plağın gelişiminde etkili olduğu ve özellikle prosansefalonun medial ve ventral büyümesini indüklediği bildirilmiştir (Mitchell ve ark., 2004).

Notch-1 geni: Somitler ve segmentasyon koordinasyonunda, *Notch-1* geninin rolü olduğu düşünülmektedir. Bu gen transmembran reseptörünü kodlamakla birlikte hücre-hücre kohezyonu ile ilgili olduğu bilinmektedir (Mitchell ve ark., 2004).

Zinc gen ailesi: Bu genler Zinc-finger proteinlerinden olup notch sinyal aktivasyonu yolu ile NTD oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Mitchell ve ark., 2004).

Hox gen ailesi: İnsanda somitlerin farklılaşması muhtemel olasılıkla hox gen ailesinin etkin rolü ile meydana gelmektedir (Mitchell ve ark., 2004).

PAX-3, PAX-7 ve PAX-1: Segmentasyondaki işlevleri henüz netleştirilememiş olan bu regülatuar genler, presomitik mezodermde ya da somit evrelerinde ekspresse olmaktadır. Heterozigot *PAX-3* mutasyonu Waardenburg sendromunda bildirilmiştir. Söz konusu sendromda NTD, sağırılık ve inkomplet pigment anomalileri ile birlikte kendini göstermekte ve *PAX3* genini içeren Waardenburg sendromu tip 3, 2. kromozomda interstisiyel delesyon taşıyan hastalarda myelomeningosel ile birlikte bildirilmiştir (Mitchell ve ark., 2004).

PDGFRA ve BRCA1 genleri: NTD ile ilişkilendirilen kanıtlar bulunmuş olan bu genler *PAX-1* transkripsiyon faktörü tarafından aktivite kazanmaktadır (Mitchell ve ark., 2004).

Shroom proteini: Shroom yakın geçmiş zamanda yapılan çalışmalarla tanımlanmış aktin bağlayıcı protein olmakla beraber, nörolasyonun apikal oluşum evresinde aktif rol oynadığı gösterilmiştir ve tek bir gendeki ekspresyonla olayın merkezi olarak bildirilmiştir (Mitchell ve ark., 2004).

NTD ile ilişkili olduğu düşünülen birçok tek gen hastalığı bildirilmiştir. Yapılan hayvan deneylerinde insanda karşılığı bulunan ve NTD oluşumunda kritik rolü olan nörolasyon evresinde etkin 100'e yakın mutant genin varlığı bildirilmiştir (Juriloff ve Harris, 2000). Ancak insanda NTD'den tek başına sorumlu tek bir gen bildirilmemiştir. Bununla birlikte Serebrokostomandibular Sendrom, Fraser Sendromu, Meckel Gruber Sendromu,

Waardenburg Sendromu, Akrokallosal Sendrom, Fankoni Pansitopeni Sendromu, Hydrolethalus Sendromu, Jarcho-Levin Sendromu gibi pek çok sendromik durum NTD yapılarını içerir. NTD etiyolojisini oluşturan genetik faktörlerin varlığının bir başka kanıtı da, spontan abortus ile sonuçlanan NTD'li vakaların kromozomal malformasyonlarla olan anlamlı ilişki durumlarıdır (Berg ve ark., 2007). Trizomi 9, trizomi 13, trizomi 18 gibi bazı trizomilerde ve triploid kromozomaberasyonlarını taşıyan karyotiplerde çeşitli malformasyonlarla birlikte meningoel, meningoelmyelose ve hidrosefali gibi NTD ilişkili durumlar görülebilmektedir (Rothman ve ark., 1995).

Kardeşler arasında myelomeningoel bir birey varsa tekrarlama riski %2 ile %5 arasındadır (Sebold ve ark., 2005). Etkilenen bireylerin birinci ve ikinci derece akrabalarında NTD görölme prevelansı genel popülasyona göre anlamlı derecede yüksektir. Kız bebeklerde ve monozigot ikizlerde NTD'ye özellikli bir eğilim durumunun varlığı bildirilmektedir. İkiz gebeliklerde tekil gebeliklerle karşılaştırıldığında ensefalose ve anensefali prevelansları artarken spina bifida prevelansının azaldığı görölmektedir (Padmanabhan, 2006). Anensefali çocuklar doğumda veya hemen sonrasında öldüklerinden kalıtım şekli belirlenememekle birlikte yüksek akrabalık oranları ile görülen anensefalideki sıklık özellikle göze çarpmaktadır (Zlotogora, 1997; Al-Gazali ve ark., 1999; Pinar, 2004). Bir NTD gebeliğinden sonra tekrarlama riski yaklaşık % 3-5'tir. Geçirilmiş iki NTD gebeliğinden sonra bu risk % 11,7 ile 20 arasında değişir (Seller, 1981).

2.1.2. İzole (Gelişimsel) Nöral Tüp Defektleri

İzole NTD'lerin etiyolojisinde hem çevresel faktörlerin hem de genetik yatkınlığın etkilerini ortaya koyan veriler anomalinin multifaktöriyel doğasını ortaya koymaktadır. Annede hipertansiyon, yetersiz beslenme, obezite, diabetes mellitus, yüksek ateş gibi sağlık sorunları, kullanılan bazı ilaçlar, maruz kalınan çevresel kirlenimler ve genetik faktörler nöral tüpün hatalı kapanmasında rol oynayabilmektedir. NTD'de, yaşanan coğrafi bölgenin, ebeveynlerin eğitim ve sosyoekonomik durumunun, mevsimsel değişikliklerin insidasta farklılığa sebep olması, etiyolojisinde muhtemel çevresel etmenlerin yer aldığını göstermektedir. Multifaktöriyel kalıtımla geçen hastalıkların aile

bireylerinde görölme olasılığı mendel tipi kalıtıma göre daha düşük insidansa sahiptir (Oğur,1998). NTD oluşumunda rolü olduğu bilinen ve en çok üzerinde durulan çevresel faktörler şunlardır:

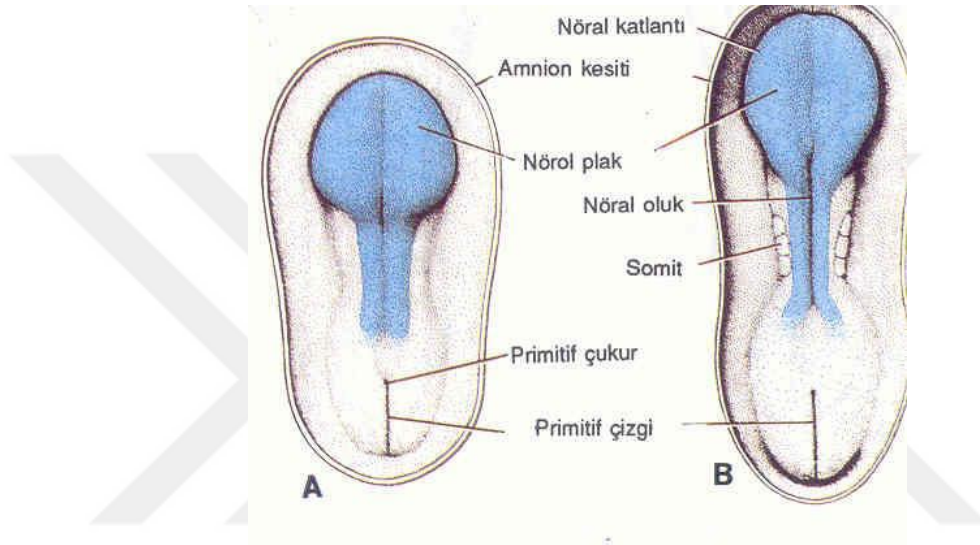
- Coğrafi faktörler
- Teratojen faktörler
- Maternal diabetes ve obezite
- Maternal hipertermi
- Gebelikle ilişkili durumlar
- Sosyoekonomik düzey ve beslenme
- Folik asit ve B₁₂ vitamini eksikliği

2.2. Embriyolojik Gelişim

Santral sinir sistemi, embriyonel yaşamın 3. haftasının başlarında, kalınlaşmış ektoderm plağı (nöral plak) halinde belirtmeye başlar. Bu plak, primitif çukurun ön kısmında, mid-dorsal bölgede konumlanmıştır. Nöral plağın lateral kısımları yukarı yönde kabarmaya devam ederek nöral katlantıları oluşturur (Sulik ve Sadler, 1993).

Gelişimin ileri safhalarında, nöral katlantılar kabarmaya devam ederek, orta çizgide birbirleriyle birleşir; kaudal ve sefalik yönde gelişigüzel biçimde ilerleyerek nöral tüpü meydana getirir. Tüpün kranial ve kaudal uçlarında birleşme daha sonra gerçekleşir. Dolayısıyla kranial ve kaudal boşluklar oluşur. Oluşan kranial boşluk rostral nöropor (anterior nöropor) ismini almakla birlikte 25. günde kapanır. Oluşan diğer boşluk olan kaudal nöroporun (posterior nöropor) ise kapanması 2 gün sonra gerçekleşir. Nöral tüpte kan damar sisteminin kurulmasıyla nöroporların kapanması gerçekleşir. Nöral tüp duvarları kalınlaşarak beyin ve omuriliği oluştururken, nöral tüpün lümeni, beyin ventrikül sistemine, omuriliğinki ise santral kanala dönüşerek gelişimine devam eder (Şeftalioğlu, 1998). Nöral oluğun yan bölgesindeki nöral kristayı meydana getiren bir grup hücre göç ederek periferik sinir sisteminin büyük bir bölümünü meydana getirir (Çimen, 2008).

Yeni kapanmış bir nöral tüpün duvarları, nöroepitelyal hücrelerden meydana gelir. Bu nöroepitelyal hücreler, duvar boyunca uzanarak, kalın bir pseudostratifiye epitel oluşturarak birbirleriyle lümende bulunan birleşim komplekslerinin sayesinde bağlantı halinde bulunurlar. Nöral oluğun oluşumu esnasında ve tüpün kapanması tamamlandıktan hemen sonra, bu hücreler hızla bölünmeye başlayarak, daha fazla miktarda nöroepitelyal hücre yığınları oluştururlar. Oluşan hücre yığınlarına nöroepitelyal katman veya nöroepitelyum adı verilir (Sulik ve Sadler, 1993).



Şekil 2.1: On sekiz günlük embriyonun ventral görünümü (A) ve 20. günde dorsal görünümü (Sulik ve Sadler, 1993)

2.2.1. Nöral Tüpün Kapanması

Nöral tüp defektleri nöral tüpün oluşumu ve kapanma sürecini de içine alan embriyolojik yaşamın ilk dört haftasında, embriyoyu etkileyen faktörler sonucu nöral tüpün farklı bölgelerinin kapanmasındaki başarısızlık sonucu oluşur. Kapanmanın zamanına ve ne kadar kesintiye uğradığına bağlı olarak hem kranial hem de kaudal uçlarında defektler meydana gelebilir. 23. ve 26. gün hasarları, kranial nöropor etkilenmesi nedeni ile daha çok anensefali, 26. gün sonrası hasarları ise kaudal nöropor hasarlarına sebep olduğundan meningo-myelosel olarak karşımıza çıkar (Oğur, 2004).

Nöral tüpün kapanabilmesi için önemli olan birtakım spesifik sinyal yolları vardır. Bu sinyal yolları; kapanmayı başlatan düzlemsel hücre polaritesi (planar cell polarity, PCP)

sinyali, dorsolateral menteşe noktaları (dorsolateral hinge points, DLHP) oluşumunu önleyen sonik hedhehog sinyali, DLHP'lerin önlenmesinde gerekli olan BMP (kemik morfojenik protein) sinyali, nörogenezisin regülasyonunu sağlayan notch sinyali, mekanizması bilinmemekle birlikte retinoid sinyali ve protein kinaz C yoluyla protein fosforilasyonu ile inositol metabolizmasında etkili olduğu düşünülmektedir (Greene ve ark., 2009).

Nöral tüpün kapanma safhaları morfolojik olarak, nöral katlantının dorsal kenarların birbirine yaklaşarak birleşmesi, birleşme sonrası temas eden kenarlarda apoptoz yoluyla epitelyal çökme meydana gelmesi ve nöroepitelyumun birleşmesinden oluşur. Shh (Sonic hedgehog protein) ve Gli1 (glioma-ilişkili onkogene homologu 1), Gli2 (glioma-ilişkili onkogene homologu 2), Gli3'ün (glioma-ilişkili onkogene homologu 3) bölgeye özgü ekspresyonları hayvan embriyolarında nöral katlantı birleşim safhalarını kontrol eden majör etkenlerdir. Gli1, kısa zamanda hücreleri birleştiren, orta hat nöral plak hücreleri tarafından eksprese edilen, Gli2 ve Gli3 tüm orta hat nöral plak hücreleri tarafından eksprese edilen proteinlerdir. İşlevleri arasında Gli1, Shh sinyalinde görev alırken, Shh da Gli2 transkripsiyonunu repress eder. Gli3 ve Shh da birbirini repress eder. Gli1 ventral önbeynin nöronal farklılaşmasını durdurur. Bunun aksine ventral spinal motor nöronlar Gli1 ve Gli2 tarafından inhibisyona uğrar. Dolayısıyla, Gli proteinleri hem pozisyona özgü bilgiyi hem de merkezi sinir sistemi içerisinde nöronal tipe özgü farklılaşmayı sağlarlar (Padmanabhan, 2006). Ayrıca nöral tüpün kapanmasında görev yapan hücre canlılığı ile ilişkili proteinler, sitoskeletal proteinler, hücre yüzey-extraselüler matriks interaksiyonları, hücre siklusu/nörogenezisle ilişkili proteinler gibi son derece önemli işleve sahip proteinlerde vardır (Greene ve ark., 2009).

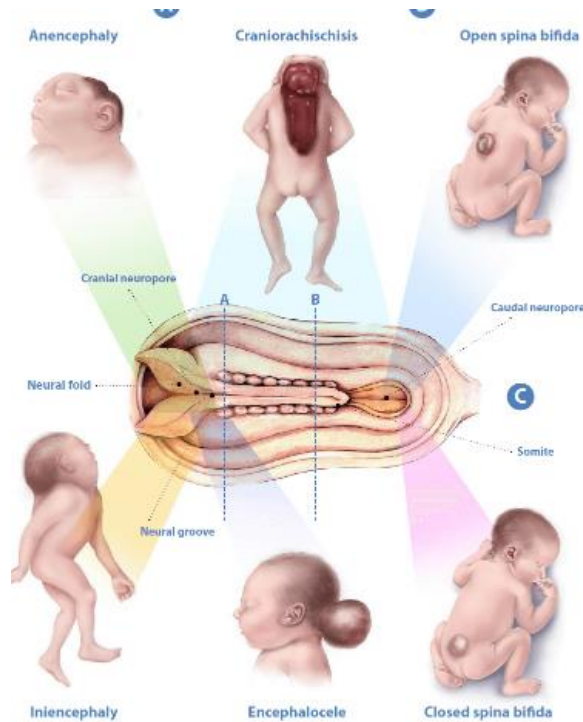
2.2.2. Sekonder Nörolasyon

Spinal kordun büyük bir kısmını ve ileride sakral segment 2 (S2)'yi oluşturacak olan primer nöral tüpün spinal kısmı yaklaşık 31. somit düzeyine gelince gelişir ve sonlanır. Kaudal nöropor yaklaşık 25 somit evresine geldiğinde kapanır. Spinal kordun en distal kısmı ise kaudal çıkıntıdan sekonder nörolasyon adı verilen bir süreçle gelişir. Kaudal çıkıntılı pluripotent hücreler içeren daha sonra bu hücrelerden nöral kord, hindgut'ın bir

kısmı kaudal somitler ve kaudal notochorda dönüşerek süreç devam eder. Nöral tüp formasyonunun tamamlanması, fertilizasyonun sonrasında 18. günde başlar ve 10 gün içinde tamamlanır. Nöral tüp kapanmasındaki bu kritik kısım, kapanmadaki primer yetmezliğin en sık olduğu kısımdır. Farklı şiddet ve klinik malformasyonlarda NTD'lerin neden en sık tüpün kaudal kısmında geliştiğini aydınlatmak için, kaudal nöral tüp oluşumunun mekanizmasını açıklayacak ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Padmanabhan, 2006).

2.3. Nöral Tüp Defektlerinin Klinik Tipleri

Nöral tüp defektleri kranial veya spinal kanal tutulumuna göre klinik olarak sınıflandırılır. Anensefali ve ensefaloselde sadece kranial tutulum oluşurken, kranioraşişizisde kranial ve spinal kapanma defekti bir arada oluşur. Spinal tutulum ise spina bifida olarak tanımlanır. Spina bifidalar da tutulum bölgelerine göre torakal, lumbal ve lumbosakral olarak sınıflandırılmaktadır. SB'lar tutulum seyrine göre meningomiyelosele, meningocele, spina bifida okulta olmak üzere üç formda sınıflandırılır (Pico ve ark., 2009).



Şekil 2.2: Nöral tüp defektleri (Botto ve ark., 1999)

Tablo 2.1: Nöral tüp defektlerinin sınıflandırılması (Pico ve ark., 2009)

Kraniyal Defektler	Spinal Defektler
Anensefali	Spina Bifida Okkulta
Ensefalosel	Spina Bifida Kistika
Eksensefali	Meningomyelosel
Kranioraşışizis	Meningosel
İnensefali	Gergin Omirilik Sendromu
	Siringomyeli

2.3.1. Kranial Defektler

Anensefali, kraniyal nöral tüpün kapanmaması sonucu oluşan beyin nöral kıvrımlarının açık kalarak çevreye maruz kaldığı NTD şeklidir (Copp ve Greene, 2013). Anensefali mortalitesi yüksek bir maformasyondur.

Ensefalosel, kranial orta hat gelişim defektlerinden biri olan ensefalosel beyin ve zarlarının kraniumdaki kemik defektinden kistik şekilde dışarıya doğru herniye olmasıyla gelişen nadir görülen ve prognozları oldukça kötü NTD'dir (Singh ve ark., 2012; O'Connell ve ark., 2019).

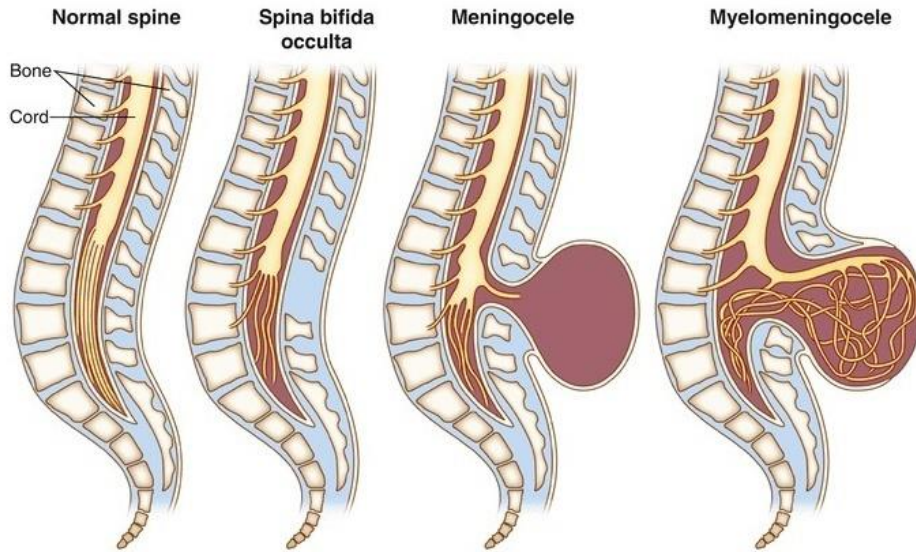
Eksensefali, eksensefali beyinin neredeyse tamamının gelişmesine karşın kraniumun bir kısmının ya da tamamının gelişmemesi ile meydana gelen gelişimsel bir anomalidir (Northrup ve Volcik, 2000).

Kranioraşışizis kraniorakşizis, kranial veya spinal nöral tüpü ayrı ayrı etkileyen, tüm nöral tüpün orta beyinden omurganın alt bölgesine kadar açık kaldığı geniş bir lezyon içerir (Copp ve Greene, 2013).

İnensefali, iniensefali, boynun aşırı hiperekstansiyonu ve çeşitli seviyelerde vertebral defektlerle birlikte görülen nadir ve letal bir anomalidir (Gadodia ve ark., 2010).

2.3.2. Spinal Defektler

Spina bifida, kemik omur defektine bağılı olarak omurganın tam kapanmadığı doğuştan bir hastalıktır. Embriyonik dönemde ortaya çıkan bir orta hat omurga kusurudur. Bir veya daha fazla vertebral arkın yetersiz kapanması, nöral tüpün eksik bağlantısının sonucudur. Nöral tüp defektinin boyutuna bağılı olarak çeşitli spina bifida türleri tanımlanabilir. Spina bifida occulta olarak da bilinen kapalı spinal disrafizmler, yalnızca vertebral arkın kemik defekti ile karakterize edilirken, spina bifida sistika (eşanlamlı: açık spina bifida veya spina bifida aperta), her iki meningi de içeren çıkıntılı bir kist ile tanımlanabilir veya meninksler omurilik dokusu ile kombinasyon halindedir ve açık spinal disrafizmler olarak tanımlanır (Mühl-Benninghaus, 2018). Spina bifida çoğunlukla spinal kordun lomber bölgesini tutmakla birlikte, yerleşim bölgesine göre % 47'si lumbosakral, % 26'sı lomber, % 20'si sakral, % 5'i torasik ve % 2'si servikal bölgede insidans dağılımı gösterir (Selzman ve ark., 1993).



Şekil 2.3: Spina bifida türleri (İnt. Kay. 1).

Spina bifida okkulta, omuriliği çevrelemesi gereken pluripotansiyel mezodermal dokunun hatalı gelişmesiyle meydana gelen en az şiddetli formda görülen NTD grubudur. Görülen meningeal veya nöral doku herniasyonu yoktur. Genel olarak yüzey normal ciltle kaplı, anormal saç kümesi veya doğum lekesi şeklinde küçük bir çukur görülebilen omurganın kemikli bir kusurudur (Northrup ve Volcik, 2000). Genelde

prognoz iyidir (Gregerson, 1997). Diğer kapalı spina bifida formları içinde diyastometamiyeli, spinal lipom, gergin filum terminale, anterior sakral meningoşel, lateral torasik meningoşel, split notokord sendromu, kaudal regresyon sendromu, dorsal dermal sinüs, siringomiyeli-hidromiyeli bulunmaktadır (Gleason ve ark., 2012).

Spina bifida aperta, NTD'lerin açık formu ciddi bir konjenital anomaliyi temsil eder. Tüp omurga boyunca kaynaşmazsa, ortaya çıkan kusur meningoşel, miyeloşel, meningoşel gibi açık bir disrafizm türüdür. NTD'li bebeklerde sıklıkla ek ciddi nörolojik, kas-iskelet sistemi, genitoüriner ve bağırsak anomalileri vardır. Açık formlar sıklıkla hidroşefali ve Arnold chiari malformasyon tip II ile ilişkilidir ve spina bifida aperta olarak sınıflandırılır (Sekhar ve Kumar, 2022). Spina bifida apertada görülen anormallikler 4 şekilde sınıflanır:

Meningoşel, SB'nın nadir görülen bu türünde sırtında meninkslerden oluşan bir kese görülür. Kese meninksler ve beyin omurilik sıvısı içeriyorsa ve omurilik normal konumlarındaysa, bu kusura meningoşel denir (Northrup ve Volcik, 2000). Omuriliği çevreleyen zarlar açıkta kalan omurgadan dışarıya doğru herniye olur. Herniye olan kesede serebrospinal sıvı bulunur, nöral doku bulunmaz. Bu sıvı beyin ve omuriliği korur ve çevreler. Bu durumda sinirler diğer türlere göre daha az zarar gördüğünden çok az hasara neden olur (Elwood ve ark., 1992).

Meningomyeloşel (MMC) veya Spina Bifida Cystica, gebeliğin ilk 26. gününde nöral arkin posterior kapanma defekti nedeniyle meydana gelen, vertebral kanalın açık kalması, meninkslerin cilt dışına çıkması ve içi epitel ile döşeli, subaraknoid mesafe ile doğrudan bağlantılı sırt bölgesine yerleşmiş kistik kitle ile karakterize doğumsal bir anomalidir. Nörolojik, ürolojik ve ortopedik komplikasyonlar söz konusudur. Bireylerde sıklıkla alt ekstremitelerde, mesanede ve rektumda motor ve duysal defektler vardır (Gümüş ve ark., 2002). Meningomyeloşel olguları, sıklıkla lomber bölgede görülür. Servikal spinal disrafik lezyonların tanısı yenidoğan döneminde yapılan fizik muayene ile konulabilmektedir. Olgularda cerrahi onarımla açıklığın kapatılması ve beyin omurilik sıvısı (BOS) sızıntısının önlenmesi sağlanır. Fibröz yapışıklıkların kaldırılarak kese içindeki nöroglial dokuların ve spinal kordun serbest hale getirilmesi ileride

oluşacak nörolojik defektlerin önlenmesi ve hidrosefali eşlik eden olgularda V/P şant takılması ile kontrol altına alınması önemlidir (Eroğlu ve ark., 2017). Nörolojik komplikasyonların başında hidrosefali gelir. %40-50 olguda olaya hidrosefali eşlik eder. Hidrosefali oluşumunun ana sebebi Chiari anomalisinin eşlik etmesi ve bu küçük beyin prolapsusunun BOS dolaşımında tıkanmaya neden olmasıdır. Myelomeningosellerde alt ekstremitelerde flask pareziler dahil farklı ortopedik problemler görülür. Ayrıca Pes equino varus ve kalça displazisi sıklıkla vardır (Aksoy, 1985). Meningomyelosel vakalarının çoğu sporadik kökenlidir ve genetik olmayan bir şekilde ortaya çıkar (Almeida ve ark., 1988). Klinik tablo vertebral kolondaki spinal lezyonun yerine bağlıdır. Etkilenen seviye ne kadar yüksek olursa, o kadar fazla eksiklik olur ve hastanın prognozu o kadar kötü olur. Meningomyelosel, çocuklarda nörojenik mesanenin en yaygın nedenlerinden biridir (Woodhouse, 2008). Hastalar yaşam boyu işlevsel bir engellilik ve parapleji, sfinkter disfonksiyonu, motor ve duyu bozuklukları gibi yaşla birlikte kötüleşebileceği diğer problemlere sahip olabilirler (Yamashiro ve Farmer, 2021). Öte yandan, böbrek, solunum ve kardiyak komplikasyonlar spina bifidalı hastalarda sık görülen mortalite nedenleridir (Woodhouse, 2008).

Lipomeningomyelosel, nöral tüpün tam kapanmadan önce nöroektoderm ve kutaneus ektodermin zamanından önce ayrılmaları yağ dokusunun prekürsörleri olan bazı mezoderm hücrelerinin nöral oluk içerisine toplanması ve de nöral doku ile cilt altını birleştiren bir lipom oluşmasına böylece lipomeningomyelosel'e sebep olmaktadır (Aksoy, 1985).

Miyeloşizis, birincil nöral plakanın tam olarak kapatılamaması, kenarların kusurla aynı hızda olan yarı bir omurilikle sonuçlanmasıdır (Mohd-Zin ve ark., 2017). Fıtıklaşmış sinir dokunun deri ve meningeal zarlarla sarılı olmadığı tamamen çıplak olduğu spina bifida meningomyeloselin en şiddetli halidir (Yilmazer ve ark., 2009).

Diastematomyeli, omuriliğin iki hemikorda bölünmesiyle sonuçlanan, nadir görülen bir spinal disrafizm şeklidir (Kaminker ve ark., 2000).

Siringomyeli, omurilik içinde sıvı dolu bir kistin oluştuğu ve miyelopatiye neden olduğu nadir oluşan bir defektir. Esas olarak kranioservikal bileşkedeki anormallikler ile ilişkili foraminal siringomyeli, araknoiditin herhangi bir nedeni ile ilgili non-foraminal siringomyeli (enfeksiyon, inflamasyon, travma) ve daha nadiren intramedüller tümörlerle ilişkili siringomyeli olarak ayırt edilir (Leclerc ve ark., 2021).

2.3.3. Nöral Tüp Defektine Eşlik Eden Anomaliler

Chiari Tip 2 Malformasyonu, yaygın olarak Arnold-Chiari malformasyonu olarak bilinen Chiari II malformasyonu (CM-II), gagalı orta beyinin, bademciklerin aşağı doğru yer değiştirmesi ve serebellar vermis ve spinal miyelomeningosel ile karakterize nispeten yaygın bir konjenital malformasyondur. Miyelomeningoselli hastaların çoğunda CM-II eşlik eder ve tipik olarak hidrosefali ile ilişkilidir (Kuhn ve Emmady, 2022).

Hidrosefali, BOS üretiminin veya dolaşımının bozulması veya BOS emiliminin bozulmasından kaynaklanabilecek beyin ventriküllerinde aşırı beyin omurilik sıvısı (BOS) birikimi ile karakterize bir durumdur. Aynı zamanda ventriküler yapının tıkanması ile karakterizedir (Taha Najim ve ark., 2022). Genellikle kafa içi basıncındaki artışla ilişkilidir ve beynin ventriküllerinin veya subaraknoid boşlukların genişlemesine yol açabilir (Sobana ve ark., 2021). Pediatrik hidrosefalide yapılan araştırmalarda konjenital nedenlerin arasında meningomiyelosel, X'e bağlı kalıtım gösteren aqueductus stenozu, chiari malformasyonu vb. malformasyonlar bildirilmektedir (Vural, 2015).

Skolyoz, MMC'li bireyler arasında yaygın ve şiddetli ortopedik malformasyonlarla birlikte ortaya çıkan durumlardan biridir ve bu grupta tahmini oran %50'ye kadar çıkmaktadır (Bradko ve ark., 2022). Açık spina bifida'ya en sık eşlik eden skolyoz ve kifoz deformitesi (defekt düzeyinde) gibi diğer malformasyonlar arasında pes equinovarus (%24) gibi ayak deformiteleri de sayılabilir (Biggio ve ark., 2004)

2.4. Nöral Tüp Defektlerinin Genetiği

Nöral tüp defektlerinin sıklığı, doğası ve patolojinin yaşama ve üreme sürecine etkileri gibi nedenlerle NTD'ler çok kuşaklı ailelerde görece olarak az izlenebilmekte ve olgular daha çok sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar, NTD'lerin etiolojisinde güçlü bir genetik bileşen olduğunu göstermekte ve kalıtım modeli, kısmi penetrasyonlu tek genlerin etkisinin aksine, çok faktörlü bir poligenik veya oligogenik modeli desteklemektedir (Harris ve Juriloff, 2007). Ailede spina bifida veya anensefali öyküsü olması, NTD oluşumu için en güçlü risk faktörlerinden biridir (Mitchell, 2005). Büyük ölçüde 1970'lerde ve 1980'lerde yürütülen aile çalışmaları, NTD'li bireylerin akrabalarında spina bifida veya anensefali veya her ikisi için riskin arttığını göstermiştir. Bu risk kardeşlerde %3-8 (birinci derece akrabalar); amca, hala, dayı gibi ikinci derece akrabalarda %1-2; üçüncü derece akrabalarda ise %0,5 olarak bildirilmiştir. Bu oran genel toplumda %0,1 kabul edilmektedir (Janerich ve Piper, 1978; Demenais ve ark., 1982; Hunter, 1984).

NTD'lerin genetik epidemiyolojisini karakterize etmeye yönelik çalışmalar, ilişkili spesifik genler hakkında bilgi vermemiştir. Örneğin, çok merkezli bir çalışmada, bazı kromozomal bölgeler tanımlanmış, ancak bugüne kadar NTD'ler için güçlü bir duyarlılık lokusu doğrulanmamıştır (Lupo ve ark., 2017). NTD genetiği üzerine yapılan çoğu çalışma, bir veya daha fazla aday gene odaklanmıştır (Boyles ve ark., 2005; Harris ve Juriloff, 2010). Aday gen çalışmaları özellikle mutant farelerde NTD'lere neden olan, 200'den fazla örneği bulunan insan gen ortologları ve folat metabolizması ile ilgili gen üzerinde yoğunlaşmıştır (Greene ve Copp, 2014).

Vaka-kontrol ilişkilendirme çalışmaları, birkaç geni sorumlu tutarken, yüksek kapasiteli dizileme teknolojileri ile yapılan mutasyon taramaları pek çok olası patojenik mutasyonu tanımlamıştır. Bununla birlikte, bir varyantın kuvvetli neden olarak atanması, NTD'lerin bariz multigenik doğası ve çok sayıda olası aday gen, değiştirici gen, epigenetik faktör ve çevresel etkiler nedeniyle karmaşıktır. Ayrıca, belirli genlerde varsayılan mutasyonların tanımlandığı vakalarda, her bir varyant NTD hastalarının yalnızca küçük bir kısmında belirlenmiştir; bu da NTD'lerin genetik temelini önemli

ölçüde heterojen olduğunu düşündürür. Bu nedenle, nöral tüp kapanmasının morfolojik ve hücresel temelleri son zamanlarda daha iyi anlaşılmış olsa da, bireysel vakalarda NTD'lerin genetik temeli büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır (Greene ve Copp, 2014).

Fare çalışmaları, genetik etkileşimlerin NTD'lerle sonuçlanabileceği üç mekanizma önermektedir. İlk olarak, bazı durumlarda fonksiyonel fazlalık, iki ortolog genin mutasyona uğraması ile oluşabilir. Bu duruma iyi çalışılmış iki örnek, Hamblet ve arkadaşlarının *DVL1*(Dışhevelled 1)-*DVL2* (Dışhevelled 2) genlerini, Savoury ve arkadaşlarının *CDX1* (Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 1) - *CDX2* (Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2) genlerini çift dozda devre dışı bıraktığı çalışmalarda elde ettikleri verilerdir. Söz konusu çalışmalar bu genlerin ekspresyonunun nöral tüpün kapanması için gerekli olduğuna işaret etmektedir (Hamblet ve ark., 2002; Savory ve ark., 2011). İkinci olarak da, heterozigot mutasyonların aditifada compaund etkileri, homozigotlara benzeyen NTD'leri ile sonuçlanabilir. Örneğin, *DVL* tekli nakavtların hiçbirisi nöral tüp kapanma kusurları göstermese de, *DVL1* ve *DVL2* veya *DVL2* ve *DVL3* genlerinin bozulmasının (*DVL1*^{-/-} ; *DVL2*^{-/-} , *DVL2*^{-/-} ; *DVL3*^{+/-} , *DVL2*^{+/-} ; *DVL3*^{-/-}) eksik nörolasyonla sonuçlandığı gösterilmiştir (Etheridge ve ark., 2008). Üçüncü mekanizma önerisi ise, kendi içinde çiftleştirilmiş fare suşları arasında NTD fenotiplerinin penetrans ve ekspresivitesindeki varyasyonlara, minör katkılı genlerdeki varyantların etkisini bildiren yayınlarda görülmektedir. Örneğin, *Cecr1* (Cat eye sendromu kromozom bölgesi, aday 1) mutasyonundan kaynaklanan ekzensefali oranının, aynı suşun kendileştirilmesi ile güçlü bir şekilde etkilendiği bildirilmiştir (Davidson ve ark., 2007). NTD'ler için değiştirici genlerin kimliği nadiren belirlenirken, bazı fare suşlarında *LMNB1* (Lamin B1)'de bilinen bir varyant mevcuttur ve kıvrıkcık kuyruklu (*GRHL3*^{ct}, Grainyhead-Like 3) embriyolarda NTD'lerin sıklığını önemli ölçüde artırır (Castro ve ark., 2012). NTD'de penetrans varyasyonunun, muhtemelen çoklu minör etkili gen varyantlarından kaynaklandığı ve diğer potansiyel değiştirici lokusların var olduğu düşünülmektedir (Davidson ve ark., 2007).

NTD'nin oluşumunda folat eksikliği önemli bir faktördür. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) folat metabolizmasında görevli bir enzimdir (Homberger ve ark., 2000). İnsanda *MTHFR* geni, birinci kromozomun 1p36.3 bölgesinde lokalizedir. MTHFR enzimi 656 aminoasitten oluşan bir zincire sahiptir (Homberger ve ark., 2000). MTHFR enzimi, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür (Bagley ve Selhub, 1998; Homberger ve ark., 2000; Bailey ve ark., 2002). *MTHFR* geninde meydana gelen birtakım mutasyonlar, MTHFR enzim aktivitesinde azalmaya sebep olur. MTHFR enziminde meydana gelen azalmanın, plazma homosistein düzeyindeki artışa ve aktif folat düzeyinin düşmesine ve böylece NTD oluşumunda artışa sebep olduğu düşünülmektedir (Yaliwal ve Desai, 2012). Folatın birinci fonksiyonu, hem guanin, adenin, timin sentezi için hem de DNA metilasyonunu da içeren temel metilasyon reaksiyonlarına metilasyon aşamaları için en önemli metil vericisi olan S-adenozilmetionin (SAM) ve metionin sentezi için bir karbon sağlamaktır. Folat eksikliği DNA hipometilasyonu ve anormal gen ekspresyonu gibi durumlarla sonuçlanır. Yüksek homosistein seviyesi kusurlu folat metabolizmasına işaret etmektedir. Homosistein sülfür içeren aminoasittir ve metionin döngüsünde orta düzeyde bir kilit noktasıdır. Bu döngü tüm yaşam için zorunlu olan DNA metilasyonunu içeren transmetilasyon reaksiyonlarının tüm çeşitleri için metil grupları oluşturmaktadır (Keser ve ark., 2014).

Nöral tüpün gelişimini tamamlaması için hücre proliferasyonu, vitalite, migrasyon olaylarında kusursuz koordinasyon gerekmektedir. Bu olaylardan herhangi biri folik asit metabolizmasındaki bir eksiklik sebebiyle aksayabilir (Coşkun, 2003). Fare modellerinde NTD'lere neden olan folat metabolizması ve transportu üzerinde, DNA onarımı, retinoik asit reseptörleri ve hücre polarite sinyal ağı gibi önemli biyolojik yollarda yer alan 200'den fazla gende mutasyon varlığı gösterilmiştir. (Song ve ark., 2016).

Folik asit, vücutta tek karbon zincirlerinin transferinde rol oynar. Eksikliği veya genetik mekanizmasındaki bozukluklar tek karbon metabolizmasında azalmaya sebep olur. Azalan enzim aktivitesi 5-metiltetrahidrofolat seviyesinin azalmasına dolayısıyla da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde

artmaya neden olmaktadır. Pürin ve pirimidin nükleotid sentezi folik asit türevlerinin en önemli görevidir. Pirimidin nükleotidlerinin sentezinde 5,10- metilentetrahidrofolat, timidilatmonofosfat (TMP) oluşturmak için deoksiüridilatmonofosfatı (dUMP) metiller. Folat, dUMP (deoksiüridilatmonofosfat)'den dTMP (deoksitimidilatmonofosfat) sentezi için gerekmektedir. dUMP, metionin ve SAM üretimi için gereklidir, SAM ise fragil bölgeler ve sentromer gibi spesifik bölgelerde kromozomal fragiliteyi engeller ve DNA metilasyonu için birincil metil vericisidir. Folat eksikliğinin, SAM ve dTMP sentezini azaltma, CpG hipometilasyonu ve DNA'da fazla urasil birleştirme gibi etkileri vardır. DNA replikasyonu için gerekli timidilatın yapılamaması sonucu DNA'da urasil içeriği artar. Fazla urasil birleşmesi nokta mutasyonu oluşumuna ve kromozom kırıklarına yol açabilir (Keser ve ark., 2014). De novo purin ya da timidilat sentezi için gerekli tek karbon ünitelelerinin noksanlığı, mitoz oranını ve DNA onarımını azaltarak replikasyonunun yavaşlamasına yol açmaktadır. Neticede azalmış hücre proliferasyon kapasitesi ve genomik instabilite ortaya çıkar. Urasilın yanlış biçimde katılımının verdiği genomik instabilite aynı zamanda nöral tübün kapanmasını etkileyebilir. Genomik instabilitenin sentromerik ve telomerik instabilite gibi durumlarının NTD'ye yol açabileceği gösterilmiştir. Yaygın olarak bilinmektedir ki; folik asit gelişme esnasında yeterli nükleotid havuzunun sentezini sağlar. Bununla beraber urasilin DNA yapımına uygunsuz katılımı ve genomik instabilite varlığının, nöral tüpün kapanmasında yetersizliğe neden olabileceğine ait deliller bulunmaktadır. Diğer yandan artan homosistein hücresel metilasyonda negatif regülasyona sebep olmaktadır (Coşkun, 2003).

Folik asit metabolizmasındaki düşüşün sebep olduğu DNA hipometilasyonu, sitozin metilasyonunu regüle eden genlerin %30'unun ekspresyonunu etkileyebilir. Histon metilasyonunun bozulmasıyla kromatin yapısında kararsızlık meydana gelir. DNA replikasyonu için timidilatın meydana gelememesi sonucu DNA'da urasil içeriğinde birikme meydana gelir. De novo purin ya da timidilat sentezi için gerekli tek karbon ünitelelerinin yetersizliği, DNA onarımında azalmaya ve replikasyonda yavaşlamaya sebep olur; bu durum mitoz oranını düşürür. Sonuç olarak azalan hücre proliferasyonu ve genomik instabilitede bozulmalar ortaya çıkar (Coşkun, 2003).

DNA metilasyonunun azalmasının hücre farklılaşmasını etkilediği düşünülmektedir. Daha spesifik olarak, son zamanlarda, gelişim sırasında farklılaşma için de novo metilasyonun ve ilişkili gen susturmanın gerekli olduğu öne sürülmüştür (Bai ve ark., 2005). Bu, de novo metiltransferaz enzimleri DNMT3A (DNA Metiltransferaz 3A) ve DNMT3B (DNA Metiltransferaz 3B)'nin hedeflenen kaybının embriyonik kök hücrelerde farklılaşma kapasitesini değiştirdiği çalışmalardan elde edilen verilerle desteklenmektedir (Jackson ve ark., 2004). Ayrıca, DNMT 3B-/-embriyolarda NTD saptanması nöral tüp kapanmasında uygun zamanda oluşan hücre diferansiyasyonunun gerekliliğini desteklemektedir. Gen ekspresyonunun metilasyon aracılı baskılanmasına aracılık eden genlerin delesyonunun da nöral tüpün kapanamamasına sebep olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2001).

DNA replikasyonu için nükleotid biyosentezindeki bozukluklar ve onarım, kritik morfogenetik süreçte mitotik oranları azaltabilir veya mutasyon oranlarını artırabilir; her iki durum da nöral tüp kapanmasında başarısızlığa neden olur (Keller-Peck ve Mullen, 1997). Nöral tüpün kapanması sırasında nöroepitelyumun hızlı büyümesi, hücre bölünme hızını sürdürmek için de novo nükleotid biyosentezinin artışına ihtiyaç duyar. Urasil yanlış birleşiminden kaynaklanan genomik kararsızlık, nöral tüp kapanmasını da etkileyebilir, çünkü sentromerik ve telomerik kararsızlık gibi genomik kararsızlık örneklerinin NTD'lere neden olduğu çalışmalar rapor edilmiştir (Herrera ve ark., 1999; Hollander ve ark., 1999; Wang ve ark., 2004). Folatın işlevi genel olarak anlaşılrsa da gelişim sırasında yeterli nükleotid havuzları, ne ölçüde bu özel eksikliğin NTD'lere katkıda bulunabileceği konusunda belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca, urasilin yanlış birleşmesine ve nöral tüpün kapanmasında genomik kararsızlığa ilişkin doğrudan kanıtlar eksiktir (Beaudin ve Stover, 2007).

NTD model organizması olarak, farede hipotez oluşturan araştırmalar için en az 250 NTD'ye neden olan mutasyon vardır, bu da bu yapısal doğum kusurlarının temelini oluşturan genetik karmaşıklığın altını çizer (Eppig ve ark., 2005; Harris ve Juriloff, 2010). Fare NTD modellerinin çalışmaları otuz yılı aşkın bir süredir sürmektedir. Bir veya en fazla birkaç aday gene odaklanan bir dizi klinik vaka kontrol çalışması, artan NTD riski ile ilişkili olduğu düşünülen aleller bulmuştur. İlk çalışmaların çoğu, NTD

fenotipleri ile sunulan doğal olarak oluşan fare modellerinde tanımlanan aday genlere dayanıyordu. Gen düzenlemenin ortaya çıkışı ve transgenik farelerin nispeten kolay ve verimli bir şekilde oluşturulması, bu gen keşif çabasını hızlandırmak için kritik olmuştur. Folik asidin NTD prevalansının önemli bir değiştiricisi olduğunun kabul edilmesi (MRC Vitamin Study Group, 1991), insan NTD'leri için aday genler olarak folik asidin enzimatik biyotransformasyonunda yer alan genlere dikkat çekti. Bu modeller, *MTHFR*, *MTRR* (Metiyonin Sentaz Redüktaz), *CBS* (Sistatinin Beta-Sentaz), *MTHFD1* (Metilentetrahidrofolat Dehidrojenaz 1), *SHMT1* (Serin Hidroksimetiltransferaz), *BHMT* (Betain-Homosistein Metiltransferaz) ve diğerleri için gen inaktivasyonunu içeriyordu (Beaudin ve Stover, 2007).

Kraniorakşizis ile ilişkilendirilen ilk gen *VANGL2* (Vangl Planar Hücre Polariteli Protein 2), homozigotluğun kapanma başarısızlığına neden olduğu 2002 yılında loop-tail (İlmek, LP) geninin konumsal klonlanması yoluyla tanımlandı (Kibar ve ark., 2001; Murdoch ve ark., 2001; Mitchell, 2005). Bunun ardından fare kapanma 1 bölgesinin kapanma başarısızlığının tümü kanonik olmayan WNT sinyallemede işlev gören bir dizi farklı gendeki kusurlardan yani düzlemsel hücre polaritesi (PCP) yolundan kaynaklanabileceği ortaya çıkmıştır (Copp ve ark., 2003; Zohn ve ark., 2003).

PCP sinyali, orijinal olarak *Drosophila*'da, reseptörün kıvrıldığı ve sitoplazmik proteinin dağıldığı, ancak β -katenine ihtiyaç duyulmadığı bir genetik kaskad olarak tanımlandı (McEwen ve Peifer, 2000). Daha sonra, bu yolun, epitel düzlemdeki polariteyi belirlediği bulundu (Strutt, 2003). PCP sinyali o zamandan beri omurgalı embriyolarında gastrulasyonla ilişkilendirilmiştir (Jessen ve ark., 2002; Park ve Moon, 2002). Bu nedenle, PCP sinyali, morfogenez sırasında düzlemsel polariteyi oluşturmak ve sürdürmek için kritik olan yüksek oranda korunmuş bir yolu temsil eder. Her bir PCP yolu mutanti için homozigotluk, kraniorakşizisi oluştururken, bazı gen çiftleri için bileşik heterozigotların da bu fenotipi ürettiği bulunmuştur. Örneğin, *VANGL2*^{+/-}; *CELSR1*^{+/-} ve *VANGL2*^{+/-} ; *SCRIB1*^{+/-} genotipleri için embriyolarda, heterozigot gen etkileşimlerinin potansiyelini gösterir şekilde 1. kapanışta başarısızlık bildirilmiştir (Murdoch ve ark., 2003; Stumpf ve Goldstein, 2003). Bununla birlikte, *VANGL2*, diğer mutant genlerle birleştirilirse farklı NTD fenotipleri verebilir. Örneğin, PCP geni *PTK7*

(Protein-Tirosin Kinaz 7) ve *PCP* olmayan gen *GRHL3* ile birlikte heterozigotlukta, açık spina bifida oluşumu rapor edilmiştir. Kanonik bir WNT ko-faktörünü kodlayan *CTHRC1* (Kolajen Üç Helix Tekrar İçeren Protein 1) geninin kaybı ile kombinasyonu halinde, eksensefali ile sonuçlanır (Yamamoto ve ark., 2008).

Bu bulgulara göre yakın ilişkili gen kusurları kombinasyonunun, tüm NTD'leri meydana getirebileceği görülmektedir. Nihayetinde benzer bir bulgunun insan NTD'leri ve bunların genetik nedenleri için de geçerli olması mümkündür (Copp ve Greene, 2010).

2.4.1. Hücre Biyolojik Fonksiyonları

Nöral tüp kapanmasında kritik hücre biyolojik fonksiyonları kafatasının kapanması için gerekli olan hücre iskelet proteinleri, hücre döngüsü/nörogenez ile ilgili proteinler, aşırı apoptoz ile NTD'lerin ortaya çıktığı hücre canlılığı ile ilgili proteinler ve bilinmeyen mekanizmalarla çalışan hücre yüzeyi-hücre dışı matris etkileşimlerini içerir.

2.4.2. Hücre İskelet Proteinleri

Nöral tüpün kapanması için gerekli olduğu kanıtlanan hücre iskeleti proteinlerini kodlayan genler içerisinde; shroom ve vinculin hücre iskeleti protein bileşenleri ve kofilin, mena ve palladin gibi hücre iskeleti ile ilişkili proteinler yer alır. Ayrıca, ABL1/2 (Abelson tirozin-protein kinaz 1), tirozin kinazlar, jun N-terminal kinazlar (JNK'ler), MARCKS (Miristoillenmiş Alanin Zengin C-kinaz Substratı) ve MRP gibi sinyal transdüksiyon proteinleri de dahildir ve bunların bozulması hücre iskeletiyle ilişkili bir fenotip üretir. Bu genetik analiz, nöroepitelyal hücreler içinde apikal aktin mikrofilamentlerini demonte eden ve deneysel modellerde NTD'leri oluşturduğu iyi bilinen teratojenik ajanlar, özellikle sitokalsinler üzerine yapılan çalışmalar ile ifade edilmiştir (Sadler ve ark., 1982). Çarpıcı bir şekilde, hücre iskeletinin hem genetik hem de teratojenik bozuklukları ekzensefali üretirken, sadece birkaç durumda (örneğin sadece Shroom ve Mlp mutantlarında) spinal NTD'ler gözlemlenmiştir (Copp ve Greene, 2010).

Tablo 2.2: Hücre iskeleti mekanizmasını bozarak NTD'lere neden olan fare genleri (Copp ve Greene, 2010)

Gen Sembolleri	NTD Oluşturan Genler	NTD Türü	Protein Fonksiyonu
<i>ABL1, ABL2</i>	<i>ABL / ARG</i> çift mutanı	Eksensefali	Reseptör olmayan tirozin kinazlar
<i>COFİLİN (N-)</i>	<i>n-cofilin</i>	Eksensefali	F-aktin depolimerize edici faktör
<i>GRLF1</i>	<i>RhoGAP P190</i>	Eksensefali	Glukokortikoid reseptörü DNA bağlama faktörü
<i>MAPK8; MAPK9</i>	<i>JNK1/JNK2</i> çift mutanı	Eksensefali	c-Jun-N-terminal kinazlar
<i>MARCKS</i>	<i>MARCKS</i> (miristoillenmiş alanin bakımından zengin C-kinaz substratı)	Eksensefali	Sinyal iletiminde işlevi olan hücre iskeleti ile ilgili protein
<i>MENA; PROFİLİN</i>	<i>Mena/profilin I</i> çift mutant	Eksensefali	Aktin polimerizasyonunun düzenlenmesi
<i>MENA; VASP</i>	<i>Mena/Vasp</i> çift mutanı	Eksensefali	Mena/Vasp/Evl hücre iskeleti düzenleyici ailesinin üyesi
<i>MLP</i>	<i>MARCKS</i> benzeri protein	Eksensefali ± Sb	Sinyal iletiminde işlevi olan hücre iskeleti ile ilgili protein
<i>PALLADİN</i>	<i>Palladin</i>	Eksensefali	Aktin hücre iskeleti ile ilişkili protein
<i>SHRM</i>	<i>Shroom</i>	Eksensefali + Sb	PDZ içeren hücre iskeleti proteini
<i>VCL</i>	<i>Vinculin</i>	Eksensefali	Hücre iskeleti proteini

2.4.3. Hücre Döngüsü ve Nörogenez

Emriyoda nörolasyon aşaması, nöroepitelyumda hücre döngüsü sürelerinin 4-6 saat kadar sürdüğü hızla çoğalan bir sistemdir. Bu sistemde bazı nöroepitelyal hücreler hücre döngüsünden çıkmaya başlar ve nöral tüpün kapanması aşamasında nöronal farklılaşma aşamasına geçerler. Bu da devam eden proliferasyon ve nöronal farklılaşma arasındaki dengenin başarılı kapanma için kritik olabileceğini düşündürür. NTD'lere neden olan mutasyonlarda bir dizi gen, hücre çoğalması ve/veya erken nörojenezin önlenmesi için gerekli görülmektedir. Ayrıca NTD'lerin, nöroepitelyal hücreler nöronal farklılaşmaya başladığında aktive olan Notch sinyal yolunun negatif düzenleyicilerini kodlayan bazı genlerdeki kusurlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Copp ve Greene, 2010).

Tablo 2.3: Hücre proliferasyonu veya nöronal farklılaşma mekanizmasını bozarak NTD'lere neden olan fare genleri (Copp ve Greene, 2010)

Gen Sembolleri	NTD Oluşturan Genler	NTD Türü	Protein Fonksiyonu
<i>BRD2</i>	<i>BRD2</i>	Eksensefali	Çift bromodomain içeren protein
<i>HES1</i>	<i>Hairy</i> ve <i>split 1 arttırıcı</i>	Eksensefali	Notch sinyalini inhibe eden transkripsiyon faktörü
<i>HES1, HES3</i>	<i>Hes1/Hes3</i> çift mutanı	Eksensefali	Notch sinyalini inhibe eden transkripsiyon faktörleri
<i>JMJ</i>	<i>Jumonji</i>	Eksensefali	Retinoblastoma bağlayıcı protein homologu
<i>NF1</i>	<i>Nörofibromin</i>	Eksensefali	p21 ras'ın negatif düzenleyicisi
<i>NF1,PAX3</i>	<i>NF1/PAX3</i> çift mutant	Eksensefali ± Sb	Nf1; transkripsiyon faktörü
<i>NOTCH3</i>	<i>Notch3</i> over-expression	Eksensefali	Delta ailesi ligandları için hücre yüzeyi reseptörü
<i>NUMB</i>	<i>Numb</i>	Eksensefali	Asimetrik hücre bölünmesine katılan protein
<i>NUP50</i>	<i>Nükleoporin</i>	Eksensefali	p27 Kip1'e bağlanan nüklear pore proteini
<i>PAX3</i>	<i>Spotch</i> (<i>Sp,Sp^{2H}</i> mutant ; <i>PAX3-CRE</i> suşu	Eksensefali + Sb	Transkripsiyon faktörü
<i>PAX3; PAX7</i>	<i>PAX3/PAX7</i> çift mutanı	Eksensefali + Sb	Transkripsiyon faktörleri
<i>RBP-J K</i>	<i>RBP-J κ</i>	Eksensefali	Notch etkileşimli transkripsiyon faktörü

2.4.4. Hücre Ölümü

Nöral tüpün kapanma yetersizliği aşırı hücre ölümünden kaynaklanabilir. Artan apoptoz, NTD geliştiren gen hedefli embriyo çalışmalarında gözlemlenen en sık hücresel değişikliklerden biridir. Tüm hücresel anormalliklerde olduğu gibi, sonradan ortaya çıkabilen anormalliklerde de, başarısız morfogenezin ikincil bir sonucu olabileceğinden, artan apoptozun başarısız nöral tüp kapanmasındaki önceliğini göstermek oldukça önemlidir. Nöral tüp kapanması öncesinde veya sırasında aşırı hücre ölümüneneden olan genetik kusurlar tabloda listelenmektedir (Copp ve Greene, 2010).

Tablo 2.4: Nöroepitelyal hücre ölümü derecesinde meydana gelen değişikliklerle NTD'lere neden olan fare genleri (Copp ve Greene, 2010)

Gen Sembolleri	NTD Oluşturan Genler	NTD Türü	Protein Fonksiyonu
<i>AP2A</i>	<i>AP2a</i> (<i>Tcfap2a</i> olarak da bilinir)	Eksensefali	Transkripsiyon faktörü
<i>APAF1</i>	<i>APAF1</i> ve ön beyin aşırı büyümesi (fog) mutasyonu	Eksensefali	Kaspaz bağımlı apoptoz yolunda proteaz aktive edici faktör
<i>BCL10</i>	<i>BCL10</i>	Eksensefali	IKK'leri ve NF-KB'yi aktive eden, CARD içeren anti-apoptotik protein
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA1</i>	Eksensefali + Sb	Transkripsiyon faktörü
<i>BRCA1; GADD45</i>	<i>BRCA1/GADD45</i> çift mutant	Eksensefali	Transkripsiyon faktörleri
<i>CASP3</i>	<i>Caspaz 3</i>	Eksensefali	Apoptoz yolunun enzimi
<i>CASP9</i>	<i>Caspaz 9</i>	Eksensefali	Apoptoz yolunun enzimi
<i>CHUK, IKKB</i>	<i>IKK1/IKK2</i> çift mutan	Eksensefali	Anti-apoptotik yolda NF-KB'yi aktive eden kinazlar
<i>MEKK4</i>	<i>MEKK4; MEKK4</i> 'ün kinaz inaktif mutan	Eksensefali ± Sb	JNK/p38'i fosforile eden MAP kinaz enzimi
<i>TCOF1</i>	<i>Treacle</i>	Eksensefali	Nükleolar fosfoprotein
<i>TRX2</i>	<i>TRX2</i> (Tiyoredoksin)	Eksensefali	Mitokondriyal redoks proteini

2.4.5. Gen-Protein Düzenleyici Fonksiyonlar

Nöral tüpün kapanması için birkaç protein grubunun gerekli olduğu bulunmuştur. Bu proteinler downstream anahtar sinyal yollarının modüle edilmesinden sorumlu olan transkripsiyonel koaktivasyon ve kromatin yeniden şekillenmesi için gerekli proteinler, transkripsiyon düzenleme proteinleri ve protein fonksiyonunun düzenlenmesinde gerekli (örneğin, birkaç hücrel veya sinyal fonksiyonuna katılabilen ubiquitin aracılı protein bozunma kompleksleri) olan proteinlerdir (Copp ve Greene, 2010).

NTD'lere yol açan diğer bir gen grubu da *HECTD1* (Hect Domain-Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1), *MIB2* (Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase 2) ve *SMURF1/2* (Smad-Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1) dahil olmak üzere ubiquitin ligazları kodlayan genlerdir. Bu proteinler, proteazomda parçalanma için proteinleri her yerde toplamak ve hedeflemek için çoklu enzim komplekslerinin bir parçası olarak işlev görür. Bu tür hedeflenmiş proteinler, transkripsiyonel düzenleme yolundaki aktiviteyi kontrol etmek için alternatif bir araç sağlayan düzenlenmiş protein bozunması ile nöral

tüpün kapanması için gerekli olan yollardan herhangi birine katılabilir (Zohn ve ark., 2007; Narimatsu ve ark., 2009)

Tablo 2.5: Transkripsiyonel düzenleme ve kromatin dinamiklerini içeren mekanizmalar yoluyla NTD'lere neden olan fare genleri (Copp ve Greene, 2010)

Gen Sembolleri	NTD Oluşturan Genler	NTD Türü	Protein Fonksiyonu
<i>ADNP</i>	<i>ADNP</i>	Eksensefali	Vazoaktif bağırsak peptidi (VIP) tarafından düzenlenen aktiviteye bağlı nöroprotektif protein (ADNP)
<i>CART1</i>	<i>CART1</i> (kıkırdak homeoprotein 1)	Eksensefali	Transkripsiyon faktörü
<i>CECR2</i>	<i>CECR2</i>	Eksensefali	SNF2L ile kromatin modelleme kompleksi oluşturan transkripsiyon faktörü
<i>CITED2</i>	<i>CITED2</i>	Eksensefali	Transkripsiyonel koaktivatör
<i>CREBBP</i>	<i>CBP</i>	Eksensefali	Transkripsiyonel koaktivatör
<i>EP300</i>	<i>P300</i>	Eksensefali	Transkripsiyon integratörü
<i>GCN5</i>	<i>GCN5</i>	Eksensefali	Histon asetiltransferaz
<i>HIPK1, HIPK2</i>	<i>HIPK1/HIPK2</i> çift mutanıt	Eksensefali	AML1 ve p300 ile kompleks oluşturan homeodomain-etkileşimli protein kinazlar
<i>NAP1L2</i>	Nükleozom topluluğu protein-1 benzeri 2 (<i>NAP1L2</i>)	Eksensefali + Sb	Nükleozom topluluğu
<i>RYBP</i>	<i>Ring1</i> ve <i>YY1</i> bağlayıcı protein	Eksensefali	Polycomb kompleks proteini; YY1 için bağlayıcı, ayrıca NTD'lerin bir nedeni
<i>SMARCA4</i>	<i>BRG1</i>	Eksensefali	Kromatin remodeling proteini
<i>SMARCC1</i>	<i>SRG3</i>	Eksensefali	Kromatin yeniden şekillenmesinde yer alan SWI/SNF kompleksinin alt birimi
<i>SUZ12</i>	<i>SUZ12</i>	Sb	Polycomb protein
<i>XNP</i>	<i>ATRX</i>	Eksensefali	SWI/SNF kromatin yeniden modelleme ailesinin üyesi

2.4.6. Spesifik Sinyal Yolları

Nöral tüpün kapatılması için gerekli olan sinyal yolları PCP sinyali (kapanmanın başlatılması), sonic hedgehog sinyali (aşırı aktivasyonunda muhtemel DLHP oluşumunun önlenmesi ile NTD'ye yol açar), BMP sinyali (DLHP'leri önlemek), Notch sinyali (nörogenezin düzenlenmesi), retinoid sinyali (bilinmeyen hücrel mekanizmalar yolunda), inositol mekanizması (protein kinaz C yoluyla protein fosforilasyonu)'dır.

Sonic Hedgehog Sinyali

Drosophila Hedgehog'unun üç memeli homologundan biri olan sonik hedgehog (*Shh*), transmembran reseptörü Patched1'e (*Ptc1*) bağlanarak hücre içi bir sinyal yolu başlatır.

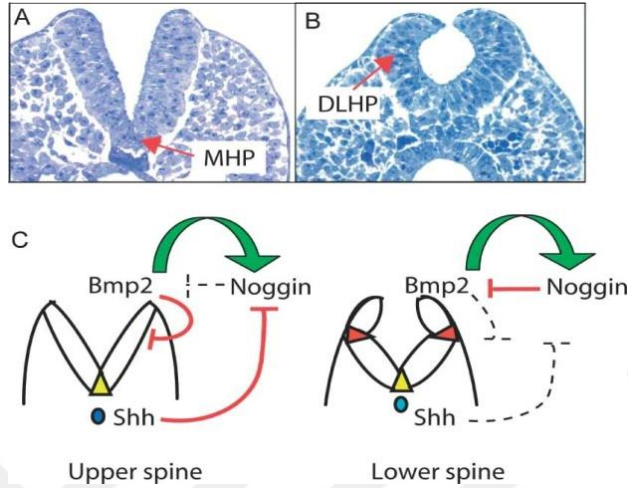
Shh ligandının yokluğunda, Ptc1, aktivitesini inhibe etmek için ilişkili bir zar proteini olan pürüzsüzleştirilmiş (Smoothened, Smo) ile etkileşime girer. Ptc1'e Shh bağlanması, Smo üzerindeki engelleyici etkiyi ortadan kaldırarak, Gli protein ailesi üyelerinin çekirdeğe girmesine ve transkripsiyonel aktivatörler olarak hareket etmesine izin verir. Bu çekirdek sinyal iletim mekanizmasına ek olarak, Shh yolu üzerinde ya pozitif ya da negatif etkiler uygulayan çeşitli başka proteinlerde meydana gelen değişiklikler tanımlanmıştır. *FKBP8* (FK506-bağlayıcı protein 8), *Gli3*, *Rab23* (RAS ilişkili protein 23) ve *Tulp3* (TUB benzeri protein 3) dahil olmak üzere diğer Shh inhibitör genlerinin fonksiyon kaybı da NTD'ler üretir. Buna karşılık, Smo ve Shh'nin kendisi de dahil olmak üzere, sinyalleme aktif eden proteinlerin fonksiyon kaybı, NTD'ler oluşturmazken, aşırı ekspresyonu nöral tüpün kapanmasını tehlikeye atabilir (Chiang ve ark., 1996; Zhang ve ark., 2001).

Tablo 2.6: Sonic hedgehog sinyal yolunun düzensizliğiyle NTD'lere neden olan fare genleri (Copp ve Greene, 2010)

Gen Sembolleri	NTD Oluşturan Genler	NTD Türü	Protein Fonksiyonu
<i>FKBP8</i>	<i>FK506-bağlayıcı protein 8 (FKBP38 olarak da bilinir)</i>	Sb	Shh sinyalinin negatif düzenleyicisi
<i>GLI2 (P1-4)</i>	<i>Gli2 (PKA fosforilasyon bölgeleri mutasyona uğramış)</i>	Eksensefali	Shh sinyal iletim proteini
<i>LUZP</i>	<i>LUZP</i>	Eksensefali	Beyinde ifade edilen lösin fermuar transkripsiyon faktörü Shh sinyalinin olası negatif düzenleyicisi
<i>PRKACA</i> <i>PRKACB</i>	Protein kinaz α alt birimleri <i>Ca/Cβ1</i> çift mutant	Eksensefali	Protein kinaz A Shh sinyalinin negatif düzenleyicisi
<i>PTCH1</i>	<i>Patched1</i>	• Eksensefali veya kranioraksizis	Sonik kirpi peptidi için transmembran reseptörü Shh sinyalinin negatif düzenleyicisi
<i>RAB23</i>	<i>Açık beyin (opb)</i>	Eksensefali + Sb	Rab vezikül taşıma proteinleri ailesi; Shh sinyalinin negatif düzenleyicisi
<i>SHH</i>	<i>Sonic hedgehog</i> (aşırı ifade)	Eksensefali	Sinir sistemi dorso-ventral paternini düzenleyen sinyal peptidi
<i>SUFU</i>	<i>Suppressor of fused (kaynaşmış baskılayıcı)</i>	Eksensefali	Shh sinyal iletim inhibitörü
<i>TULP3</i>	<i>Tubby benzeri protein 3; hitchhiker (ENU mutanti)</i>	Eksensefali + Sb	Shh sinyalinin negatif düzenleyicisi

Bu bulgular, Shh sinyalinin nöral tüp kapanması üzerindeki genel olumsuz etkisini tartışmaktadır. Shh'nin işlevi, dorsal nöroepitelyumdan anti-BMP sinyalini inhibe etmektir. Bu nedenle, Shh sinyallemedeki herhangi bir patolojik artışın, sonuç olarak spina bifida ile birlikte DLHP oluşumunu engellemesi beklenir. Öte yandan, Shh

sinyalinin kaybı, tüm vücut eksenini boyunca nöral tüpün kapanmasını sağlayarak DLHP'lerin erken oluşmasına izin verir (Ybot-Gonzalez ve ark., 2007).



Şekil 2.4: Fare nöral tüp kapanmasında dorsolateral bükülmenin moleküler düzenlenmesi. Fare embriyosunun (A) yüksek spinal bölgelerinden (B) düşük spinal bölgelerine morfolojide nöral tüp kapanma değişiklikleri (Ybot-Gonzalez ve ark., 2007).

2.4.7. Retinoid Sinyali ve İnositol Metabolizması

Retinoik asitin (RA) uzun yıllardır kemirgen sistemlerinde güçlü bir teratojen olarak işlev gördüğü bilinmektedir ve en sık gözlenen malformasyonları arasında NTD'ler bulunmaktadır. Retinoidlerin erken gelişimde endojen senteziyle ayrılmaz bir parça oluşturduğu ve retinoid üretimi ile devri arasındaki dengede herhangi bir bozukluğun, nöral tüpün kapanması dahil olmak üzere gelişim olaylarını olumsuz etkileyebileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle, RA sentezinin başlıca enzimi olan Retinoikasit metabolize eden enzim (RALDH2), anahtar bir RA metabolize edici enzim olan Sitokrom P450 26A1 (CYP26A1) ve RA sinyalinin aracılık ettiği RA reseptörleri α ve γ 'yı kodlayan genlerin işlev kaybıyla birlikte farelerde NTD'ler, bildirilmiştir (Lohnes ve ark., 1994; Niederreither ve ark., 1999). RA reseptörlerinin down stream sinyal yollarının varlığı iyi bilinmesine rağmen, RA sinyalinin hücresel düzeyde nöral tüp kapanmasına nasıl katıldığı tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir.

Bir seri çalışmada, inositolün kıvrıkcık kuyruklu mutant fare modelinde spinal NTD'lerin büyük bir bölümünü önleyebildiği, buna karşın folik asidin etkisiz olduğu gösterilmiştir (Greene ve Copp, 1997; Cogram ve ark., 2004). Bu durum, NTD'yi önlemek için folik asit tedavisine ek olarak inositol takviyesi kullanılabileceğini düşündürmektedir. Embriyonik gelişim sırasındaki inositol eksikliği hem sıçanlarda hem de farelerde kranial NTD'lere neden olabilir. Ayrıca, farelerin *ITPK1* (Inositol 1,3,4-Trisphosphate 5/6-Kinase), *PIP5KI γ* (Fosfatidilinositol-4-fosfat-5-kinaz I γ) ve *INPP5E* (inositol polyphosphate-5-phosphatase E) genlerindeki hedeflenen mutasyonları, inositol metabolizmasının doğrudan bozulması nedeniyle NTD'leri oluşturmaktadır (Wang ve ark., 2007; Jacoby ve ark., 2009).

PIP5KI γ mutasyonunda ise öngörülen etki, eksojen inositol tarafından NTD'lerin önlenmesi için bilinen bir gereklilik olan protein kinaz C (PKC) stimülasyonunda bir düşüşün olmasıdır (Cogram ve ark., 2004). Bu nedenle, inositol metabolizmasının, bu tür fosforilasyonlarda hedefleri tam olarak bilinmemekle birlikte, PKC'nin aracılık ettiği temel protein fosforilasyon olaylarının akışında inositolün yer alabileceği öngörülmektedir.

2.5. Nöral Tüp Defeklerinin İnsan ve Fare Genleri İlişkisi

Hem fare hem de insan NTD'lerinde PCP gen mutasyonları bulunmasına rağmen, insanlarda ve farelerde oluşan fenotipler her zaman aynı değildir. Örneğin, *VANGL2* varyantlarının heterozigot genotipleri insanda anensefali, holoprozensefali ve kapalı spina bifidayı oluştururken (Lei ve ark., 2010; Kibar ve ark., 2011), fare *VANGL2* mutantları, diğer gen mutasyonları ile birlikte homozigotlarda kraniorakşizis ve bileşik heterozigotlarda açık spina bifidayı oluşturur (Greene ve ark., 2009). Sadece iki PCP geni, *CELSR1* (Cadherin EGF Lag Seven-Pass G-Type Receptor 1) ve *SCRIB* (Scribble Planar Cell Polarity Protein), hem farelerde hem de insanlarda aynı NTD fenotipi olan kraniorakşizis ile ilişkilendirilmiştir, kraniorakşizis insanlarda *VANGL2* mutasyonları ile tanımlanmamıştır (Doudney ve ark., 2005).

Tablo 2.7: NTD olgularında tanımlanan zararlı varyantların listesi (Beaumont ve ark., 2019)

Olgu	NTD tipi	Aile Öyküsü	Gen	Kromozomal Pozisyon	cDNA Değişimi	Protein Değişimi
1	Spina bifida aperta	Anensefali	<i>CELSR1</i>	Chr22(GRCh37):g.46931170T > C	NM_014246.1(CELSR1):c.1898A > G	p.(His633Arg)
2	Myelomeningosel	Spina okulta	<i>CELSR1</i>	Chr22(GRCh37):g.46835126G > A	NM_014246.1(CELSR1):c.4366C > T	p.(Arg1456Trp)
3	Meningomyeloseli olan fetus Arnold Chiari	--	<i>CELSR1</i>	Chr22(GRCh37):g.46762881G > A	NM_014246.1(CELSR1):c.8205+9C > T	p.?
4	Spina bifida aperta	--	<i>CELSR1</i>	Chr22(GRCh37):g.46930459G > A	NM_014246.1(CELSR1):c.2609C > T	p.(Pro870Leu)
			<i>FREM2</i>	Chr13(GRCh37):g.39265966C > G	NM_207361.5(FREM2):c.4485C > G	p.(Ile1495Met)
5	Ensefelosel	--	<i>PTK7</i>	Chr6(GRCh37):g.43126589A > T	NM_001270398.1(PTK7):c.2780A > T	p.(Glu927Val)
6	Spina aperta meningomyelosel kraniostenoz	--	<i>FZD6</i>	Chr8(GRCh37):g.104340629G > A	NM_001164615.1(FZD6):c.1526G > A	p.(Arg509Gln)
7	2meningomyelosel yarık dudak olgusu	Yarık dudak/damak	<i>PRICKLE 1</i>	Chr12(GRCh37):g.42858614A > G	NM_001144881.1(PRICKLE1):c.1222T > C	p.(Trp408Arg)
8	Meningomyelosel hidrocefali Arnold Chiari	Yarık dudak/damak	<i>GRHL3</i>	Chr1(GRCh37):g.24669505G > A	NM_198174.2(GRHL3):c.1409G > A	p.(Arg470His)
9	Myelomeningoceale Arnold Chiari	--	<i>PAX3</i>	Chr2(GRCh37):g.223084996A > G	NM_181459.3(PAX3):c.1036T > C	p.(Ser346Pro)
10	Meningomyelosel	4 kardeşle spina bifida	<i>T</i>	Chr6(GRCh37):g.166571889_166571890ins14	NM_003181.3(T):c.1221_1222ins14	p.(Thr408Alafs*22)
11	Spina bifida aperta	--	<i>GLDC</i>	Chr9(GRCh37):g.6540098G > C	NM_000170.2(GLDC):c.2618C > G	p.(Ser873Cys)
12	Myelolipoma	Lomber sakralizasyon	<i>FREM2</i>	Chr13(GRCh37):g.39343798C > A	NM_207361.5(FREM2):c.5494C > A	p.(Gln1832Lys)
13	Spina bifidalı fetus	--	<i>FREM2</i>	Chr13(GRCh37):g.39266039C > T	NM_207361.5(FREM2):c.4558C > T	p.(Arg1520Trp)
14	Spina bifida + ArnoldChiari 2 fetus	--	<i>APAF1</i>	Chr12(GRCh37):g.99065314del	NM_181861.1(APAF1):c.1610del	p.(Asp537Valfs*14)
15	Spina bifidalı fetus	--	<i>DISP1</i>	Chr1(GRCh37):g.223178035C > T	NM_032890.4(DISP1):c.3296C > T	p.(Pro1099Glu)
16	Spina bifida aperta	--	<i>PTK7</i>	Chr6(GRCh37):g.43100281C > T	NM_001270398.1(PTK7):c.1108C > T	p.(Arg370Trp)
			<i>SCRIB</i>	Chr8(GRCh37):g.144887542C > T	NM_182706.4(SCRIB):c.2410G > A	p.(Gly804Ser)
17	Anensefali-eksensefalili fetus	--	<i>VANGL1</i>	Chr1(GRCh37):g.116206325C > T	NM_001172412.1(VANGL1):c.248C > T	p.(Ser83Leu)
			<i>PTCH1</i>	Chr9(GRCh37):g.98211565G > T	NM_000264.4(PTCH1):c.3590C > A	p.(Ser1197Tyr)

NTD'nin poligenik nedensellik modeline dayanarak, mevcut genetik bulguların eksik olduğu ve keşfedilmeyi bekleyen ek sorumlu genetik varyantların bulunduğu düşünülür. Predispozan varyantların kesin kombinasyonu, bir kişinin anensefali, spina bifida veya kraniorakşizis geliştirip geliştirmedeğini belirleyebilir (Copp ve ark., 2013).

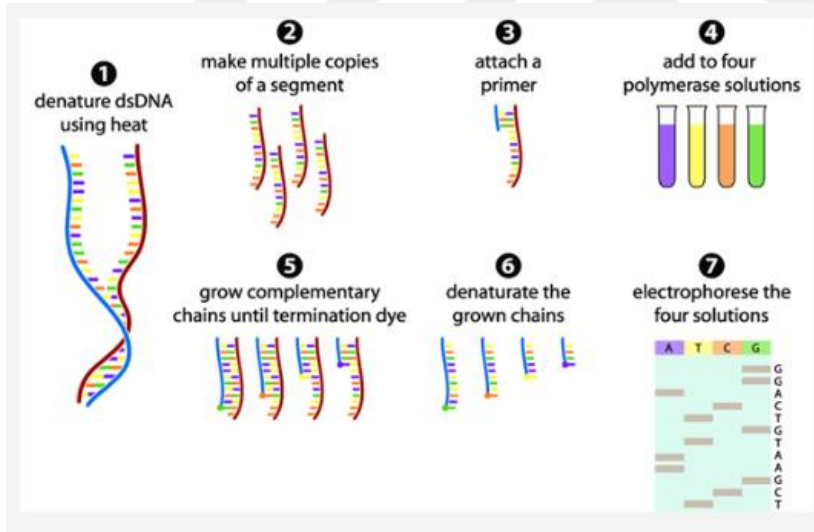
İnsanlarda potansiyel NTD ile ilişkilendirilen en güçlü aday, Latin kökenli olmayan popülasyonlardaki MTHFR C677T (rs1801133) polimorfizmidir (Amorim ve ark., 2007). Zhang ve ark.'nın vaka kontrol çalışmaları C677T ve NTD'ler arasındaki anlamlı ilişkiyi desteklemektedir. En çok çalışılan ikinci MTHFR varyantı, NTD riskinde önemli bir artış ile ilişkilendirilmeyen A1298C'dir (Zhang ve ark., 2013). Blom ve ark. tarafından yapılan başka bir meta-analiz çalışması, annelerde riskin arttığı ve C677T varyantı için homozigot olan NTD bebekleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Blom ve ark., 2006). MTHFR'nin, folat tek karbon metabolizmasındaki rolü açık olarak NTD mekanizması ile yakından ilişkili olduğundan, en çok çalışılan insan spina bifida genidir (Mohd-Zin ve ark., 2017).

2.6. Nöral Tüp Defektlerinin Tanısında Kullanılan DNA Dizileme Yöntemleri

2.6.1. Sanger Dizileme

Frederick Sanger tarafından 1975 yılında geliştirilmiştir. Günümüzde genetik tanı laboratuvarlarında sık kullanılan DNA dizileme yöntemidir. Hata payı çok düşük bir teknolojidir ve dizi belirleme için "altın standart" olarak kabul edilir. Enzimatik DNA sentezine dayanan sanger DNA dizi analizi yönteminde, dizisi saptanacak olan DNA zinciri, yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır ve sentez reaksiyonu, DNA Pol-1 ile kataliz edilir. Yöntemde, kimyasal değişikliğe uğratılmış modifiye dideoksinükleotit trifosfatlar kullanılarak sentezlenecek bölgenin baz uzunluğu kadar sayıda ve farklı uzunluklarda dizi fragmanları elde edilme esasına dayanır. Dideoksi nükleotit trifosfatlar'da (ddNTP) 3'OH grubu bulunmadığı için nükleotid ilavesi yapılmaz ve zincir sentezi durur. Zincir sonlanması için farklı floresans işaretli 4 farklı ddNTP'ye ilaveten reaksiyon tüplerinde kalıp DNA zinciri, primer ve nükleozid trifosfatlar (dNTP) bulunur. Sanger'in zincir sonlandırma tekniği esas alınarak otomatik

DNA dizi cihazları geliştirilmiştir. Eski tekniklerde radyoaktif işaretler kullanılarak etiketleme yapılırken, yeni tekniklerde ise her bir ddNTP için farklı floresan işaretler kullanılmaktadır. Her bir dideoksi nükleotidin farklı renklerle gösterilmesi işlemi, beraberinde dizileme çalışmalarının tek bir tüpte yürütülebilmesine de olanak sağlamıştır. Elde edilen diziler, otomatik cihaz tarafından jelde yürütülerek, floresan dedektör önünden geçirilme aşamasında bilgisayar programında gözle görülebilir pikler halinde görüntülenir. Bu otomatik dizi analizi cihazları hem normal hem de mutant gen dizilerinin analizlerini yapabildiğinden, genetik temeli olan hastalıklardaki yeni mutasyonların tespit edilmesine olanak sağladığı gibi, farklı canlı türlerine ait genom dizilerinin tespit edilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Lüleyap, 2008). Bu yöntem yerini Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing – NGS) tabanlı yaklaşımlara verirken; klinik laboratuvarlarda, tek gen bozukluklarının teşhisi, NGS tarafından tanımlanan dizi varyantlarını doğrulamak için kullanılan bir yöntem olarak önemli bir rol oynamaktadır (Sanger ve ark., 1977).



Şekil 2.5: Sanger dizileme yöntemi (İnt. Kay. 2)

2.6.2. Yeni Nesil Dizileme

Sanger dizilemede çalışılacak gen hakkında önceden bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Genlerin büyüklüğü ve benzer bulgulara yol açan birden fazla genin varlığı tanıyı zorlaştırmakta, maliyeti ve süreyi arttırmaktadır. Bu yüzden, genetik hastalıkların etiyolojisinin araştırılmasında, birden fazla genin hatta genomun tüm

genlerinin, birden fazla örnekte eş zamanlı tek bir test ile araştırılabilmesini sağlayan yeni nesil dizileme teknolojileri 2004 yılında devrimsel bir aşama sağlamıştır. Bu platformların çoğu, sentez yoluyla dizilemeye dayanır ve klonal olarak kümelenmiş ampliconlarının oluşturulması, emülsiyon PCR veya köprü PCR yoluyla sağlanır. NGS teknolojisi, insan genom projesinden elde edilen verilere eşdeğer, hem niteliksel hem de niceliksel dizi verilerini 10-20 gün içinde yüksek hız ve verim ile sağlar. Nadir hastalıklarda nedensel gen varyantını tanımlamak için NGS'nin uygulandığı birkaç farklı yol kullanılmaktadır. NGS sistemlerinde tam genom dizileme (WGS), tüm ekzom dizileme (WES), transkriptom dizileme, metilom ve diğer dizileme yaklaşımları uygulanmaktadır (Rabbani ve ark., 2012).

2.6.3. Tüm Ekzom Dizileme

Ekson bölgeleri insan genomunun %1,5'ini temsil etmesine rağmen bilinen patojenik varyantların büyük çoğunluğunu içermektedir. Tüm Ekzom Dizileme, hastalık-gen ilişkilerini araştırmak amacıyla genomun sadece kodlanan bölgelerinin seçici olarak sekanslanması prensibine dayalı bir yöntemdir (Ng ve ark., 2009). TED, yeni nesil dizileme yöntemlerinin en çok çalışılan türlerinden birisidir ve bu yöntemle konjenital genetik hastalıkların %30'u tanı alabilmektedir. (Tarailo-Graovac ve ark., 2016). Çalışmalar, hastalığa neden olan genlerde bilinen ve yeni mutasyonları tespit etmek için tüm ekzom dizilemenin hem klinik hem de araştırma amaçlı faydasını göstermiştir (Worthey ve ark., 2011; Wangler ve ark., 2014). Genomik çalışmaların özellikle lokus heterojenliği veya beklenmedik fenotipik varyasyonu olan durumlar için başarılı olduğu kanıtlanmıştır (Posey ve ark., 2016). TED ayrıca yeni tanımlanan hastalık genlerindeki patolojik varyantların tanımlanmasına ve mevcut genomik verilerin gelecekte yeniden analizine olanak tanır (Bainbridge ve ark., 2013; Yang ve ark., 2014).

Ekzom dizileme, tüm ekzonları yakalamak için prob-hibridizasyon yöntemi kullanılarak sentez yoluyla dizileme prensibine dayanmaktadır (Hodges ve ark., 2007; Gnirke ve ark., 2009). TED süreci, kütüphane oluşturma, hibridizasyon ve dizileme olmak üzere üç ana adımdan oluşmaktadır. Dizileme sonrası biyoinformatik analiz işlemi ile sonuçlandırılmaktadır (Rabbani ve ark., 2012).

2.7. Nöral Tüp Defektlerinde Tanı ve Genetik Danışmanlık

NTD'lerinden tanı tarama, alfa-fetoprotein (AFP) için anne kanının biyokimyasal testine veya geleneksel 2 boyutlu (2D) ultrason kullanımına dayanır (Salih ve ark., 2014). Fetal yolk kesesi ve karaciğerin bir glikoproteini olan AFP'nin fetal serum konsantrasyonları, amniyotik sıvının 150 ila 200 katıdır (Habib, 1977). AFP, fetüste toplam serum globulinlerinin %90'ını temsil eder, açık kusurlu nöral tüp ile amniyotik sıvıya ve dolayısıyla anne kanına sızar (Brock ve ark., 1975). Kapalı NTD'ler (lezyonların yaklaşık %10'u) AFP'yi artırmaz. Tersine, yükselmiş serum AFP, fetal ölüm, birleşik ikizler, Turner sendromu, omfalosel, gastroşizis, kloak ekstrofisi ve konjenital nefroz gibi diğer anormallikler ile ilişkili olabilir. Amniyotik sıvıda asetilkolinesteraz seviyesinin eş zamanlı tahlili, teşhis doğruluğuna daha fazla katkıda bulunacaktır (Lennon ve Gray, 1999). Geleneksel 2D ultrason, NTD'ler için bir tarama aracı olarak maternal AFP'nin yerini büyük ölçüde almıştır (Boyd ve ark., 2008).

Doğum öncesi tanının rutin olarak mevcut olmadığı ve/veya terapötik kürtajın bir seçenek olmadığı durumlarda, NTD'li birçok bebek doğar. Açık spina bifida ile doğan bebekler için doğum sonrası tıbbi bakım genellikle lezyonu kapatmak için cerrahi müdahaleleri içerir. Omuriliğin bağlanması hafifletmek, hidrosefaliyi tedavi etmek ve/veya ortopedik ve ürolojik sorunları ele almak için genellikle birden fazla ameliyat gerekir (Greene ve Copp, 2014).

Açık NTD'ler hamilelik sırasında erken ortaya çıktığından, sinir dokusunun amniyotik sıvı ortamına maruz kalması nedeniyle ikincil nörolojik hasarın meydana gelebileceği uzun bir süre vardır. Bu düşünceler, fetal ve maternal risklere rağmen, doğum sonrası onarımla karşılaştırıldığında nörolojik sonuçları iyileştirebilen, spina bifida için utero fetal cerrahinin geliştirilmesine ivme kazandırmıştır (Adzick ve ark., 2011). Spina bifida'nın deneysel modelleri, nöral hasarı düzeltmeye yönelik ek tedavi ile olası cerrahi müdahale kombinasyonunu araştırmak için kullanılmaktadır. Çalışmalar, nöral rejenerasyonu teşvik etmek için biyolojik olarak parçalanabilen yapı iskelelerinin

implantasyonu ve/veya hasarlı omuriliği doldurmak için nöral kök hücrelerinin kullanılması üzerine yoğunlaşmıştır (Saadai ve ark., 2011).

Genetik danışma, aileye NTD'lerin nedenlerinin, prognozunun, tekrarlama risklerinin, perikonsepsiyonel folik asit desteği gibi koruyucu tedavi ve prenatal tanı olanaklarının anlatılması biçiminde danışma ve takip sistemi uygulanır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Belirlenmesi

Çalışma grubumuz Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalına nörol tüp defekti (NTD) tanısı ile 2014-2020 yılları arasında başvuran vakalara ait dosyaların retrospektif değerlendirilmesi ile oluşturuldu. Hasta dosyalarında bulunan anamnez bilgilerinde veya hastane bilgi sistemi taramalarında intrauterin dönemde, nöral tüp defekti saptanan ve daha sonra düzenli olarak polikliniğimizde takip edilen yaşları 4-24 arasında olan 9 vaka çalışmaya dahil edildi.

3.2. Etik Kurul Onayı

Vakaların ebeveynlerine, rutin takip sırasında çalışmaya ilişkin bilgi verilerek katılmaya gönüllü olanlara 2021/314 nolu Tıbbi Etik Kurulunun onayından geçen gönüllü onam formu (Ek 1) imzalatıldı. Çalışmamızda değerlendirilmek üzere her hasta için hasta bilgi formu (Ek 2) dolduruldu. Rutin tetkikler için yapılan girişim sırasında EDTA'lı tüpe 2 mL periferik kan alındı.

Bu çalışmada nadir varyantların ve hastalığa neden olan mutasyonların saptanması amacıyla tüm kodlayan bölgelerin etkin biçimde dizilenmesine olanak tanıyan tüm ekzom dizileme (Whole Exome Sequencing, WES) yöntemi kullanıldı. NTD'nin multifaktöryel doğası göz önünde bulundurularak her bir vakaya ilişkin elde edilen varyant verileri, ayrıntılı fizik muayene bulguları, laboratuvar ve görüntüleme sonuçları ile anamnez bilgileri bütüncül olarak değerlendirildi.

3.3. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpe (2 mL) alınan periferik kan örneklerinden QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no: 51104) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı.

3.4. Genomik DNA Miktar ve Saflığının Ölçümü

Genomik DNA (gDNA) örneklerinin miktar (ng/μl) ile saflığı 260 ve 280 nm dalga boyunda Nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü. A260/280 oranı 1,80-1,89 aralığında değerler ideal olarak kabul edildi. Hazırlanan DNA örnekleri -20°C’de saklandı.

3.5. Tüm Ekzom Dizileme

Olgulara ait periferik kan örneklerinden DNA izolasyonunu takiben, özgün olarak tasarlanan primerler ile PCR işlemi yapıldı. Üreticinin önerdiği, otomatize yığın (cluster) oluşturma ve dizileme aşamaları gerçekleştirildi. Tüm ekzom dizileme (TED) çalışması için genomik DNA örneği rastgele fragmanlara ayrıldı. Boyutları 250-450 baz çifti arasında olan fragmanlar Library Preparation EF 2.0 with Enzymatic Fragmentation and Twist Universal Adapter System protokolü kullanılarak seçilen her zincirin 3’ ucuna bir baz eklendi. Elde edilen DNA fragmanlarının her iki ucuna adaptör ve barkodlar bağlanarak ligasyon aracılı PCR (Ligation-mediated polymerase chain reaction, LM-PCR) ile amplifiye edildi, ardından bağlanmayan oligonükleotidlerin uzaklaştırılması için saflaştırma yapıldı. Ardından hibridizasyon için Twist Target Enrichment Protocol ve Appendix Y protokolü kullanıldı. Hibridizasyon sonrasında Streptavidin muamelesi ve Post-capture için zenginleştirme işlemi yapıldı. Sonrasında hibridize olmayan fragmanlar yıkanarak temizlendi. Yakalanan ürünler sirkularizasyon aşaması ile yuvarlak bir zincir haline getirilerek aynı zincir üzerinde DNA nanotopları (DNB) oluşturmak ve MGI platformuna uygun hale getirilmek üzere Circulating Module protokolü kullanılarak amplifiye edildi. Son aşama olarak G400 manuali takip edilerek DNB yapımı ve yükleme gerçekleştirilerek dizileme işlemi yapıldı.

3.5.1. Enzimatik Parçalama ve Twist Evrensel Adaptör Sistemi ile Kütüphane Hazırlama

Tablo 3.1: Enzimatik parçalama ve kütüphane hazırlama basamakları

	Evrensel Adaptörler ve UDI Primerlerle Enzimatik Fragmentasyon (Genomik DNA, 50 ng başlangıç)	Süre
1. Basamak	DNA fragmentasyonu uygulaması, onarım sonlandırma ve dA-tailing (dA kuyruklu DNA fragmentleri)	1 saat
2. Basamak	Twist evrensel adaptörlerin bağlanması ve yıkama (İndekslemeye hazır gDNA kütüphaneleri)	1 saat
3. Basamak	Twist UDI primerlerini kullanarak PCR amplifikasyonu, yıkama ve QC uygulaması (Amplifiye edilmiş işaretli kütüphane)	1 saat

1.1. Termal döngüleyici aşağıdaki gibi programlandı.

Tablo 3.2: Termal döngüleyici programı

	Sıcaklık	Zaman
1. Basamak	4°C	Bekleme
2. Basamak	37°C	20 dakika
3. Basamak	65°C	30 dakika
4. Basamak	4°C	Bekleme

1.2. Genomik DNA (gDNA) numunelerinin konsantrasyonunu belirlemek için Qubit dsDNA Geniş Aralıklı Kantitasyon Testi kullanıldı. gDNA örnekleri 1,25 ng/μl'lik konsantrasyona seyreltilti.

1.3. Her seyreltilmiş gDNA örneğinden 40 μl gDNA PCR strip tüpe eklendi, santrifüj edildi ve buz üzerine kondu. Aşağıdaki tabloda verildiği şekilde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde enzimatik parçalanma karışımı hazırlandı.

Tablo 3.3: Enzimatik parçalanma karışımı için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktif	Reaksiyon başına hacim
Frag/AT tamponu	4 μL
Frag/AT enzimleri	6 μL
Toplam	10 μL

1.4. Her 40 µL gDNA numune tüpüne 10 µL enzimatik parçalanma karışımı eklendi, tüpler kapatıldı, santrifüj yapıldı ve hemen önceden soğutulmuş termal döngüleyiciye aktarıldı.

1.5. Termal döngüleyici programının 2 ila 4. adımları başlatıldı. Termal döngüleyici programı tamamlandığında numuneler bloktan çıkartılarak buz üzerine kondu.

2.1. dA kuyruklu DNA fragmentlerini içeren her numune tüpüne 5 µL Twist Universal Adaptörler eklendi. Pipetajla hafifçe karıştırılarak yıkandı ve buz üzerinde tutuldu. Her numuneye 20 µL Ligation Master Mix eklendi ve nazıkçe pipetajlanarak karıştırıldı. Termal döngüleyicide 20°C'de 15 dakika inkübe edilerek Ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi, ardından yıkama adımına geçildi.

2.2. Her ligasyon örneğine 60 µL homojenize (0.8x) DNA Saflaştırma Boncukları eklendi ve vortekslenerek iyice karıştırdı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Numuneler 1 dakika boyunca veya süpernatant berraklaşana kadar manyetik bir plaka üzerinde inkübe edildi. DNA Saflaştırma Boncukları, berrak bir süpernatant bırakarak bir pelet oluşturur. Tüpleri manyetik plakadan çıkarmadan süpernatant uzaklaştırıldı.

2.3. 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol eklenerek boncuk peleti yıkandı, ardından etanol uzaklaştırıldı. Numuneleri manyetik plaka üzerinde tutarken, toplam iki yıkama için yıkama işlemi tekrarlandı. Boncuk peletini bozmamaya dikkat ederek, kalan tüm etanol 10 µL'lik bir pipetle dikkatlice temizlendi. Boncuk pelet manyetik plaka üzerinde havayla kurutuldu.

2.4. Tüpler manyetik plakadan çıkartıldı ve her numuneye 17 µL dH₂O eklendi. Homojen hale gelene kadar pipetlenerek karıştırıldı. Tüpler manyetik bir plaka üzerine yerleştirildi ve boncuklar bir pelet oluşturana kadar bekletildi. Bağlı kütüphaneleri içeren 15 µL berrak süpernatant temiz, PCR şerit tüpe aktarıldı.

3.1. Aşağıdaki koşullara göre termal döngüleyici programlandı.

Tablo 3.4: Üçüncü adım termal döngüleyici programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Sayı Döngüleri
1. Başlangıç	98°C	45 saniye	1
2. Denatürasyon	98°C	15 saniye	
Bağlanma	60°C	30 saniye	6-8
Uzama	72°C	30 saniye	
3. Son uzama	72°C	1 dakika	1
4. Son bekleme	4°C	Bekleme	-

3.2. gDNA kütüphanelerinin her birine 10 µL Twist UDI Primer eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı. Ardından 25 µl Equinox Library Amp Mix (2x) eklendi ve pipetleme ile iyice karıştırıldı. Tüpler termal döngüleyiciye konularak program başlatıldı.

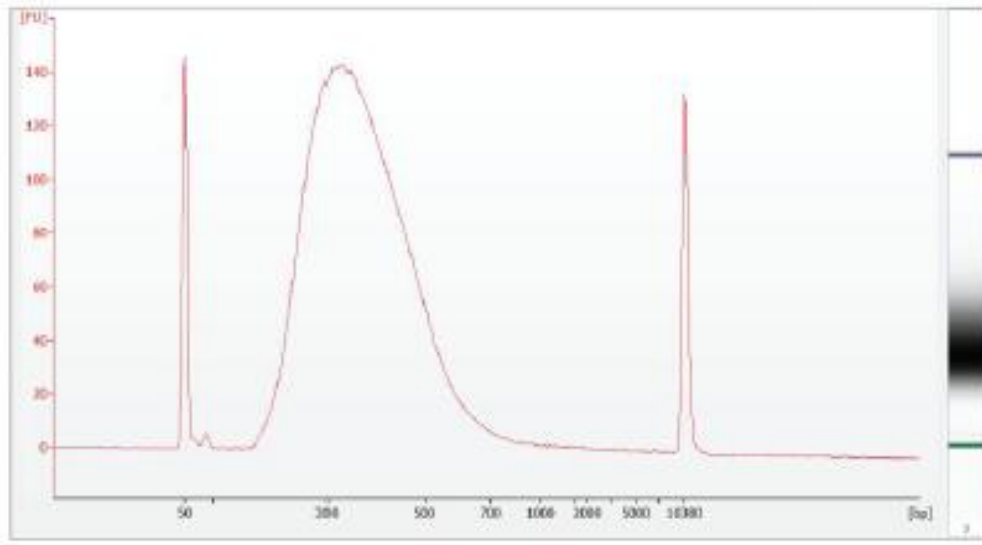
3.3. Termal döngüleyici programı tamamlandığında numuneler bloktan çıkartıldı, yıkamaya geçildi. Her ligasyon örneğine 50 µL (1x) homojenize DNA Saflaştırma Boncukları eklendi. Vortekslenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve örnekler manyetik bir plaka üzerine yerleştirildi, bir dakika beklendi.

3.4. DNA Saflaştırma Boncukları, berrak bir süpernatant bırakarak bir pelet oluşturdu. Plakayı veya tüpleri manyetik plakadan çıkartmadan süpernatant alındı ve atıldı. Boncuk peleti 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol eklenerek nazikçe yıkandı, 1 dakika inkübe edildi, ardından etanol çekilip atıldı. Örnekler manyetik plaka üzerinde tutulurken %80 etanolle yıkama bir kez daha tekrarlanır. Boncuk peletini bozmamaya dikkat ederek, kalan tüm etanol 10 µL'lik bir pipetle dikkatlice temizlendi. Boncuk pelet manyetik plaka üzerinde bırakılarak havayla kurutuldu.

3.5. Tüpler manyetik plakadan çıkartıldı ve her numuneye 22 µL dH₂O eklendi. Homojen hale gelene kadar pipetaj yapılarak karıştırıldı. Tüpler manyetik plaka üzerine yerleştirildi, 3 dakika veya boncuklar bir pelet oluşturana kadar bekletildi.

3.6. Amplifiye işaretli kütüphaneleri içeren 20 µL şeffaf süpernatant pellete dokunmamaya dikkat edilerek temiz 0,2 ml'lik PCR tüpüne veya 96 oyuklu bir termal döngü plakasının kuyusuna aktarıldı.

3.19. Thermo Fisher Scientific Qubit dsDNA Geniş Aralıklı Kantitasyon Testi ve Agilent DNA 7500 Testi kullanılarak her kütüphanenin boyut aralığı ölçüldü. Ortalama parça uzunluğu, 150-1.000 bp'lik bir aralık ayarı kullanılarak tipik olarak 350-425 bp arasında gözlemlendi.



Şekil 3.1: 37°C'de 20 dakikalık bir fragmentasyona 50 ng yüksek kaliteli gDNA girişi ve 6 döngü PCR ile oluşturulan saflaştırılmış bir kitaplığın temsili elektroferogramı.

3.5.2. Twist Hibridizasyon ve Hedef Zenginleştirme

DNA Saflaştırma Boncukları ve Alternatif Hibridizasyon Kurulumu ile Ön Yakalama ve Konsantrasyon Belirleme

1. Her amplifiye edilmiş kütüphane için gereken hacim µL cinsinden hesaplanır. Amplifiye edilmiş indekslenmiş kütüphanelerin toplam hacmi ≥ 25 µL ise, doğrudan bir sonraki adıma geçildi. Toplam hacmi < 25 µL ise, toplam hacmi 25 µL'ye getirmek için moleküler biyoloji sınıfı su eklendi.

2. Her amplifiye edilmiş kütüphaneden hesaplanan hacimler temiz bir 0,2 mL PCR Strip-tüpe aktarıldı. Kütüphanelere hacminin 1.5X'ine eşit bir hacimde homojenize DNA saflaştırma boncukları eklendi.

3. Örnekler manyetik plakaya yerleştirildi ve bir dakika bekletildi. DNA Saflaştırma Boncukları, berrak bir süpernatant bırakarak bir boncuk peleti oluşturduğunda süpernatant uzaklaştırıldı.

4. Boncuk peleti 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol ile yıkandı, bir dakika inkübe edildi, ardından etanol uzaklaştırıldı. Numuneyi manyetik plaka üzerinde tutarken bu yıkama toplam iki yıkama için bir kez tekrarlandı. Boncuk peletini bozmamaya dikkat ederek, kalan tüm etanol 10 µL'lik bir pipetle dikkatlice alındı ve atıldı.

5. Boncuk pelet manyetik plaka üzerinde havayla kurutuldu. Tüpler manyetik plakadan çıkartıldı ve her numuneye 20 µL Hibridizasyon Karışımı eklendi. Amplifiye edilmiş kütüphaneleri içeren homojenize boncuk örneği 0.2 ml PCR Strip-Tube'a dikkatlice aktarıldı.

Yakalama Problarının Kütüphanelerle Hibritleştirilmesi

1. Aşağıdaki koşullarla termal döngüleyici programlandı.

Tablo 3.5: Hibridizasyon reaksiyonu için termal döngüleyici koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
1	95°C	5 dakika	1
2	70°C	Bekleme	

7. Amplifiye işaretli kütüphaneleri içeren DNA saflaştırma boncuk solüsyonuna aşağıdaki tabloda açıklanan reaktifler eklendi. Baloncuk oluşturmamaya dikkat ederek, pipetajlan karıştırıldı. Tüm yakalama reaksiyonunun üstüne 30 µL Hibridizasyon Enhancer eklendi.

Tablo 3.6: Hibridizasyon reaksiyonu kurulumu için reaktifler ve hacimler

Reaktif	Hacim
Amplifiye işaretli kütüphaneler ile SPRI boncuk solüsyonu	20 µL
Bloker solüsyon (Human Cot-1 DNA; [1 µg/µL])	5 µL
Twist Universal blokerler	2 µL
Twist fixed	4 µL
Su	4 µL
Su (40 µL toplam hacme kadar)	0-5 µL
Toplam	40 µL

8. Hibridizasyon Reaksiyonu termal döngüleyiciye konuldu ve programı başlatıldı.
70°C TUTMA adımında 16 saat inkübe edildi.

9. Streptavidin Bağlama Boncukları adımında doğrudan Hibritleştirilmiş Hedefleri Bağlama adımına geçildi.

3.5.3. Twist Hedef Zenginleştirme Protokolü

Tablo 3.7: Hedef zenginleştirme iş akışı

	Hibridizasyon Hedef Zenginleştirme İş Akışı	Zaman
1. Basamak	Kütüphaneleri hibridizasyona hazırlama (işaretlenmiş kütüphane havuzu)	1 saat
2. Basamak	Havuzlarla yakalama problemlerini hibritleştirme (solüsyonda hibritleştirilmiş hedefler)	16 saat
3. Basamak	Hibritleştirilmiş hedefleri streptavidin boncuklarına bağlama (Boncuklar üzerinde yakalanan hedefler)	1.5 saat
4. Basamak	Yakalama sonrası PCR amplifiye edilir, saflaştırılır ve QC uygulanır. (Zenginleştirilmiş kitaplıklar)	1 saat
5. Basamak	Illumina platformunda dizileme (Illumina platformunda dizilemeye hazır kütüphaneler)	-

1.1. Hibridizasyon için gereken her kütüphanenin hacmini (µL olarak) hesaplamak için her amplifiye edilmiş, işaretli kütüphanenin konsantrasyonu kullanıldı:

- Aşağıdaki tablodan havuz başına indekslenen her kitaplığın miktarı belirlendi.
- Havuz başına indekslenen her kütüphanenin miktarı, kitaplık hazırlama QC'sinden ng/µl olarak ölçülen konsantrasyonlara bölündü.

Tablo 3.8: Hibridizasyon reaksiyonu için kullanılan hacimler

Havuz başına işaretli numune sayısı	Havuz başına her bir işaretli kütüphane miktarı	Havuz başına toplam küme
1	500 ng	500 ng
2	500 ng	1000 ng
3	500 ng	1500 ng
4	375 ng	1500 ng
8	187,5 ng	1500 ng

1.2. Gerçekleştirilen her hibridizasyon reaksiyonu için, amplifiye edilmiş işaretli her kütüphaneden hesaplanan hacimler reaksiyon tüpüne aktarıldı.

1.3. Düşük veya hiç ısı kullanmadan bir vakum yoğunlaştırıcı kullanarak dizinlenmiş kitaplık havuzları kurutuldu.

2.1. Hibridizasyon karışımı 65°C'de ısı bloğunda 10 dakika veya tüm çökelti eriyene kadar ısıtıldı, ardından 5 dakika boyunca tezgah üzerinde oda sıcaklığına getirildi.

2.2. Aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi temiz PCR şerit tüpte prob solüsyonu hazırlandı.

Tablo 3.9: Prob solüsyonunda kullanılan reaktifler ve hacimler

Reaktif	Hacim
Hibridizasyon Karışımı	20 µL
Twist Fix	4 µL
Su (toplam hacme kadar)	0-4 µL
Toplam	28 µL

2.3. Aşağıda açıklanan reaktifler kurutulmuş işaretli kütüphane havuzuna eklendi

Tablo 3.10: Kütüphane havuzuna eklenen reaktifler ve hacimler

Reaktif	Hacim
Kurutulmuş işaretli kütüphane havuzu	-
Bloker solüsyon	5 µL
Universal blokerler	7 µL
Total	12 µL

2.4. Prob çözeltisi, kapağı 105 °C'de olan bir termal döngüleyicide 2 dakika 95°C'de ısıtıldı, ardından hemen buz üzerinde 5 dakika soğutuldu.

2.5. Prob solüsyonu buz üzerinde soğurken, yeniden süspanse edilmiş işaretli kütüphane havuzunu içeren tüp, kapağı 105 °C'de bir termal döngüleyicide 5 dakika boyunca 95°C'de ısıtıldı, ardından hem prob solüsyonu hem de yeniden süspanse edilmiş indeksli kütüphane havuzu oda sıcaklığında 5 dakika boyunca tezgahta oda sıcaklığına getirildi.

2.6. Tüp hafifçe vurularak prob solüsyonu dikkatlice karıştırıldı, ardından 28 µL'nin tamamı yeniden süspanse edilmiş işaretli kütüphane havuzuna eklenerek vortekslendi.

2.8. Tüm yakalama reaksiyonunun üstüne 30 µl Hibridizasyon Enhancer eklendi ve spin yapıldı. Hibridizasyon reaksiyonu, kapağı 85 °C'de olan bir termal döngüleyicide 70°C'de 16 saat inkübe edildi.

3.1. Hazır Streptavidin Bağlama Boncukları karıştırılana kadar vortekslendi. 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne 100 µL Streptavidin Bağlama Boncukları eklendi. Her hibridizasyon reaksiyonu için bir tüp hazırlandı.

3.2. Tüplere 200 µL Binding Buffer eklenip pipetajlandı. Tüpler 1 dakika boyunca manyetik bir stand üzerine yerleştirildi, ardından berrak süpernatant uzaklaştırıldı. Toplam üç yıkama için iki kez daha tekrarlandı. Üçüncü yıkamadan berrak süpernatant çıkarıldıktan sonra, son 200 µL Binding Buffer eklendi ve homojenleşene kadar vortekslendi boncuklar yeniden süspanse edildi.

3.3. Hibridizasyon tamamlandıktan sonra, termal döngüleyicinin kapağı açıldı ve her hibridizasyon reaksiyonunun hacmi doğrudan ilgili yıkanmış Streptavidin Bağlama Boncukları tüpüne aktarıldı. Pipetleyerek hafifçe karıştırıldı.

3.4. Hibridizasyon reaksiyon tüpleri Streptavidin Bağlama Boncukları ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca sallayıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra spinlendi.

3.5. Tüpler 1 dakika boyunca manyetik bir stand üzerinde tutuldu. Hibridizasyon Enhancer dahil berrak süpernatant boncuk pelet bozulmadan çıkartıldı ve atıldı. Tüpler manyetik standdan çıkartıldı ve 200 µL Yıkama Tamponu 1 eklenerek pipetajlandı, spinlendi.

3.6. Tüm hacim yeni 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Tüpler 1 dakika boyunca manyetik bir stand üzerine yerleştirildi, berrak süpernatant uzaklaştırıldı.

3.7. Tüpler manyetik standdan çıkartıldı ve 200 µL 48°C Yıkama Tamponu 2 eklendi. Pipetleyerek karıştırıldı, spinlendi. 5 dakika 48°C'de inkübe edildi. Tüpler 1 dakika boyunca manyetik bir stand üzerine yerleştirildi. Berrak süpernatant atıldı. Toplam üç yıkama için iki kez daha tekrarlandı. Son yıkamadan sonra, tüm süpernatant kalıntıları dikkatlice temizlendi.

3.8. Tüpler manyetik standdan çıkartıldı ve 45 µL dH₂O eklendi. Homojen olana kadar pipetleyerek karıştırıldı

3.9. Streptavidin Bağlayıcı Boncuk solüsyonu pipetlenerek karıştırıldı. 22,5 µL Streptavidin Bağlayıcı Boncuk solüsyonu 0,2 ml PCR şerit tüplerine aktarıldı.

3.10. Streptavidin Bağlayıcı Boncuk solüsyonunu içeren tüplere aşağıdaki reaktifler eklenerek bir PCR karışımı hazırlandı. Termal döngüleyiciye aktarılır ve döngü programı başlatılır.

Tablo 3.11: PCR karışımına katılan reaktifler ve hacimleri

Reaktif	Reaksiyon başına hacim
Streptavidin Bağlayıcı Boncuk solüsyonu	22.5 µL
Amplifikasyon Primerleri, ILMN	2.5 µL
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µL
Total	50 µL

3.11. Aşağıdaki koşullarla termal döngüleyici programlandı. Isıtılmış kapak 105 °C'ye ayarlandı.

Tablo 3.12: PCR reaksiyonu kurulan termal döngüleyici programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngüler
Başlama	98°C	45 saniye	1
Denatürasyon	98°C	15 saniye	
Bağlama	60°C	30 saniye	Değişken
Uzama	72°C	30 saniye	
Son Uzama	72°C	1 dakika	1
Son Bekleme	4°C	Bekleme	-

4.1. Termal döngüleyici programı tamamlandığında hemen saflaştırma adımına geçidi.

4.2. Önceden dengelenmiş DNA Saflaştırma Boncukları iyice karışana kadar vortekslendi. Tüplere 50 µl (1.0x) homojenize DNA Saflaştırma Boncukları eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Tüpler 1 dakika boyunca manyetik plaka üzerinde tutuldu. DNA Saflaştırma Boncukları, berrak bir süpernatant bırakarak bir pelet oluşturdu. Plakayı veya tüpleri manyetik plakadan çıkartmadan, berrak süpernatant uzaklaştırıldı.

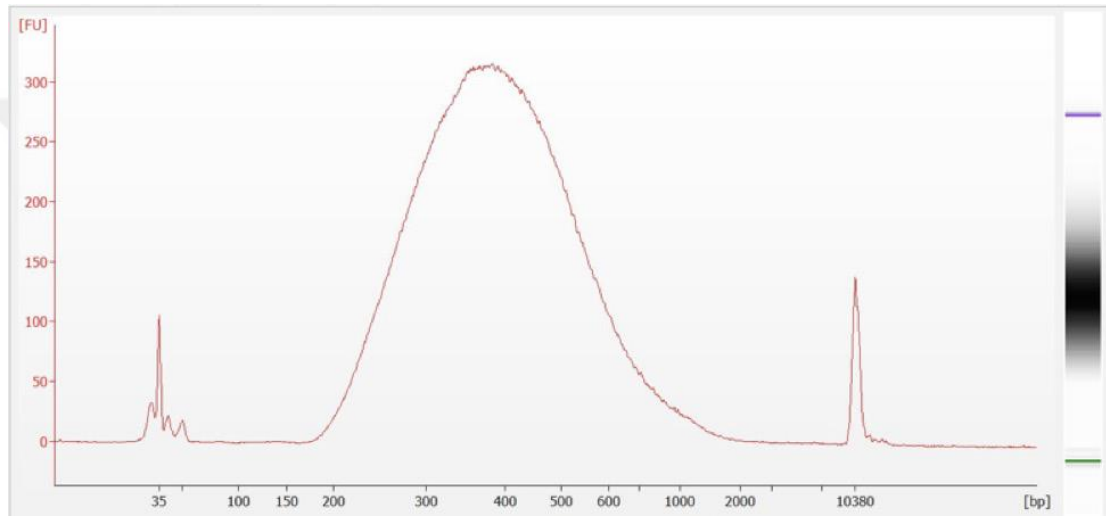
4.3. 200 µL taze hazırlanmış %80 etanol eklenerek boncuk peleti yıkandı. Tüp manyetik plaka üzerindeyken yıkama işlemi toplam iki yıkama için bir kez tekrarlandı. Boncuk peletini bozmamaya dikkat ederek, 10 µL'lik bir pipet kullanarak kalan tüm etanol dikkatlice temizlendi. Boncuk pelet manyetik plaka üzerinde havayla kurutuldu.

4.4. Tüpler manyetik plakadan çıkartıldı ve her yakalama reaksiyonuna 32 µL dH₂O, 10 mM Tris-HCl pH 8 eklendi. Homojen hale gelene kadar pipetleyerek karıştırıldı. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler manyetik bir plaka üzerine yerleştirildi ve boncuklar tamamen topaklanana kadar bekletildi.

4.5. Zenginleştirilmiş kitaplığı içeren 30 µL berrak süpernatant boncuk peleti bozmamaya dikkat edilerek temiz 0,2 ml'lik PCR şerit tüpe aktarıldı.

4.6. Agilent Bioanalyzer Yüksek Hassasiyetli DNA Kiti ve Thermo Fisher Scientific Qubit dsDNA Yüksek Hassasiyetli Kantitasyon Testi kullanarak zenginleştirilmiş her kütüphanenin miktarı belirlendi.

Agilent Bioanalyzer Yüksek Hassasiyetli DNA Kiti kullanılırken, son numuneden 0,5 µL yüklendi. Ortalama miktarı, 150–1.000 bp'lık bir aralık ayarı kullanılarak 375–425 bp arasında pik elde edildi. Nihai konsantrasyon ≥ 15 ng/µl olmalıdır.



Şekil 3.2: Hazırlanan zenginleştirilmiş gDNA kitaplığı örneklerinin Agilent Yüksek Hassasiyetli DNA analiz kiti ile oluşturulan elektroferogram.

3.5.4. Dizileme

Daha sonra MGI platformuna uygun hale getirmek için MGI Circularization Kit Module protokolü uygulandı. Son aşama olarak, yeterli konsantrasyonda olan örnekler, ön işlemlerden geçirildi. Dizileme cihazına ait solüsyonlar hazırlanıp her bir DNB, MGISEQ-G400RS dizileme platformundaki “flow cell”e yükleme yapıldı. Gerekli inkübasyon sonrası, “flowcell”ler cihaza yüklenerek dizileme işlemi gerçekleştirildi.

3.6. Biyoinformatik Analiz

Tespit edilen varyantların analizinde, in siliko analizler, veri tabanı araştırmaları ve literatür değerlendirmeleri yapıldı. Dizi verilerinin analizi, human genome (hg19) referans alınarak tanımlanmış veri analiz sistemine göre Maq ve BWA yazılımları kullanılarak yapıldı. Maq software kullanılarak elde edilen dizi verileri referans insan genomu (hg19) ile karşılaştırıldı. Hedef sekanslar dışındaki okumalar dışlandı, referans bazdan farklı her baz olası SNV olarak alındı. BWA indeli saptamak amacıyla referans genomla olan gapler karşılaştırmak için kullanıldı. Ek filtreler uygulandı. Varyantlar Quality score ve coverage değerlerine göre gözden geçirildi. Yeni varyant anotasyonu dbSNP, Personal Genome, Varsome, Polyphen2, HGMD-Public, PubMed, Clinvar, EXAC ve 1000 Genomes veri tabanlarıyla karşılaştırılarak yapıldı. Varyantlar; yenilik, kodlanan proteine etkisi, türler arasındaki korunmuşluk, ekspresyon paternlerine göre değerlendirildi. Aday genler Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) kullanılarak incelendi.

Varyantların sınıflandırılmasında ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics)'nin 2015 yılında yayımladığı ve dünya genelinde kabul edilen kılavuz kullanılmıştır (Richards ve ark., 2015). Bu kılavuza göre varyantlar, 5 ana grup altında değerlendirilmektedir. Bu gruplar, benign (Benign, B), yüksek olasılıkla benign (Likely Benign, LB), klinik önemi bilinmeyen (Variant of Uncertain Significance, VUS), yüksek olasılıkla patojenik (Likely Pathogenic LP) ve patojenik (Pathogenic P) olarak sınıflandırılmışlardır.

4. BULGULAR

4.1. Aile Öyküsü ve Klinik Bulgular

Olgu 1

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 7 yaşında, kız

Ebeveyn ve parental akrabalık: Aralarında akrabalık yok, anne 35, baba 32 yaşında.

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: Prenatal 16. GW (gestational week, gebelik haftası) NTD ve hidrosefali tanısı alan olguda, hidrosefali, mikrosefali, paraparezi, NTD (meningomyelose) tanımlandı. Miadında sezeryan ile 3400 gr doğan olgu 16 gün küvezde kalmış. Doğan doğmaz ağladı mı bilinmiyor. Anne sütünü 4 ay alan olgu, baş-boyun kontrolünü 4. ayda, destekli oturmayı 18. ayda, desteksiz oturmayı 30. ayda sağlamış. Konuşmaya 1 yaşında başlamış ve halen yürümektedir. Meningomyelose (doğum sonrası 3. Gün), ventriküloperitoneal şant (VP şant) (doğum sonrası 1. hafta) operasyonları olmuş. İlk nöbetini küvezde geçirmiş, tedavi başlanmış, sonrasında 7 yaşına kadar 4-5 kez nöbet geçirmiş. 2 yıldır nöbeti yok, antiepileptik ilaç kullanıyor. Belirgin kirpik yapısına sahip. Gelişim geriliği ve anemi mevcut. Transtorasik ekokardiyografide kalp kulakçıkları arasında delik (atriyal septal defekt, ASD) gözlenmiş. Üriner usg'de sol toplayıcı sistemde grade 1 hidronefroz ile uyumlu görünüm izlenmiş olup, renal pelviste AP çapı (anterior/posterior çap=ön/arka çap) 7 mm ölçülmüştür. Beyin MR tetkikinde serebellar tonsiller foramen magnumdan kaudale doğru 5mm'den fazla ventrasyon göstermiştir. Bulgular Chiari malformasyonu açısından anlamlı gözlenmiştir. Beyin BT'de Sağ pariyetalden giren şant katateri sağ lateral ventrikül içerisinde hafif süperiorda sonlanmaktadır. Oksipital lobun hem alt hem ortasında yaklaşık 8x7 mm boyutlu düşük yoğunluklu alan izlenmiştir (ensefalomalazi?)

Ailede benzer birey: Annesinin kuzeni anensefali ile doğmuş, ex olmuş.

Olgu 2

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 4 yaşında erkek

Ebeveyn ve parental akrabalık: Aralarında akrabalık yok, anne 34, baba 36 yaşında.

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: 88 kilo ile gebe kalan anne gebelikte folik asit ve B12 takviyesi almamış. Annede başka düşük ve ölüm doğum yok. Üçlü

tarama testinde tanı konmuş. Prenatal dönemde 30. GW'de bel açıklığı (NTD) ile tahliye önerilmiş ama aile kabul etmemiş. Tanı sonrası gebeliğin seyri normal. Gebelikte sigara, alkol, ilaç kullanımı ve ateşli hastalık yok. Sezaryen ile 36. haftada 3600 gr doğmuş, 3 ay küvezde kalmış. Doğar doğmaz ağlamamış, 1 ay anne sütü almış. Yürüyemiyor, desteksiz oturamıyor, konuşma 2 yaşında oluşmuş. Bilateral aşılektomi, bilateral kasık fıtığı amaliyatı geçirmiş. İlk nöbet 1 yaşında olmak üzere generalize tonik klonik tarzda 1 dk civarı süren nöbetler geçiriyor. NTD (meningomyelosel, diastometamyeli, tethered cord), hidrocefali nedeniyle şant takılmış, mikrosefalisi var, bilateral PEV (pes ekinovarus, çarpık ayak)'e sahip, defekasyon lavmanla yapıyor, epilepsisi, paraplejisi var. Torakal MR (manyetik rezonans) incelemesinde T12-L1 düzeyinde torakal spinal kanalı ikiye bölen diastometamyeliye ait kemik septa saptanmış. Torakal spinal kord T1-6 düzeyinde önemli düzeyde incelmış. T6 vertebra düzeyinde torakal spinal kordun posteriora doğru yer değişikliği gösterdiği saptanmış. T6-8 düzeyinde torakal spinal kordda belirgin sinyal artışı saptanmış. Lomber MR myelografi incelemesinde lomber vertabralarda füzyonlar mevcut. Spinal kord L4 düzeyinde sonlanmıştır (tethered cord, gergin omurilik sendromu). Kranial MR incelemesinde korpus kallozum disk genezisi izlenmiştir (korpus kollozum gelişme yokluğu). Sağ frontal bölgede superior frontal grus komşuluğunda kronik dolaşım yetmezliğine bağlı yerel iskemik doku nekrozu ile sekonder gelişmiş olabilecek kistik ensefalomalazi alanı saptanmış. Kranio vertebra düzeyinde serebellar tonsillerin kafatasının alt kısmında bulunan boyun deliğinin yaklaşık 25 mm kaudeline yer değiştirdiği izlenmiş.

Ailede benzer birey: Ailede benzer yok, abisinde spina bifida okkulta (lomber kılınma) var, 11 yaşında erkek kuzeni yutkunamıyor ve konuşamıyor.

Olgu 3

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 6 yaşında erkek.

Ebeveyn ve parental akrabalık: Aralarında akrabalık olmayan 25 yaşında baba ile 22 yaşında anne

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: Anne 80 kilo ile gebe kalmış. Tiroid hastalığı var. Gebelikte folik asit ve B12 takviyesi almamış. Anne diğer gebeliklerinde folik asit ve B12 takviyesi almış. Üçlü tarama testi negatif çıkmış. Annenin ölü doğum

veya düşük öyküsü yok. Prenatal dönemde 24. GW'de hidrosefali ve NTD tespit edilmiş. Anne karnında tanı sonrası olguda hareket azlığı gözlenmiş. Miadında ve NVYD (normal vajinal yol ile doğum) ile 2500 gr doğmuş, Doğar doğmaz ağlamamış. Doğduğunda meningomyelosel operasyonu geçirmiş, doğumunun 15. gününde şant takılmış ve 1 ay küvezde kalmış. Anne sütünü 6 ay alan olgu 3. ayda baş kontrolü sağlamış, 6. ayda destekli oturabilmiş ve 1 yaşında konuşmaya başlamış. Doğduğundan beri yürüyemiyor. Tek böbreğinden 5 kez hidronefroz sebebiyle opere olmuş. 2 yaşında memenjit geçirmiş. Üriner böbrek ultrasonografisinde sol böbrek izlenmemiş. Sağ böbrekte grate 3 hidronefroz saptanmış, idrar sondası kullanıyor. Alt ekstremitelerde paralizik duyu yok. Kalpte ritm bozukluğu mevcut aort darlığı var. Olgu 2 sağlıklı kardeşe sahip.

Ailede benzer birey: Ailede benzer yok. Annesinin babasında tek böbrek mevcutmuş.

Olgu 4

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 15 yaşında erkek.

Ebeveyn ve parental akrabalık: 3. kuşaktan kardeş çocukları olan 42 yaşında baba ile 38 yaşında anne

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: Gebelikte folik asit ve B12 takviyesi kullanılmamış. Anne 78 kilo ile gebe kalmış. Gebelikte sigara, alkol, ilaç kullanımı ya da ateşli hastalık durumları yaşanmamış. Üçlü tarama testi yapılmamış. Annede düşük ya da ölü doğum öyküsü yok. Prenatal dönemde doğuma 1 hafta kala meningomyelosel tanısı konmuş. Miadında sezeryan ile 2700 gr doğmuş. Doğar doğmaz ağladı mı bilinmiyor, 11 gün serviste takip edilmiş ve NTD operasyonu yapılmış. Anne sütü 2 yıl almış. Baş boyun kontrolünü 3 ayda, desteksiz oturmayı 2 yaşında, yürümeyi 6 yaşında (adım atacak kadar) ve konuşmayı 1 yaşında edinmiş. Yürümeye zorluk yaşayan olguda idrar kontrolü yok, ayaklarda hipotoni mevcut. Lumbosakral MR incelemesinde L5, S1, S2, S3 seviyelerinde posterior T1-T2'de hipointens 45x35 mm boyutlarında lipom lehine değerlendirilen görünüm tesbit edilmiş. L5-S1 intervertebral posterior disk kabarılaşması izlenmiş (tethered kord). Lomber spinal MR incelemesinde spinal kord normal lokalizasyonda sonlanmayıp, inferiorda L4 vertebra düzeyinde sonlanmış görünmekte. L4 düzeyinde kalın bir filum şeklinde posterior gergin olarak sakral 2 düzeyinde cilt altı pos içerisinde posteriora sonlanmaktadır (meningomyelosel). Spinal

kanal açıklığı bu düzeyde belirgin artmış olup, L5 ve sakral düzeyde posterior elemanlarda füzyon defekti mevcut (spina bifida). Alt ekstremitelerde belirgin kas gücü kaybı var, DTR (derin tendon refleksi) hiperaktif. Paraparezi var. İdrar inkontinans mevcut TAK (temiz aralıklı kateterizasyon) kullanıyor. Mesanede nöromusküler disfonksiyon, nörojenik mesane mevcut.

Ailede benzer birey: Ailede benzer birey yok.

Olgu 5

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 8 yaşında kız.

Ebeveyn ve parental akrabalık: 2. Derece kuzen 21 yaşında baba ile 18 yaşında anne

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: Anne 60 kilo ile gebe kalmış ve gebelik sürecinde folik asit ve B12 takviyesi almış. Gebelik sürecinde zararlı alışkanlıklar, ilaç kullanımı ya da ateşli hastalık mevcut değil. Annede düşük yada ölü doğum yok. Üçlü tarama testi yapılmış negatif sonuç alınmış. Prenatal dönemde oligohidramnios mevcutmuş. Tanı 24. GW'de konmuş. Tanı sonrası gebeliğin seyri normal. Miadında 38. GW'de sezeyan ile 1200 gr doğmuş, doğar doğmaz ağlamış, anne sütü 1 ay almış. Konuşma 1 yaşında olmuş ve yürüyemiyor. İmmün yetmezlik, NTD, hidrosefali ve neonatal diyabetes mellitus mevcut. Üriner USG'de sol böbrek yerinde izlenmemiş, sağ böbrek bölgesinde çapraz, birleşik ektopi ile uyumlu, sağ ve sol böbrekler birlikte izlenmiş. NTD (meningomyelosel), kalça çıkıklığı, tek taraf sağ doğuştan kalça çıkığı, VP Şant, bilateral çarpık ayak gevşetme aşılektomi operasyonları geçirmiş. Sol ayakta polidaktili 6 parmak mevcut.

Ailede benzer birey: Dayısında mental retardasyon var. Olgunun 1 kız ve 2 erkek kardeşi Lökosit Adezyon Defekti Tip 1 tanısı almış.

Olgu 6

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 6 yaşında kız.

Ebeveyn ve parental akrabalık: Aralarında akrabalık olmayan 25 yaşında baba ile 19 yaşında anne

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: 70 kilo ile gebe kalan anne gebelikte folik asit ve B12 takviyesi düzensiz almış. Annede düşük veya ölü doğum öyküsü yok. Üçlü tarama testi yapılmış ve negatif çıkmış. Prenatal 32. GW'de tanı konmuş.

Miadında sezeryan ile 3800 gr doğmuş, doğar doğmaz ağladı mı bilinmiyor, 15 gün küvezde takip edilmiş, 1.5 aylıkken meningomyelosele operasyonu geçirmiş, anne sütü 3 ay almış, desteksiz oturma 7 ay, konuşma 1 yaş, yürüyemiyor, 1.5 yaşında vertebradan omur eksize edilmiş, omuilikte sinir yapışmasına bağlı opere olmuş, skolyozu var, renal hipoplazi mevcut. Meningomyelosele, çarpık ayak sekeline bağlı metatarsus adduktus (ayağın ön tarafının içe dönüklüğü) deformitesi var. Ayaklarda düz tabanlık, rocker bottom foot (köşeli ayak) ve pes cavus (çukur ayak tabanı) mevcut. Sağ elde 5. Parmak distalinde kemik çıkıntısı mevcut. Üriner USG değerlendirmesinde sol böbrek normal lokalizasyonda izlenmemiş olup daha poterosuperior alanda yerleşim göstermektedir. Boyutu simetriğine göre küçük izlenmiştir. Sakrum ve koksikse ait kemik yapılarda agenezi izlenmiştir. L2-L5 düzeylerinde vertebralarda füzyon ve segmentasyon anomalileri izlenmiştir. L2-3 düzeyinde başlayan ve inferiorda sakral bölgeye dek uzanan vertebral yapılarda multipl seviyede füzyon ve segmentasyon anomalileri, posterior bölgede spina bifida ile uyumlu gözlemlendi. L1-3 düzeyinde diastomyeli ve orta hatta kemik septa izlenmiş. Bu düzeyde sağda cilt altı yağlı dokulara doğru uzanan ve nöral elemanlar bulunduran meningomyelosele kesesi izlenmiştir. Spinal kordsakral düzeye de uzanım göstermektedir (tethered kord). Alt lomber vertebralarda yarım oluşmuş görünüm izlenmiştir. Sakrum belirgin deforme görünümündedir.

Ailede benzer birey: Ailede benzer birey yok.

Olgu 7

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 7 yaşında kız.

Ebeveyn ve parental akrabalık: Aralarında akrabalık olmayan 33 yaşında baba ile 29 yaşında anne

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: Annede düşük yada ölü doğum öyküsü yok. Miadında sezeryan ile 2500 gr doğmuş. Doğar doğmaz ağlamış, hipoksik doğum öyküsü olmayan olgu doğumunun 1. günü NTD kapama ve 2. günü VP şant operasyonu olmuş, 15 gün küvezde takip edilmiş. Meningomyelosele, hidrosefali var, Bilateral PEV + rocker bottom foot olan olguda sağ alt ekstremitede duyu kaybı mevcut ve yürüyemiyor. Üriner sistem enfeksiyonu yaşıyor. Beyin bilgisayarlı tomografisinde her iki serebellar hemisfer beyin sapını çevrelemektedir (Chiari Tip 2 Malformasyonu). Dördüncü ventrikül izlenmemiş. Her iki lateral ventrikül kalibrasyonunda hidrosefali

konfigürasyonda artış izlenmiş. Biletarel lateral ventriküllerin oksipital hornları genişlemiştir (kolosefali). Troko lomber bölgede açıklığı sağa bakan üst torakal bölgede açıklığı sola bakan skolyoz izlenmiş. T2,T3,T4 seviyesinde spinal kordun santralinde siringomyeli kavitesi görülmüştür. Aşiloplasti ameliyatı olmuş. Nöbeti yok.

Ailede benzer birey: Ailede benzer birey yok.

Olgu 8

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 24 yaşında erkek.

Ebeveyn ve parental akrabalık: Aralarında akrabalık olmayan 48 yaşında baba ile 44 yaşında anne

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: Normal bir prenatal dönemi olan olgu miadında NVYD 1750gr doğmuş. Doğar doğmaz ağlamış, 2,5 aylık ve 18 aylık döneminde olmak üzere 2 kez nöbet geçirmiş 40 gün hastanede tedavi almış. Sonraki dönemlerinde de devam eden toplam 5 nöbet geçirmiş. Anne sütü almamış emme refleksi zayıfmış. Yürümeye ve konuşmaya 8 yaşında başlamış. Şuan hala tek kelimeler halinde konuşabiliyor. Üriner inkontinans mevcut. Tek böbreğe sahip. Apandisit, tek taraf inmemiş testis, meningomyelosele ameliyatları geçirmiş. Gelişim geriliği, NTD, mental retardasyon, aspirasyon pnömonisi ve sık düşme eylemi mevcut. Eller ve parmaklarda kontraktür var. Baş parmak konumu geriye yerleşimli. Sol üst ekstremitede belirgin kas gücü kaybı var. Geniş burun köprüsü ve burun tipine, dilde derin fissürlere, belirgin dudak yapısına, derin göz yapısına, önükoid vücut yapısına, skolyoza ve öz bakım eksikliğine sahip.

Ailede benzer birey: Olgunun 5 yaşındaki yeğeninde NTD tanısı var.

Olgu 9

Olgunun yaşı, cinsiyeti: 6 yaşında kız.

Ebeveyn ve parental akrabalık: Aralarında akrabalık olmayan 39 yaşında baba ile 36 yaşında bir anne

Fizik muayene, laboratuvar bulguları ve öykü: Anne 90 kilo ile gebe kalmış, 2 düşüğü var. Gebelikte folik asit ve B12 takviyesi almış ve gebelik sürecinde tiroit tanısı almış. Üçlü tarama testi yapılmış risk normal sınırlarda raporlanmış. 28. GW'de NTD tanısı konmuş olan olguda tanı sonrası gebeliğin seyrinde bebekte hareket azlığı

gözlenmiş. Hidrosefali ve meningoel tanısı olan miadında sezeryan ile 3300 gr doğan olguya 1. gün meningoel nedeniyle VP şant takılmış. Yeni doğan yoğun bakımda 40 gün küvezde kalmış. Anne sütü almamış olan olgu desteksiz oturmaya 2 yaşında başlamış ve yürüyemiyor. Anne-baba diyebilecek kadar konuşabilen olgu çoğunlukla anlamsız sesler çıkartıyor. Biri 8 aylıkken diğer 4 yaşında olmak üzere 2 kez nöbet geçirmiş. 2 kez meningomyeloseel ameliyatı olmuş. Skolyozu, epilepsisi var. Önden kabarık ve düz kafa yapısı mevcut. Sağ alt ekstremitede duyu kaybı var. Dizlerde bilateral spastisite, bilateral pes cavus, multiple diş çürükleri mevcut. Sağ böbrek içi tüplerde 2-3 derece büyüme, sol böbrek içi tüplerde 1 derece büyüme izlenmiş. Transtorasik ekokardiyografide kalpte ince duktus arteriozus damarı, kardiyak üfürüm ve atriyal septal defekt (ASD) gözlenmiş. T12 düzeyinden başlayan ve konus medullaris de dek uzanım gösteren diastomyeli ile uyumlu görünüm izlenmiştir. Konus medullaris L4-5 intervertebral diski düzeyinde sonlanmaktadır (tethered cord). İntratentorial kesitlerde 4. Ventrikül silinmiş, bilateral beyincik pedinküller foramen magnumdan inferiora herniye görünümde ve bulgular chiari tip 2 malformasyonu ile uyumlu gözlenmiş.

Ailede benzer birey: Annenin kuzeni benzer kese ile doğmuş.

Olgulara ait demografik ve fenotipik veriler Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

Tablo 4.1: Olgulara ait demografik ve fenotipik veriler

Demografik ve fenotipik veriler	Olgı No								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cinsiyet	Kız	Erkek	Erkek	Erkek	Kız	Kız	Kız	Erkek	Kız
Doğum yılı	2015	2017	2015	2006	2014	2015	2015	1998	2015
Anne sütü (ay)	4	1	6	24	1	3	?	-	-
Doğum şekli	S*	S	NVYD**	S	S	S	S	NVYD	S
Baş boyun kontrolü (ay)	4	-	3	3	?	3	?	?	8
Doğum kilosu (g)	3400	3600	2500	2700	1200	3800	2500	1750	3300
Küvez geçmişi (gün)	26	90	21	-	120	15	15	-	40
Yürüme (yaş)	2,5	-	-	6	-	-	-	8	-
Konuşma zamanı (yaş)	1	2	1	1	1	1	1	-	-
Desteksiz oturma (ay)	18	-	6	24	?	7	?	?	24
Geçirilmiş ameliyat	MMC***, VP şant****	MMC, VP şant, bilateral aşilektomi, bilateral kasık fıtığı	MMC, VP şant, hidronefroz	MMC, inmemiş testis	MMC, VP şant, kalça çıkığı	MMC	MMC, VP şant, aşiloplasti	Apandisit, inmemiş testis	MMC, VP şant
Anne baba akrabalığı	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Aynı köy	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ailede benzer birey	+	+	+	-	+	-	-	+	+

*S: Sezeryan, **NVYD: Normal vajinal yolla doğum, ***MMC: Meningomyelosel, ****VP şant: Ventrikülo-peritoneal şant

4.2. Moleküler Bulgular

Varyant analizi yapılırken tespit edilen varyantların, hastada meydana getirdiği klinik etkenlere göre sınıflandırılması ve değerlendirilmesi, hayatının devamında ve tedavide etken oluşturacak durumların araştırılması ve tanısının kesinleştirilmesi biyoinformatik analizler ile yapılmaktadır (D'Antonio, 2013). Varyantlar sınıflandırılırken ACMG'nin (American College of Medical Genetics and Genomics) 2015 yılında yayımladığı ve bütün dünyaca kabul edilen kılavuz kullanılmıştır. Bu kılavuza göre varyantlar, 5 ana grupta sınıflandırılmıştır. Bunlar, benign [Benign (B)], yüksek olasılıkla benign [Likely Benign (LB)], klinik önemi bilinmeyen [Variant of Uncertain Significance (VUS)], yüksek olasılıkla patojenik [Likely Pathogenic (LP)] ve patojenik [Pathogenic (P)] olarak sınıflandırılmışlardır (Richards ve ark., 2015).

Çalışılan 9 olguda en sık gözlenen bulgular NTD'nin yanısıra mikrosefali, hidrosefali ve üriner sistem bozuklukları olarak saptandı (Tablo 4.2). Olguların genotiplendirilmesi sonucunda her bir olgu için primer ve sekonder varyantlar tanımlanmıştır. Bulunan varyantların 23 tanesi VUS, 8 tanesi patojenik olarak değerlendirildi. Tespit edilen varyantlar literatürde ilişkili bulunduğu sendrom ismiyle aşağıdaki tabloda "ilişkili hastalık" kısmında belirtildi.

Tablo 4.2: Çalışılan NTD olgularının genotiplendirme sonuçları

Olgu No	Gen	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	Zigosite	Varyant Sınıflandırması	İlişkili Hastalık
1	<i>BPTF</i>	NM_004459.7: c.4922C>T	p.T1641M	Het	VUS	Dismorfik yüz ve distal anomalilerle seyreden nörogelişimsel bozukluk
	<i>FGFR1</i>	NM_002274067.2: c.33C>G	p.I11M	Het	VUS	Hartsfield sendromu
	<i>ADGRG6</i>	NM_001032395.3: c.19C>T	p.R7*	Het	VUS	Konjenital artrogripozis multiplex
		NM_001032395.3: c.288C>T	p.A963V	Het	VUS	Değişken fenotiple seyreden letal konjenital kontraktür sendromu
		NM_001032395.3: c.1536A>T	p.Q512H	Het	VUS	
	<i>PAH</i>	NM_000277.3: c.898G>T	p.A300S	Het	Patojenik	Hiperfenilalaninemi
2	<i>MN1</i>	NM_002430.3: c.908_928dupCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	p.P303_Q309dup	Het	Patojenik	Cebalid sendromu
	<i>YIF1B</i>	NM_001145463.2: c.85A>G	p.M29V	Het	VUS	Kaya-Barakat-Massa sendromu
	<i>STIL</i>	NM_001282938.1: c.224dupA	p.N75fs*16	Het	Likely Patojenik	Otozomal resesif primer mikrosefali 7
	<i>MPDZ</i>	NM_003829.5: c.4984G>T	p.E1662*	Het	VUS	Beyin ve göz anomalilerinin eşlik edebildiği Konjenital Hidrosefali 2
3	<i>CCDC88C</i>	NM_001080414.4: c.1342G>A	p.A448T	Homo	VUS	Konjenital hidrosefali 1
	<i>TET3</i>	NM_001366022.1: c.1358C>T	p.A374S	Homo	VUS	Beck-Fahrner sendromu
	<i>SLC17A8</i>	NM_139318.3: c.1120G>T	p.A374S	Het	Patojenik	OD sağırılık 25
4	<i>TRIM71</i>	NM_001039111.3: c.1789G>A	p.G597S	Het	VUS	Konjenital komünikan hidrosefali 1
	<i>NARS1</i>	NM_004539.4: c.1067A>C	p.D356A	Het	Patojenik	Nörogelişimsel bozukluk
	<i>HK1</i>	NM_033500.2: c.856A>T	p.S286C	Het	VUS	OD Herediter Motor ve Duyusal Nöropati (Russe Tipi) ve OR Nörogelişimsel Bozukluk
	<i>COL6A3</i>	NM_004369.4: c.5693T>C	p.V1898A	Homo	VUS	Distoni 27, Ulrich Konjenital Musküler Distrofi 1 ve Bethlem Miyopati 1
5	<i>ITGB2</i>	NM_000211.5: c.388T>C	p.Y130H	Hom	Patojenik	Lökosit adezyon defekti
	<i>TOP2B</i>	NM_001068.3: c.2110A>G	p.T704A	Het	VUS	Distal anomaliler ve ürogenital malformasyonlarla seyreden b hücre immünyetmezliği
	<i>JAG1</i>	NM_000214.3: c.1613C>T	p.A538V	Het	VUS	CMT-Aksonal tip 2 HH
	<i>GBE1</i>	NM_000158.4: c.986A>G	p.Y328C	Het	Patojenik	Glikojen depo hastalığı tip IV

Tablo 4.2: Devamı

Olgu No	Gen	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi	Zigosite	Varyant Sınıflandırması	İlişkili Hastalık
6	<i>ODC1</i>	NM_002539.3: c.250G>A	p.G84R	Het	Likely Benign	Bachmann-Bupp sendromu
	<i>NLRP12</i>	NM_144687.4: c.1054C>T	p.R352C	Het	VUS	Familyal soğuk otoinflamatuvar sendrom 2 ve otoinflamatuvar hastalıklara yatkınlık
	<i>HS6ST1</i>	NM_OO4807.3: c.1144C>T	p.R382W	Het	VUS	Hipogonadotropik hipogonadizm 15
7	<i>DLL1</i>	NM_005618.4: c.1330G>C	p.V444L	Het	VUS	Non-spesifik beyin anomalileri ile seyreden nörogelişimsel bozukluk
	<i>CACNA1C</i>	NM_001167624.3: c.5068_5070delGCT	p.A1690del	Het	VUS	Timothy Sendromu ve Uzun QT Sendromu
8	<i>MAPK8IP3</i>	NM_001040439.2:c.602+7_602+56delGGGGCGCGGCGGGG TGGAGGTACGCGGGCGCGGCGGGGCGGAGGTACGC	-	Het	Patojenik	Beyin anomalilerinin eşlik edebildiği nörogelişimsel bozukluk
	<i>CFTR</i>	NM_000492.4: c.3674C>T	p.A1225V	Het	VUS	Kistik fibrozis
	<i>GABRD</i>	NM_000815.5: c.1141C>G	p.R381G	Het	VUS	Değişken fenotipik özelliklerde epilepsi
9	<i>EDA</i>	NM_001399.5: c.1121G>A	p.S374N	Het	Likely Patojenik	Ektodermal Displazi 1 (Hipohidrotik) ve Selektif Diş Agenezi 1
	<i>BRPF1</i>	NM_004634.3: c.479C>A	p.S160Y	Het	VUS	Dismorfik yüz ve pitoz ile seyreden entelektüel gelişim bozukluğu
	<i>PIGV</i>	NM_017837.4: c.1022C>A	p.A341E	Het	Patojenik	Mental retardasyonla seyreden hiperfosfatazya sendromu 1

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, NTD hastalığı bulguları olup daha önce tanısı konulmamış olan ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine refere edilen 9 hastanın tüm ekzom dizileme verilerinin biyoinformatik analiz teknikleri kullanarak değerlendirmesi ile elde edilen veriler analiz edilerek yorumlanmıştır.

Olgu 1: TED analiz sonucunda NTD fenotipine neden olabileceği düşünülen iki varyant ve diğer patolojik fenotipler ile ilişkilendirilen dört varyant tespit edildi.

BPTF (Bromodomain PHD Finger Transcription Factor) geni ve fenotip ilişkisi: *BPTF* geninde heterozigot (NM_004459.7): c.4922C>T varyantı tespit edildi. Gendeki bu değişiklik ilgili proteinde T1641M amino asit değişikliğine sebep olmaktadır. Tespit edilen varyant literatürde OD kalıtım gösteren “Dismorfik Yüz ve Distal Anomalilerle Seyreden Nörogelişimsel Bozukluk” ile ilişkilendirilmiş ve in-siliko analizlerde VUS olarak sınıflandırılmıştır (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *BPTF* geni 17q24.2’de lokalize olup, kromatin yeniden modelleme kompleksi ailesinden nükleozom yeniden modelleme faktörünün (NURF) en büyük alt birimi olan bromodomain bitki homeodomain (PHD) finger transkripsiyon faktörünü kodlar (Bartholomew, 2014; Stankiewicz ve ark., 2017). NURF komplekslerinin, ATP’ye bağlı nükleozom modellemesini katalizlediği ve kromatinin transkripsiyonunu kolaylaştırdığı, böylece çeşitli genleri düzenlediği ve daha yüksek dereceli kromatin yapılarının yönetilmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir (Hamiche ve ark., 1999). Hayvan çalışmaları , birincil germ katmanlarının farklılaşmasında ve embriyonal ön-arka eksenin kurulmasında *BPTF*’nin temel rolünü göstermiştir (Landry ve ark., 2008). İnsanda *BPTF* geninin haplo yetmezliğinin, klinik olarak zihinsel yetersizlik veya gelişimsel gecikme, dil gecikmesi ve mikrosefali ile karakterize edilen dismorfik fasiyes ve distal uzuv anomalileri ile nörogelişimsel bozukluğa neden olduğu bilinmektedir (Stankiewicz ve ark., 2017; Glinton ve ark., 2021). Çalışmalar, *BPTF*’nin mezoderm, endoderm ve farklılaştırılmış ektoderm soylarının oluşumunda ve erken gelişim sırasında embriyonal ön-posterior ekseninin kurulmasında gerekli olduğunu tespit etmiştir (Goller ve ark., 2008; Landry ve ark., 2008). *BPTF*-knockdown zebra

balığı modeli, *BPTF* ekspresyon eksikliğinin nörolojik anormallikleri ve mikrosefali doğurabilecek nöronal ölümü artırdığını göstermektedir (Gilmore ve Walsh, 2013; Stankiewicz ve ark., 2017). *BPTF*-knockdown zebra balığı modelinde döllen larvaların 3 gün sonra ventral görüntüleri, seratohyal açıda önemli bir artış göstermiştir. Bu bulgular insan kraniyofasiyal anomali özelliklerinin altında *BPTF*'nin haplo yetmezliğinin yatabileceğini düşündürmektedir (Stankiewicz ve ark., 2017). Yakın zamanda ön beyne özgü *BPTF* çalışmalarında şiddetli kortikal hipoplaziden muzdarip nakavt fare modeli üretilmiş, progenitör farklılaşmanın düzenlenmesinde ve kortikal nöron alt bölümünün aktivasyonunda *BPTF*'in önemli rolü olduğu desteklenmiştir (Zapata ve ark., 2022). Dismorfik yüz ve distal anomalilerle seyreden nörogelişimsel bozukluk bulguları arasında yer alan ve olgu 1'de tespit edilen mikrosefali, epileptik nöbetler ve gelişim geriliği literatür ile uyumludur.

***FGFR1* (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) geni ve fenotip ilişkisi:** *FGFR1* geninde heterozigot (NM_002274067.2): c.33C>G varyantı tespit edildi. Gendeki bu değişiklik, ilgili proteinde p.I11M amino asit değişikliğine sebep olmaktadır. Tespit edilen *FGFR1* varyantı, in siliko analizlerde VUS olarak sınıflandırıldı (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *FGFR1* geni, 8p11.23'te lokalizedir. *FGFR1*, hücre büyümesini, farklılaşmasını, hayatta kalmasını ve anjiyogenezi düzenlemek için RAS/MAPK (Ras-mitogen-activated protein kinase) sinyal yolağı aracılığıyla sinyalleme aracılığı eden bir reseptör tirozin kinaz (RTK) olan, fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1'i kodlar. Özellikle *FGFR1*'in in vivo bozulmasıyla, farelerde anormal nörolasyon ve spina bifida fenotipinin oluşması, *FGF* yolunun embriyolojik gelişim sırasında kritik role sahip olduğuna işaret eder (Deng ve ark., 1997; Hoch ve Soriano, 2006). Bu bulgular *FGFR1*, nörolasyonda rol oynayan *FGFR1* aracılı sinyal yolları ile nöral tüp defektleri arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürür (Deng ve ark., 1997). Zuniga ve ark. (2002), *FGFR* yolağı üzerinde düzenleyici etkiye sahip olan fare *Twist* geninin, kraniyal nöral tüp, uzuv ve somit gelişimi, ekstremite morfogenezi üzerinde etkili olan moleküler mekanizmaları üzerine çalışmışlardır. Çalışmalarında uzuv tomurcuğu gelişimini kontrol eden hücre-hücre sinyalleme basamaklarını ve düzenlemede yer alan mezenşimal transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu analiz ettiler. Sonuç olarak

Twist'in uzuv tomurcuğu morfogenezinin sürdürülmesi ve ilerlemesi için gerekli olduğunu ortaya koydular. *Twist* eksikliği olan farelerde, polarizasyon bölgesi ve apikal ektodermal sırt (AER) arasında çalışan, SHH/FGF feedback sinyal döngüsü bozulur. Zuniga ve ark., epitelyal-mezenşimal sinyalleşmedeki bu kusurların, uzuv tomurcuklarında bozulmuş fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyalinin doğrudan bir sonucu olabileceği öne sürülmüştür (Zuniga ve Zeller 2020). *FGFR1*'deki mutasyonlar, klasik holoprosensefali için tipik olmayan kraniyofasiyal, uzuv ve beyin anormalliklerinin kombinasyonlarını içeren, klinik olarak farklı bir holoprosensefali (HPE) sendromik formu olan Hartsfield sendromu ile de ilişkilendirilmiştir (Hong ve ark., 2016).

***ADGRG6* (Adhesion G Protein-Coupled Receptor G6) geni ve fenotip ilişkisi:**

ADGRG6 geninde p.R7* amino asit değişikliğine neden olan heterozigot (NM_001032395.3): c.19C>T varyantı, p.A963V amino asit değişikliğine neden olan heterozigot (NM_001032395.3): c.288C>T varyantı ve p.Q512H amino asit değişikliğine neden olan heterozigot (NM_001032395.3): c.1536A>T varyantı olmak üzere 3 adet varyant tespit edildi. Tespit edilen varyantlar in-siliko analizlerde VUS olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *ADGRG6* olarak da bilinen, 6q24.1'de yer alan *GPR126* geni 144.348 bp uzunluğundadır ve 25 ekzondan oluşur. Monk ve ark. (2011)'e göre, *ADGRG6*, periferik sinir sisteminin, nöral uçtan türetilen Schwann hücreleri tarafından miyelinlendiği ve *ADGRG6* geninin Schwann hücresi olgunlaşması ve hem zebra balığı hem de memelilerde miyelinasyonun başlatılması için esas olduğu bildirilmektedir. (Karner ve ark., 2015) ise kıkırdakta bir *GPR126* delesyonunun farelerde idiyopatik skolyoz ve pektus ekskavatumu yol açabileceğini bulmuştur. Ayrıca *GPR126* geni varyantlarının Adolesan İdiyopatik Skolyoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kou ve ark., 2013). *GPR126*, adhesion GPCR (G-proteini bağlı reseptörler) sınıfının bir üyesidir ve bu nedenle hem hücre-hücre hem de hücre-matris etkileşimlerini kolaylaştırdığı bilinmektedir (Langenhan ve ark., 2013). Tespit edilen varyantlardan p.R7* varyantı literatürde hem sağlıklı bireylerde hem de “Konjenital Artrogripozis Multiplex” vakalarında bildirilmiş olup *ADGRG6* geni otozomal resesif kalıtım kalıbına sahip “Değişken Fenotiple Seyreden Letal Konjenital Kontraktür Sendromu” ile

ilişkilendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Artrogripozis multipleks konjenita olarak da bilinen artrogripoz, klinik olarak doğuştan eklem kontraktürleri veya birden fazla vücut bölgesinde hareket kısıtlaması olarak tanımlanır (Hall ve ark., 1982; Bamshad ve ark., 1996). Bu gendeki varyantların hepsi heterozigot seviyededir ve olgu taşıyıcı olarak belirlenmiştir.

PAH (Phenylalanine hydroxylase) geninde ve fenotip ilişkisi: PAH geninde (NM_000277.3): c.898G>T varyantı belirlenmiştir. Bu varyant p.A300S amino asit değişimine sebep olmaktadır. PAH geni 12q23.2 kromozom bölgesinde yer alır, 90 kb'lık gen (Güttler ve Woo, 1986) 13 ekzon içerir (Konecki ve ark., 1991). Metabolizmal eksiklik ile karakterize otozomal resesif bir hastalık olan fenilketonüri (PKU), esas olarak fenilalanin hidroksilaz (PAH) genindeki fonksiyon kaybı mutasyonlarından kaynaklanır (Vockley ve ark., 2014). PAH, L-fenilalanini (L-Phe) L-tirozine (L-Tyr) dönüştüren PAH enzimini kodlar (Shi ve ark., 2012). PKU'dan etkilenen bireylerin çoğu, her iki alelde de farklı mutasyonlar taşıyan bileşik heterozigotlardır. Mutasyonların fonksiyonel etkilerinin bilinmesi muhtemel kalıntı enzim fonksiyonunun tahmin edilmesini sağlar, ancak fenotipi etkileyen hala bilinmeyen faktörler vardır (Kayaalp ve ark., 1997; Sterl ve ark., 2012). Tespit edilen varyant literatürde otozomal resesif “Hiperfenilalaninemi” ile ilişkilendirilmiş olup varyant heterozigot olarak tespit edildiğinden olgu taşıyıcı olarak değerlendirildi.

Olgu 2: TED analizi sonucunda NTD fenotipine neden olabileceği düşünülen bir varyant tespit edildi. Bununla birlikte dikkat çekici üç varyant daha belirlendi.

MN1 (Meningioma Chromosome Region 1) geni ve fenotip ilişkisi: MN1(Meningioma Chromosome Region 1) geninde heterozigot (NM_002430.3): c.908_928dupCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGC varyantı tespit edildi. DNA dizisindeki bu değişiklik proteinde p.P303_Q309dup amino asit değişikliğine neden olmaktadır. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde patojenik olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). Kromozom 22q12.1 bölgesinde yer alan MN1 geni 70 kb büyüklüğe sahiptir ve yaklaşık 4.7 kb ve 2.8 kb'lık iki ekzonundan 1.320 amino asit büyüklüğünde bir ürün kodlamaktadır

(Lekanne Deprez ve ark., 1995). *MN1*, fare ve insanda beyin ve kraniyofasiyal gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark., 2008; Breckpot ve ark., 2016; Hoebel ve ark., 2017). Farelerde *MN1*, embriyonik 9.5 günde orta beyin, arka beyin ve kraniyofasiyal mezenşimde gelişen yüzün tüm çıkıntılarında güçlü bir şekilde eksprese edilir (Liu ve ark., 2008). Damak büyümesi sırasında gelişen ikinci plakanın ön-arka eksenini boyunca önemli düzeyde farklı ekspresyon sergiler (Liu ve ark., 2008). Homozigot *MN1* nakavt fareler, yarı damak nedeniyle doğumda veya doğumdan hemen sonra ölürlere ve preterm null farelerde anormal kafatası kemiği gelişimi gözlenir. Heterozigot nakavt fareler, hipoplastik membranöz kemik ve yarı damağın eksik penetransını içeren daha az şiddetli bir fenotip sergiler (Meester-Smoor ve ark., 2005). İnsanlarda, *MN1*'i içeren heterozigot delesyona sahip en az dokuz birey rapor edilmiştir ve hepsinin yarı damak da dahil olmak üzere orofasiyal bulguları vardır (Said ve ark., 2011; Davidson ve ark., 2012; Breckpot ve ark., 2016). Mak ve ark. (2020) çalışmalarında *MN1*'in insan kraniyofasiyal ve beyin gelişiminde kritik bir rol oynadığına dikkat çekmiş ve rhombensefalosinapsisin altında yatan biyolojik mekanizmaların anlaşılması için *MN1*'in önemini vurgulamışlardır. *MN1* ekspresyonunun, birincil osteoblastların farklılaşması sırasında arttığı ve *MN1* geninin bu hücre tipinin çoğalma, farklılaşma ve çeşitli işlevleri için gerekli olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2009). Bu veriler, *MN1*'in kafatası kemiklerinin gelişiminde önemli ve korunmuş bir rol oynadığını göstermektedir. Breckpot ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada kromozom 22q12'yi içeren ve heterojen bir palatal defekt spektrumu, vestibüler schwannomalar ve korpus kallozum agenezisi dahil olmak üzere çoklu konjenital anomaliler ile başvuran, delesyon taşıyan 7 hasta daha rapor etmişlerdir. Ancak bu bulgular Olgu 2 ile benzeşmemektedir.

***YIF1B* (Interacting Factor Homolog B, Membrane-Trafficking Protein) geni ve fenotip ilişkisi: heterozigot (NM_001145463.2):** *YIF1B* geninde c.85A>G varyantı tespit edildi. Bu değişiklik p.M29V amino asit değişikliğine neden olmaktadır. *YIF1B* geni 19q13.2 'de lokalize olup, FinGER protein ailesine ait ve endoplazmik retikulum (ER)-Golgi trafiğinde görev alan bir ürünü kodlar (Graab ve ark., 2019). Tespit edilen varyant novel olup klinik önemi bilinmemektedir. Diaz ve ark. (2020)'ları yaptıkları çalışmada hücresel düzeyde *YIF1B*'nin ER morfolojisinin ve birincil siliyer bütünlüğün

korunması için gerekli olduğunu ve delesyonunun miyelinasyonun değişmesine ve nöronal ölüme yol açtığını gösterdiler. Beyindeki miyelinleşme, olgun oligodendrositlerdeki oligodendrosit progenitör hücrelerin çoğalmasına, göçüne ve farklılaşmasına dayanır. Miyelin proteini plazmolipin (PLLP), miyelinizasyon için gerekli olan yeni zarları oluşturmak üzere hücre zarına hedeflenmelerini sağlamak adına lipidleri golgi aygıtında bir araya getirir (Yaffe ve ark., 2015). Bu da Golgi'nin kritik rolünü gösterir. Anterograd trafiğin değişmesi ve golgi aparatının düzensizliği veya *YIF1B* tükenmiş oligodendrositlerde spesifik reseptörlerin yanlış hedeflenmesi, değişen miyelinizasyondan sorumlu olarak karşımıza çıkmakta ve ortaya çıkan düzensizlikte rol oynamaktadır (Carrel ve ark., 2008; Alterio ve ark., 2015). Farelerde ve insanlarda *YIF1B* delesyonunun daha belirgin etkisi serebellar atrofidir. Purkinje hücrelerinin ve Bergmann hücrelerinin, serebellar gelişime dahil olduğu öne sürülen kirpiklere sahip olduğu gösterilmiştir (Di Pietro ve ark., 2017). Purkinje hücreleri, uygun gelişim ve dendritogenez için sağlam siliyer Sonic Hedgehog (SHH) sinyaline ihtiyaç duyar. SHH serebellumun büyümesini ve gelişmesini düzenler (Dahmane ve Ruiz i Altaba, 1999; Cheng ve ark., 2018). Dolayısıyla *YIF1B* geni insanda nörogenez için kritik öneme sahiptir. İnsanda *YIF1B* geninin homozigot ya da compound heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları patolojik Kaya-Barakat-Massa Sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Tesbit edilen varyant heterozigot olduğundan fenotipe yansımaları beklenmemektedir.

***STIL* (SCL/TAL1-Interrupting Locus) geni ve fenotip ilişkisi:** *STIL* geninde heterozigot (NM_001282938.1): c.224dupA varyantı tesbit edildi. Varyant proteinde p.N75fs*16 amino asit değişikliğine neden olur. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde de Likely Patojenik olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *STIL* geni 1p33 kromozom bölgesinde lokalizedir ve 20 ekzon içerir. *STIL* geni sentrozomlarda, mitotik iğ kontrol noktasını düzenleyen bir proteini kodlar. Sentrozomal fonksiyonların bozulması, nöronal progenitör hücrelerin asimetrik hücre bölünmelerini inhibe ederek mikrosefaliye sebep olur (Marthiens ve Basto, 2014). *STIL* geninin tespit edilen varyantı literatürde “OR Primer Mikrosefali 7” ile ilişkilendirilmiştir. Otozomal resesif primer mikrosefali (MCPH), bir nörogelişim bozukluğudur (Woods ve ark., 2005). Hastalık lokus heterojenitesi gösterir ve 25'ten fazla genin MCPH'ye neden olduğu bildirilmiştir

(Nasser ve ark., 2020). Öte yandan *STIL*, sonik hedgehog yoluna bağlıdır. Bu nedenle *STIL* mutasyonlarının, farklı mekanizmalar yoluyla MCPH ve holoprosensefaliye neden olabileceği bildirilmiştir (Izraeli ve ark., 2001; Carr ve ark., 2014; Sun, Carr, ve ark., 2014; Sun, Li, ve ark., 2014).

MPDZ (Multiple PDZ Domain Crumbs Cell Polarity Complex Component) geni ve fenotip ilişkisi: *MPDZ* geninde (NM_003829:5): c.4984G>T varyantı heterozigot düzeyde tespit edilmiştir. Bu varyant p.E1662* amino asit değişikliğine neden olmaktadır. *MPDZ* geni c.4984G>T varyantı literatürde OR “Beyin ve Göz Anomalilerinin Eşlik Ettiği Konjenital Hidrosefali 2” ile ilişkilendirilmektedir (OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, Erişim Tarihi: 05.10.2022). Olgu heterozigot genotipte taşıyıcı olarak değerlendirildi. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde VUS olarak değerlendirildi. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde de VUS olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *MPDZ* geni 9p23 kromozom bölgesinde yer alır. Hücresel bağlantılarda rolü olan *MPDZ* proteinini kodlar. Ek olarak, *MPDZ*'nin hücre-hücre etkileşimi de dahil olmak üzere integral membran proteinlerinin montajı ve lokalizasyonunda çok yönlü rollere sahip olabileceği bildirilmiştir (Ackermann ve ark., 2009; Ali ve ark., 2011). Ayrıca *MPDZ* proteinleri, çok değerlikli yapı iskele proteinlerini bağlayabilen ve hücre içi sinyalleme, reseptör kümelenmesini ve epitel hücrelerinin polaritesini düzenleyebilen çoklu alanlardan oluşmuştur (Hamazaki ve ark., 2002). Konjenital hidrosefali beyin boşluklarında anormal beyin omurilik sıvısı (BOS) birikimidir (Schrandt-Stumpel ve Fryns, 1998; Garne ve ark., 2010). Ventriküler sistemde artan miktarda BOS, kafa içi basıncını yükselterek beyin dokusunun sıkışmasına ve baş çevresinin genişlemesine neden olur (Guerra ve ark., 2015). Konjenital hidrosefali-2, uterus başlıyan konjenital bir hastalıktır. Etkilenen bireylerde değişken şekilde genişlemiş ventriküllere ve değişken nörolojik sekillere sahip hidrosefali vardır. Bazı kişilerde lisensefali, korpus kallozumun incilmesi ve nöronal heterotopi gibi başka beyin anormallikleri de yer alır. Çoğu hastada motor gelişim gecikmiştir ve nöbetler vardır. Kardiyak septal defektler, iris koloboma ve spesifik olmayan dismorfik özellikler dahil olmak üzere ek konjenital özellikler gözlenebilir. Bazı hastalar uterus başlıyan

bebeklik döneminde veya erken çocukluk döneminde ölürken, diğerleri uzun süreli hayatta kalabilmektedir (Shaheen ve ark., 2017).

Olgu 3: TED analizi sonucunda olgunun fenotipine neden olabileceği düşünülen bir varyant tespit edildi. Bununla birlikte dikkat çekici üç sekonder varyant daha belirlenmiştir.

***CCDC88C* (Coiled-Coil Domain-Containing Protein 88C) geni ve fenotipe etkisi:**

CCDC88C geninde homozigot (NM_001080414.4): c.1342G>A varyantı tespit edilmiştir ve bu değişiklik p.A448T amino asit değişimine sebep olmaktadır. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde VUS olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *CCDC88C* geni, 14q32.11-q32.12 kromozom bölgesinde yer alır ve DVL1 (Dishevelled 1) bağlayıcı protein DAPLE'yi kodlar. DAPLE-DVL1 homodimeri, beta-katenin bozulmasını teşvik eder ve kanonik WNT sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olarak işlev görür (Oshita ve ark., 2003; Ekici ve ark., 2010). *CCDC88C*, hücre polaritesi ve sinir sistemindeki dendritlerin gelişimi dahil olmak üzere birçok işlevi olan, her yerde bulunan stoplazmik bir proteindir (Yahia ve ark., 2021). *CCDC88C*'de homozigot fonksiyon kaybı mutasyonları, sinir sisteminin morfogenezini bozarak OR konjenital hidrosefaliye neden olur (Ekici ve ark., 2010; Marivin ve ark., 2019). *CCDC88C* geni “Konjenital Hidrosefali 1” ile ilişkilendirilmekle beraber son zamanlarda yapılan çalışmalar, *CCDC88C*'deki heterozigot mutasyonların, geç başlangıçlı spinoserebellar ataksi tip 40'ın gelişimiyle de ilişkilendirmektedir. Güncel olarak, *CCDC88C*'deki mutasyonlar, monogenik nörolojik fenotiplere, mutant allele bağlı olarak iki mekanizmadan biri ile ya hetero-trimerik G-proteinlerinin aktivasyonu veya JNK (c-jun N-terminal kinaz) kaskadının aktivasyonu ile bağlantılı olabilir (Tsoi ve ark., 2014; Marivin ve ark., 2019). *CCDC88C*'de tanımlanan tüm homozigot mutasyonlar, WNT sinyal yolunda uygun *CCDC88C* protein fonksiyonu için gerekli post synaptic density disc-large zo-1'ü (PDZ) bağlanma bölgesini ortadan kaldırır. Çalışmalarda *CCDC88C* mutasyonları ciddi doğum öncesi başlangıçlı hidrosefalinin bilinen birkaç resesif nedeninden biri olarak ortaya konmuştur (Ruggeri ve ark., 2018). Olgu 3'de belirlenen *CCDC88C* geninde homozigot c.1342G>A varyasyonunun konjenital hidrosefali 1

fenotipinin parçası olan hidrosefali ve zayıf motor gelişimi bulgularının açıklayıcısı olabileceği düşünülmektedir.

TET3 (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 3) geni ve fenotip ilişkisi: *TET3* geninde homozigot (NM_001366022.1): c.1358C>T varyantı tespit edilmiş olup p.A374S amino asit değişikliği ile sonuçlanmaktadır. *TET3* c.1358C>T varyantı “Beck-Fahrner Sendromu (BEFAHRS)” ile ilişkilendirilmiştir (OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, Erişim Tarihi: 05.10.2022). Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde VUS olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *TET3* geni, 2p13.1'de lokalizedir. Erken zigot oluşumu, embriyogenez ve nöronal farklılaşma sırasında DNA demetilasyonunu başlatan bir metilsitozin dioksijenazı kodlar (Beck ve ark., 2020). Beck ve ark. (2020) tarafından bildirilen ailelerde BEFAHRS sendromunun hem OD hem de OR formları bildirilmiştir. Otozomal resesif geçişli hastaların birçok heterozigot taşıyıcı ebeveyni benzer, ancak daha hafif özellikler göstermiştir. *TET3*, oositlerde, zigotlarda ve nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir ve farelerde *TET3*'ün ablasyonu embriyonik dönemde letaldir (Wu ve Zhang, 2017). *TET3*, döllenmeden sonra erkek ebeveyn genomunun demetilasyonunda önemli bir rol oynar (Mayer ve ark., 2000; Inoue ve ark., 2011, 2012; Iqbal ve ark., 2011; Wossidlo ve ark., 2011). Ayrıca, fare nöronlarında *TET3*'ün farklılaşmış inhibisyonu veya tükenimi sinaptik işlevi etkileyebilmektedir (Li ve ark., 2014; Yu ve ark., 2015; Zhu ve ark., 2016). *TET3*'teki homozigot yanlış anlamlı varyantlar, bir ailede OR zihinsel engelliliğin olası bir nedeni olarak gösterilmiştir (Santos-Cortez ve ark., 2018). Bu bulgular *TET3*'ün erken embriyonik gelişim ve nöronal fonksiyondaki önemli rolünü destekler niteliktedir. Beck-Fahrner sendromu, değişken zihinsel gelişim bozukluğu ile birlikte gelişimsel gecikme ile karakterize bir bozukluktur. Etkilenen bireylerde genellikle otistik özellikler veya dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu (DEHB) gibi davranışsal anormalliklerin yanı sıra öğrenme güçlükleri bulunur. Çoğu hastada hipotoni ve dismorfik yüz bulguları vardır. Olgu 3'de gözlenen gelişimsel gecikme ve nadiren nöbetler gibi büyüme anormallikleri *TET3*'ün homozigot varyantı ile ilişkili olabilir. Aynı şekilde alt ekstremitelerdeki duyu yokluğu da literatürdeki bulgularla örtüşmektedir.

SLC17A8 (Solute Carrier Family 17, Vesicular Glutamate Cotransporter, Member 8) geni ve fenotip ilişkisi: *SLC17A8* geninde heterozigot (NM_139318.3): c.1120G>T varyantı tespit edildi, bu varyant p.A374S amino asit değişikliğine neden olmaktadır. Tespit edilen varyant “OD Sağırılık 25” ile ilişkilendirilmiş olup, in-siliko analizlerde patojenik olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *SLC17A8* geni 12q23.1 kromozom bölgesinde yer alır. Solüte taşıyıcı 17 ailesine (sodyum bağımlı fosfat taşıyıcı, veziküler glutamat taşıyıcı 3; VGLUT3) dahildir (Seal ve ark., 2008). Fare kokleasında yapılan çalışmalar, *SLC17A8* olarak da bilinen veziküler glutamat taşıyıcı 3'ün (*VGLUT3*) spesifik olarak iç tüy hücrelerinde (IHC'ler) eksprese edildiğini ve *VGLUT3* kaybının sağırlığa neden olduğunu göstermektedir (Li ve ark., 2018). Bir başka çalışmada 4 kuşak boyunca 155 aile üyesi incelenmiş. Etkilenen aile üyelerinin tipik olarak yüksek frekanslı, yavaş ilerleyen, postlingual başlangıçlı sensörinöral işitme kaybına sahip kişiler olduğu ve annelerinden miras kalan ortak bir haplotipi paylaşmış oldukları bildirilmiştir. Hastalık başlangıç yaşı değişkendir, 10 vakada 20 yaş öncesinde, kalanlar ise 30-60 yaş arasında işitme kaybı görülmüştür (Greene ve ark., 2001; Thirlwall ve ark., 2003). Olgu 3, 6 yaşında olması sebebiyle henüz işitme kaybı bulgusu göstermiyor olabilir.

Olgu 4: TED analizi sonucunda olgunun fenotipine neden olabileceği düşünülen üç varyant tespit edildi. Bununla birlikte dikkat çekici varyant daha belirlenmiştir.

TRIM71 (Tripartite Motif-Containing Protein 71) geni ve fenotip ilişkisi: *TRIM71* geninde heterozigot (NM_001039111.3): c.1789G>A varyantı tespit edilmiştir. Bu varyant ilgili proteinde p.G597S amino asit değişikliği ile sonuçlanmaktadır. Literatürde OD “Konjenital Komünikan Hidrosefali 1” ile ilişkilendirilen varyant, VUS olarak sınıflandırıldı (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *TRIM71* geni 3p22.3 lokalizedir. *TRIM71*, kök ve progenitör hücre kaderini ve gelişim olaylarını düzenleyen, evrimsel olarak korunmuş bir RNA bağlayıcı proteindir (Welte ve ark., 2019). *TRIM71*, NHL (NCL-1, HT2A ve Lin-41) domeininin ve hedef genlerin 5' veya 3' UTR'lerinin doğrudan etkileşimleri yoluyla mRNA'ların

transkripsiyon sonrası susturulmasına aracılık eder (Slack ve Ruvkun, 1998; Vella ve ark., 2004; Ecsedi ve Grosshans, 2013; Aeschmann ve ark., 2017). Fonksiyonel ve genetik analizler, TRIM-NHL RNA bağlayıcı proteinlerin, bağlandıkları hedef mRNA'larda protein ekspresyonunu negatif olarak düzenlediğini göstermektedir. Bu baskılayıcı aktivite, gelişmekte olan beyindeki kök hücre kaderini kontrol etmede ve germ hattını farklılaştırmada çok önemli bir rol oynar (Connacher ve Goldstrohm, 2021). Ayrıca ubikuitin ligaz aktivitesinden de sorumludur (Nguyen ve ark., 2017). *TRIM71* nakavt farelerdeki nöral tüp kapanma kusuru, NPC'lerin (nöral öncü hücresi) proliferasyonunun azalmasından ve erken gelişen farklılaşmadan kaynaklanır (Chen ve ark., 2012). Furey ve ark. (2018) konjenital hidrosefalinin patogenezi için yaptıkları tüm ekzom dizileme çalışmasında nadir ve önemli derecede hasar veren *TRIM71* geninin de içinde bulunduğu hastalıkla ilişkili olabilecek 4 gen tanımladı. Bu dört genin tümünün nöral tüp gelişimi için gerekli olduğu ve ventriküler bölgede nöral kök hücre kaderini düzenledikleri bildirildi. Bu sonuçlar, tanısal, prognostik ve terapötik sonuçları olan potansiyel konjenital hidrosefali hastalarının patogenezinde bozulmuş nörojenez göstermektedir. Olgu 4'ün bulguları arasında yer alan hidrosefali, meningomyelosel ve alt ekstremitelerde duyu kaybı literatürde *TRIM71* c.1789G>A varyantının ilişkilendirildiği fenotipler ile uyumaktadır.

***NARS1* (Asparaginyl-tRNA Synthetase 1) geni ve fenotip ilişkisi:** *NARS1* geninde heterozigot (NM_004539.4): c.1067A>C varyantı belirlenmiştir ve bu varyant p. D356A amino asit değişikliği ile sonuçlanmaktadır. Tespit edilen varyant literatürde “Nörogelişimsel Bozukluk” ile ilişkilendirilmiş olup, in-siliko analizlerde likely patojenik olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). Nörogelişimsel bozukluğun hem OR hem de OD formları bulunmaktadır. *NARS1*, 18q21.31 lokalize olup, asparajinin sentezi için gerekli olan sitoplazmik asparaginil-tRNA sentetazı kodlar. *NARS1*, protein translasyonu için gerekli olan her yerde eksprese edilen sitoplazmik Sınıf IIa tRNA sentetaz ailesinin bir üyesidir (Wang ve ark., 2020). Mikrosefali, bozulmuş dil ve yürüyüş anormallikleri (NEDMILG) ile birlikte nörogelişimsel bozukluğun, *NARS1*'deki homozigot veya bileşik heterozigot mutasyondan kaynaklandığına dair kanıtlar bildirilmektedir (OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, Erişim Tarihi: 05.10.2022). Manole ve ark. (2020)

ve Wang ve ark. (2020) tarafından bildirilen ailelerde NEDMILG'nin kalıtım modeli otozomal çekinik kalıtım ile uyumlu bildirilmiş ve etkilenen tüm bireylerde, ilerleyici nörolojik fonksiyon kaybıyla birlikte mikrosefali, gelişimsel gecikme ve zihinsel engellilik tanımlanmıştır. Olgu 4'te görülen gelişimsel gecikme ve nörogelişimsel bozuklukların eşlik ettiği nöral tüp kusurları, literatür bulgularıyla uyumludur.

HK1 (Hexokinase 1) ve fenotip ilişkisi: *HK1* geninde heterozigot (NM_033500.2): c.856A>T varyantı tespit edilmiştir ve bu varyant p.S286C amino asit değişikliğine neden olur. *HK1* geni literatürde “OR Hereditör Motor ve Duyusal Nöropati (Russe Tipi)” ve “OD Nörogelişimsel Bozukluk” ile ilişkilendirilmiş olup, varyant sınıflaması VUS olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *HK1* geni 10q22.1'de lokalizedir. *HK1*, Glukozun glukoz-6-fosfata fosforilasyonu için ATP kullanarak glukoz metabolizmasındaki ilk adımı katalizler. *HK1*, beyin, eritrositler, trombositler, lenfositler ve fibroblastlar gibi fizyolojik fonksiyonlar için glikoz kullanımına bağımlı dokularda yüksek düzeyde eksprese olur (Bianchi ve ark., 1997). Resesif patolojileri kalıtsal motor ve duysal nöropatiler (AR HMSN), Charcot–Marie–Tooth (CMT) hastalığı kategorisi içinde, bireysel olarak nadir görülen, klinik ve genetik olarak heterojenite gösteren bir gruptur. OR formlar OD formlarla karşılaştırıldığında, daha erken başlangıçlı, artan şiddette ve daha kötü prognoz ile karakterizedirler (Harding ve Thomas, 1980). *HK1* her yerde eksprese edilir ancak beyinde bol miktarda bulunur ve 'beyin tipi heksokinaz' olarak bilinir (Okur ve ark., 2019). Okur ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada nörogelişimsel bozukluklar, yapısal beyin anormallikleri ve görme bozukluğu olan altı bağımsız aileden yedi hastada *HK1*'deki varyantların fenotipini genişleten dört yeni de novo varyant bildirmişlerdir. Ayrıca maternal pregestasyonel hiperglisemi, diyabet ve obezite, NTD'ler için iyi bilinen risk faktörleridir. Ortak bir altta yatan mekanizma olarak, glukoz homeostazındaki dengesizlik, doğrudan NTD'lerin gelişimi ile ilgilidir. Kadınlarda glikoz metabolizmasını düzenleyen genlerdeki polimorfizmler yada varyantlar kadınların NTD'den etkilenmiş bir hamilelik geçirme risklerini etkileyebilir (Fu ve ark., 2015). Üst ekstremitelerde duyu kaybının olmaması, alt ekstremitelerde duyu kaybı varlığı da 15 yaşındaki olgu 4'te belirlenen *HK1* varyantına dikkati çekmektedir. Meningomyelosel varlığı ve eşlik eden patolojileri dikkate

alındığında olguda gelişen fenotip ile *HK*'de tespi ettiğimiz varyant ilişkili görülmektedir.

COL6A3 (Collagen, Type VI, Alpha-3) geninde ve fenotip ilişkisi: *COL6A3* geninde homozigot (NM_004369.4): c.5693T>C varyantı ve p.V1898A amino asit değişikliği tespit edildi. Tespit edilen varyant *COL6A3* geni üzerinde literatürde otozomal resesif kalıtıma sahip “Distoni 27”, hem OD hem OR kalıtıma sahip “Ulrich Konjenital Musküler Distrofi 1” ve hem OD hem OR kalıtıma sahip Bethlem Miyopati 1” ile ilişkili bulunmuştur. Ancak tespit ettiğimiz varyant in-siliko analizlerde VUS olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *COL6A3* 2q37.3 lokalizedir ve kollajenTip VI'nın alfa-3 zincirini kodlar. Kollajen tip VI, kasların ve bağ dokusunun hücre dışı matrislerinde bulunan bir mikrofibriler kollajendir (Reed ve ark., 2005). Kollajen tip VI, sırasıyla *COL6A1*, *COL6A2* ve *COL6A3* genleri tarafından kodlanan alfa 1, alfa 2 ve alfa 3 olmak üzere üç ana alfa zincirden oluşur (Bönnemann, 2011). Kollajen VI ile ilişkili distrofler (*COL6-RD*'ler), kolajen tip VI'nın alt birimlerini kodlayan üç genden herhangi birini içeren, iskelet kaslarını ve bağ dokusunu etkileyen heterozigot veya homozigot patojenik varyantlardan kaynaklanan konjenital müsküler distrofi alt grubudur (O, 1930; Foley ve ark., 2009). Klinik sonuç, hem otozomal resesif ve hem de otozomal dominant kalıtım gösterebilen Bethlem miyopatisi olarak bilinen daha hafif bir formdan Ullrich konjenital müsküler distrofi (UCMD) olarak bilinen ciddi bir forma kadar değişebilir (Toni ve ark., 2014). UCMD, hipotoni, proksimal eklem kontraktürleri ve distal eklem hiperlaksitesinin bir kombinasyonu ile kendini gösteren yavaş ilerleyen bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Foley ve ark., 2009; Bönnemann, 2011). Etkilenen bireyler genellikle normal zekaya sahiptir (Jöbsis ve ark., 1999; Reed ve ark., 2005; Bönnemann, 2011). Distoni-27, yaşamın ilk 2 dekatında esas olarak kranioservikal bölgeyi ve üst ekstremiteleri etkileyen segmental izole distoninin başlangıcı ile karakterize OR nörolojik bir hastalıktır. İzole distoni, sürekli kas kasılmalarından kaynaklanan istemsiz bükülme duruşları ile karakterize bir hastalıktır (Zech ve ark., 2015). Zech ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *COL6A3*'ün yetişkin fare beyni boyunca tespit edilebilen ilgili mRNA seviyeleri ile nöronlarda ifade edildiğini göstermiştir. Veriler, belirli bir *COL6A3* bölgesini etkileyen fonksiyon kaybı

mutasyonlarının, altta yatan nörogelişimsel eksikliklerle resesif izole distoniye neden olduğunu ve distoni patogeneze katkıda bulunan bir beyin hücre dışı matrisini vurguladığını göstermektedir (Zech ve ark., 2015). Olgu 4'te *COL6A3* geninin patojenik varyantları ile ilişkilendirilen çalışmalarda raporlanan bulgulardan konjenital hipotoni semptomları, gecikmiş motor gelişimi, proksimal kas zayıflığı ve normal zeka (Nadeau ve ark., 2009), gibi fenotipik özellikler benzeşmede bu fenotipin olgumuzda NTD'ye sekonder geliştiğini düşünmekteyiz. Tanımladığımız homozigot c.5693T>C varyantının VUS olarak sınıflandırılmış olması bu düşüncemizi desteklemektedir.

Olgu 5: TED analizi sonucunda olgunun fenotipine neden olabileceği düşünülen iki varyant tespit edildi. Bununla birlikte dikkat çekici iki varyant daha belirlenmiştir.

***ITGB2* (Integrin, Beta-2, CD18) geni ve fenotip ilişkisi:** *ITGB2* geninde homozigot (NM_000211.5): c.388TG>C varyantı belirlenmiştir ve bu değişim p.Y130H amino asit değişikliği ile sonuçlanmaktadır. Tespit edilen varyant novel olup, daha önce literatürde bildirilmemekle birlikte in-siliko varyant sınıflandırması likely patojenik olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *ITGB2*, 21q22.3 kromozom bölgesinde yer alır. *ITGB2*, hücre adezyon molekülü için ortak olan CD11A, CD11B ve CD11C (Cluster of Differentiation, yüzey farklılaşma antiijenleri)'den oluşan 3 beta alt birimini kodlar. Lökosit hücre adezyon molekülü, alfa-beta heterodimerleri olan integrinler olarak bilinen hücre zarı glikoproteinleri sınıfına aittir (Hynes, 1992). *ITGB2* geni literatürde "Lökosit Adezyon Defekti" ile ilişkilendirilmiştir. Lökosit adezyon eksikliği (LAD), lökosit hücre adezyon molekülünün beta-2 integrin alt biriminin (CD18) eksikliğinden kaynaklanan OR bir nötrofil fonksiyon bozukluğudur. Lökosit adezyon eksikliği tip I (LAD-I), *ITGB2* genindeki mutasyonların neden olduğu birincil bir immün yetmezliktir. Lökosit hücre adezyon molekülü, periferik kan mononükleer lökositlerinin ve granülositlerinin yüzeyinde bulunur ve hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matris adezyonuna aracılık eder (Parvaneh ve ark., 2010; van de Vijver ve ark., 2012; Madkaikar ve ark., 2015). Hastalar tekrarlayan ve şiddetli bakteriyel enfeksiyonlardan, mantar enfeksiyonlarından ve geç yara iyileşmesinden muzdarip olmaktadır (van de Vijver ve ark., 2012). Olgu 5 uzun süredir enfeksiyon tedavisi görmektedir. Anne babası 2. Derece kuzen evliliği olan

hastanın diğerk iki kardeşinde LAD-1 tanısı vardı. Bu da otozomal resesif kalıtımla uyum göstermektedir.

TOP2B (Topoisomerase, DNA, II, Beta) geni ve fenotip ilişkisi: *TOP2B* geninde heterozigot (NM_001068.3): c.2110A>G varyantı tespit edilmiştir. Varyant p.T704A amino asit değişimine neden olmaktadır. Tespit edilen varyant literatürde OD kalıtıma sahip “Distal Anomaliler ve Ürogenital Malformasyonlarla Seyreden B Hücre İmmünyetmezliği” ile ilişkilendirilmiş olup yapılan in-siliko analizlerde VUS olarak değerlendirilmiştir (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *TOP2B* geni 3p24.2’de lokalize olup 49 kb büyüklüğündedir ve 36 ekzonu vardır. DNA topolojisini düzenleyen ve DNA replikasyonu ve gen transkripsiyonu sırasında topolojik stresi azaltan bir tip II β DNA topoizomerazını kodlayan *TOP2B*’de heterozigot mutasyonlar rapor edilmiştir (Hoffman ve ark., 2001). *TOP2B* aracılı OD immün yetmezliği olan sadece on hasta yayınlanmıştır, hepsinde *TOP2B*’nin DNA geçit alanı olan TOPRIM’i (topoizomeraz-primaz) etkileyen dominant-negatif mutasyonlar bildirilmiştir (Edery ve ark., 2001; Hoffman ve ark., 2001; Tischkowitz ve ark., 2004; Hügle ve ark., 2011; Broderick ve ark., 2019; Papapietro ve ark., 2020). Erdős ve ark. (2021) çalışmalarında iskelet sistemi, kraniofasial, ürogenital ve bağışıklık sistemi gelişimi için önemli olan bu gendeki bir mutasyonun, hipogamaglobulineminin dismorfik özelliklerle kombinasyonu ile sonuçlanabileceğini ve bunu desteklemek için, dismorfik özellikleri olan, tekrarlayan enfeksiyonları olan veya olmayan fiziksel malformasyonları olan hastalarda immüoglobulin düzeylerinin ve B hücre sayısının kontrol edilmesi gerektiğini bildirmektedir. Olgu 5, sol ayağında polidaktilisi, bilateral pevi, hidrosefalisi, tekrarlayan enfeksiyonları, her iki böbreğinin aynı tarafta bulunması, kalça çıkıklığı ve meningomyelosel defektine sahip olmasıyla *TOP2B* geninde heterozigot varyasyon ile ilişkilendirilebilir.

JAG1 (Jagged 1) geni ve fenotip ilişkisi: *JAG1* (Jagged 1) geninde heterozigot (NM_000214.3): c.1613C>T varyantı belirlenmiştir ve ürünü olan proteinde p.A538V amino asit değişikliğine sebep olmaktadır. *JAG1* geni literatürde OD kalıtıma sahip

‘Charcot-Marie-Tooth Aksonal tip 2 HH’ ile ilişkilendirilmiştir. Varyant sınıflaması VUS olarak verilmiştir (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *JAG1* geni 20p12.2 lokalize olup, 28 bp ile 2.284 bp arasında değişen 26 eksona sahiptir. *JAG1*, notch reseptörünün bir ligandıdır. Bağlanma sonucu reseptörün hücre içi zardan salınmasını sağlayan ve çekirdeğin yer değiştirmesine izin veren bir proteolitik bölünme kademesini tetikler. Hücre farklılaşması ve morfogenezde anahtar rol oynayan transkripsiyon faktörlerini aktive eder (Guarnaccia ve ark., 2004). Notch sinyali, normal doku gelişimi ve homeostazda sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve pleiotropik rollere sahip, yüksek oranda korunmuş hücreler arası bir yoldur (Sullivan ve ark., 2020). Li ve ark. (2006), *JAG1*'in sıçanlarda Notch sinyalini aktive ettiğini ve mezenkimal kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaşmasını arttırdığını bildirdi. Aksonal Charcot-Marie-Tooth hastalığı tip 2HH'nin (CMT2HH), *JAG1* genindeki heterozigot mutasyondan kaynaklanmaktadır. Sullivan ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada Kanonik Notch ligandı *JAG1*'in OD mutasyonlarını, kalıtsal aksonal nöropati Charcot-Marie-Tooth hastalığı tip 2 (CMT2) periferik sinir hastalığının bir nedeni olarak tanımladılar. Modifikasyon ve lokalizasyon çalışmaları, mutasyonların protein glikozilasyonunu bozduğunu ve *JAG1* hücre yüzeyi ekspresyonunu azalttığını gösterdi. Heterozigot CMT2 ile ilişkili mutasyonları barındıran fareler, hafif periferik nöropati sergileyerek *JAG1*'in özellikle rekürren laringeal sinirde periferik sinir bütünlüğünü korumadaki kritik rolünü vurguladı. Periferik sinir sistemi içinde *JAG1* hem aksonlar hem de Schwann hücreleri tarafından ifade edilirken, Notch reseptör ifadesinin esas olarak Schwann hücrelerinde meydana geldiği bildirilmektedir (Woodhoo ve ark., 2009; Hu ve ark., 2017). Zhang ve ark. (2014) çalışmalarında içinde *JAG1*'in de olduğu altı hedef geni (*HNRPU*, *JAG1*, *FMR1*, *EGR3*, *RUNX1T1* ve *NDEL1*) içeren aday genlerin beyin yapısının gelişiminde rol oynadığını ve bu sebeple konjenital doğum anormallikleri ile ilişkili olabileceklerini bildirmişlerdir. Çalışmada miRNA'lar aracılığıyla seçilen hedef genlerin ekspresyonu azaltılarak, bu genlerin MAPK (Mitojenle aktive olan bir protein kinaz) sinyal yolu üzerinden anensefali etyopatogenezine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir. *JAG1* geninin, Notch sinyal yolağı ve WNT sinyal

yolağının aktivasyonundaki görevi; Olgu 5’de tespit ettiğimiz *JAG1* c.1613C>T varyantının NTD etiyojisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

***GBE1* (Glycogen Branching Enzyme) geni ve fenotip ilişkisi:** *GBE1* geninde heterozigot (NM_000158.4): c.986A>G varyantı tespit edildi, bu varyantın p.Y328C amino asit değişikliğine neden olduğu bilinmektedir. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde patojenik olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). Tespit edilen varyant literatürde OR “Glikojen Depo Hastalığı Tip IV” ile ilişkilendirilmiştir. Olgu 5 heterozigot tespit edildiğinden taşıyıcı olarak değerlendirildi.

Olgu 6: TED analizi sonucunda olgunun fenotipi ile ilişkilendirilen üç varyant tespit edilmiştir.

***ODC1* (Ornithine Decarboxylase 1) geni ve fenotip ilişkisi:** *ODC1* (Ornithine Decarboxylase 1) geninde heterozigot (NM_002539.3): c.250G>A varyantı tespit edildi. Varyant p.G84R amino asit değişikliğine neden olmaktadır. *ODC1* geni literatürde OD “Bachmann-Bupp Sendromu” ile ilişkilendirildi. Varyant sınıflaması Likely Benign olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *ODC1* geni 2p25.1 kromozom bölgesinde yer alır. *ODC1*, endojen poliamin sentezinde hız sınırlayıcı enzimi kodlar. Poliaminler, hücresel çoğalmanın düzenlenmesi, hücre içi sinyalleme ve iyon kanallarının modülasyonu dahil olmak üzere insanlarda bir dizi hayati fonksiyona hizmet eder (Rodan ve ark., 2018). Embriyogenez, organogenez ve neoplastik hücre büyümesi dahil olmak üzere fizyolojik ve hücre gelişim süreçlerinde önemli bir rol oynar (Bupp ve ark., 2018). *ODC1*’in, şizofreni, duygudurum bozuklukları, anksiyete, epilepsi, öğrenme güçlüğü ve intihar davranışı gibi psikiyatrik ve nörolojik bulgular ve kanser gibi ek hastalıklarla bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Prokop ve ark., 2021). *ODC1* aktivitesi ve poliamin üretimi, implantasyondan fetal duruma kadar embriyonik gelişim sırasında kilit rol oynar (Hussain ve ark., 2017). 2019’da, deoksihipusin sentazdaki (DHPS) fonksiyon kaybı varyantları tarafından bozulan poliamin metabolit işleminin aynı zamanda global gelişimsel gecikme ve çoklu nörolojik fenotiplerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ganapathi ve ark., 2019). Bachmann-Bupp sendromu (BABS), gelişimsel gecikme,

alopesi dahil ektodermal anormallikler, mutlak veya göreceli makrosefali, dismorfik özellikler ve karakteristik nörogörüntüleme özellikleri ile ilişkili bir nörometabolik bozukluktur (Rodan ve ark., 2018). Rodan ve ark. (2018) , BABS ile ilişkisiz 4 hastada *ODC1* geninde de novo heterozigot mutasyon tanımladı. BABS'li 32 aylık bir kız çocuğunda *ODC1* geninde bir de novo heterozigot nonsense mutasyon tanımladı (Bupp et al. (2018). Olgu 6'damevcut olan skolyoz, gelişim geriliği, ayağında polidaktili, sağ elde 5. parmak distalinde kemik çıkıntısı, alt ekstremitede spastisite gibi dismorfik özellikler ve nörometabolik bulgular literatüre sunulan *ODC1* 'in heterozigot patojenik mutasyonları ile ilişkilendirilen vakalar ile uyumludur.

***NLRP12* (NLR Family, Pyrin Domain-Containing 12) geni ve fenotip ilişkisi:** *NLRP12* geninde heterozigot (NM_144687.4): c.1054C>T varyantı tespit edildi, bu varyant proteinde p.R352Camino asit değişikliğine neden olmaktadır. Tespit edilen varyant literatürde “OD Familial Soğuk Otoinflamatuvar Sendrom 2” ve “Otoinflamatuvar Hastalıklara Yatkınlık” ile ilişkilendirilmiş olup, in-siliko analizlerde VUS olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *NLRP12* geni 19q13.42'de lokalizedir. NLR (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing) ailesi üyesi olan lösinden zengin pyrin alanı içeren protein 12 (*NLRP12*, Monarch-1) olarak da adlandırılır. *NLRP12*, CATERPILLER (nükleotid oligomerizasyon alanı benzeri reseptörler olarak da bilinir) stoplazmik protein ailesinin bir üyesidir ve bir model tanıma reseptörü olarak doğuştan gelen bağışıklık tepkisini düzenlemede rol oynar. Enflamasyonu bastırmak için esas olarak NF- κ B (nükleer faktör kappa B) aktivasyonunu aşağı regüle eder ve bu nedenle anti-inflamatuvar bir rol oynar (Williams ve ark., 2005). Ancak bazı uyaranlara yanıt olarak proinflamatuvar protein görevi de görerek IL-1 β (interlökin-1 B) ve IL-18 (interlökin-18) sentezini artırır (Tuncer ve ark., 2014). Bu bulgular, *NLRP12*'deki patojenik varyantların teorik olarak hem az aktif hem de aşırı aktif inflamatuvar yanıtlara neden olabileceği ve aşırı aktifse otoinflamatuvar koşullara yol açabileceği yönünde yorumlanabilir. *NLRP12* ile ilişkili hastalıkta tekrarlayan enfeksiyonlar da bildirilmiştir (Kostik ve ark., 2018). Ayrıca ailesel soğuk otoinflamatuvar sendrom-2 (FCAS2), epizodik ve tekrarlayan döküntü, ürtiker, artralji, miyalji ve baş ağrısı ile karakterize OD otoinflamatuvar bir hastalıktır. Çoğu hastada bu ataklara ateş ve serolojik

inflamasyon eşlik eder. Hepsi olmasa da çoğu hastada, ataklar için bir tetikleyici olarak soğuğa maruz kaldıkları bildirilmektedir. Ek özellikler karın ağrısı, göğüs ağrısı ve sensörinöral sağırlığı içerebilir. Başlangıç yaşı, yaşamın ilk yılından orta yaşı kadar değişkendir, şiddeti ve klinik fenotipi heterojendir (Shen ve ark., 2017). Hastalık ileri yaşlarda gözlenebilen heterojeniteye sahip klinik fenotip gösterdiğinden 6 yaşındaki olgumuz düzenli olarak takip edilerek bulguları değerlendirilecektir.

HS6ST1 (Heparan Sulfate 6-O-Sulfotransferase 1) geni ve fenotip ilişkisi: *HS6ST1* geninde heterozigot tespit edilen (NM_004807.3): c.1144C>T varyantı p.R382W amino asit değişimine neden olmaktadır. Tespit edilen varyant literatürde OD ‘Hipogonadotropik Hipogonadizm 15’ için artmış risk ile ilişkilendirilmiş olup, in-siliko analizlerde VUS olarak sınıflandırıldı (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *HS6ST1* geni 2q14.3 kromozom bölgesinde yer alır. Heparan sülfat enzim ailesinin bir üyesi olan 6 - O-sülfataz enzimini kodlar. Protein normal nöronal gelişimde ve uzuv gelişiminde rol oynar. Nematodlarda, HS6- O –sülfat ile anosmin-1 etkileşime girer ve FGFR1 (Fibroblast growth factor receptor 1) ve FGF8 (Fibroblast growth factor 8)’in işlevinde yer alır (Tornberg ve ark., 2011). Memelilerde üreme sistemi gelişimi ve kontrolü, gonadotropin salgılatıcı hormon-1’i (GnRH-1) salgılayan ve hipofiz-gonadal eksenini kontrol eden, hipotalamusta bulunan spesifik nöronlara bağlıdır. Embriyogenez sırasında bu nöronlar nazal plakoddan köken alır ve olfaktör-vomer nazal sinirler boyunca ön beyne göç eder (Nachtigall ve ark., 1997; Valdes-Socin ve ark., 2010). Bu göç sürecindeki değişiklikler, idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (İHH) gibi heterojen genetik bozukluklara, cinsel olgunlaşma ve yetersizlik ile karakterize edilen diğer üreme hastalıklarına neden olan kusurlu GnRH-1 salgılanmasına yol açar (Valdes-Socin ve ark., 2010; Lippincott ve ark., 2013). Bazı çalışmalar ayrıca 6-O-endosülfataz enzimlerinin proliferasyon ve mitojenik aktivite üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Dai ve ark., 2005; Kamimura ve ark., 2006). Tillo ve ark. (2016) çalışmalarında gelişen sinir sisteminde nöronların doğru göçünün sinir ağlarının uygun modellenmesi ve işlevi için esas olduğunu bildirmiştir. Burada, heparan sülfat proteoglikanlarını (HSPG'ler) değiştiren bir enzim sınıfı olan O-sülfotransferazların, nöronal göçü ve akson gelişimini düzenlemek için gerekli olduğunu bildirmişlerdir. 6-O-sülfotransferazlar *HS6ST1* ve

HS6ST2'nin kranial akson modellemesi için gerekli olduğunu, 2-O-sülfotransferaz *HS2ST*'nin (Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransferase) arka beyindeki yüz branşman (FBM) nöronlarının göçünü düzenlemek için önemli olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *HS2ST*'nin arka beyindeki diğer sinyallerle nasıl etkileşime girdiğini araştırarak fibroblast büyüme faktörü sinyalinin FBM nöron göçünü *HS2ST*'ye bağlı bir şekilde düzenlediğini göstermişlerdir. İlişkilendirilen Hipogonadotropik Hipogonadizmde bildirilen amenore, gecikmiş yada meydana gelmeyen ergenlik, osteopeni, osteoporoz, gecikmiş veya olmayan puberte, düşük serum estradiol gibi bulgular 6 yaşındaki olgumuzda ilerleyen dönemde takip edilecektir. Olgumuzdaki nörolojik gelişimsel bozuklukların ise varyant ile birlikteliği dikkat çekicidir.

Olgu 7: Olgu 7'de fenotip ile ilişkilendirilen iki varyant tespit edildi.

***DLL1* (Delta-Like Canonical Notch Ligand 1) geni ve fenotip ilişkisi:** *DLL1* geninde heterozigot (NM_005618.4): c.1330G>C varyant değişimi ve p.V444L amino asit ikamesi tespit edildi. Tespit edilen varyant novel olup daha önce literatürde bildirilmemekle birlikte, in-siliko analizlerde VUS olarak sınıflandırıldı (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *DLL1* geni literatürde OD “Non-spesifik Beyin Anomalileri ile Seyreden Nörogelişimsel Bozukluk” ile ilişkilendirilmiştir. *DLL1* geni 6q27'de lokalize olup, hücre farklılaşması ve kaderinde rol oynayan bir Notch ligandını kodlar. *DLL1*, *Drosophila* notch ligandı delta geninin insan homologudur, sinir sistemi ve somit gelişiminde önemli rolü vardır (Gray ve ark., 1999; Fischer-Zirnsak ve ark., 2019). Galceran ve ark. (2004), fare LEF1 (Lenfoid Arttırıcı-Bağlama Faktörü 1)'in, in vitro ve in vivo olarak *DLL1* promotöründe birden fazla bölgeye bağlandığını ve LEF1 promotor bölge mutasyonlarının, fare embriyosunda presomitik mezoderimde raportör transgen ekspresyonunu bozduğunu bildirmiştir. *DLL1*, embriyogenez sırasında nöronal öncü hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir (Cao ve ark., 2019). Rios ve ark. (2011), civciv iskelet kasının morfogenezinde meydana gelen sinyal yollarını karakterize etmiş ve somitlerde bulunan kas progenitörlerinin, terminal farklılaşmaya geçmek için Notch sinyallemesinin geçici aktivasyonunu gerektirdiğini göstermiştir. Bilindiği gibi Notch sinyal yolağı hem embriyonik gelişimde hem de organ homeostazında hücre kaderinin

belirlenmesinde önemli rol oynar. Notch, hücre döngüsü, gelişim ve sağ kalım ile ilgili yolları içeren geniş ağlar boyunca apoptozu düzenler (Yağcı ve Güneş, 2017). Notch Ligandı Delta1, somitleri geçen nöral krest hücrelerinde mozaik bir modelde ifade edilir. Nöral krestte Delta1 fonksiyonunun kazanımı veya kaybı, somitlerdeki Notch sinyalini değiştirir, bu da gecikmiş veya erken miyogenez ile sonuçlanır. *DLL1*, osilasyon ve yanal inhibisyon yoluyla nöronal farklılaşmayı düzenler, farklılaşan nöronlar, Notch sinyallerini salınımlı bir şekilde ifade ederek komşu hücrelerin nöronal farklılaşmadan geçmesini engeller (Artavanis-Tsakonas ve ark., 1999; Louvi ve Artavanis-Tsakonas, 2006; Shimojo ve ark., 2011). Bu yolla Notch sinyali beyin morfogenezini etkiler. Farelerde *DLL1* kaybı, nöronal farklılaşmayı artırarak merkezi sinir sistemi hiperplazisine ve nöron sayısında artışa neden olur (Hrabě de Angelis ve ark., 1997; Yun ve ark., 2002; Marklund ve ark., 2010). *DLL1* zebra balığı ortologu DeltaA'daki (dIA) Delta-NOTCH sinyal bozucu mutasyonlar, arka beyinde çok çeşitli kusurlara ve yanal inhibisyon eksikliği nedeniyle nöronların aşırı üretimine neden olur (Riley ve ark., 2004). Çok sayıda çalışma, nöronal göç dahil olmak üzere nöronal gelişimde Notch sinyalinin rollerini tanımlamaktadır (Louvi ve Artavanis-Tsakonas, 2006). Ayrıca *DLL1*'deki varyantların insanlarda holoprozensefali ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Bu hipotez, *DLL1*'i kapsayan 6q delesyonlarının saptanmasına, özellikle de holoprozensefali olan probandlarda çerçeve içi delesyonun ve yanlış anlamlı varyantın saptanmasına dayanır (Dupé ve ark., 2011; Dubourg ve ark., 2016). Her ne kadar literatürde *DLL1* varyantları ile raporlanan bireylerdeki bazı (skolyoz, Gecikmiş gelişim, yürüyememe vb) bulgular olgu 7 ile benzeşse de bu bulguların *DLL1* varyantı ile ilişkisinin açıklanması için ileri düzey çalışmalar gereklidir. Ancak notch sinyal yolağındaki görevi literatür ile birlikte ele alındığında tespit ettiğimiz *DLL1* varyantının, NTD oluşumundaki rolü üzerinde çalışılması gerektiği açıktır.

CACNA1C (Calcium Channel, Voltage-Dependent, L Type, Alpha-1C Subunit)

geni ve fenotip ilişkisi: *CACNA1C* geninde heterozigot (NM_001167624.3): c.5068_5070delGCT varyantı ve p.A1690del amino asit ikamesi tespit edildi. *CACNA1C* genindeki missense mutasyonlar literatürde OD “Timothy Sendromu” ve “Uzun QT Sendromu” ile ilişkilendirilmiş olup, tespit ettiğimiz varyant ise VUS olarak sınıflandırıldı (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi:

07.10.2022). *CACNA1C* geni 12p13.33 lokalize, yaklaşık 150 kb'lık 44 değişmez ve 6 alternatif ekzondan oluşur. L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı CaV1.2'nin gözenek oluşturan alfa-1C alt biriminin çoklu izoformlarını kodlar. Kalpte, akciğerlerde, beyinde ve düz kasta eksprese edilen evrimsel olarak korunmuş bir proteindir. Kalsiyum sinyali, hücrel ve nöronal uyarılabilirlik, kas kasılması ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi için kritik öneme sahiptir (Bozarth ve ark., 2018). Timothy sendromu (TS), belirgin QT uzaması, doğuştan kalp kusurları, sindaktili, nöbetler, bilişsel ve davranışsal anormallikler, immün yetmezlik ve hipoglisemi ile karakterize, oldukça nadir görülen bir multisistem hastalığıdır (Walsh ve ark., 2018). TS'de mutasyon, açık durumdaki voltaja bağlı L-tipi kalsiyum kanallarının bozulmuş inaktivasyonuna neden olur, bu da nispeten sürekli bir Ca^{2+} akımıyla sonuçlanır (Yarotskyy ve ark., 2009). CaV1.2 L tipi voltaj kapılı kalsiyum kanallarının alfa-1 alt birimini kodlayan *CACNA1C*'deki varyasyon, şizofreni ve bipolar bozukluk dahil olmak üzere psikiyatrik bozukluk riskiyle güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Tigaret ve ark., 2021).

Olgu 8: Olgu 8'de fenotip ile ilişkilendirilen üç varyant tespit edildi.

***MAPK8IP3* (Mitogen-Activated Protein Kinase 8-Interacting Protein 3) geni ve fenotip ilişkisi:** *MAPK8IP*'de heterozigot

(NM_001040439.2): c.602+7_602+56delGGGGCGCGGCGGGG

TGGAGGTACGCGGGGCGCGGCGGGGCGGAGGTACGC varyantı tespit edildi.

Tespit edilen varyant literatürde OD “Beyin Anomalilerinin Eşlik Edebildiği Nörogelişimsel Bozukluk” ile ilişkilendirildi. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde patojenik olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *MAPK8IP3* geni 16p13.3'de lokalize olup, kinesin süper ailesinin bir üyesini kodlar ve aksonal taşımada rol oynar (Iwasawa ve ark., 2019). Kargoyu dynein ve kinesin motorlarına bağladığı varsayılan bir adaptör protein olan *MAPK8IP3*'teki de novo varyantların nörogelişimsel bozuklukları olan çocuklarda bildirilmiştir (Cavalli ve ark., 2005; Drerup ve Nechiporuk, 2013; Gowrishankar ve ark., 2017, 2021; Cockburn ve ark., 2018). Son yıllarda yapılan iki bağımsız çalışmada, zihinsel engelli bireylerde *MAPK8IP3*'ün de novo varyantları perisylvian polimikrogiri, serebral veya serebellar atrofi ve korpus kallozum hipoplazisi dahil beyin anomalileri ile

birlikte bildirilmiştir (Iwasawa ve ark., 2019; Platzer ve ark., 2019). Snead ve Gowrishankar (2022) çalışmalarında, *MAPK8IP3*'ün nöronlarda toplu endositozun düzenleyicisi olabileceğini ve değiştirilmiş endositik alımın *MAPK8IP3*'e bağlı nörogelişimsel bozukluklarda rol oynayabileceğini göstermektedir. Olgu 8'de mevcut olan skolyoz, zihinsel ve gelişimsel gerilik, yürüyememe, bozulmuş entelektüel gelişim, konuşamama, spastisite, yürüme dengesizliği bulgularıyla seyir eden nörogelişimsel bozukluklar literatürde *MAPK8IP3* ile birlikteliği rapor edilen fenotipler ile örtüşmektedir. Bu bulgular eşliğinde *MAPK8IP3* 'de tespit ettiğimiz varyantın Olgu 8'in fenotipini açıklayabileceğini düşünmekteyiz.

CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) geni ve fenotip ilişkisi: *CFTR* geninde heterozigot (NM_000492.4): c.3674C>T varyantı ve p.A1225V amino asit değişimi tespit edildi. Tespit edilen varyant literatürde OR “Kistik Fibrozis” ile ilişkilendirilmiştir. Varyant heterozigot olarak tespit edildiğinden olgumuz taşıyıcı olarak değerlendirildi. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde VUS olarak değerlendirildi (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *CFTR* geni 7q31.2 kromozomal bölgede yer alır. Kistik fibrozis, epitel hücrelerinde klorür kanallarının şeklini veren ve bu kanallardan klorür iyonlarının akışını regüle eden bir membran glikoproteini olan kistik fibrozis trans membran kondüktans regülatörünü (*CFTR*) kodlayan gendeki mutasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır (Kerem ve ark., 1989; Welsh ve Smith, 1993). Kistik fibrozis (KF) klasik olarak kronik obstrüktif akciğer hastalığı, ekzokrin pankreas yetmezliği ve terde sodyum ve klorür konsantrasyonunun yükselmesi bulgularıyla gözlenmektedir (Cutting 2002).

GABRD (Gamma-Aminobutyric Acid Receptor, Delta) geni ve fenotip ilişkisi: *GABRD* geninde heterozigot (NM_000815.5): c.1141C>G varyantı ve p.R381G amino asit ikamesi tespit edildi. *GABRD* geni literatürde OD “Değişken Fenotipik Özelliklerde Epilepsi” ile ilişkilendirildi. Tespit ettiğimiz varyant VUS olarak sınıflandırıldı (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *GABRD* geni 1p36.33'de lokalize olup 17 ekzondan oluşur. Memeli beynindeki başlıca inhibitör nörotransmitter olan gama-aminobütirik asit (GABA) için ligand kapılı klorür kanalının

bir alt birimini kodlar (Windpassinger ve ark., 2002). *GABRD* mutasyonları, nöbet duyarlılığı ile sonuçlanır (Dibbens ve ark., 2004). GABA, epilepsinin etiyojisi ve tedavisinde her zaman dikkat çeken bir hedef olmuştur. *GABRA1* (Gamma-Aminobutyric Acid Receptor, Alpha-1), *GABRG2* (Gamma-Aminobutyric Acid Receptor, Gamma-2) ve *GABRD* genleri, sırasıyla GABA-A reseptör proteininin $\alpha 1$, $\gamma 2$ ve δ alt birimleri için talimatlar verir. GABA-A, en önemli proteinlerden biri olarak kabul edilir ve birçok nörolojik bozuklukta önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Bhat ve ark., 2018). *GABRD* varyantları, idiyopatik generalize epilepsi-10 (EIG10), febril nöbet plus tip 5 (GEFSP5) ve juvenil miyoklonik epilepsi-7 (EJM7) ile birliktelik göstermiş ve epilepsiye yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Dibbens ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, GEFS+'lı bir ailenin etkilenmiş 2 üyesinde *GABRD* geninde heterozigot mutasyon tanımlamıştır. Etkilenmemiş annenin de mutasyonu taşıması bunun bir yatkınlık alelini temsil ettiğini göstermiştir. GABA-A reseptörleri nöronal inhibisyona aracılık ettiğinden, varyantla ilişkili azalmış reseptör akımının artan nöronal uyarılabilirlik ile ilişkili olabileceğini ve yaygın genelleştirilmiş epilepsilere katkıda bulunabileceğini gösterdiler. Olgu 8'in devamlılık gösteren epileptik nöbetleri *GABRD* varyantlarının sebep olduğu değişken fenotipik özelliklerde epilepsi kliniği ile uyum göstermektedir.

Olgu 9: Olgu 9'da fenotip ile ilişkilendirilen üç varyant tespit edildi.

EDA (Ektodisplasin A) geni ve fenotip ilişkisi: *EDA* geninde bir heterozigot (NM_001399.5): c.1121G>A varyantı ve p.S374N amino asit ikamesi tespit edildi. Tespit edilen varyant novel olup daha önce literatürde bildirilmemekle birlikte, in-siliko analizlerde Likely Patojenik olarak sınıflandırıldı (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *EDA* geni literatürde “Ektodermal Displazi 1 (Hipohidrotik)” ve “Selektif Diş Agenezi 1” ile ilişkilendirilmiştir. İlişkilendirilen hastalıkların hem X'e bağlı dominant hem de X'e bağlı resesif kalıtımla uyum göstermesi klinik açıdan önemlidir. *EDA* geni Xq13.1 kromozom bölgesinde yer alır. Diş agenezisi, gelişimsel bir başarısızlık nedeniyle dişlerin yokluğunu içeren patolojik bir durumdur (De Coster ve ark., 2009). Sendromik olmayan (selektif) diş agenezisi (NSTA) en yaygın diş anomalilerinden biridir ve *EDA* geni de dahil birkaç varyantla

ilişkili olduğu bilinmektedir (Arte ve ark., 2013). Bunlardan *EDA*, *EDAR* (Ectodysplasin A Receptor), *EDARADD* (EDAR-Associated Death Domain) ve *WNT10A* (Wingless-Type Mmtv Integration Site Family, Member 10A), hem sendromik olmayan diş agenezisi hem de sendromik diş agenezisi (STA) için aday genlerdir. *EDA*'nın, TNF reseptör süper ailesinin bir üyesi olan *EDAR*'a spesifik olarak bağlandığı ve NF- κ B 'yi aktive ettiği gösterilmiştir (Yan ve ark., 2000). *EDA*-*EDAR*-NF- κ B sinyal yolu, WNT ve BMP yollarıyla çapraz ilişkilidir (Shen ve ark., 2016). Aynı zamanda embriyonik ektodermal gelişimde önemli rol oynar (Koppinen ve ark., 2001; Cluzeau ve ark., 2011). *EDA*, hipohidrotik ektodermal displazi (HED) vakalarının %95'ini oluşturduğu bilinen tek genidir. Tespit ettiğimiz novel *EDA* (NM_001399.5): c.1121G>A varyantı *EDA*'nın patolojik mutasyonlarının dominant ya da resesif fenotipik etkilerini Olgu 9'da oluşturmamıştır. Bu durumu söz konusu varyantın likely patojenik sınıflandırması yada resesif karakterli bir varyant olmasıyla uyumlu görmekteyiz.

***BRPF1* (Bromodomain- and PHD Finger-Containing Protein) geni ve fenotip ilişkisi:** *BRPF1* geninde heterozigot (NM_004634.3): c.479C>A varyantı ve p.S160Y amino asit ikamesi tespit edildi. Tespit edilen varyant novel olup daha önce literatürde bildirilmemiş ve VUS olarak sınıflandırılmıştır (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). *BRPF1* geni literatürde OD “Dismorfik Yüz ve Pitoz ile Seyreden Entelektüel Gelişim Bozukluğu” ile ilişkilendirilmiştir. *BRPF1* geni 3p25.3 kromozom bölgesinde yer alır. Histon asetiltransferazlarla etkileşime giren ve bunları aktive eden, böylece epigenetik düzenlemede rol oynayan bir kromatin düzenleyici kodlar. *BRPF1*, lizin 23'te (H3K23) histon H3'ün asetilasyonunu teşvik etmek için bir kompleks içinde hareket etmekle görevlidir. Fonksiyonel çalışmalar, ortaya çıkan *BRPF1*'deki varyantların patojenik olduğunu ve histon H3'ün asetilasyonunu bozarak histon H3 asetilasyon eksikliğine ve bir zihinsel engellilik sendromuna neden olduğunu göstermektedir (Yan ve ark., 2017). *BRPF1* üç farklı lizin asetiltransferazın ana aktivatörü olarak işlev görür ve ayrıca histon bağlanması için çoklu yapısal alanlar içerir. You ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, fare *BRPF1* geninin ön beyne özgü inaktivasyonunun, hipokampusun önemli bir bileşeni olan dentat girusun anormal gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. *BRPF1* kaybının, dentat girusun gelişimi sırasında nöronal göçü ve hücre döngüsü ilerlemesini

düzensizleştirdiğini ve hipokampus üzerinde, özellikle de öğrenme, hafıza ve yetişkin nörojenezi için kritik bir epigenetik düzenleyici olduğunu bildirmişlerdir. Son birkaç yılda, de novo veya kalıtsal *BRPF1* mutasyonlarının neden olduğu toplam 40 klinik zihinsel engelli vaka rapor edilmiştir (Perteve ark., 2016; Marrus ve Hall, 2017; Baker ve ark., 2019, 2019; Yan ve ark., 2020). Dismorfik yüz ve pitozis ile birlikte seyreden entelektüel gelişimsel bozukluk; gecikmiş psikomotor gelişim, zihinsel yetersizlik, gecikmiş dil ve dismorfik yüz özellikleri ile karakterize OD bir nörogelişimsel bozukluktur. Ek özellikler, zayıf büyüme, hipotoni ve nöbetleri içerir (Mattioli ve ark., 2017). Olgu 9’da belirlenen entelektüel gelişimsel bozukluk, psikomotor gelişim geriliği, zihinsel yetersizlik, konuşamama literatürde *BRPF1* varyantları ile ilişkilendirilen vakalarla benzerlik göstermektedir.

***PIGV* (Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class V Protein) geni ve fenotip ilişkisi:** *PIGV* geninde heterozigot (NM_017837.4): c.1022C>A varyantı ve p.A341E amino asit ikamesi tespit edildi. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde patojenik olarak sınıflandırıldı (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022). Tespit edilen varyant literatürde OR kalıtılan ‘Mental Retardasyonla Seyreden Hiperfosfataz Sendromu 1’ ile ilişkilendirilmiştir. Mental retardasyonla ile seyreden hiperfosfataz 1 sendromu, zeka geriliği, nöbetler ve hipotoni gibi çeşitli nörolojik anormallikler ve hiperfosfatazi ile karakterize OR geçişli bir hastalıktır. *PIGV* geni 1p36.11 kromozom bölgesinde yer alır. Glikosilfosfatidilinositol (GPI), birçok proteini hücre yüzeyine sabitleyen bir glikolipiddir. Şekerlerin ve diğer bileşenlerin fosfatidilinositole eklenmesi GPI'nin biyosentetik yoluna aracılık eder. *PIGV*, GPI çekirdeğine ikinci mannozu eklemekle görevlidir (Kang ve ark., 2005). *PIGV*'deki patojenik germ hattı mutasyonları, glikosilfosfatidilinositol biyosentez eksikliğine (GPIBD) yol açar. GPI-ankor yolu genleri patojenik mutasyonlu bireylerde, bilişsel bozukluklar, motor gecikme ve sıklıkla epilepsi görülür (Rodríguez de Los Santos ve ark., 2021). Krawitz ve ark. (2010), mental retardasyon sendromlu hiperfosfatazyalı 3 Alman kardeşte Olgu 9’da da tespit edilen *PIGV* geninde (A341E) homozigot mutasyon tanımladı. Tespit edilen varyant in-siliko analizlerde patojenik olarak değerlendirilmekle birlikte olgu heterozigot olduğundan taşıyıcı olarak değerlendirildi.

6. SONUÇ

NTD, 1000 doğumda 1-2 kişiyi etkileyen, erken gelişim sırasında tam olmayan nöral tüp kapanmasından kaynaklanan bir grup konjenital malformasyonu ifade eder (Marco ve ark., 2006; Bassuk ve Kibar, 2009). NTD'nin en yaygın biçimleri açık NTD olarak adlandırılır ve sırasıyla nöral tüpün kranial ve spinal bölgesindeki füzyon başarısızlığından kaynaklanan anensefali ve miyelomeningosel (MMC veya spina bifida) içerir (Rossi ve ark., 2004). Bu malformasyonların ciddiyeti asemptomatikten felce veya doğum öncesi ölüme kadar değişir. Fenotipteki bu geniş yelpaze, NTD'ye yol açan ilk hakaretteki zamansal veya uzamsal farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir (Bassuk ve Kibar, 2009). NTD epidemiyolojisine ilişkin çalışmalar genel olarak, çevresel ve genetik faktörlerin NTD oluşumunda ortak bir rolü olduğunu öne sürmektedir (Loeken, 2005). Nöral tüp defektleri, %60'lık bir kalıtsallığa sahip sağlam bir genetik bileşene sahiptir (Bassuk ve Kibar, 2009). Yapılan çalışmalar fare NTD'sinde Mendel tarzında ayrıışan ~250'den fazla nedensel gen tanımlamış olsa da, NTD'nin insandaki genetik bileşeni büyük ölçüde bilinmemektedir (Harris ve Juriloff, 2010).

Çalışmamızda dokuz meningomyeloselli olguda ekzom dizileme yöntemiyle elde ettiğimiz varyantları NTD ve olgularda eşlik eden diğer patolojik fenotipler ile ilişkileri açısından değerlendirdik. Dokuz olgudan 6'sında NTD patogenezi ile çeşitli moleküler yollar üzerinden ilişkili olabileceğini düşündüğümüz 11 varyant dikkati çekmiştir. Bunlar olgu 1'de BPTF NM_004459.7: c.4922C>T ve FGFR1NM_002274067.2: c.33C>G, olgu 4'de TRIM71 NM_001039111.3: c.1789G>A, NARS1NM_004539.4: c.1067A>C ve HK1 NM_033500.2: c.856A>T, olgu 5'de TOP2B NM_001068.3: c.2110A>G ve JAG1 NM_000214.3: c.1613C>T, olgu 6'da ODC1 NM_002539.3: c.250G>A ve HS6ST1 NM_004807.3: c.1144C>T, olgu 7'de DLL1 NM_005618.4: c.1330G>C, olgu 8'de MAPK8IP3NM_001040439.2:c.602+7_602+56del'dir. Bununla birlikte olgularda NTD'ye eşlik eden ve fakat NTD'ye sekonder gelişip gelişmediği konusunda ayırıcı verilere ulaşamadığımız diğer patolojik fenotipler ile ilişkilendirdiğimiz daha önce literatüre sunulmuş yedi varyant belirledik.

Çalıştığımız kohortta dikkate değer şekilde nörolasyon yada nörolojik defektler ile ilişkilendirilen genlere ait bir yük birikimi gözledik. Nöral tüp oluşumunda önemli olan hücresel yeniden düzenlemeler, hücrelerin göç potansiyeli, apoptoz, hücre iskeleti ve hücre dışı matris arasındaki temel sinyal iletimi gibi süreçler ile bağlantılı olabilecek genlerde fonksiyon kaybına neden olan her varyant NTD oluşumu için aday niteliğindedir. Bu çalışma ile:

- Ciddi NTD formlarından biri olan meningomyelosel oluşumunda rol oynayabilecek varyantları tanımlayabildik
- NTD'nin etiyolojisi ile daha önce ilişkilendirilmemiş novel varyantları belirledik
- Elde ettiğimiz sonuçlar tespit ettiğimiz varyantların NTD üzerindeki potansiyel etkisi ve/veya olgularda NTD fenotipinin penetrasyonunu modüle eden çevresel faktörlerin varlığını düşündürür.

Sonuç olarak, bu çalışmada, NTD'nin karmaşık genetik bileşenini deşifre etmede TED'in geçerliliğine vurgu yapıldı. Bununla birlikte kohortumuzun küçük örneklem boyutunun sınırlamalarına ve gerekli olan aile çalışmalarının yapılamaması çalışmamızın sınırlarını daraltmaktadır.

Daha büyük NTD kohortlarında yapılacak TED çalışmaları, NTD'nin karmaşık genetiğini deşifre etmede etkili olacak ve etkilenen ailelerde kişiselleştirilmiş genetik danışmanlık stratejileri geliştirmeye yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Afman, L.A., van der Put, N.M., Thomas, C.M., Trijbels, J.M., Blom, H.J. (2001) "Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects." *QJM*. 94 pp.159-66.
- Ackermann, F., Zittronski, N., Borth, H., Buech, T., Gudermann, T., Boekhoff, I. (2009) "CaMKIIalpha interacts with multi-PDZ domain protein MUPP1 in spermatozoa and prevents spontaneous acrosomal exocytosis." *Journal of Cell Science*, 12(24), pp. 4547-4557.
- Adzick, N. S., Thom, E. A., Spong, C. Y., Brock, J. W., Burrows, P. K., Johnson, M. P., et al. (2011) "A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele." *The New England Journal of Medicine*, 364(11), pp. 993-1004.
- Aeschimann, F., Kumari, P., Bartake, H., Gaidatzis, D., Xu, L., Ciosk, R., Großhans, H. (2017) "LIN41 Post-transcriptionally Silences mRNAs by Two Distinct and Position-Dependent Mechanisms." *Molecular Cell*, 65(3), pp. 476-489.e4.
- Aksoy, K. (1985) "Temel Nöroşirurji". Ankara.
- Al-Gazali, L. I., Sztriha, L., Dawodu, A., Bakir, M., Varghese, M., Varady, E., et al. (1999) "Pattern of central nervous system anomalies in a population with a high rate of consanguineous marriages," *Clinical Genetics*, 55(2), pp. 95-102.
- Ali, M., Hocking, P. M., McKibbin, M., Finnegan, S., Shires, M., Poulter, J. A., et al. (2011) "MPDZ Null Allele In An Avian Model Of Retinal Degeneration And Mutations In Human Leber Congenital Amaurosis And Retinitis Pigmentosa", *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(10), pp. 7432-7440.
- Almeida, L., Anyane-Yeboah, K., Grossman, M., Rosen, T. (1988) "Myelomeningocele, Arnold-Chiari anomaly and hydrocephalus in focal dermal hypoplasia", *American Journal of Medical Genetics*, 30(4), pp. 917-923.
- Alterio, J., Masson, J., Diaz, J., Chachlaki, K., Salman, H., Areias, J. et al. (2015) "Yif1B Is Involved in the Anterograde Traffic Pathway and the Golgi Architecture", *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 16(9), pp. 978-993.
- Amorim, M. R., Lima, M. A. C., Castilla, E. E., Orioli, I. M. (2007) "Non-Latin European descent could be a requirement for association of NTDs and MTHFR variant 677C > T: A meta-analysis", *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143A(15), pp. 1726-1732.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J. (1999) "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development", *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415), pp. 770-776.

- Arte, S., Parmanen, S., Pirinen, S., Alaluusua, S., Nieminen, P. (2013) “Candidate gene analysis of tooth agenesis identifies novel mutations in six genes and suggests significant role for WNT and EDA signaling and allele combinations”, *PloS One*, 8(8), e73705.
- Bagley, P. J., Selhub, J. (1998) “A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), pp. 13217-13220.
- Bai, S., Ghoshal, K., Datta, J., Majumder, S., Yoon, S. O., Jacob, S. T. (2005) “DNA methyltransferase 3b regulates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells by recruiting histone deacetylase 2”, *Molecular and Cellular Biology*, 25(2), pp. 751-766.
- Bailey, L. B., Duhaney, R. L., Maneval, D. R., Kauwell, G. P. A., Quinlivan, E. P., Davis, S. R., et al. (2002) “Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms”, *The Journal of Nutrition*, 132(7), pp. 1872-1878.
- Bainbridge, M. N., Hu, H., Muzny, D. M., Musante, L., Lupski, J. R., Graham, B. H., et al. (2013) “De novo truncating mutations in ASXL3 are associated with a novel clinical phenotype with similarities to Bohring-Opitz syndrome”, *Genome Medicine*, 5(2), pp. 11.
- Baker, S. W., Murrell, J. R., Nesbitt, A. I., Pechter, K. B., Balciuniene, J., Zhao, X., Yu, Z., et al. (2019) “Automated Clinical Exome Reanalysis Reveals Novel Diagnoses”, *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 21(1), pp. 38-48.
- Bamshad, M., Jorde, L. B., Carey, J. C. (1996) “A revised and extended classification of the distal arthrogryposes”, *American Journal of Medical Genetics*, 65(4), pp. 277-281.
- Bartholomew, B. (2014) “Regulating the chromatin landscape: structural and mechanistic perspectives”, *Annual Review of Biochemistry*, 83, pp. 671-696.
- Bassuk, A. G., Kibar, Z. (2009) “Genetic basis of neural tube defects”, *Seminars in Pediatric Neurology*, 16(3), pp.101-110.
- Beaudin, A. E., Stover, P. J. (2007) “Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression”, *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 81(3), pp. 183-203.
- Beaumont, M., Akloul, L., Carré, W., Quélin, C., Journal, H., Pasquier, L., et al. (2019) “Targeted panel sequencing establishes the implication of planar cell polarity pathway and involves new candidate genes in neural tube defect disorders”, *Human Genetics*, 138(4), pp. 363-374.

- Beck, D. B., Petracovici, A., He, C., Moore, H. W., Louie, R. J., Ansar, M., et al. (2020) "Delineation of a Human Mendelian Disorder of the DNA Demethylation Machinery: TET3 Deficiency", *The American Journal of Human Genetics*, 106(2), pp. 234-245.
- Bell, S. E., Mavila, A., Salazar, R., Bayless, K. J., Kanagala, S., Maxwell, S. A. et al. (2001) "Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling", *Journal of Cell Science*, 114(15), pp. 2755-2773.
- Bhat, M. A., Guru, S. A., Mir, R., Waza, A. A., Zuberi, M., Sumi, M. P., et al. (2018) "Association of GABAA Receptor Gene with Epilepsy Syndromes", *Journal of molecular neuroscience: MN*, 65(2), pp. 141-153.
- Bianchi, M., Crinelli, R., Serafini, G., Giammarini, C., Magnani, M. (1997) "Molecular bases of hexokinase deficiency", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1360(3), pp. 211-221.
- Biggio, J. R., Wenstrom, K. D., Owen, J. (2004) "Fetal open spina bifida: a natural history of disease progression in utero", *Prenatal Diagnosis*, 24(4), pp. 287-289.
- Blom, H. J., Shaw, G. M., den Heijer, M., Finnell, R. H. (2006) "Neural tube defects and folate: case far from closed", *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), pp. 724-731.
- Boyd, P. A., Devigan, C., Khoshnood, B., Loane, M., Garne, E., Dolk, H., et al. (2008) "Survey of prenatal screening policies in Europe for structural malformations and chromosome anomalies, and their impact on detection and termination rates for neural tube defects and Down's syndrome", *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 115(6), pp. 689-696.
- Boyles, A. L., Hammock, P., Speer, M. C. (2005) "Candidate gene analysis in human neural tube defects", *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 135C(1), pp. 9-23.
- Bozarth, X., Dines, J. N., Cong, Q., Mirzaa, G. M., Foss, K., Lawrence Merritt II, J., et al. (2018) "Expanding clinical phenotype in CACNA1C related disorders: From neonatal onset severe epileptic encephalopathy to late-onset epilepsy", *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176(12), pp. 2733-2739.
- Bönnemann, C. G. (2011) "Chapter 5 - The collagen VI-related myopathies: Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy", Griggs, R. C. ve Amato, A. A. (eds) *Handbook of Clinical Neurology*. (Muscular Dystrophies), pp. 81-96.
- Bradko, V., Castillo, H., Fremion, E., Conklin, M., Dahl, B., Castillo, J. (2022) "What is the Role of Scoliosis Surgery in Adolescents and Adults with

Myelomeningocele? A Systematic Review”, *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 480(4), pp. 773-787.

- Breckpot, J., Anderlid, B.-M., Alanay, Y., Blyth, M., Brahimi, A., Duban-Bedu, B., et al. (2016) “Chromosome 22q12.1 microdeletions: confirmation of the MN1 gene as a candidate gene for cleft palate”, *European journal of human genetics: EJHG*, 24(1), pp. 51-58.
- Brock, D. J., Scrimgeour, J. B., Nelson, M. M. (1975) “Amniotic fluid alphafetoprotein measurements in the early prenatal diagnosis of central nervous system disorders”, *Clinical Genetics*, 7(2), pp. 163-169.
- Broderick, L., Yost, S., Li, D., McGeough, M. D., Booshehri, L. M., Guaderrama, M., et al. (2019) “Mutations in topoisomerase II β result in a B cell immunodeficiency”, *Nature Communications*, 10(1), pp. 3644.
- Bruno, C., Cassandrini, D., Assereto, S., Orhan Akman, H., Minetti, C., Di Mauro, S. (2007) “Neuromuscular forms of glycogen branching enzyme deficiency”, *Acta Myologica*, 26(1), pp. 75-78.
- Bupp, C. P., Schultz, C. R., Uhl, K. L., Rajasekaran, S., Bachmann, A. S. (2018) “Novel de novo pathogenic variant in the ODC1 gene in a girl with developmental delay, alopecia, and dysmorphic features”, *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 176(12), pp. 2548-2553.
- Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D. M., Hill, A. J., Zhang, F., et al. (2019) “The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis”, *Nature*, 566(7745), pp. 496-502.
- Carr, A. L., Sun, L., Lee, E., Li, P., Antonacci, C., Gorbea, E., et al. (2014) “The human oncogene SCL/TAL1 interrupting locus is required for mammalian dopaminergic cell proliferation through the Sonic hedgehog pathway”, *Cellular Signalling*, 26(2), pp. 306-312.
- Carrel, D., Masson, J., Al Awabdh, S., Capra, C. B., Lenkei, Z., Hamon, M., et al. (2008) “Targeting of the 5-HT1A serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B”, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(32), pp. 8063-8073.
- Carter, C. O. (1974) “Clues to the aetiology of neural tube malformations”, *Developmental Medicine and Child Neurology*, 16(6 Suppl 32), pp. 3-15.
- Castro, S. C. P. D., Malhas, A., Leung, K.-Y., Gustavsson, P., Vaux, D. J., Copp, A. J., Greene, N. D. E. (2012) “Lamin B1 Polymorphism Influences Morphology of the Nuclear Envelope, Cell Cycle Progression, and Risk of Neural Tube Defects in Mice”, *PLOS Genetics*, 8(11), e1003059.

- Cavalli, V., Kujala, P., Klumperman, J., Goldstein, L. S. B. (2005) "Sunday Driver links axonal transport to damage signaling", *The Journal of Cell Biology*, 168(5), pp. 775-787.
- Chapman, P. H., Swearingen, B., Caviness, V. S. (1989) "Subtorcular occipital encephaloceles. Anatomical considerations relevant to operative management", *Journal of Neurosurgery*, 71(3), pp. 375-381.
- Chen, J., Lai, F., Niswander, L. (2012) "The ubiquitin ligase mLin41 temporally promotes neural progenitor cell maintenance through FGF signaling", *Genes & Development*, 26(8), pp. 803-815.
- Cheng, F. Y., Fleming, J. T., Chiang, C. (2018) "Bergmann glial Sonic hedgehog signaling activity is required for proper cerebellar cortical expansion and architecture", *Developmental Biology*, 440(2), pp. 152-166.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., et al. (1996) "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function", *Nature*, 383(6599), pp. 407-413.
- Cluzeau, C., Hadj-Rabia, S., Jambou, M., Mansour, S., Guigue, P., Masmoudi, S., et al. (2011) "Only four genes (*EDA1*, *EDAR*, *EDARADD*, and *WNT10A*) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases", *Human Mutation*, 32(1), pp. 70-72.
- Cockburn, J. J. B., Hesketh, S. J., Mulhair, P., Thomsen, M., O'Connell, M. J., Way, M. (2018) "Insights into Kinesin-1 Activation from the Crystal Structure of KLC2 Bound to JIP3", *Structure (London, England: 1993)*, 26(11), pp. 1486-1498.e6.
- Cogram, P., Hynes, A., Dunlevy, L. P. E., Greene, N. D. E., Copp, A. J. (2004) "Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol", *Human Molecular Genetics*, 13(1), pp. 7-14.
- Connacher, R. P., Goldstrohm, A. C. (2021) "Molecular and biological functions of TRIM-NHL RNA-binding proteins", *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 12(2), e1620.
- Copp, A. J., Greene, N. D. (2010) "Genetics and development of neural tube defects", *The Journal of Pathology*, 220(2), pp. 217-230.
- Copp, A. J., Greene, N. D. E. (2013) "Neural tube defects – disorders of neurulation and related embryonic processes", *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 2(2), pp. 213-227.
- Copp, A. J., Greene, N. D. E., Murdoch, J. N. (2003) "Dishevelled: linking convergent extension with neural tube closure", *Trends in Neurosciences*, 26(9), pp. 453-455.

- Copp, A. J., Stanier, P., Greene, N. D. E. (2013) "Neural tube defects – recent advances, unsolved questions and controversies", *Lancet neurology*, 12(8), pp. 799-810.
- Dahmane, N., Ruiz i Altaba, A. (1999) "Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum", *Development (Cambridge, England)*, 126(14), pp. 3089-3100.
- Dai, Y., Yang, Y., MacLeod, V., Yue, X., Rapraeger, A. C., Shriver, Z., et al. (2005) "HSulf-1 and HSulf-2 are potent inhibitors of myeloma tumor growth in vivo", *The Journal of Biological Chemistry*, 280(48), pp. 40066-40073.
- Davidson, C. E., Li, Q., Churchill, G. A., Osborne, L. R., McDermid, H. E. (2007) "Modifier locus for exencephaly in *Cecr2* mutant mice is syntenic to the 10q25.3 region associated with neural tube defects in humans", *Physiological Genomics*, 31(2), pp. 244-251.
- Davidson, T. B., Sanchez-Lara, P. A., Randolph, L. M., Krieger, M. D., Wu, S.-Q., Panigrahy, A., et al. (2012) "Microdeletion del(22)(q12.2) encompassing the facial development-associated gene, *MN1* (meningioma 1) in a child with Pierre-Robin sequence (including cleft palate) and neurofibromatosis 2 (NF2): a case report and review of the literature", *BMC medical genetics*, 13(19).
- De Coster, P. J., Marks, L. A., Martens, L. C., Huysseune, A. (2009) "Dental agenesis: genetic and clinical perspectives", *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 38(1), pp. 1-17.
- Demenais, F., Le Merrer, M., Briard, M. L., Elston, R. C. (1982) "Neural tube defects in France: segregation analysis", *American Journal of Medical Genetics*, 11(3), pp. 287-298.
- Deng, C., Bedford, M., Li, C., Xu, X., Yang, X., Dunmore, J. et al. (1997) "Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR-1) Is Essential for Normal Neural Tube and Limb Development", *Developmental Biology*, 185(1), pp. 42-54.
- Detrait, E. R., George, T. M., Etchevers, H. C., Gilbert, J. R., Vekemans, M., Speer, M. C. (2005) "Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics", *Neurotoxicology and Teratology*, 27(3), pp. 515-524.
- Di Pietro, C., Marazziti, D., La Sala, G., Abbaszadeh, Z., Golini, E., Matteoni, R. et al. (2017) "Primary Cilia in the Murine Cerebellum and in Mutant Models of Medulloblastoma", *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(1), pp. 145-154.
- Diaz, J., Gérard, X., Emerit, M.-B., Areias, J., Geny, D., Dégardin, J., et al. (2020) "YIF1B mutations cause a post-natal neurodevelopmental syndrome associated with Golgi and primary cilium alterations", *Brain*, 143(10), pp. 2911-2928.

- Dibbens, L. M., Feng, H.-J., Richards, M. C., Harkin, L. A., Hodgson, B. L., Scott, D., et al. (2004) "GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies", *Human Molecular Genetics*, 13(13), pp.1315-1319.
- Doudney, K., Moore, G. e., Stanier, P., Ybot-Gonzalez, P., Paternotte, C., Greene, N. d. e., et al. (2005) "Analysis of the planar cell polarity gene Vangl2 and its co-expressed paralogue Vangl1 in neural tube defect patients", *American Journal of Medical Genetics Part A*, 136A(1), pp.90-92.
- Drerup, C. M., Nechiporuk, A. V. (2013) "JNK-interacting protein 3 mediates the retrograde transport of activated c-Jun N-terminal kinase and lysosomes", *PLoS genetics*, 9(2), e1003303.
- Dubourg, C., Carré, W., Hamdi-Rozé, H., Mouden, C., Roume, J., Abdelmajid, B., et al. (2016) "Mutational Spectrum in Holoprosencephaly Shows That FGF is a New Major Signaling Pathway", *Human Mutation*, 37(12), pp.1329-1339.
- Dupé, V., Rochard, L., Mercier, S., Le Pétilion, Y., Gicquel, I., Bendavid, C., et al. (2011) "NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly", *Human Molecular Genetics*, 20(6), pp.1122-1131.
- Ecsedi, M., Grosshans, H. (2013) "LIN-41/TRIM71: emancipation of a miRNA target", *Genes & Development*, 27(6), pp.581-589.
- Edery, P., Deist, F. L., Briard, M.-L., Debré, M., Munnich, A., Griscelli, C., et al. (2001) "B cell immunodeficiency, distal limb abnormalities, and urogenital malformations in a three generation family: a novel autosomal dominant syndrome?", *Journal of Medical Genetics*, 38(7), pp.488-493.
- Ekici, A. B., Hilfinger, D., Jatzwauk, M., Thiel, C. T., Wenzel, D., Lorenz, I., et al. (2010) "Disturbed Wnt Signalling due to a Mutation in CCDC88C Causes an Autosomal Recessive Non-Syndromic Hydrocephalus with Medial Diverticulum", *Molecular Syndromology*, 1(3), pp.99-112.
- Elwood, J. M., Little, J., Elwood, J. H. (1992) *Epidemiology and Control of Neural Tube Defects*. Oxford, New York (Monographs in Epidemiology and Biostatistics).
- Eppig, J. T., Bult, C. J., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Blake, J. A., the Mouse Genome Database Group (2005) "The Mouse Genome Database (MGD): from genes to mice—a community resource for mouse biology", *Nucleic Acids Research*, 33(suppl_1), pp.471-475.
- Erdős, M., Lányi, Á., Balázs, G., Casanova, J.-L., Boisson, B., Maródi, L. (2021) "Inherited TOP2B Mutation: Possible Confirmation of Mutational Hotspots in the TOPRIM Domain", *Journal of Clinical Immunology*, 41(4), pp.817-819.

- Eroğlu, A., Eseoğlu, M., Pusat, S., Şimşek, H., Atabey, C. (2017) “Yenidoğanda Nadir Görülen Servikal Meningomyelose”, 6(1), pp.58-61.
- Etheridge, S. L., Ray, S., Li, S., Hamblet, N. S., Lijam, N., Tsang, M., et al. (2008) “MURINE DISHEVELLED 3 FUNCTIONS IN REDUNDANT PATHWAYS WITH DISHEVELLED 1 AND 2 IN NORMAL CARDIAC OUTFLOW TRACT, COCHLEA, AND NEURAL TUBE DEVELOPMENT”, *PLOS Genetics*, 4(11), e1000259.
- Fischer-Zirnsak, B., Segebrecht, L., Schubach, M., Charles, P., Alderman, E., Brown, K., et al. (2019) “Haploinsufficiency of the Notch Ligand DLL1 Causes Variable Neurodevelopmental Disorders”, *The American Journal of Human Genetics*, 105(3), pp.631-639.
- Foley, A. R., Hu, Y., Zou, Y., Columbus, A., Shoffner, J., Dunn, D. M., Weiss, R. B. et al. (2009) “Autosomal recessive inheritance of classic Bethlem myopathy”, *Neuromuscular disorders: NMD*, 19(12), pp.813-817.
- Fu, Y., Wang, L., Yi, D., Jin, L., Liu, J., Zhang, Y. et al. (2015) “Association between maternal single nucleotide polymorphisms in genes regulating glucose metabolism and risk for neural tube defects in offspring”, *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 103(6), pp.471-478.
- Furey, C. G., Choi, J., Jin, S. C., Zeng, X., Timberlake, A. T., Nelson-Williams, C., et al. (2018) “De Novo Mutation in Genes Regulating Neural Stem Cell Fate in Human Congenital Hydrocephalus”, *Neuron*, 99(2), pp.302-314.
- Gadodia, A., Gupta, P., Sharma, R., Kumar, S., Gupta, G. (2010) “Antenatal Sonography and MRI of Iniencephaly apertus and clausus”, *Fetal Diagnosis and Therapy*, 27(3), pp.178-180.
- Galceran, J., Sustmann, C., Hsu, S.-C., Folberth, S., Grosschedl, R. (2004) “LEF1-mediated regulation of Delta-like1 links Wnt and Notch signaling in somitogenesis”, *Genes & Development*, 18(22), pp.2718-2723.
- Ganapathi, M., Padgett, L. R., Yamada, K., Devinsky, O., Willaert, R., Person, R., et al. (2019) “Recessive Rare Variants in Deoxyhypusine Synthase, an Enzyme Involved in the Synthesis of Hypusine, Are Associated with a Neurodevelopmental Disorder”, *American Journal of Human Genetics*, 104(2), pp.287-298.
- Garne, E., Loane, M., Addor, M.-C., Boyd, P. A., Barisic, I., Dolk, H. (2010) “Congenital hydrocephalus--prevalence, prenatal diagnosis and outcome of pregnancy in four European regions”, *European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 14(2), pp.150-155.
- Gilmore, E. C., Walsh, C. A. (2013) “Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development”, *WIREs Developmental Biology*, 2(4), pp.461-478.

- Gleason, C. A., Devaskar, S. U., Avery, M. E. (2012) *Avery's diseases of the newborn*. Philadelphia, PA.
- Glinton, K. E., Hurst, A. C. E., Bowling, K. M., Cristian, I., Haynes, D., Adstamongkonkul, D., et al. (2021) "Phenotypic expansion of the BPTF-related neurodevelopmental disorder with dysmorphic facies and distal limb anomalies", *American Journal of Medical Genetics Part A*, 185(5), pp.1366-1378.
- Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E. M., Brockman, W., et al. (2009) "Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing", *Nature Biotechnology*, 27(2), pp.182-189.
- Goller, T., Vauti, F., Ramasamy, S., Arnold, H.-H. (2008) "Transcriptional Regulator BPTF/FAC1 Is Essential for Trophoblast Differentiation during Early Mouse Development", *Molecular and Cellular Biology*, 28(22), pp.6819-6827.
- Gowrishankar, S., Lyons, L., Rafiq, N. M., Rocznia-Ferguson, A., De Camilli, P., Ferguson, S. M. (2021) "Overlapping roles of JIP3 and JIP4 in promoting axonal transport of lysosomes in human iPSC-derived neurons", *Molecular Biology of the Cell*, 32(11), pp.1094-1103.
- Gowrishankar, S., Wu, Y., Ferguson, S. M. (2017) "Impaired JIP3-dependent axonal lysosome transport promotes amyloid plaque pathology", *The Journal of Cell Biology*, 216(10), pp.3291-3305.
- Graab, P., Bock, C., Weiss, K., Hirth, A., Koller, N., Braner, M., et al. (2019) "Lysosomal targeting of the ABC transporter TAPL is determined by membrane-localized charged residues", *Journal of Biological Chemistry*, 294(18), pp.7308-7323.
- Gray, G. E., Mann, R. S., Mitsiadis, E., Henrique, D., Carcangiu, M.-L., Banks, A., et al. (1999) "Human Ligands of the Notch Receptor", *The American Journal of Pathology*, 154(3), pp.785-794.
- Greene, C. C., McMillan, P. M., Barker, S. E., Kurnool, P., Lomax, M. I., Burmeister, M., et al. (2001) "DFNA25, a Novel Locus for Dominant Nonsyndromic Hereditary Hearing Impairment, Maps to 12q21-24", *The American Journal of Human Genetics*, 68(1), pp.254-260.
- Greene, N. D., Copp, A. J. (1997) "Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse", *Nature Medicine*, 3(1), pp.60-66.
- Greene, N. D. E., Copp, A. J. (2014) "Neural Tube Defects", *Annual review of neuroscience*, 37, pp.221-242.
- Greene, N. D. E., Stanier, P., Copp, A. J. (2009) "Genetics of human neural tube defects", *Human Molecular Genetics*, 18(2), pp.113-129.

- Gregerson, D. M. (1997) "Clinical consequences of spina bifida occulta", *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics*, 20(8), pp.546-550.
- Guarnaccia, C., Pintar, A., Pongor, S. (2004) "Exon 6 of human Jagged-1 encodes an autonomously folding unit", *FEBS Letters*, 574(1-3), pp.156-160.
- Guerra, M. M., Henzi, R., Orloff, A., Lichtin, N., Vio, K., Jiménez, A. J., et al. (2015) "Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 74(7), pp.653-671.
- Gümüş, N., Kaya, Y., Karakaya, S., Başar, N. (2002) "Dev Meningomyelosele Onarımı Olgu Sunumu", 10(2), 4.
- Güttler, F., Woo, S. L. (1986) "Molecular genetics of PKU", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 9 Suppl 1, pp.58-68.
- Habib, Z. A. (1977) "Maternal serum alpha-feto-protein: its value in antenatal diagnosis of genetic disease and in obstetrical-gynaecological care", *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica. Supplement*, pp.61, 1-92.
- Hall, J. G., Reed, S. D., Greene, G. (1982) "The distal arthrogryposes: delineation of new entities--review and nosologic discussion", *American Journal of Medical Genetics*, 11(2), pp.185-239.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S. (2002) "Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule", *The Journal of Biological Chemistry*, 277(1), pp.455-461.
- Hamblet, N. S., Lijam, N., Ruiz-Lozano, P., Wang, J., Yang, Y., Luo, Z., et al. (2002) "Dishevelled 2 is essential for cardiac outflow tract development, somite segmentation and neural tube closure", *Development (Cambridge, England)*, 129(24), pp.5827-5838.
- Hamiche, A., Sandaltzopoulos, R., Gdula, D. A., Wu, C. (1999) "ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF", *Cell*, 97(7), pp.833-842.
- Harding, A. E., Thomas, P. K. (1980) "Autosomal recessive forms of hereditary motor and sensory neuropathy.", *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 43(8), pp.669-678.
- Harris, M. J., Juriloff, D. M. (2007) "Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects", *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 79(3), pp.187-210.
- Harris, M. J., Juriloff, D. M. (2010) "An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of

- neural tube closure”, *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 88(8), pp.653-669.
- Herrera, E., Samper, E., Blasco, M. A. (1999) “Telomere shortening in mTR-/- embryos is associated with failure to close the neural tube.”, *The EMBO Journal*, 18(5), pp.1172-1181.
- Hoch, R. V., Soriano, P. (2006) “Context-specific requirements for Fgfr1 signaling through Frs2 and Frs3 during mouse development”, *Development*, 133(4), pp.663-673.
- Hodges, E., Xuan, Z., Baliya, V., Kramer, M., Molla, M. N., Smith, S. W., et al. (2007) “Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing”, *Nature Genetics*, 39(12), pp.1522-1527.
- Hoebel, A. K., Drichel, D., van de Vorst, M., Böhmer, A. C., Sivalingam, S., Ishorst, N., et al. (2017) “Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Palate Detected by Exome Sequencing”, *Journal of Dental Research*, 96(11), pp.1314-1321.
- Hoffman, H. M., Bastian, J. F., Bird, L. M. (2001) “Humoral immunodeficiency with facial dysmorphism and limb anomalies: a new syndrome”, *Clinical Dysmorphology*, 10(1), pp.1-8.
- Hollander, M. C., Sheikh, M. S., Bulavin, D. V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., et al. (1999) “Genomic instability in Gadd45a-deficient mice”, *Nature Genetics*, 23(2), pp.176-184.
- Homberger, A., Linnebank, M., Winter, C., Willenbring, H., Marquardt, T., Harms, E. et al. (2000) “Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene”, *European journal of human genetics: EJHG*, 8(9), pp.725-729.
- Hong, S., Hu, P., Marino, J., Hufnagel, S. B., Hopkin, R. J., Toromanović, A., et al. (2016) “Dominant-negative kinase domain mutations in FGFR1 can explain the clinical severity of Hartsfield syndrome”, *Human Molecular Genetics*, 25(10), pp.1912-1922.
- Hrabě de Angelis, M., McIntyre, J., Gossler, A. (1997) “Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1”, *Nature*, 386(6626), pp.717-721.
- Hu, X., Hou, H., Bastian, C., He, W., Qiu, S., Ge, Y., et al. (2017) “BACE1 regulates the proliferation and cellular functions of Schwann cells”, *Glia*, 65(5), pp.712-726.
- Hunter, A. G. (1984) “Neural tube defects in Eastern Ontario and Western Quebec: demography and family data”, *American Journal of Medical Genetics*, 19(1), pp.45-63.

- Hussain, T., Tan, B., Ren, W., Rahu, N., Kalhor, D. H., Yin, Y. (2017) "Exploring polyamines: Functions in embryo/fetal development", *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 3(1), pp.7-10.
- Hügler, B., Hoffman, H., Bird, L. M., Gebauer, C., Suchowerskyj, P., Sack, U., et al. (2011) "Hoffman syndrome: New patients, new insights", *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155(1), pp.149-153.
- Hynes, R. O. (1992) "Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion", *Cell*, 69(1), pp.11-25.
- Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y. (2012) "Transcriptional activation of transposable elements in mouse zygotes is independent of Tet3-mediated 5-methylcytosine oxidation", *Cell Research*, 22(12), pp.1640-1649.
- Inoue, A., Shen, L., Dai, Q., He, C., Zhang, Y. (2011) "Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development", *Cell Research*, 21(12), pp.1670-1676.
- Iqbal, K., Jin, S.-G., Pfeifer, G. P., Szabó, P. E. (2011) "Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), pp.3642-3647.
- Isaković, J., Šimunić, I., Jagečić, D., Hribljan, V., Mitrečić, D. (2022) "Overview of Neural Tube Defects: Gene–Environment Interactions, Preventative Approaches and Future Perspectives", *Biomedicines*, 10(5), pp.965.
- Iwasawa, S., Yanagi, K., Kikuchi, A., Kobayashi, Y., Haginoya, K., Matsumoto, H., et al. (2019) "Recurrent de novo MAPK8IP3 variants cause neurological phenotypes", *Annals of Neurology*, 85(6), pp.927-933.
- Izraeli, S., Lowe, L. A., Bertness, V. L., Campaner, S., Hahn, H., Kirsch, I. R. et al. (2001) "Genetic evidence that *Sil* is required for the Sonic Hedgehog response pathway", *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 31(2), pp.72-77.
- Jackson, M., Krassowska, A., Gilbert, N., Chevassut, T., Forrester, L., Ansell, J. et al. (2004) "Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells", *Molecular and Cellular Biology*, 24(20), pp.8862-8871.
- Jacoby, M., Cox, J. J., Gayral, S., Hampshire, D. J., Ayub, M., Blockmans, M., et al. (2009) "INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse", *Nature Genetics*, 41(9), pp.1027-1031.
- Janerich, D. T., Piper, J. (1978) "Shifting genetic patterns in anencephaly and spina bifida.", *Journal of Medical Genetics*, 15(2), pp.101-105.

- Jessen, J. R., Topczewski, J., Bingham, S., Sepich, D. S., Marlow, F., Chandrasekhar, A. et al. (2002) "Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements", *Nature Cell Biology*, 4(8), pp.610-615.
- Jöbsis, G. J., Boers, J. M., Barth, P. G., de Visser, M. (1999) "Bethlem myopathy: a slowly progressive congenital muscular dystrophy with contractures", *Brain: A Journal of Neurology*, 122 (Pt 4), pp.649-655.
- Juriloff, D. M., Harris, M. J. (2000) "Mouse models for neural tube closure defects", *Human Molecular Genetics*, 9(6), pp.993-1000.
- Kamimura, K., Koyama, T., Habuchi, H., Ueda, R., Masu, M., Kimata, K. et al. (2006) "Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in Drosophila FGF signaling", *The Journal of Cell Biology*, 174(6), pp.773-778.
- Kaminker, R., Fabry, J., Midha, R., Finkelstein, J. A. (2000) "Split Cord Malformation With Diastatomyelia Presenting as Neurogenic Claudication in an Adult: A Case Report", *Spine*, 25(17), pp.2269-2271.
- Kang, J. Y., Hong, Y., Ashida, H., Shishioh, N., Murakami, Y., Morita, Y. S., et al. (2005) "PIG-V Involved in Transferring the Second Mannose in Glycosylphosphatidylinositol *", *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), pp.9489-9497.
- Karner, C. M., Long, F., Solnica-Krezel, L., Monk, K. R., Gray, R. S. (2015) "Gpr126/Adgrg6 deletion in cartilage models idiopathic scoliosis and pectus excavatum in mice", *Human Molecular Genetics*, 24(15), pp.4365-4373.
- Kaufman, B. A. (2004) "Neural tube defects", *Pediatric Clinics of North America*, 51(2), pp.389-419.
- Kayaalp, E., Treacy, E., Waters, P. J., Byck, S., Nowacki, P., Scriver, C. R. (1997) "Human Phenylalanine Hydroxylase Mutations and Hyperphenylalaninemia Phenotypes: A Metanalysis of Genotype-Phenotype Correlations", *The American Journal of Human Genetics*, 61(6), pp.1309-1317.
- Keller-Peck, C. R., Mullen, R. J. (1997) "Altered cell proliferation in the spinal cord of mouse neural tube mutants curly tail and Pax3 splotch-delayed", *Brain Research. Developmental Brain Research*, 102(2), pp.177-188.
- Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., et al. (1989) "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis", *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), pp.1073-1080.
- Keser, N., Pazarbaşı, A., Özpak, L. (2014) "Metilentetrahidrofolat Redüktaz Aktivitesi ve Folat Metabolizması", *Archives Medical Review Journal*, ; 23(2), pp.237-256.

- Kibar, Z., Salem, S., Bosoi, C., Pauwels, E., De Marco, P., Merello, E., et al. (2011) "Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects", *Clinical Genetics*, 80(1), pp.76-82.
- Kibar, Z., Vogan, K. J., Groulx, N., Justice, M. J., Underhill, D. A., Gros, P. (2001) "Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail", *Nature Genetics*, 28(3), pp.251-255.
- Kim, J. K., Huh, S. O., Choi, H., Lee, K. S., Shin, D., Lee, C., et al. (2001) "Srg3, a mouse homolog of yeast SWI3, is essential for early embryogenesis and involved in brain development", *Molecular and Cellular Biology*, 21(22), pp.7787-7795.
- Konecki, D. S., Schlotter, M., Trefz, F. K., Lichter-Konecki, U. (1991) "The identification of two mis-sense mutations at the PAH gene locus in a Turkish patient with phenylketonuria", *Human Genetics*, 87(4), pp.389-393.
- Koppinen, P., Pispä, J., Laurikkala, J., Thesleff, I., Mikkola, M. L. (2001) "Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar", *Experimental Cell Research*, 269(2), pp.180-192.
- Kostik, M. M., Suspitsin, E. N., Guseva, M. N., Levina, A. S., Kazantseva, A. Y., Sokolenko, A. P., et al. (2018) "Multigene sequencing reveals heterogeneity of NLRP12-related autoinflammatory disorders", *Rheumatology International*, 38(5), pp.887-893.
- Kou, I., Takahashi, Y., Johnson, T. A., Takahashi, A., Guo, L., Dai, J., et al. (2013) "Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis", *Nature Genetics*, 45(6), pp.676-679.
- Krawitz, P. M., Schweiger, M. R., Rödelberger, C., Marcelis, C., Kölsch, U., Meisel, C., et al. (2010) "Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome", *Nature Genetics*, 42(10), pp.827-829.
- Kuhn, J., Emmady, P. D. (2022) "Chiari II Malformation", *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Landry, J., Sharov, A. A., Piao, Y., Sharova, L. V., Xiao, H., Southon, E., et al. (2008) "Essential role of chromatin remodeling protein bptf in early mouse embryos and embryonic stem cells", *PLoS Genetics*, 4(10), e1000241.
- Langenhan, T., Aust, G., Hamann, J. (2013) "Sticky Signaling—Adhesion Class G Protein–Coupled Receptors Take the Stage", *Science Signaling*, 6(276).
- Leclerc, A., Matveeff, L., Emery, E. (2021) "Syringomyelia and hydromyelia: Current understanding and neurosurgical management", *Revue Neurologique*, 177(5), pp.498-507.

- Lei, Y., Zhang, T., Li, H., Wu, B.-L., Wang, H. (2010) "VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects", (10;362(23):2232-5.).
- Lekanne Deprez, R. H., Riegman, P. H., Groen, N. A., Warringa, U. L., van Biezen, N. A., Molijn, A. C., et al. (1995) "Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma", *Oncogene*, 10(8), pp.1521-1528.
- Lemay, P., De Marco, P., Traverso, M., Merello, E., Dionne-Laporte, A., Spiegelman, D., et al. (2019) "Whole exome sequencing identifies novel predisposing genes in neural tube defects", *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 7(1), e00467.
- Lennon, C. A., Gray, D. L. (1999) "Sensitivity and specificity of ultrasound for the detection of neural tube and ventral wall defects in a high-risk population", *Obstetrics and Gynecology*, 94(4), pp.562-566.
- Li, C., Shu, Y., Wang, G., Zhang, H., Lu, Y., Li, X., et al. (2018) "Characterizing a novel vGlut3-P2A-iCreER knockin mouse strain in cochlea", *Hearing Research*, 364, pp.12-24.
- Li, X., Wei, W., Zhao, Q.-Y., Widagdo, J., Baker-Andresen, D., Flavell, C. R., et al. (2014) "Neocortical Tet3-mediated accumulation of 5-hydroxymethylcytosine promotes rapid behavioral adaptation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19), pp.7120-7125.
- Li, Zhiwen, Ren, A., Zhang, L., Ye, R., Li, S., Zheng, J., Hong, S., et al. (2006) "Extremely high prevalence of neural tube defects in a 4-county area in Shanxi Province, China", *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 76(4), pp.237-240.
- Lippincott, M. F., True, C., Seminara, S. B. (2013) "Use of genetic models of idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism in mice and men to understand the mechanisms of disease", *Experimental Physiology*, 98(11), pp.1522-1527.
- Liu, W., Lan, Y., Pauws, E., Meester-Smoor, M. A., Stanier, P., Zwarthoff, E. C. et al. (2008) "The Mn1 transcription factor acts upstream of Tbx22 and preferentially regulates posterior palate growth in mice", *Development (Cambridge, England)*, 135(23), pp.3959-3968.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dollé, P., Dierich, A., Gorry, P., et al. (1994) "Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants", *Development (Cambridge, England)*, 120(10), pp.2723-2748.
- Louvi, A., Artavanis-Tsakonas, S. (2006) "Notch signalling in vertebrate neural development", *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(2), pp.93-102.

- Lupo, P. J., Agopian, A. J., Castillo, H., Castillo, J., Clayton, G. H., Dosa, N. P., et al. (2017) "Genetic epidemiology of neural tube defects", *Journal of Pediatric Rehabilitation Medicine*. Editör T. Brei ve A. Houtrow, 10(3-4), pp.189-194.
- Madkaikar, M., Italia, K., Gupta, M., Chavan, S., Mishra, A., Rao, M., et al. (2015) "Molecular characterization of leukocyte adhesion deficiency-I in Indian patients: Identification of 9 novel mutations", *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 54(3), pp.217-223.
- Mak, C. C. Y., Doherty, D., Lin, A. E., Vegas, N., Cho, M. T., Viot, G., et al. (2020) "MN1 C-terminal truncation syndrome is a novel neurodevelopmental and craniofacial disorder with partial rhombencephalosynapsis", *Brain*, 143(1), pp.55-68.
- Manole, A., Efthymiou, S., O'Connor, E., Mendes, M. I., Jennings, M., Maroofian, R., et al. (2020) "De Novo and Bi-allelic Pathogenic Variants in NARS1 Cause Neurodevelopmental Delay Due to Toxic Gain-of-Function and Partial Loss-of-Function Effects", *The American Journal of Human Genetics*, 107(2), pp.311-324.
- Marivin, A., Morozova, V., Walawalkar, I., Leyme, A., Kretov, D. A., Cifuentes, D., et al. (2019) "GPCR-independent activation of G proteins promotes apical cell constriction in vivo", *Journal of Cell Biology*, 218(5), pp.1743-1763.
- Marklund, U., Hansson, E. M., Sundström, E., de Angelis, M. H., Przemeck, G. K. H., Lendahl, U., et al. (2010) "Domain-specific control of neurogenesis achieved through patterned regulation of Notch ligand expression", *Development (Cambridge, England)*, 137(3), pp.437-445.
- Marco, P., Merello, E., Mascelli, S., Capra, V. (2006) "Current perspectives on the genetic causes of neural tube defects", *Neurogenetics*, 7, pp.201-21.
- Marrus, N., Hall, L. (2017) "Intellectual Disability and Language Disorder", *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 26(3), pp.539-554.
- Marthiens, V., Basto, R. (2014) "Microcephaly: STIL(l) a tale of too many centrosomes", *Current biology: CB*, 24(4), pp.162-164.
- Mattioli, F., Schaefer, E., Magee, A., Mark, P., Mancini, G. M., Dieterich, K., et al. (2017) "Mutations in Histone Acetylase Modifier BRPF1 Cause an Autosomal-Dominant Form of Intellectual Disability with Associated Ptosis", *The American Journal of Human Genetics*, 100(1), pp.105-116.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T. (2000) "Demethylation of the zygotic paternal genome", *Nature*, 403(6769), pp.501-502.

- McComb, J. G. (2015) "A practical clinical classification of spinal neural tube defects", *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 31(10), pp.1641-1657.
- McEwen, D. G., Peifer, M. (2000) "Wnt signaling: Moving in a new direction", *Current biology: CB*, 10(15), pp.562-564.
- Meester-Smoor, M. A., Vermeij, M., van Helmond, M. J. L., Molijn, A. C., van Wely, K. H. M., Hekman, A. C. P., et al. (2005) "Targeted disruption of the Mn1 oncogene results in severe defects in development of membranous bones of the cranial skeleton", *Molecular and Cellular Biology*, 25(10), pp.4229-4236.
- Mitchell, L. E. (2005) "Epidemiology of neural tube defects", *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 135C(1), pp.88-94.
- Mitchell, L. E., Adzick, N. S., Melchionne, J., Pasquariello, P. S., Sutton, L. N., Whitehead, A. S. (2004) "Spina bifida", *Lancet (London, England)*, 364(9448), pp.1885-1895.
- Mohd-Zin, S. W., Marwan, A. I., Abou Chaar, M. K., Ahmad-Annuar, A., Abdul-Aziz, N. M. (2017) "Spina Bifida: Pathogenesis, Mechanisms, and Genes in Mice and Humans", *Scientifica*, e5364827.
- Monk, K. R., Oshima, K., Jörs, S., Heller, S., Talbot, W. S. (2011) "Gpr126 is essential for peripheral nerve development and myelination in mammals", *Development (Cambridge, England)*, 138(13), pp.2673-2680.
- Murdoch, J. N., Doudney, K., Paternotte, C., Copp, A. J., Stanier, P. (2001) "Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of Lpp1, a novel gene involved in floor plate specification", *Human Molecular Genetics*, 10(22), pp.2593-2601.
- Murdoch, J. N., Henderson, D. J., Doudney, K., Gaston-Massuet, C., Phillips, H. M., Paternotte, C., et al. (2003) "Disruption of scribble (Scrib1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse", *Human Molecular Genetics*, 12(2), pp.87-98.
- Mühl-Benninghaus, R. (2018) "Spina bifida", *Der Radiologe*, 58(7), pp.659-663.
- Nachtigall, L. B., Boepple, P. A., Pralong, F. P., Crowley, W. F. (1997) "Adult-Onset Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism — A Treatable Form of Male Infertility", *New England Journal of Medicine*, 336(6), pp.410-415.
- Nadeau, A., Kinali, M., Main, M., Jimenez-Mallebrera, C., Aloysius, A., Clement, E., North, B., et al. (2009) "Natural history of Ullrich congenital muscular dystrophy", *Neurology*, 73(1), pp.25-31.
- Napolitano, C., Timothy, K. W., Bloise, R., Priori, S. G. (1993) "CACNA1C-Related Disorders", *GeneReviews®*. Seattle (WA).

- Narimatsu, M., Bose, R., Pye, M., Zhang, L., Miller, B., Ching, P., et al. (2009) "Regulation of planar cell polarity by Smurf ubiquitin ligases", *Cell*, 137(2), pp.295-307.
- Nelson, W., Behrman, R. E., Vaughan, V. C. (1983) *Nelson textbook of pediatrics*. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Ng, S. B., Turner, E. H., Robertson, P. D., Flygare, S. D., Bigham, A. W., Lee, C., et al. (2009) "Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes", *Nature*, 461(7261), pp.272-276.
- Nguyen, D. T. T., Richter, D., Michel, G., Mitschka, S., Kolanus, W., Cuevas, E., Wulczyn, F. G. (2017) "The ubiquitin ligase LIN41/TRIM71 targets p53 to antagonize cell death and differentiation pathways during stem cell differentiation", *Cell Death and Differentiation*, 24(6), pp.1063-1078.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., Chambon, P. (1999) "Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development", *Nature Genetics*, 21(4), pp.444-448.
- Nikkilä, A., Rydhström, H., Källén, B. (2006) "The incidence of spina bifida in Sweden 1973-2003: the effect of prenatal diagnosis", *European Journal of Public Health*, 16(6), pp.660-662.
- Northrup, H., Volcik, K. A. (2000) "Spina bifida and other neural tube defects", *Current Problems in Pediatrics*, 30(10), pp.313-332.
- O, U. (1930) "Kongenitale, atonisch-sklerotische Muskeldystrophie", *Monatsschr Kinderheilkd*, 47, pp.502-510.
- Obladen, M. (2011) "Cats, frogs, and snakes: early concepts of neural tube defects", *Journal of Child Neurology*, 26(11), pp.1452-1461.
- O'Connell, O., Meaney, S., O'Donoghue, K. (2019) "Anencephaly; the maternal experience of continuing with the pregnancy. Incompatible with life but not with love", *Midwifery*, 71, pp.12-18.
- Okur, V., Cho, M. T., van Wijk, R., van Oirschot, B., Picker, J., Coury, S. A., et al. (2019) "De novo variants in HK1 associated with neurodevelopmental abnormalities and visual impairment", *European Journal of Human Genetics*, 27(7), pp.1081-1089.
- Oshita, A., Kishida, S., Kobayashi, H., Michiue, T., Asahara, T., Asashima, M. et al. (2003) "Identification and characterization of a novel Dvl-binding protein that suppresses Wnt signalling pathway", *Genes to Cells*, 8(12), pp.1005-1017.
- Padmanabhan, R. (2006) "Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects", *Congenital Anomalies*, 46(2), pp.55-67.

- Papapietro, O., Chandra, A., Eletto, D., Inglott, S., Plagnol, V., Curtis, J., et al. (2020) "Topoisomerase 2 β mutation impairs early B-cell development", *Blood*, 135(17), pp.1497-1501.
- Park, M., Moon, R. T. (2002) "The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos", *Nature Cell Biology*, 4(1), pp.20-25.
- Parvaneh, N., Mamishi, S., Rezaei, A., Rezaei, N., Tamizifar, B., Parvaneh, L., et al. (2010) "Characterization of 11 New Cases of Leukocyte Adhesion Deficiency Type 1 with Seven Novel Mutations in the ITGB2 Gene", *Journal of Clinical Immunology*, 30(5), pp.756-760.
- Pertea, M., Kim, D., Pertea, G. M., Leek, J. T., Salzberg, S. L. (2016) "Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown", *Nature Protocols*, 11(9), pp.1650-1667.
- Pinar, H. (2004) "Postmortem findings in term neonates", *Seminars in neonatology: SN*, 9(4), pp.289-302.
- Platzer, K., Sticht, H., Edwards, S. L., Allen, W., Angione, K. M., Bonati, M. T., et al. (2019) "De Novo Variants in MAPK8IP3 Cause Intellectual Disability with Variable Brain Anomalies", *American Journal of Human Genetics*, 104(2), pp.203-212.
- Posey, J. E., Rosenfeld, J. A., James, R. A., Bainbridge, M., Niu, Z., Wang, X., et al. (2016) "Molecular Diagnostic Experience of Whole-Exome Sequencing in Adult Patients", *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 18(7), pp.678-685.
- Prokop, J. W., Bupp, C. P., Frisch, A., Bilinovich, S. M., Campbell, D. B., Vogt, D., et al. (2021) "Emerging Role of ODC1 in Neurodevelopmental Disorders and Brain Development", *Genes*, 12(4), pp.470.
- Rabbani, B., Mahdieh, N., Hosomichi, K., Nakaoka, H., Inoue, I. (2012) "Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders", *Journal of Human Genetics*, 57(10), pp.621-632.
- Record, R. G., McKeown, T. (1949) "Congenital Malformations of the Central Nervous System", *British Journal of Social Medicine*, 3(4), pp.183-219.
- Reed, U. C., Ferreira, L. G., Liu, E. C., Resende, M. B. D., Carvalho, M. S., Marie, S. K., et al. (2005) "Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy: clinical and genetic heterogeneity", *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*, 63(3B), pp.785-790.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., et al. (2015) "Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint

consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology”, *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), pp.405-424.

- Riley, B. B., Chiang, M.-Y., Storch, E. M., Heck, R., Buckles, G. R., Lekven, A. C. (2004) “Rhombomere boundaries are Wnt signaling centers that regulate metameric patterning in the zebrafish hindbrain”, *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 231(2), pp.278-291.
- Rios, A. C., Serralbo, O., Salgado, D., Marcelle, C. (2011) “Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH”, *Nature*, 473(7348), pp.532-535.
- Rodan, L. H., Anyane-Yeboah, K., Chong, K., Klein Wassink-Ruiter, J. S., Wilson, A., Smith, L., et al. (2018) “Gain-of-function variants in the ODC1 gene cause a syndromic neurodevelopmental disorder associated with macrocephaly, alopecia, dysmorphic features, and neuroimaging abnormalities”, *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176(12), pp.2554-2560.
- Rodríguez de Los Santos, M., Rivalan, M., David, F. S., Stumpf, A., Pitsch, J., Tsortouktzidis, D., et al. (2021) “A CRISPR-Cas9-engineered mouse model for GPI-anchor deficiency mirrors human phenotypes and exhibits hippocampal synaptic dysfunctions”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(2), e2014481118.
- Ronald S. Gibbs/Karlan/Haney/Nygaard (2010) *Danforth's Obstetrik ve Jinekoloji*. Güneş Tıp Kitabevleri.
- Rothman, K. J., Moore, L. L., Singer, M. R., Nguyen, U. S., Mannino, S., Milunsky, A. (1995) “Teratogenicity of high vitamin A intake”, *The New England Journal of Medicine*, 333(21), pp.1369-1373.
- Ruggeri, G., Timms, A. E., Cheng, C., Weiss, A., Kollros, P., Chapman, T., et al. (2018) “Bi-allelic mutations of CCDC88C are a rare cause of severe congenital hydrocephalus”, *American Journal of Medical Genetics Part A*, 176(3), pp.676-681.
- Saadai, P., Nout, Y. S., Encinas, J., Wang, A., Downing, T. L., Beattie, M. S., et al. (2011) “Prenatal repair of myelomeningocele with aligned nanofibrous scaffolds-a pilot study in sheep”, *Journal of Pediatric Surgery*, 46(12), pp.2279-2283.
- Sadler, T. W., Greenberg, D., Coughlin, P., Lessard, J. L. (1982) “Actin distribution patterns in the mouse neural tube during neurulation”, *Science (New York, N.Y.)*, 215(4529), pp.172-174.

- Said, E., Cuschieri, A., Vermeesch, J., Fryns, J. P. (2011) "Toriello-Carey syndrome with a 6Mb interstitial deletion at 22q12 detected by array CGH", *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 155A(6), pp.1390-1392.
- Salgado, D., Desvignes, J.-P., Rai, G., Blanchard, A., Miltgen, M., Pinard, A., et al. (2016) "UMD-Predictor: A High-Throughput Sequencing Compliant System for Pathogenicity Prediction of any Human cDNA Substitution", *Human Mutation*, 37(5), pp.439-446.
- Salih, M. A., Murshid, W. R., Seidahmed, M. Z. (2014) "Epidemiology, prenatal management, and prevention of neural tube defects", *Saudi Medical Journal*, 35(Suppl 1), pp.15-28.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp.5463-5467.
- Santos-Cortez, R. L. P., Khan, V., Khan, F. S., Mughal, Z.-U.-N., Chakchouk, I., Lee, K., Rasheed, M., Hamza, R., et al. (2018) "Novel candidate genes and variants underlying autosomal recessive neurodevelopmental disorders with intellectual disability", *Human Genetics*, 137(9), pp.735-752.
- Savory, J. G. A., Mansfield, M., Rijli, F. M., Lohnes, D. (2011) "Cdx mediates neural tube closure through transcriptional regulation of the planar cell polarity gene *Ptk7*", *Development (Cambridge, England)*, 138(7), pp.1361-1370.
- Schrander-Stumpel, C., Fryns, J. P. (1998) "Congenital hydrocephalus: nosology and guidelines for clinical approach and genetic counselling", *European Journal of Pediatrics*, 157(5), pp.355-362.
- Seal, R. P., Akil, O., Yi, E., Weber, C. M., Grant, L., Yoo, J., et al. (2008) "Sensorineural Deafness and Seizures in Mice Lacking Vesicular Glutamate Transporter 3", *Neuron*, 57(2), pp.263-275.
- Sebold, C. D., Melvin, E. C., Siegel, D., Mehlretter, L., Enterline, D. S., Nye, J. S., et al. (2005) "Recurrence risks for neural tube defects in siblings of patients with lipomyelomeningocele", *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 7(1), pp.64-67.
- Sekhar, K. I., Kumar, B. R. (2022) "A Study on the Incidence, Clinical Presentations, and Surgical Outcome in Spinal Dysraphism Patients", *Clinical Medicine*, 09(03), pp.15.
- Seller, M. J. (1981) "Recurrence risks for neural tube defects in a genetic counseling clinic population", *Journal of Medical Genetics*, 18(4), pp.245-248.

- Selzman, A. A., Elder, J. S., Mapstone, T. B. (1993) "Urologic consequences of myelodysplasia and other congenital abnormalities of the spinal cord", *The Urologic Clinics of North America*, 20(3), pp.485-504.
- Shaheen, R., Sebai, M. A., Patel, N., Ewida, N., Kurdi, W., Altweijri, I., et al. (2017) "The genetic landscape of familial congenital hydrocephalus", *Annals of Neurology*, 81(6), pp.890-897.
- Shen, M., Tang, L., Shi, X., Zeng, X., Yao, Q. (2017) "NLRP12 autoinflammatory disease: a Chinese case series and literature review", *Clinical Rheumatology*, 36(7), pp.1661-1667.
- Shen, W., Wang, Y., Liu, Y., Liu, H., Zhao, H., Zhang, G., et al. (2016) "Functional Study of Ectodysplasin-A Mutations Causing Non-Syndromic Tooth Agenesis", *PloS One*, 11(5), e0154884.
- Shi, X.-T., Cai, J., Wang, Y.-Y., Tu, W.-J., Wang, W.-P., Gong, L.-M., et al. (2012) "Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism in Mainland China: 30 Years of Experience", *JIMD Reports - Case and Research Reports*, 2012/3. Berlin, Heidelberg (JIMD Reports), pp.79-83.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., Kageyama, R. (2011) "Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells", *Frontiers in Neuroscience*, 78(5).
- Singh, H., Singh, D., Sharma, D., Tandon, M. S., Ganjoo, P. (2012) "Perioperative challenges in patients with giant occipital encephalocele with microcephaly and micrognathia", *Journal of Neurosciences in Rural Practice*, 3(1), pp.68-70.
- Slack, F. J., Ruvkun, G. (1998) "A novel repeat domain that is often associated with RING finger and B-box motifs", *Trends in Biochemical Sciences*, 23(12), pp.474-475.
- Snead, A. M., Gowrishankar, S. (2022) "Loss of MAPK8IP3 Affects Endocytosis in Neurons", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, pp.16.
- Sobana, M., Halim, D., Aviani, J. K., Gamayani, U., Achmad, T. H. (2021) "Neurodevelopmental outcomes after ventriculoperitoneal shunt placement in children with non-infectious hydrocephalus: a meta-analysis", *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 37(4), pp.1055-1065.
- Song, R. B., Glass, E. N., Kent, M. (2016) "Spina Bifida, Meningomyelocele, and Meningocele", *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 46(2), pp.327-345.
- Stankiewicz, P., Khan, T. N., Szafranski, P., Slattey, L., Streff, H., Vetrini, F., et al. (2017) "Haploinsufficiency of the Chromatin Remodeler BPTF Causes

- Syndromic Developmental and Speech Delay, Postnatal Microcephaly, and Dysmorphic Features”, *The American Journal of Human Genetics*, 101(4), pp.503-515.
- Sterl, E., Paul, K., Paschke, E., Zschocke, J., Brunner-Krainz, M., Windisch, E., et al. (2012) “Prevalence of tetrahydrobiopterine (BH4)-responsive alleles among Austrian patients with PAH deficiency: comprehensive results from molecular analysis in 147 patients”, *Journal of inherited metabolic disease*, pp.36.
- Strutt, D. (2003) “Frizzled signalling and cell polarisation in *Drosophila* and vertebrates”, *Development (Cambridge, England)*, 130(19), pp.4501-4513.
- Stumpf, M. P. H., Goldstein, D. B. (2003) “Demography, recombination hotspot intensity, and the block structure of linkage disequilibrium”, *Current biology: CB*, 13(1), pp.1-8.
- Sulik, K. K., Sadler, T. W. (1993) “Postulated mechanisms underlying the development of neural tube defects. Insights from in vitro and in vivo studies”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 678, pp.8-21.
- Sullivan, J. M., Motley, W. W., Johnson, J. O., Aisenberg, W. H., Marshall, K. L., Barwick, K. E. S., et al. (2020) “Dominant mutations of the Notch ligand Jagged1 cause peripheral neuropathy”, *The Journal of Clinical Investigation*, 130(3), pp.1506-1512.
- Sun, L., Carr, A. L., Li, P., Lee, J., McGregor, M., Li, L. (2014) “Characterization of the human oncogene SCL/TAL1 interrupting locus (Stil) mediated Sonic hedgehog (Shh) signaling transduction in proliferating mammalian dopaminergic neurons”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 449(4), pp.444-448.
- Sun, L., Li, P., Carr, A. L., Gorsuch, R., Yarka, C., Li, J., et al. (2014) “Transcription of the SCL/TAL1 interrupting Locus (Stil) is required for cell proliferation in adult Zebrafish Retinas”, *The Journal of Biological Chemistry*, 289(10), pp.6934-6940.
- Taha Najim, R., Mybeck, L., Andersson, S., Andersson Grönlund, M. (2022) “Thinner peripapillary retinal nerve fibre layer and macular retinal thickness in adolescents with surgically treated hydrocephalus in infancy”, *Acta Ophthalmologica*, 100(6), pp.673-681.
- Tarailo-Graovac, M., Shyr, C., Ross, C. J., Horvath, G. A., Salvarinova, R., Ye, X. C., et al. (2016) “Exome Sequencing and the Management of Neurometabolic Disorders”, *The New England Journal of Medicine*, 374(23), pp.2246-2255.
- Thirlwall, A. S., Brown, D. J., McMillan, P. M., Barker, S. E., Lesperance, M. M. (2003) “Phenotypic Characterization of Hereditary Hearing Impairment Linked

- to DFNA25”, *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 129(8), pp.830-835.
- Tigaret, C. M., Lin, T.-C. E., Morrell, E. R., Sykes, L., Moon, A. L., O’Donovan, M. C., et al. (2021) “Neurotrophin receptor activation rescues cognitive and synaptic abnormalities caused by hemizyosity of the psychiatric risk gene *Cacna1c*”, *Molecular Psychiatry*, 26(6), pp.1748-1760.
- Tillo, M., Charoy, C., Schwarz, Q., Maden, C. H., Davidson, K., Fantin, A. et al. (2016) “2- and 6-O-sulfated proteoglycans have distinct and complementary roles in cranial axon guidance and motor neuron migration”, *Development*, 143(11), pp.1907-1913.
- Tischkowitz, M., Goodman, F., Koliou, M., Webster, D., Edery, P., Jones, A. et al. (2004) “Autosomal dominant B-cell immunodeficiency, distal limb anomalies and urogenital malformations (BILU syndrome) – report of a second family”, *Clinical Genetics*, 66(6), pp.550-555.
- Toni, S., Morandi, R., Busacchi, M., Tardini, L., Merlini, L., Battistini, N. C., et al. (2014) “Nutritional status evaluation in patients affected by bethlem myopathy and ullrich congenital muscular dystrophy”, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, pp.315.
- Tornberg, J., Sykiotis, G. P., Keefe, K., Plummer, L., Hoang, X., Hall, J. E., et al. (2011) “Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), pp.11524-11529.
- Tsoi, H., Yu, A. C. S., Chen, Z. S., Ng, N. K. N., Chan, A. Y. Y., Yuen, L. Y. P., et al. (2014) “A novel missense mutation in *CCDC88C* activates the JNK pathway and causes a dominant form of spinocerebellar ataxia”, *Journal of Medical Genetics*, 51(9), pp.590-595.
- Tuncer, S., Fiorillo, M. T., Sorrentino, R. (2014) “The multifaceted nature of NLRP12”, *Journal of Leukocyte Biology*, 96(6), pp.991-1000.
- Turhan, A. H., Isik, S. (2019) “Neural Tube Defects: A Retrospective Study of 69 Cases”, *Asian Journal of Neurosurgery*, 14(2), pp.506-509.
- Valdes-Socin, H., Debray, F. G., Parent, A. S., Lebrethon, M. C., Bourguignon, J. P., Bours, V., et al. (2010) “Comment J’EXPLORE ... un hypogonadisme hypogonadotrope congénital isolé”, *Rev Med Liège*, pp.634-641.
- Vella, M. C., Choi, E.-Y., Lin, S.-Y., Reinert, K., Slack, F. J. (2004) “The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the *lin-41* 3’UTR”, *Genes & Development*, 18(2), pp.132-137.

- van de Vijver, E., Maddalena, A., Sanal, Ö., Holland, S. M., Uzel, G., Madkaikar, M., et al. (2012) "Hematologically important mutations: Leukocyte adhesion deficiency (first update)", *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 48(1), pp.53-61.
- Vockley, J., Andersson, H. C., Antshel, K. M., Braverman, N. E., Burton, B. K., Frazier, D. M., et al. (2014) "Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline", *Genetics in Medicine*, 16(2), pp.188-200.
- Vural, M. (2015) "Hidrocefalide Ayırıcı Tanı", *Türkiye Klinikleri Neurosurgery - Special Topics*, 5(1), pp.29-31.
- Walsh, M. A., Turner, C., Timothy, K. W., Seller, N., Hares, D. L., James, A. F., et al. (2018) "A multicentre study of patients with Timothy syndrome", *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 20(2), pp.377-385.
- Wang, L., Li, Z., Sievert, D., Smith, D. E. C., Mendes, M. I., Chen, D. Y., et al. (2020) "Loss of NARS1 impairs progenitor proliferation in cortical brain organoids and leads to microcephaly", *Nature Communications*, 11(1), 4038.
- Wang, X., Wang, R.-H., Li, W., Xu, X., Hollander, M. C., Fornace, A. J., et al. (2004) "Genetic interactions between Brca1 and Gadd45a in centrosome duplication, genetic stability, and neural tube closure", *The Journal of Biological Chemistry*, 279(28), pp.29606-29614.
- Wang, Y., Lian, L., Golden, J. A., Morrissey, E. E., Abrams, C. S. (2007) "PIP5KI gamma is required for cardiovascular and neuronal development", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28), pp.11748-11753.
- Wangler, M. F., Gonzaga-Jauregui, C., Gambin, T., Penney, S., Moss, T., Chopra, A., et al. (2014) "Heterozygous de novo and inherited mutations in the smooth muscle actin (ACTG2) gene underlie megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome", *PLoS genetics*, 10(3), e1004258.
- Welsh, M. J., Smith, A. E. (1993) "Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis", *Cell*, 73(7), pp.1251-1254.
- Welte, T., Tuck, A. C., Papasaikas, P., Carl, S. H., Flemr, M., Knuckles, P., et al. (2019) "The RNA hairpin binder TRIM71 modulates alternative splicing by repressing MBNL1", *Genes & Development*, 33(17-18), pp.1221-1235.
- Williams, K. L., Lich, J. D., Duncan, J. A., Reed, W., Rallabhandi, P., Moore, C., et al. (2005) "The CATERPILLER Protein Monarch-1 Is an Antagonist of Toll-like Receptor-, Tumor Necrosis Factor α -, and Mycobacterium tuberculosis-induced

- Pro-inflammatory Signals*”, *Journal of Biological Chemistry*, 280(48), pp.39914-39924.
- Windpassinger, C., Kroisel, P. M., Wagner, K., Petek, E. (2002) “The human γ -aminobutyric acid A receptor delta (GABRD) gene: molecular characterisation and tissue-specific expression”, *Gene*, 292(1), pp.25-31.
- Woodhoo, A., Alonso, M. B. D., Droggiti, A., Turmaine, M., D’Antonio, M., Parkinson, D. B., et al. (2009) “Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity”, *Nature Neuroscience*, 12(7), pp.839-847.
- Woodhouse, C. R. J. (2008) “Myelomeningocele: neglected aspects”, *Pediatric Nephrology*, 23(8), pp.1223-1231.
- Woods, C. G., Bond, J., Enard, W. (2005) “Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): A Review of Clinical, Molecular, and Evolutionary Findings”, *The American Journal of Human Genetics*, 76(5), pp.717-728.
- Worthey, E. A., Mayer, A. N., Syverson, G. D., Helbling, D., Bonacci, B. B., Decker, B., et al. (2011) “Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease”, *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 13(3), pp.255-262.
- Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., et al. (2011) “5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming”, *Nature Communications*, 2, 241.
- Wu, X., Zhang, Y. (2017) “TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond”, *Nature Reviews. Genetics*, 18(9), pp.517-534.
- Yaffe, Y., Hugger, I., Yassaf, I. N., Shepshelovitch, J., Sklan, E. H., Elkabetz, Y., et al. (2015) “The myelin proteolipid plasmalogen forms oligomers and induces liquid-ordered membranes in the Golgi complex”, *Journal of Cell Science*, 128(13), pp.2293-2302.
- Yahia, A., Chen, Z. S., Ahmed, A. E., Emad, S., Adil, R., Abubaker, R., et al. (2021) “A heterozygous mutation in the CCDC88C gene likely causes early-onset pure hereditary spastic paraplegia: a case report”, *BMC Neurology*, 21(1), pp.78.
- Yaliwal, L. V., Desai, R. M. (2012) “Methylenetetrahydrofolate reductase mutations, a genetic cause for familial recurrent neural tube defects”, *Indian Journal of Human Genetics*, 18(1), pp.122-124.
- Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., et al. (2008) “Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt

signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex”, *Developmental Cell*, 15(1), pp.23-36.

Yamashiro, K. J., Farmer, D. L. (2021) “Fetal myelomeningocele repair: a narrative review of the history, current controversies and future directions”, *Translational Pediatrics*, 10(5), pp.1497-1505.

Yan, K., Rousseau, J., Littlejohn, R. O., Kiss, C., Lehman, A., Rosenfeld, J. A., et al. (2017) “Mutations in the Chromatin Regulator Gene BRPF1 Cause Syndromic Intellectual Disability and Deficient Histone Acetylation”, *The American Journal of Human Genetics*, 100(1), pp.91-104.

Yan, K., Rousseau, J., Machol, K., Cross, L. A., Agre, K. E., Gibson, C. F., et al. (2020) “Deficient histone H3 propionylation by BRPF1-KAT6 complexes in neurodevelopmental disorders and cancer”, *Science Advances*, 6(4), eaax0021.

Yan, M., Wang, L. C., Hymowitz, S. G., Schilbach, S., Lee, J., Goddard, A., et al. (2000) “Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors”, *Science (New York, N.Y.)*, 290(5491), pp.523-527.

Yang, Y., Muzny, D. M., Xia, F., Niu, Z., Person, R., Ding, Y., et al. (2014) “Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing”, *JAMA*, 312(18), pp.1870-1879.

Yarotskyy, V., Gao, G., Peterson, B. Z., Elmslie, K. S. (2009) “The Timothy syndrome mutation of cardiac CaV1.2 (L-type) channels: multiple altered gating mechanisms and pharmacological restoration of inactivation”, *The Journal of Physiology*, 587(3), pp.551-565.

Ybot-Gonzalez, P., Gaston-Massuet, C., Girdler, G., Klingensmith, J., Arkell, R., Greene, N. D. E. et al. (2007) “Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling”, *Development (Cambridge, England)*, 134(17), pp.3203-3211.

Yilmazer, M., Köken, G., Şahin, F. K., Ariöz, D. T., Coşar, E., Köken, R., ve ark. (2009) “Gebelik ve nöral tüp defektleri”, *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 6(3), pp.193-196.

You, L., Yan, K., Zhou, J., Zhao, H., Bertos, N. R., Park, M., et al. (2015) “The Lysine Acetyltransferase Activator Brpf1 Governs Dentate Gyrus Development through Neural Stem Cells and Progenitors”, *PLOS Genetics*, 11(3), e1005034.

Yu, H., Su, Y., Shin, J., Zhong, C., Guo, J. U., Weng, Y.-L., et al. (2015) “Tet3 regulates synaptic transmission and homeostatic plasticity via DNA oxidation and repair”, *Nature Neuroscience*, 18(6), pp.836-843.

- Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G., Rubenstein, J. L. R. (2002) "Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon", *Development (Cambridge, England)*, 129(21), pp.5029-5040.
- Zaganjor, I., Sekkarie, A., Tsang, B. L., Williams, J., Razzaghi, H., Mulinare, J., et al. (2016) "Describing the Prevalence of Neural Tube Defects Worldwide: A Systematic Literature Review", *PLOS ONE*, 11(4), e0151586.
- Zapata, G., Yan, K., Picketts, D. J. (2022) "Generation of a mouse model of the neurodevelopmental disorder with dysmorphic facies and distal limb anomalies syndrome", *Human Molecular Genetics*, 31(20), pp.3405-3421.
- Zech, M., Lam, D. D., Francescatto, L., Schormair, B., Salminen, A. V., Jochim, A., et al. (2015) "Recessive Mutations in the $\alpha 3$ (VI) Collagen Gene COL6A3 Cause Early-Onset Isolated Dystonia", *The American Journal of Human Genetics*, 96(6), pp.883-893.
- Zhang, T., Lou, J., Zhong, R., Wu, J., Zou, L., Sun, Y., et al. (2013) "Genetic Variants in the Folate Pathway and the Risk of Neural Tube Defects: A Meta-Analysis of the Published Literature", *PLOS ONE*, 8(4), e59570.
- Zhang, W. D., Yu, X., Fu, X., Huang, S., Jin, S. J., Ning, Q., et al. (2014) "MicroRNAs function primarily in the pathogenesis of human anencephaly via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway", *Genetics and Molecular Research*, 13(1), pp.1015-1029.
- Zhang, X., Dowd, D. R., Moore, M. C., Kranenburg, T. A., Meester-Smoor, M. A., Zwarthoff, E. C., et al. (2009) "Meningioma 1 is required for appropriate osteoblast proliferation, motility, differentiation, and function", *The Journal of Biological Chemistry*, 284(27), pp.18174-18183.
- Zhang, X. M., Ramalho-Santos, M., McMahon, A. P. (2001) "Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node", *Cell*, 105(6), pp.781-792.
- Zhu, X., Girardo, D., Govek, E.-E., John, K., Mellén, M., Tamayo, P., et al. (2016) "Role of Tet1/3 Genes and Chromatin Remodeling Genes in Cerebellar Circuit Formation", *Neuron*, 89(1), pp.100-112.
- Zlotogora, J. (1997) "Genetic disorders among Palestinian Arabs: 1. Effects of consanguinity", *American Journal of Medical Genetics*, 68(4), pp.472-475.
- Zohn, I. E., Anderson, K. V., Niswander, L. (2007) "The Hectd1 ubiquitin ligase is required for development of the head mesenchyme and neural tube closure", *Developmental Biology*, 306(1), pp.208-221.

Zohn, I. E., Chesnutt, C. R., Niswander, L. (2003) “Cell polarity pathways converge and extend to regulate neural tube closure”, *Trends in Cell Biology*, 13(9), pp.451-454.

Zuniga, A., Quillet, R., Perrin-Schmitt, F., Zeller, R. (2002) “Mouse Twist is required for fibroblast growth factor-mediated epithelial–mesenchymal signalling and cell survival during limb morphogenesis”, *Mechanisms of Development*, 114(1), pp.51-59.

İnternet Kaynağı 1 :

(https://sites.uclouvain.be/anesthweekly/MRP_ENG/index.html?SpinaBifida.html)

İnternet Kaynağı 2: (<https://letgenbio.com/sanger-sekanslama/>)

İnternet Kaynağı 3: (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, Erişim Tarihi: 07.10.2022).

İnternet Kaynağı 4: (OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, Erişim Tarihi: 05.10.2022)

EKLER

EK-1: GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ÇALIŞMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: **Nöral Tüp Defekti Olan Hastalarda Genetik Verilerin Araştırılması**

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Handan YILDIZ

Diğer Araştırmacıların Adı : Doktora Öğr. Nermin AKÇALI, Dr. Öğr. Üyesi Muhsin ELMAS Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN

“Nöral Tüp Defekti Olan Hastalarda Genetik Verilerin Araştırılması” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amacıyla yapılmaktadır. Çalışmaya katılmaya konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

1. Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Bu bölümde aşağıdaki sorular cevaplanmalıdır.

A. Neden özellikle bu kişi/ hasta seçilmiştir.

Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni size nöral tüp defekti tanısı almış olmanızdır. Katılımınız ile bu hastalığın nedeni ve tedavisinde yeni biyobelirteçlerin ortaya çıkartılmasını ışık tutacak bir araştırma gerçekleştirilecektir.

B. Çalışmaya toplam kaç kişi katılması planlanmaktadır.

Çalışmaya nöral tüp defekti tanısı almış 10 kişinin katılması planlanmaktadır.

2. Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım?

(Bu bölüm aynen korunacaktır)

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalamak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

3. Genetik araştırma nasıl yapılacaktır?

a. Hangi örnek(ler) alınacak ve nasıl alınacak?

Çalışma kapsamında, hastalardan EDTA'lı tüpe 2 cc venöz kan alınacaktır. Bu örnekler çalışmanın yapılacağı analizler için gerekli DNA izolasyonları içindir. Lütfen aşağıdaki ilgili kısmı işaretleyiniz.

b. Örnekte neler araştırılacak.

Nöral tüp defektleriyle ilişkisi olduğu düşünülen sorumlu genler kan örneğiniz çalışılarak araştırılacaktır.

c. Örnekler nerede çalışılacak.

AFSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında DNA izolasyonunu takiben hizmet alımı yapılacak firmanın Laboratuvarında Ekzom çalışmaları yapılacaktır. Veriler hizmet alımı yapılacak firmanın Laboratuvarında ve Tıbbi Genetik AD'nda analiz edilecektir.

d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor?

Çalışma tamamlandıktan sonra, hastanın izni olmadığı takdirde, mevcut merkezde, yasal olarak belirtildiği şekilde, usulüne uygun olarak imha edilecektir.

4. Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilecek mi?

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ilerde yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

1. ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış * örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ilerde yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
2. ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
3. ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
4. ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanımını onaylıyorum.

x Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

5. Çalışmanın riskleri nelerdir?

Yapılacak genetik teste bağlı oluşabilecek riskler. Yapılacak testler sizin veya ailenizin bir ferдинin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceği ortaya çıkabilir. Bu bilginin kötüye kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de olumsuz etkileyebilir.

6. Çalışmanın yararları nelerdir?

İlerleyen yıllarda bu tür çalışmalara rehber olması ve nöral tüp defekti olguları başta olmak üzere benzer şekilde tedavisi kısıtlı olan ve ciddi klinik bulgular veren hastalıklara karşı yeni tedavilerin geliştirilmesine yol açmayı sağlamak.

7. Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak? (Bu bölüm aynen korunacaktır.)

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınızda vardır. Lütfen aşağıda ki kuyucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

- ☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum.
- ☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatür de yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik kurul, Sağlık Bakanlığı ve diğer ilgili sağlık otoriteleri orijinal tıbbi kaydınıza doğrudan erişebilir. Bu yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayarak yalnızca adı geçen kişi ve kurumlara erişim izni vermiş olacaksınız. Ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

8. Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir? Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir para ödeme yapılmayacaktır.

9. Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?(Bu bölüm aynen korunacaktır.)Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

10. Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacaktır? Araştırmadan dolayı katılımcının görebileceği olası bir zarar durumu bulunmamaktadır

11. Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda Sorumlu araştırmacı **Prof. Dr. Handan YILDIZ'a** ... numaralı telefondan veya yardımcı araştırmacı Doktora Öğr. Nermin AKÇALI'ya ... numaralı telefonlardan ulaşabilirsiniz.

Gönüllünün:
Araştırmacının

Onamı İmzalatan

Adı Soyadı:

Adı Soyadı: Nermin AKÇALI

Tel:

EK-2: Hasta Bilgi Formu

Hastanın adı:

Cinsiyet:

1. Yaşı:
2. Kilosu:
3. Baş çevresi:
4. Boyu:
5. Doğduğu kilo:
6. Konuşma yaşı:
7. Yürüme yaşı:
8. Gebelikte folik asit kullanımı:
9. Gebelikte B12 kullanımı :
10. Sezaryen/normal doğum:
11. Anne-baba yaşı:
12. Annede-babada kronik/sistemik hastalıklar:
13. Gebelikte annenin kilosu:
14. Anne baba arasında akrabalık var mı?:
15. NTD'li kardeş öyküsü: Ailede NTD'li akraba öyküsü:
16. Hamileliğin ilk trimesterinde sigara, alkol, ilaç kullanımı, ateşli hastalık geçirip geçirmediği:
17. Üçlü tarama testinin varlığı:
18. Tanı sonrasında gebeliğin seyri:
19. Annenin gebelik sayısı ve düşük öyküsü:
20. Bebeğe ntd'ye eşlik eden ekstremitte tutulumu veya başka rahatsızlık:
21. Geçirdiği ameliyatlar:

EK-3: İntihal Yazılım Programı Raporu



EK-4: Etik Kurul İzin Belgesi



ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM

Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2011)

Yüksek Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (2014)

Yüksek Lisans: Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Genetik AD (2019)

YAYINLAR

Uluslararası Hakemli Dergilerde (SCI) Yayımlanmış Makaleler

- [1] Yıldız, M., **Akçalı, N.** and Terzi, H. 2015. Proteomic and biochemical responses of canola (*Brassica napus* L.) exposed to salinity stress and exogenous lipoic acid. *Journal of Plant Physiology*, 179: 90-99.
- [2] Yıldız M., Terzi H., Yıldız SH., Varol N., Özdemir Erdoğan M., Kasap M., **Akçalı N.**, Solak M. 2020. Proteomic analysis of the anti-cancer effect of various extracts of endemic *Thermopsis turcica* in human cervical cancer cells". *Turkish Journal of Medical Science*, 50:1993-2004.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanmış Makaleler

- [1] Yıldız, M., Terzi, H. ve **Akçalı, N.**, 2014. Tuz stresi altındaki bitkilerin metabolik yollarındaki proteom değişimleri. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(1): 81-93.
- [2] Yıldız, M., Terzi, H. ve **Akçalı, N.**, 2014. Bitki Tuz Stresi Toleransında Salisilik Asit ve Poliaminler. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14(2): 7-22.
- [3] Yıldız, M., Şener, YM., Terzi, H. ve **Akçalı, N.**, 2022. Kromozom Polimorfizmleri İle İnfertilite Arasındaki İlişkinin Analizi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, yayın sürecinde.

Ulusal Sempozyum/Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- [1] Yıldız, M., Terzi, H., **Akçalı, N.** ve Pehlivan, E., Kanola (*Brassica napus* L.) Çeşitlerinin Tohum Çimlenmesi Üzerine Tuzluluk, Sıcaklık ve Fotoperiyodun Etkileri, 5. Uluslararası Katılımlı Tohumculuk Kongresi, 545, 2014, DİYARBAKIR.
- [2] Yıldız, M., Terzi, H. ve **Akçalı, N.**, Tuz stresi altındaki kanola (*Brassica napus* L.) fidelerinin tuza toleransında lipoik asidin etkisi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 593, 23-27 Haziran 2014, ESKİŞEHİR.
- [3] Yıldız, M., **Akçalı, N.** ve Terzi, H., Kanola (*Brassica napus* L.) Fidelerinde NaCl-Teşvikli Proteomik Değişimler Üzerine Dışsal Lipoik Asidin Etkisi, 1. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, 66, 01-04 Eylül 2015, ERZURUM.
- [4] Elmas, M., **Akçalı, N.**, Söylemez, Z. ve Solak, M., Robertsonian translokasyonu ve 9. kromozomun perisentrik inversiyonun birlikte olduğu tekrarlayan gebelik kaybı olgusu, 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2015, Ölüdeniz/FETHİYE
- [5] Söylemez Z., **Akçalı N.**, Avcı K., Varol N., Özdemir Erdoğan M., (2017). Down sendromlu bir olguda hemihipertrofi. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Ölüdeniz/FETHİYE 160 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3793870)
- [6] **Akçalı N.**, Elmas M., Karaosmanoğlu C., Yıldırım A., Çoban N., (2017). Trizomi X sendromlu bir olgu. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Ölüdeniz/FETHİYE.
- [7] Melike ATASEVEN KULALI, **Nermin AKÇALI**, Serap TUTGUN ONRAT, Down sendromlu çocukların epidemiyolojik ve klinik özellikleri, 4th International Health Science and Life Congress, 221, 08-10 April 2021 Burdur/Turkey

Projelerde Yaptığı Görevler:

- [1] “Afyonkarahisar endemiği *Thermopsis turcica*'dan izole edilen doğal bileşiklerin insan kanser hücre hatlarında anti-kanser potansiyellerinin araştırılması” Afyon Kocatepe Üniversitesi Projesi, 15.TEMATİK.01, **Yardımcı Araştırmacı**
- [2] "Yaşa bağlı makula dejenerasyonu ile ilişkili başlıca gen polimorfizmlerinin toplumumuzda incelenmesi" TÜBİTAK Projesi, 112S269, 2014-2015
- [3] “Kisspeptin geni ve endometriyal polip ilişkisi” BAP Projesi, 2022, **Yardımcı Araştırmacı**

Ulusal kongre, panel, konferans katılımları

- [1] Afyon Kocatepe Üniversitesi 1. Biyoloji Günleri, 26-27 Nisan 2012, Afyon
- [2] 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir

- [3] 1. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, 01-04 Eylül 2015, Erzurum
- [4] AKÜ Kanser Günleri, 9-10 Nisan 2015, Afyon
- [5] 14.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2015, Ölüdeniz/Fethiye
- [6] Nadir Hastalıklar Konferansı, 2016, Afyon
- [7] Ege Tıp Günleri Çalıştayı ‘‘Sitogenetik Uygulamalar’’, 4-5 Mayıs 2017, İzmir
- [8] Erciyes Tıp Günleri, 11-13 Mayıs 2017, Kayseri
- [9] 15.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2017, Ölüdeniz/Fethiye
- [10] 4th International Health Science and Life Congress, 08-10 April 2021 Burdur/Turkey
- [11] İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Okuryazarlık Eğitim Toplantıları ‘‘Genetik Hastalıklara Yaklaşım’’, 13 Ekim 2021

Laboratuvar Tecrübesi

Proteomik analizler (Protein ekstraksiyonu, İki-yönlü jel elektroforezi, In-gel tryptic digestion vb.)

Postnatal Sitogenetik (Periferik kandan hücre kültürü, image analiz sistemi vb.)

Prenatal Sitogenetik (Amniyosentez ve tahliye materyalinden hücre kültürü ve analiz)

Kemikiliği Sitogenetiği (Hücre kültürü ve analiz)

Moleküler analizler (Otomatize ve manüel DNA izolasyonu, RNA izolasyonu, PCR ve Real-Time PCR, Pyro-sekanslama vb.)

Doku ve Hücre Kültürü