

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

**Pre-perinatal dönemde ayırıcı tanıda osteogenezis imperfekta
düşünülen olgularda yeni nesil dizilemenin
kesin tanıya katkısı**

Dr. Leyli Şentürk

Tıpta Uzmanlık Tezi

Danışman: Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner

2. Danışman : Dr. Çağrı Güleç

İSTANBUL-2019

TEZ DEĞERLENDİRME TUTANAĞI

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerekli uzmanlık süresini ve rotasyonlarını tamamlayan uzmanlık öğrencisi

Dr. Leyli ŞENTÜRK

“Pre-perinatal dönemde ayırıcı tanıda Osteogenezis İmperfekta düşünülen olgularda yeni nesil dizilemenin tanıya katkısı” konulu tezi 05.07.2019 tarihinde jürimiz tarafından 2.kez değerlendirilmiş ve Bilime katkı sağlayan orijinal bir çalışma olduğu, tez yazım kurallarına uygun yazıldığı ve aday tarafından başarılı bir şekilde savunulduğu için **başarılı** bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Seher BAŞARAN



Üye

Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER



Üye

Doç. Dr. Gözde YEŞİL



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Leyli Şentürk

İTHAF

Koray'a

Tüm hasretimle...

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasını disiplinle takip eden, büyük bir özveri ile okuyan, saygıdeğer hocam *Prof. Dr. Seher Başaran* ve öğrenme arzusu ve sabrıyla örnek aldığım saygıdeğer danışman hocam *Prof. Dr. Oya Uyguner'e*

Tecrübeleri ile bana yol gösteren değerli hocam *Prof. Dr. Hülya Kayserili Karabey'e*,

Çok değerli bilgi ve tecrübeleri ile uzmanlık eğitimime değer katan sayın hocalarım *Prof. Dr. Şükrü Palandüz, Prof. Dr. Kıvanç Çefle, Prof. Dr. Şükrü Öztürk ve Doç. Dr. Birsen Karaman'a*,

Tübitak projesi kapsamında NGS analizlerinin yapılmasındaki katkısından dolayı saygıdeğer hocam *Prof. Dr. Beyhan Tüysüz'e*,

Zekası, karakteri ve sabrıyla şaşırtıcı, bilim insanı ve iş arkadaşlığıyla eşi bulunmaz ikinci tez danışmanım sayın *Dr. Çağrı Güleç'e*

Her zaman zekasını hayranlıkla izleyeceğim sayın *Uzm. Dr. Umut Altunoğlu'na*,

NGS analizlerinde bana yol gösteren sayın *Dr. Güven Toksoy'a*

Çalışmalarım sırasında zor zamanlarımda bana destek olan sevgili arkadaşlarım sayın *Doç. Dr. Asuman Gedikbaşı, Uzm. Dr. Şahin Avcı, Uzm. Dr. Tuğba Kalaycı, Dr. Tutku Turgut, Alev Yalın, Ebru Bektaş'a*; dosya araştırmaları sırasında yaptıkları yardımlarla sayın *Yasemin Ari Şengül, Cemal Koç* ve adını yazamadığım tüm klinik ve laboratuvar çalışanı arkadaşlarımla, rahmetle andığım *Kadir Kaya'ya*

Beni bu günlere getiren, çalışmam boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan başta canım annem ve eşim olmak üzere tüm *aileme*,

Sonsuz teşekkür ederim...

Dr. Leyli Şentürk, 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	II
BEYAN	III
İTHAF	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	XII
ŞEKİLLER LİSTESİ	XIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	XVI
ÖZET.....	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.2.1. İskelet Sistemi Embriyolojisi.....	6
2.2.2. Kemik biyokimyası.....	10
2.2.3. Kemikğin biyo-mekanik özellikleri	13
2.2.4. Kırığın evrimi.....	14
2.3. İntrauterin fetal kırıklar	15
2.4. Letal İskelet Displazileri.....	15
2.4.1. Letal iskelet displazilerinde sınıflama, radyolojik ve histopatolojik bulgular....	16
2.4.1.1. FGFR3 grubu.....	16
2.4.1.2. Tip II kollajen grubu.....	16
2.4.1.3 Sülfasyon bozuklukları grubu.....	17
2.4.1.4 Filaminopatiler.....	17
2.4.1.5 Kısa kot polidaktili grubu.....	17
2.4.1.6 Mineralizasyon bozuklukları.....	17
2.4.1.7 <i>Bent bone</i> displaziler-Kampomelik displazi.....	18
2.4.1.8 OI ve azalmış kemik dansitesi grubu.....	18
2.5. Osteogenezis İmpfekta.....	18
2.5.1. Tarihçe.....	19
2.5.2. Klinik Sınıflama.....	21
2.5.3. Genişletilmiş Sillence sınıflaması.....	23
2.5.4 Moleküler Patogenez.....	24
2.5.4.1. Tip 1 kollajenin sentez ve işlenme defekti.....	24
2.5.4.2. Yapısal ve kantitatif kollajen kusurları	26
2.5.4.3. OI'de Kollajen genler.....	27

2.5.4.4. Oİ’de Non-Kollajen genler ve patogenezez.....	29
2.5.4.5. Mineralizasyon Defektleri (OI Tip V/ OI Tip VI).....	29
2.5.4.6. Şaperon ve çapraz bağlanma kusurları (OI TİP XI/ Tip X/ Bruck Sendromu).....	30
2.5.4.7. Post-translasyonel kusurlar (OI Tip VII/ Tip VIII/ Tip IX).....	32
2.5.4.8. Kollajen işleme kusurları (OI Tip XIII/Osteogenesis İmperfecta/Ehlers–Danlos Fenotipi).....	33
2.5.4.9. Osteoblast farklılaşması ve işlevindeki kusurlar (OI Tip XII/OI Tip XIV/ OI Tip XV/ OI Tip XVI).	34
2.5.4.10. Endoplazmik retikulum ve olası metabolik komponentler (OI Tip XVI /OI tip XIX).....	35
2.6. Oİ’da İskelet Dışı Bulgular.....	38
2.6.1. İşitme Kaybı.....	38
2.6.2. Oİ’da Göz Bulguları.....	39
2.6.3. Dentinogenezis İmperfekta.....	40
2.6.4. Kraniyo-spinal anomaliler.....	40
2.6 5. Endokrin anomaliler.....	41
2.6.6. Kardiyo-vasküler anomaliler.....	42
2.6.7. Cilt bulguları.....	42
2.6.8. Diğer Bulgular.....	43
2.7. Tanı.....	43
2.7.1. Biyokimyasal tanı	43
2.7.2. Prenatal Tanı.....	44
2.7.3. Postnatal Tanı.....	45
2.8. Oİ’de Radyolojik Tanı.....	46
2.8.1. TİP I	46
2.8.2. Tip II.....	46
2.8.3. Tip IIA	46
2.8.4. TİP IIB /TİP IX.....	46

2.8.5. TİP IIC.....	47
2.8.6. TİP III.....	48
2.8.7. TİP IV	48
2.8.8. TİP V.....	48
2.8.9. TİP VII.....	49
2.8.10. TİPVIII.....	50
2.8.11. TİP IX.....	50
2.9. Postmortem Histopatoloji.....	50
3. MATERYAL – METOD.....	53
3.1. Olgu Grubu ve Klinik Değerlendirmeler.....	53
3.2. Moleküler Yöntemler.....	53
3.2.1. DNA Kalitesinin Değerlendirilmesi ve Yoğunluğunun Ölçümü	53
3.2.2. Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi	54
3.2.2.1. Hedef Genlerin Belirlenmesi	54
3.2.2.2. Qubit Florometre İle DNA Yoğunluklarının Ölçümü.....	56
3.2.2.3. Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması.....	56
3.2.2.4. Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi.....	58
3.2.2.5. Barkod ve Adaptörlerin Bağlanması.....	59
3.2.2.6. Çoğaltılmamış Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması.....	60
3.2.2.7. Qubit florometre ile kütüphane ürünlerinin kantitasyonu.....	60
3.2.2.8. Amplifiye kütüphane ürünlerinin saflaştırılması.....	61
3.2.2.9. Kütüphane kantitasyonu ve seyreltme faktörünün hesaplanması.....	62
3.2.2.10. Veri Analizi	62
3.2.3. YND ile Saptanan Değişimlerin ve Panel-Gen Testi ile Kapsanmayan veya Düşük Okuma Alınan Bölgelerin Sanger Dizileme Çalışmaları	64
3.2.3.1. Sanger Dizileme İçin Primerlerin Tasarlanması	64
3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	64
3.2.3.3. Enzimatik Yöntem ile PZR Ürün Saflaştırılması	65
3.2.3.4. DNA Dizi Analizi	65
3.2.3.5. Dizi PZR Reaksiyonu.....	65
3.2.3.6. Dizi PZR Reaksiyonu Ürünlerinin Saflaştırılması	66

3.2.3.7. Elektroforez Cihazına Yükleme	66
3.2.3.8. Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi	66
3.2.4. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Analizi	67
3.2.4.1. MLPA Çalışma.....	67
3.2.4.2. DNA Denatürasyonu ve Prob Karışımı ile Hibridizasyon Aşaması	67
3.2.4.3. Ligasyon Aşaması	67
3.2.4.4. PZR Aşaması	68
3.2.4.5. Kapiler Elektroforez Cihazı ile Fragmanların Yürütülerek Ayırıştırılma Aşaması	68
3.2.4.6. Veri Analizi	69
3.2.5 Ion Torrent Platformunda CNV Analizi	69
BULGULAR.....	70
4.1.1. Aile (OI#1).....	74
4.1.1.1. Klinik Bulgular	74
4.1.1.2. Moleküler Bulgular	75
4.1.2 Aile (OI#2).....	75
4.1.2.1 Klinik Bulgular	75
4.1.2.2 Moleküler Bulgular.....	77
4.1.3 Aile (OI#3)	78
4.1.3.1 Klinik Bulgular.....	78
4.1.3.2 Moleküler Bulgular.....	79
4.1.4 Aile (OI#4).....	79
4.1.4.1. Klinik Bulgular	79
4.1.4.2. Moleküler Bulgular.....	80
4.1.5. Aile (OI#5).....	81
4.1.5.1 Klinik Bulgular	81
4.1.5.2 Moleküler Bulgular.....	82
4.1.6. Aile (OI#6)	83
4.1.6.1 Klinik Bulgular	83

4.1.6.2. Moleküler Bulgular	84
4.1.7. Aile (OI#7)	85
4.1.7.1. Klinik Bulgular	85
4.1.7.2. Moleküler Bulgular	85
4.1.8. Aile (OI#8)	86
4.1.8.1 Klinik Bulgular	86
4.1.8.2 Moleküler Bulgular	87
4.1.9. Aile (OI#9)	88
4.1.9.1. Klinik Bulgular	88
4.1.9.2. Moleküler Bulgular	89
4.1.10. Aile (OI#10)	90
4.1.10.1. Klinik Bulgular	90
4.1.10.2. Moleküler Bulgular.....	91
4.1.11 Aile (OI#11)	92
4.1.11.1. Klinik Bulgular.....	92
4.1.11.2. Moleküler Bulgular	93
4.1.12. Aile (OI#12)	93
4.1.12.1. Klinik Bulgular.....	93
4.1.12.2. Moleküler Bulgular	94
4.1.13 Aile (OI#13)	95
4.1.13.1. Klinik Bulgular	95
4.1.13.2. Moleküler Bulgular	96
4.1.14.Aile (OI#14)	97
4.1.14.1 Klinik Bulgular	97
4.1.14.2. Moleküler Bulgular	98
4.1.15. Aile (OI#15)	99
4.1.15.1. Klinik Bulgular	99

4. 1.15.2 Moleküler Bulgular	100
4.1.16 Aile (OI#16).....	101
4.1.16.1. Klinik Bulgular	101
4.1.16.2. Moleküler Bulgular.....	102
4.1.17. Aile (OI#17).....	103
4.1.17.1. Klinik Bulglar	103
4.1.17.2. Moleküler Bulgular	104
4.1.18. Mutasyon Saptanmayan Olgular.....	105
5. TARTIŞMA	108
6. KAYNAKLAR	117
7. ETİK KURUL KARARI	139
8. FORMLAR	140
9. ÖZGEÇMİŞ	143

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: ISDS sınıflaması 2015 revizyonu.....	1
Tablo 2: OI eponimleri.....	19
Tablo 3: Genişletilmiş Sillence sınıflaması.....	23
Tablo 4: OI panel genleri, kromozomal yerleşimleri ve ilişkili fenotipler.....	54
Tablo 5: 2X primer havuzu için hazırlanan miks.....	56
Tablo 6: Kullanılan PZR solüsyonları.....	57
Tablo 7: Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan termal döngü programı.....	57
Tablo 8: Havuzdaki primer çiftine göre döngü ayarlama.....	58
Tablo 9: Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı.....	58
Tablo 10: Örnek barkod adaptör karışımı.....	59
Tablo 11: Barkod-adaptör ligasyon solüsyonu.....	59
Tablo 12: Ligasyon için kullanılan termal döngü programı.....	59
Tablo 13: Ürün başına hazırlanan Qubit miksi.....	60
Tablo 14: Qubit PZR termal döngü programı.....	61
Tablo 15: Ortalama amplikon büyüklüğüne göre seyreltme faktörünün hesaplanması.....	62
Tablo 16: Saptanan OI ilişkili patojenik variant tipleri	72
Tablo 17: YND panel gen testinde mutasyon saptanan olguların postmortem bulguları.....	72
Tablo 18: YND ile Mutasyon Saptanmayan Olgular.....	106
Tablo 19: COL1A1 ve COL1A2 genlerinde saptanan Glisin>Serin dönüşümüne neden olan patojenik değişimler.....	113

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Somit gelişimi.....	6
Şekil 2. Endokondral kemik oluşumu.....	7
Şekil 3. İntramembranöz kemikleşme.....	8
Şekil 4. Fetal kemik gelişimi	9
Şekil 5. Fetal haftaya göre kemik radyolojisi	10
Şekil 6. Kortikal kemik kesiti.....	11
Şekil 7. Kollajen sentezi.....	12
Şekil 8. Tip 1 kollajenin yapısı.....	13
Şekil 9. Kemik organizasyonunun evrimi.....	14
Şekil 10. M.Ö. 1000 yılında Mısır'da bulunan bir çocuk mumyasına ait kalıntılar.....	20
Şekil 11. OI'nin bildirildiği ilk tıbbi metin.....	20
Şekil 12. Willem Vrolik tarafından tanımlanan fetusa ait illüstrasyon.....	21
Şekil 13. OI moleküler patogenezi.....	25
Şekil 14. COL1A1 ve COL1A2 genlerinin 3 boyutlu görseli.....	27
Şekil 15. Tip 1 kollajende tek nükleotidlik değişim.....	28
Şekil 16. COL1A1 ve COL1A2 ekzonlarında tanımlanan mutasyon diyagramı.....	29
Şekil 17. IFITM5 mutasyonu taşıyan olgunun iskelet bulguları.....	30
Şekil 18. OI veya Bruck sendromunda tip I kollajenin mutasyonu sonucu post-translasyonel modifikasyonundaki anomaliyi gösteren illüstratif bir örnek.....	31
Şekil 19. Prolil 3-hidroksilasyon kompleksi ve fibril kollajenler üzerindeki aktivitesi.....	32
Şekil 20. Kıkırdak ilişkili proteini (CRTAP) kodlayan gendeki mutasyonu taşıyan otozomal resesif letal OI tanılı olgu.....	33
Şekil 21. Endoplazmik retikulum (ER) stresi ve katlanmamış protein yanıtı (UPR).....	36
Şekil 22. OASIS'in aktivasyon mekanizmaları.....	36
Şekil 23. CREB3L1 mutasyonlu olgu örneği.....	37
Şekil 24. MBTPS2'deki mutasyonu taşıyan 2 yaşında erkek olgu.....	38
Şekil 25. Dentinogenezis İmperfekta	40
Şekil 26. Baziller İmpresyon.....	41
Şekil 27. OI alt tipleri arasında optik cilt biyopsi farkları.....	43
Şekil 28. OI'da postnatal tanı algoritması.....	45

Şekil 29. Tip I OI fetüs örneği.....	46
Şekil 30. OI Tip IIA COL1A1 mutasyonlu fetus.....	47
Şekil 31. COL1A1 missense mutasyonlu Tip IIB olgusu.....	47
Şekil 32. Uzun, ince, yetersiz modellenmiş kemikler, çoklu kırıklar, beading içeren kostalarla Tip IIC olgusu.....	47
Şekil 33. Deforme uzun kemikleri gösteren radyografisiyle Tip III olgusu.....	48
Şekil 34. OI Tip IV 23 haftalık fetüs radyografisi.....	48
Şekil 35. OI Tip V fetusta sol humerus ve kotlarda kırıklar X-ray görüntüsüne ait bir örnek.....	49
Şekil 36. CRTAP delesyonundan etiklenmiş 3 haftalık OI olgusu.....	49
Şekil 37. Postnatal homozigot LEPRE1 mutasyonlu (c.401_402delAA) infanta ait radyolojik görüntüler.....	50
Şekil 38. PPIB geni homozigot delesyonlu olguya ait radyolojik görüntü.....	50
Şekil 39. Postmortem multipl kostal fraktürler.....	51
Şekil 40. OI'de kemik histolojisi.....	52
Şekil 41. Polarize ışık altında görülen kemik lamellasyonu farklılıkları.....	52
Şekil 42. YND çip görüntüsü.....	70
Şekil 43. Patojenik varyant saptanan genler ve Olgulara ait demografik veriler/antenatal tanı haftası.....	71
Şekil 44. Aile OI#1 Klinik Bulgular.....	74
Şekil 45. Aile OI#1 Moleküler sonuçlar.....	75
Şekil 46. Aile OI#2 Klinik Bulgular.....	76
Şekil 47. Aile OI#2 Moleküler sonuçlar.....	77
Şekil 48. Aile OI#3 Klinik Bulgular.....	79
Şekil 49. Aile OI#3 Moleküler sonuçlar.....	79
Şekil 50. Aile OI#4 Klinik Bulgular.....	80
Şekil 51. Aile OI#4 Moleküler sonuçlar.....	81
Şekil 52. Aile OI#5 Klinik Bulgular.....	82
Şekil 53. Aile OI#5 Moleküler sonuçlar.....	82
Şekil 54. Aile OI#6 Klinik Bulgular.....	84
Şekil 55. Aile OI#6 Moleküler sonuçlar.....	84
Şekil 56. Aile OI#7 Klinik Bulgular.....	85
Şekil 57. Aile OI#7 Moleküler sonuçlar.....	86

Şekil 58. Aile OI#8 Klinik Bulgular.....	87
Şekil 59. Aile OI#8 Moleküler sonuçlar.....	88
Şekil 60. Aile OI#9 Klinik Bulgular.....	89
Şekil 61. Aile OI#9 Moleküler sonuçlar.....	90
Şekil 62. Aile OI#10 Klinik Bulgular.....	91
Şekil 63. Aile OI#10 Moleküler sonuçlar.....	91
Şekil 64. Aile OI#11 Klinik Bulgular.....	92
Şekil 65. Aile OI#11 Moleküler sonuçlar.....	93
Şekil 66. Aile OI#12 Klinik Bulgular.....	94
Şekil 67. Aile OI#12 Moleküler sonuçlar.....	95
Şekil 68. Aile OI#13 Klinik Bulgular.....	96
Şekil 69. Aile OI#13 Moleküler sonuçlar.....	97
Şekil 70. Aile OI#14 Klinik Bulgular.....	98
Şekil 71. Aile OI#14 Moleküler sonuçlar.....	99
Şekil 72. Aile OI#15 Klinik Bulgular.....	100
Şekil 73. Aile OI#15 Moleküler sonuçlar.....	100
Şekil 74. Aile OI#16 Klinik Bulgular.....	102
Şekil 75. Aile OI#16 Moleküler sonuçlar.....	103
Şekil 76. Aile OI#17 Klinik Bulgular.....	104
Şekil 77. Aile OI#17 Moleküler sonuçlar.....	104

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

aCGH	: Array Comparative Genomic Hybridization
AP	: Anteroposterior
AS	: Amniyosentez
BI	: Basillar İmpresyon
BMD	: Bone mineral density
BAM	: Binary Alignment Map
bç	: Baz çifti
CD	: Campomelic dysplasia
cDNA	: Complementary DNA (tamamlayıcı DNA)
CNV	: Copy Number Variation
CVS	: Koryon villus biyopsisi (<i>chorionic villus sampling</i>)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DbSNP	: <i>The Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
DI	: <i>Dentinogenesis Imperfecta</i>
dH₂O	: Distile su
Dntp	: Deoksiribonükleotid trifosfat
ddNTP	: dideoksinükleotid
dk	: dakika
ECM	: Ekstraselüler matriks (<i>extracellular matrix</i>)
EDS	: Ehlers-Danlos sendromu
EDTA	: Etilendiamin tetraasedik
asit EM	: Elektron mikroskopisi
ExAC	: Exome Aggregation Consortium
FGFR3	: <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
FISH	: <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FL	: <i>Femur lenght</i>
GH	: Gebelik haftası
GPTT	: Gravide, Parite, Tıbbi terminasyon
HC	: <i>Head Circumference</i>
HGMD	: Human Gene Mutation Database (İnsan Mutasyon Veri Bankası)

IGV	: Integrative Genomics Viewer
ISDS	:Uluslararası İskelet Displazileri Topluluğu (<i>The International Skeletal Dysplasia Society</i>)
KS	: Kordosentez
KSV	: Kopya sayısı variant
MAF	: Minör allel frekansı
MLPA	: <i>Multiple Ligation Dependent Probe Amplification</i>
NCBI	: <i>The National Center for Biotechnology Information</i>
OD	: Otozomal Dominant
OFC	: <i>Oksipitofrontal circumference</i>
OR	: Otozomal Resesif
OMIM	:Online Mendelian Inheritance in Man
PEV	: Pes Ekino-varus
PN	: Postnatal
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rER	: <i>rough endoplasmic reticulum</i>
SD	: Standart Deviasyon
SD	: Sanger Dizileme
SIFT	: <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
Sn	: saniye
TBF	: Trabeküler kemik fraksiyonu
Tm	: Temperature of Melting (Erime ısısı)
TSS	: Torrent Suit Server
TED	:Tüm Ekzom Dizleme
TGD	:Tüm Genom Dizileme
USCS	:University of California Santa Cruz
UPR	:Katlanmamış protein yanıtı
UTR	:Untranslated region
US	:Ultrasonagrafi
XLD	:X'e bağlı dominant(<i>X-linked dominant</i>)
XLR	:X'e bağlı resesif(<i>X-linked recessive</i>)
VCF	:Variant Call Format
YND	:Yeni Nesil Dizleme
µl	:mikrolitre

ÖZET

Giriş: Osteogenezis İmperfekta, ISDS sınıflamasında ‘azalmış kemik dansitesi’ grubunda yer alan ve sıklığı 1/10,000-20,000 arasında bildirilen, şiddeti ve başlama yaşı perinatal letal formlardan, ilerleyen yaşlarda saptanan hafif formlara kadar değişkenlik gösteren bir hastalıktır. Major bulguları, azalan kemik kitlesi, kemik kırılabilirliğinde artış, mavi sklera, dentinogenezis imperfekta, işitme kaybı, laksite, artmış eklem hareketliliği, kısa boy, kolay morarma, göz, kardiyopulmoner ve nörolojik anomalilerdir. Olguların %85’i Tip-1 kollajeni kodlayan genlerin dominant mutasyonlarıyla ilişkili olup, son 15 yılda sentez, katlanma, posttranslasyonel modifikasyonlar, şaperon fonksiyonları ve osteoblastik aktivite gibi farklı görevlere sahip proteinlerin resesif mutasyonlarıyla dâhil edilmiştir.

Yöntemler: Bu çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD polikliniğinde, 2000-2019 tarihleri arasında pre/perinatal dönemde ayırıcı tanıda OI tanısı alan 26 fetal olguda, *Ion Torrent* platformunda özgün tasarlanan OI ve azalmış mineralizasyon ilişkili 26 geni kapsayan panel-gen testinde, yeni nesil dizileme tekniğiyle (YND) elde edilen varyantlar değerlendirildi.

Sonuçlar: ACMG kriterleri baz alınarak değerlendirilen 26 olguda 4 farklı gende (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*), toplam 17 varyant saptandı (tanı, %65,3). Olası patojenik varyantlar Sanger dizi ile doğrulandı, uygun ailelerde segregasyon analizi yapıldı. Patojenik varyant saptanmayan olgularda, MLPA analiziyle *COL1A1* genindeki olası delesyon/duplikasyonlar dışlandı. Tüm olgu grubunda YND sonuçlarında kopya sayısı varyant (KSV) analiz programı kullanılarak büyük delesyon ve duplikasyonlar dışlandı.

Tartışma: Bu çalışmada, tasarlanan panel-gen testinin OI’nın moleküler tanısındaki etkinliği, olası genotip-fenotip korelasyonu ve letal iskelet displazilerinde genetik danışmanın önemi vurgulandı.

Anahtar Kelimeler: OI, YND, genetik danışma, letal

ABSTRACT

Introduction: Osteogenesis Imperfekta (OI) incidence is reported to 1/10,000-20,000. The severity and age of onset of the disease may vary from severe forms that are fatal in the perinatal period to mild forms detected later in life. Major findings are decreased bone mass, increased bone fragility, blue sclera, dentinogenesis imperfecta, hearing loss, laxity, increased joint mobility, short stature, easy bruising. In the last 15 years, despite the discovery of new genes, 85% of cases are associated with dominant mutations in genes encoding type 1 collagen.

Methods: In this study, we evaluated 26 fetal cases with OI in differential diagnosis in pre / perinatal period between 2000 and 2019 in Istanbul Medical Faculty, Department of Medical Genetics, with panel-gene test through the next generation sequencing tecnics

Results: We have identified total of 17 pathogenic variants in four genes (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*) in 26 different cases. Gross deletions and duplications in *COL1A1* gene are excluded by MLPA in cases with no identified known mutations, furthermore all samples are investigated and exluded for copy number variants (CNV) in Ion Reporter analysis program for genes in the panel.

Discussion: Our study conducted in our Medical Genetics department, efficacy and contribution of panel- gene test in molecular diagnosis of OI are evaluated, genotype-phenotype correlation and importance of providing complete genetic counseling is emphasized.

Key Words: OI, NGS, genetic counseling, lethal

GİRİŞ VE AMAÇ

İskelet anomalileri, kemik ya da kıkırdığın gelişim ve büyümesini etkileyerek iskeletin farklı bölümlerinde şekilsel ve işlevsel anomalilerle sonuçlanan karmaşık bir grup bozukluktur. Klinik açıdan metabolik kemik bozuklukları, osteokondrodisplaziler, disostozlar, malformasyon/redüksiyon defektleri ile majör iskelet bulgusu taşıyan multiple konjenital anomali sendromları adı altında incelenen, heterojen bir gruptur. Etyolojide kromozom anomalileri, vasküler anomaliler, çevresel faktörler ve moleküler defektler gibi çok farklı nedenler rol oynar.

İskelet anomalileri içinde kemik ve kıkırdığın gelişim ve büyüme sürecindeki yolaklarda görev alan yapısal proteinlerin yapım, modifikasyon ve regülasyonundaki kalıtsal bozuklukların rol oynadığı osteokondrodisplaziler ilk kez 1970’te “Kemiğin Yapısal Hastalıklarının Uluslararası İsimlendirilmesi” (*International Nomenclatures of Constitutional Diseases of Bone*) tarafından sistematik olarak değerlendirilmiş, radyolojik anormallikler temelinde ise ilk kez Spranger tarafından sınıflandırılmıştır (2). 2015 yılında "Uluslararası İskelet Displazileri Topluluğu (ISDS)" tarafından hazırlanan son nosolojide, moleküler, biyokimyasal ve radyografik kriterlerin kombinasyonu ile 42 grup, 436 hastalık ve ilişkili 364 gen belirlenmiştir (2). (Tablo 1)

Tablo 1. ISDS sınıflaması 2015 revizyonundan uyarlanmıştır (Ref. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. Bonafe L

Grup	Hastalığın Adı
1.	FGFR3 kondrodisplazi grubu
2.	Tip 2 Kollajen Grubu
3.	Tip 11 kollajen grubu
4.	Sulfatasyon defekti grubu
5.	Perlecan grubu
6.	Aggrecan grubu
7.	Filamin grubu ve ilişkili hastalıklar
8.	TRPV4 grubu
9.	Majör iskelet tutulumu olan siliyopatiler
10.	Multipl epifizyal displazi ve psödoakondroplazi grubu
11.	Metafizyal displazile
12.	Spondilometafizyal displaziler (SMD)
13.	Spondilo-epi-(meta)-fizyal displaziler (SE(M)D)

	Ağır spondilodisplastik displaziler
15.	Akromelik displaziler
16.	Akromezomelik displaziler
17.	Mezomelik ve rizo-mezomelik displaziler
18.	Kampomelik displazi ve ilişkili hastalıklar
19.	Silindir kemik displazileri grubu
20.	Multipl eklem çıkıkları ile giden displaziler
21.	Kondrodisplazi punktata (CDP) grubu
22.	Neonatal osteosklerotik displaziler
23.	Osteopetrozis ve ilişkili hastalıklar
24.	Diğer skleroze kemik hastalıkları
25.	Osteogenezis imperfekta ve azalmış kemik dansitesi grubu
26.	Anormal mineralizasyon grubu
27.	Lizozomal depo hastalıkları-iskelet tutulumu (dizostosis multipleks grubu)
28.	Osteolizis grubu
29.	İskelet bileşenlerinin disorganize gelişimi grubu
30.	Aşırı büyüme (uzun boy) sendromları-iskelet tutulumu
31.	Genetik inflamatuvar/romatoid benzeri osteoartropatiler
32.	Kleidokranial displazi ve ilişkili hastalıklar
33.	Kraniosinostoz sendromları
34.	Dizostozlar - belirgin kraniofasial tutulum
35.	Dizostozlar – belirgin vertebra -/w kosta tutulumu
36.	Patellar dizostozlar
37.	Brakidaktilliler (ekstraskletal tutulumun görülmediği)
38.	Brakidaktilliler (ekstraskletal tutulumun görüldüğü)
39.	Ekstremitte hipoplazisi-redüksiyon defektleri grubu
40.	Ektrodaktili – ek bulgular
41.	Polidaktili-Sindaktili-Trifalangizm grubu
42.	Eklem gelişiminde defektler ve sinostozlar

İskelet displazilerinin sıklığı 2-5/10 000 canlı doğum olup, (3,4) yaklaşık 50'si perinatal dönemde letal seyreder. Perinatal mortalite hızı %0,9' dur. Letalite genellikle toraks darlığı ve buna eşlik eden akciğer hipoplazisiyle ilişkilidir (5). Letal iskelet displazileri grubu, tipik olarak non-letal gruba göre daha erken başlangıç ve ağır-ayrıt edilebilir fenotipik özelliklere sahip olduğundan daha yüksek bir prenatal tanı potansiyeline sahiptir (6). İkinci trimesterde (<24 hafta) ortalamaya göre 5. persantil veya 2 SD'nin altında femur veya humerus uzunluğu gösteren herhangi bir fetüs, tüm fetal iskeletin değerlendirilmesi açısından uzmanlığa ve genetik tanı algoritmasına sahip bir merkezce değerlendirilmelidir. Değerlendirmede uzun kemiklerin incelenmesine ek olarak, fetal yüz profile, vertebra gövdelerinin şekli, kemik

mineralizasyonu, el ve ayakların görünüşü, eğiklik (*bowing*) ve kırığın eşlik edip etmemesi gibi bir çok ek ultrason parametreleri vardır (7). Bazı patognomik bulgular (iliak crestte dantel görünümü, mandibular açının kaybolması, *wormian* kemik, akroosteolizis, epifizlerde noktasal kalsifikasyonlar gibi) izlenebileceği gibi birden fazla hastalığı düşündürecek bulgulara (osteopetrozis, makrosefali, eğilmiş kemik, hipoplastik skapula) ek olarak iskelet dışı semptomlarla (fetal hipokinezi, NT artışı, hidrops, santral sinir sistemi anomalileri, konjenital kalp hastalıkları, gastrointestinal anomaliler ve anormal genital yapı) ayırıcı tanı güçleşebilir. Antenatal dönemde tanı konamayan olgularda postmortem klinik muayene, radyografiler, ve histopatoloji moleküler test algoritmasının belirlenmesi açısından oldukça değerlidir (8,9).

Letal iskelet displazileri arasında azalmış mineralizasyon, kırık, eğrilik, dar toraks bulgularıyla antenatal dönemde tanı konabilen osteogenezis imperfekta (OI), ilk kez 1979 yılında Sillence tarafından klinik şiddet baz alınarak 4 grupta değerlendirilmiş (91), 2010'da revize edilerek (10) 5 alt gruba ayrılmış, son nozolojide de klinik şiddete dayalı bu sınıflamaya sadık kalmıştır (2). Sıklığı 1/15.000-20.000'dir (13). Tip I OI'de populasyon frekanslarının 100.000'de 2.35 ile 4.7 arasında değiştiği bildirilmiştir. Tip II OI insidansı raporları 1-1,4/ 40.000-100.000 canlı doğum arasında değişmektedir. Tip III ve IV OI ise tam insidansı bilinmemekle birlikte, tip I'den daha az yaygındır (14).

OI'nın major klinik bulguları; kısa boy, azalan kemik kitlesi, kemik kırılabilirliğinde artış, mavi sklera, dentinogenezis imperfekta (DI), işitme kaybı, laksite ve artmış eklem hareketliliği, kolay morarma, göz, kardiyopulmoner ve nörolojik anomalilerdir (17). Perinatal dönemde ağır seyreden letal formlardan, ilerleyen yaşlarda saptanan hafif formlara kadar şiddet ve başlangıç yaşı değişkenlik gösterir. En hafif şekli olan OI Tip I, kırıklar, mavi sklera ve işitme kaybı ile karakterizedir. DI nadiren görülür. Kırık sıklığı ergenlikle azalır. Bu bireyler normal boya yakın ve minimal kemik deformasyonuna sahiptir (13). Tip II genellikle yenidoğan döneminde çoklu doğumsal kırıklar, mikromeli ve şiddetli akciğer hastalığı ile letaldır (18). OI Tip III progresif formudur. Etkilenen bireyler yüzlerce kırık yaşayabilir. Çoğu üçgen yüz, frontal *bossing* mavi / gri sklera, DI ve iskelet deformitelerine sahiptir. Birçoğunun platisbazi veya basilar invaginasyonları vardır. Boyları çok kısadır (19). OI Tip IV, I ve III ile örtüşen tip olup orta şiddette bir fenotipe sahiptir. Etkilenen bireyler düzinelerce uzun kemik kırığı geçirir ancak çoğu ambulasyon sağlar.

Son 15 yıla kadar OI'nın, tip I kollajenin sırasıyla $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ zincirlerini kodlayan *COL1A1* ve *COL1A2* genlerindeki dominant varyantların neden olduğu bir kemik displazisi olduğu düşünülmüştür. Zamanla çoğu resesif yeni genin keşfedilmesi ile kollajenin yapısal, enzimatik özellikleri ve ekstremler alana transportunu etkileyen farklı proteinlerdeki kusurların tanımlanması normal kemik gelişimi ve kollajen patofizyolojisi ile ilgili bilgiye katkı sağlamıştır (20). Daha yakın zamanda genomik düzeyde yapılan çalışmalarda, OI ile örtüşen fenotiplerin sayıları 20'lere (12) ilişkili gen sayısı da 26'ya (*BMP1*, *COL1A1*, *COL1A2*, *CREB3L1*, *CRTAP*, *DLX3*, *FAM46A*, *IFITM5*, *LRP5*, *MBTPS2*, *NBAS*, *NTRK1*, *P3H1*, *P4HB*, *PLOD2*, *PPIB*, *SCN9A*, *SEC24D*, *SERPINF1*, *SERPINH1*, *SLC2A2*, *SP7*, *SPARC*, *TMEM38B*, *WNT1*) ulaşmıştır (11) (Tablo 5)

Genetik heterojenitesi nedeniyle OI ve benzeri hastalıklarda genlerin tek tek dizilenmesi tanısal süreci zorlaştırmaktadır. Eş zamanlı, çok sayıda olguda, birden fazla sayıda gen ve ekzonun düşük maliyetle dizilenmesine olanak sağlayan yeni nesil dizileme teknolojisi, moleküler genetik tanıda önemli bir çözüm sunmaktadır.

Bu çalışma ile, geniş prenatal ve postmortem olgu arşivine sahip olan İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD kliniğinde, Ocak 2000-Haziran 2019 yılları arasında patolojik USG bulguları, radyolojik ve/veya laboratuvar yöntemleriyle ayırıcı tanısında OI düşünülerek sonlandırılan, IUMF ile sonlanan veya yenidoğan olguların dosya bilgilerinin retrospektif değerlendirilmesiyle 26 kişiden oluşan olgu grubu oluşturuldu.

Ayırıcı tanıda OI düşünülen 26 fetal olguda OI ve azalmış mineralizasyonla giden fenotiplerle ilişkili 26 genin tüm ekzon, ekzon-intron sınır bölgelerini kapsayan ve Ion Torrent platformunda yapılan panel-gen testi yeni nesil dizi incelemesinden elde edilen varyantların değerlendirilmesinin yapılması amaçlandı. Klinik önemi belirlenen değişimlerin özgün primerler tasarlanarak Sanger dizi ile doğrulanması, uygun ailelerde segregasyon analiz sonuçlarının irdelenmesi, herhangi bir patojenik varyant ilişkisi saptanmayanlarda panelin tasarım gereği kapsam dışı bıraktığı bölgelerin HGMD (*Human Genome Mutation Database*) veri tabanında bildirilen patojenik varyant bölgeleri açısından değerlendirilmesi planlandı. Ayrıca tüm hasta grubunda yeni nesil dizileme (YND) platformunda biyoinformatik istatistiksel hesaplamaya dayalı kopya sayısı varyant (KSV) analiz programı kullanılarak büyük delesyon ve duplikasyonlar ve *COL1A1* geninde yapılan MLPA (Multiple Ligation Dependent Probe Amplification) analizinde delesyon/duplikasyonlar araştırıldı. Patojenik varyant saptanmayan olgular tekrar değerlendirildi ve bu değerlendirmenin sonuçlarının seçilmiş olgulara tanısal yaklaşım sağlayacak yeni bir projeye temel oluşturması öngörüldü.

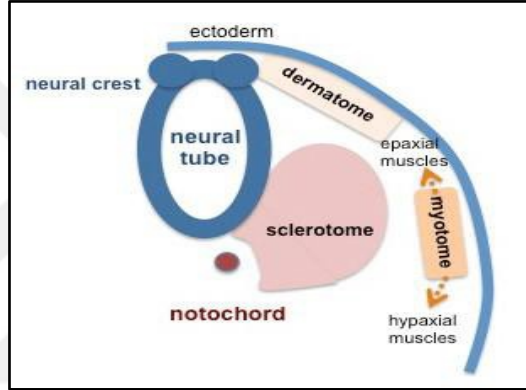
Nihayetinde çalışma sonuçlarının risk altındaki ailelere olası üreme seçeneklerini (prenatal/preimplantasyon tanı) içeren bütünlüklü bir genetik danışma verilmesini sağlaması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.2.1 İskelet Sistemi Embriyolojisi

İskelet sistemi embriyolojik köken olarak mezoderm ve nöral krest orijinli mezenkim hücrelerinden meydana gelir. 3. haftanın başında nöral tüpün iki yanında yoğunlaşan paraksiyel mezodermin gelişimiyle ortaya çıkan somitomerlerden 4. haftanın başında, kranialden kaudale 44 çift somit farklılaşarak notokorda doğru hareketlenip çevrelemeye başlar. Ventral ve medialdeki hücrelere sklerotom, oluşturdukları gevşek dokuya mezenkim veya embriyonik bağ dokusu denir. (Şekil 1) Sklerotomlardan fibroblast, kondroblast ve osteoblastlar farklılaşarak aksiyal iskeleti oluşturur (22)



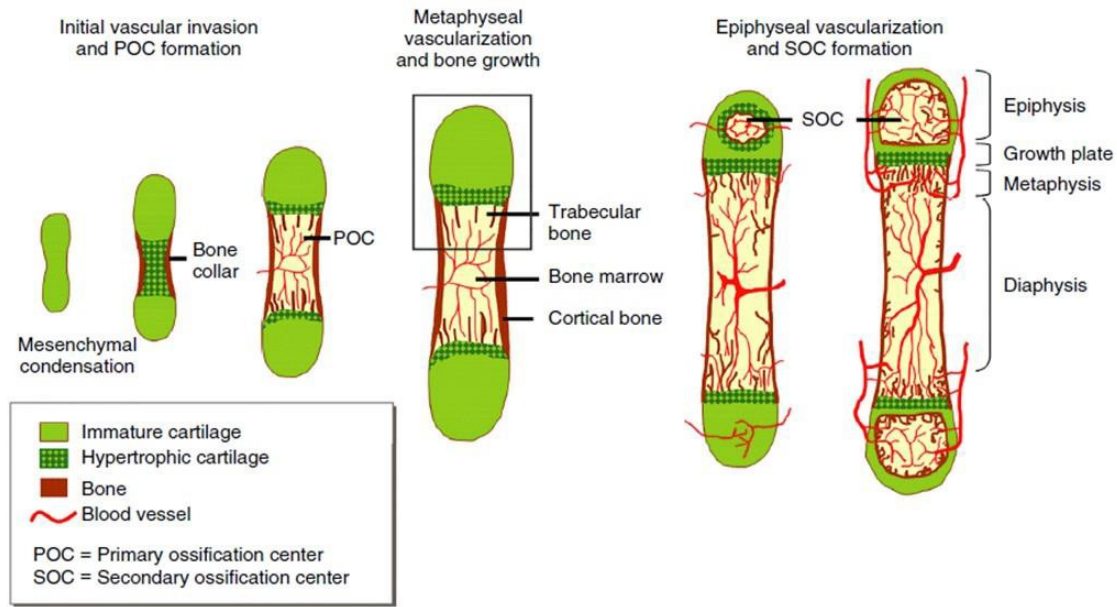
Şekil 1. Somit gelişimi (ref. Dr Mark Hill 2019, UNSW Embryology)

Kraniyal bölgedeki nöral krest hücreleri doğrudan mezenkime dönüşerek yüz ve kafatası kemiklerinin oluşumuna katkıda bulunur. Sternum ise tamamen bağımsız olarak ventral duvardaki somatik mezodermden oluşur.

Mezenkim endokondral ve intramembranöz ossifikasyon olmak üzere iki farklı mekanizma aracılığıyla hücresel yoğunlaşmaya uğrar. Apendeküler ve aksiyel iskelet, programlanmış bir endokondral ossifikasyon modeline maruz kalırken, kalvarium, klavikula ve pubisin kısımları membranöz ossifikasyon ile ossifiye olur (23, 24).

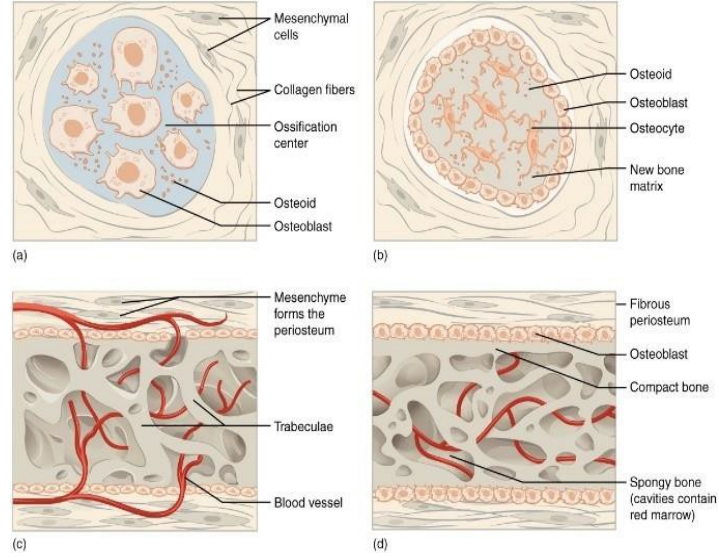
Endokondral ossifikasyonda mezenkimal hücreler potansiyel kemiğin bir modelini oluşturacak olan kondrositlerde yoğunlaşmaya başlar. Merkezdeki proliferatif kondrositlerin non-proliferatif hipertrofik duruma farklılaşması ile tetiklenen karmaşık bir işlem başlar. Bunu kıkırdak içine osteoblast progenitörleri, osteoklastlar, kan damarı endotel hücreleri ve hipertrofik hematopoetik hücrelerin istilası izler. 12. haftanın sonunda, ossifikasyon merkezleri arasındaki kıkırdak “büyüme plağı” veya “epifiz” adı verilen bir alanda sıkışıp

kalır. Ara madde içine gömülen osteoblastlar osteosit'e dönüşür. Çevredeki osteoblastlar faaliyete devam eder. Bu şekilde kemik trabekülleri oluşur. Bu işlem sürerken kan damarları yoluyla gelen Ca-fosfat tuzları doku içine çöker. Kıkırdak matriks mineralize olur ve kemik dokusu ile yer değiştirir. Eğer kompakt kemik gelişecek ise lameller yapı oluşacaktır. Burada tekrar osteoklastlar devreye girerek dokuda boşluklar açar, Hawers ve Volkmann kanalları gelişir. Hipertrofik kondrositler yüksek düzeyde alkalen fosfotaz ve kollajen tip X üretir ve zamanla apoptoza uğrar ve böylece primer ossifikasyon merkezi oluşur. Ossifikasyon, kemiğin shaft kısmındaki primer merkezden uçlardaki kıkırdağa doğru ilerler, büyüme sonlandığında kemiğin shaftı ile birleşerek kaybolur (239) (Şekil 2).



Şekil 2. Endokondral kemik oluşumu (Ref, Maes C, Kronenberg HM. Bone development and remodeling. 2010).

Yassı kemiklerde gerçekleşen intramembranöz kemikleşmede ise kıkırdak doku olmadan mezenkimal dokunun primer hücreleri, direkt osteoblastlara, osteoblastların yüzeyel tabakası da periosta dönüşür. Osteoblastlardan kollajen liflerinden zengin kemik matriksi sentezlenerek direkt kemik doku oluşur. Osteoblastlar bir yandan mineralize olmuş osteoid dokuyu çevrelerken, matrikste kalan osteoblastlar ise osteositlere dönüşür (Şekil 3)

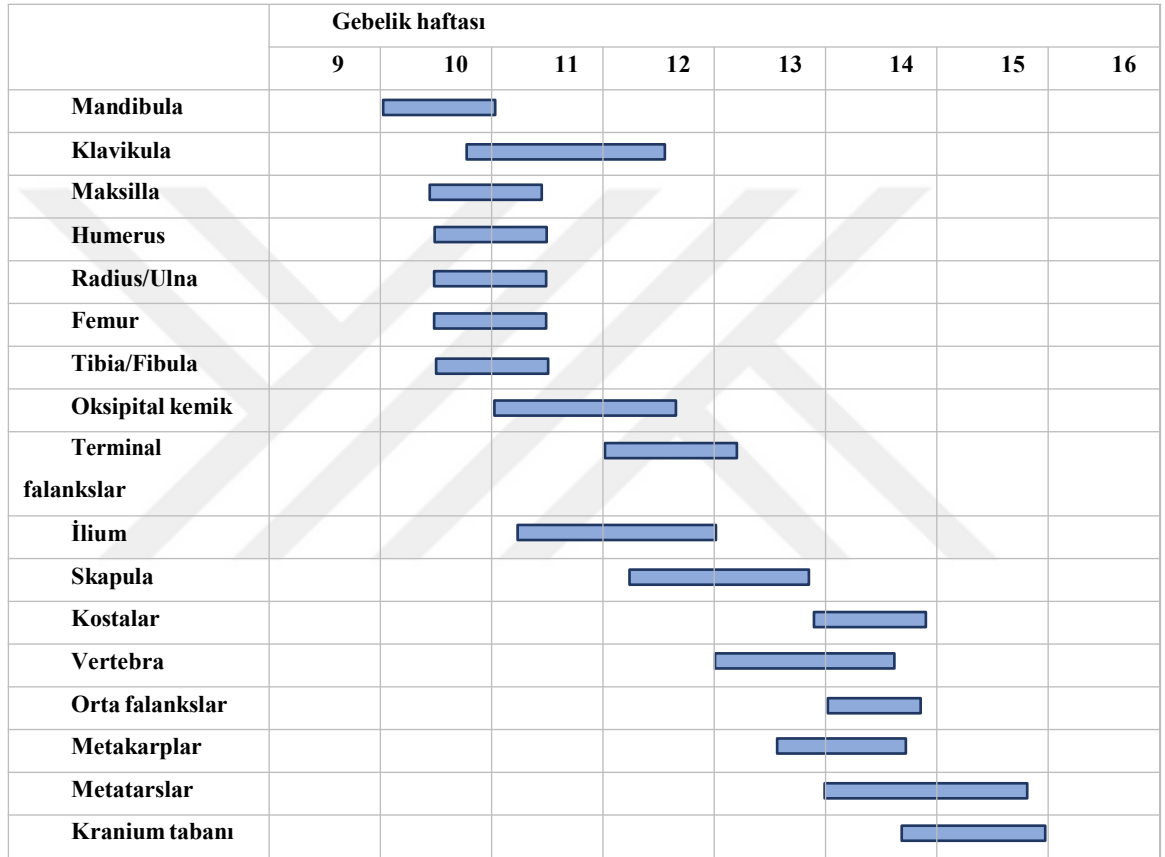


Şekil 3. İntramembranöz kemikleşme (Ref Olsen BR. Bone embryology, American society for bone and mineral research. 2006:2-6.

Paraksiyal mezodermden somitlere farklılaşmaya ve ekstremit gelişimine kadar ki tüm süreç, farklı sinyal yolları ile kontrol edilmektedir. Bazı büyüme faktörleri (FGF, Wnts, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), kemik morfojenik proteinleri (BMP), TGF-beta, insülin benzeri büyüme faktörleri, tiroid hormonları, ekstrasellüler matriks proteinleri (kollajen, proteoglikanlar, matriks metalloproteinazları), transkripsiyon faktörleri (SOX9, Runx2, Runx3) ve epigenetik faktörler (histon deasetilazlar, DNA metilasyonu) bütün bu süreçlerde önemli rol oynar.(25) Paraksiyal mezodermin nöral tüpün her iki yanında aynı anda somitlere farklılaşma zamanı, yüzey reseptörü Notch1 (*Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1*) ve ligandları aracılığıyla gerçekleşir. Lateral plak mezoderminden ekstremit tomurcuklarının oluşumunda, tomurcuğun ucu apikal ektodermal kabartı ile çevrelenerek proksimal-distal, dorsal-ventral ve posterior-anterior olmak üzere üç eksende şekillenir (25, 243) Proksimo-distal ekseninde gelişmesi FGF'ler (fibroblast growth factors) ile anterior-posterior ekseninde gelişmesi ise Sonic hedgehog (Shh) protein aracılığıyla olur (242). Mezenşimal hücrelerin osteoblast veya kondrositlere farklılaşması ise β -catenin bağımlı Wnt sinyal yolağı ile kontrol edilir (4). Ekstrasellüler Wnt sitokinleri hücre içindeki β -catenin parçalanması engelleyerek osteoblastik hücre farklılaşması için gerekli genlerin (core binding factor α 1/Runx domain factor 2, OSX gibi) ekspresyonunda artışa neden olur (240). Büyüme plaklarındaki kondrosit proliferasyon ve farklılaşması kemik morfogenetik proteinlerinin (BMP) FGF'ler üzerindeki kontrolüyle düzenlenir. BMP'ler, kıkırdak öncüsü hücrelerin kondrositlere dönüşmesi için gerekli uyarıyı sağlar. FGF'ler kritik bir düzeye erişip, ekstremit yeterli büyüklüğe ulaştığında BMP'ler aktifleşerek FGF'lerin salgılanmasını

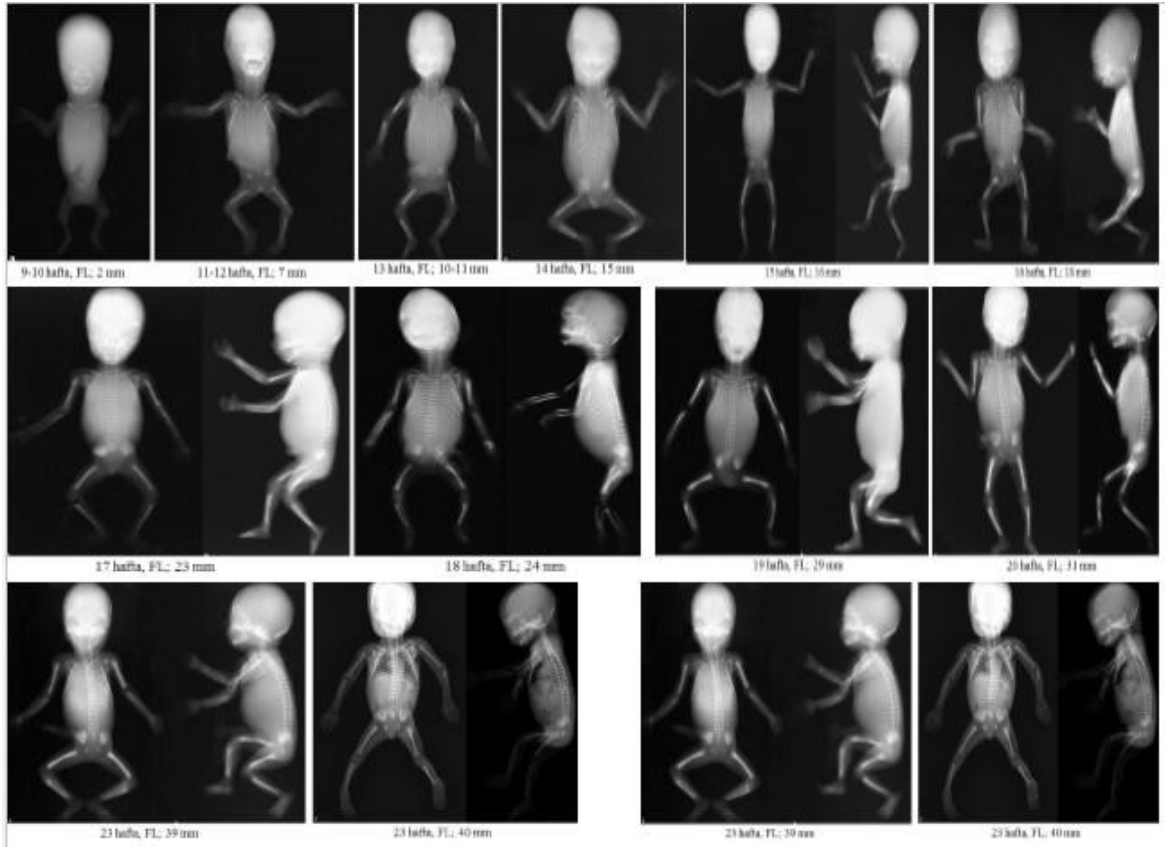
baskılar. FGF'lerin uyarısının ortadan kalkması ile Shh ekspresyonu da baskılanır ve ekstremité büyümesi durur.

Fetal kemik ossifikasyonu intrauterine 8. haftada klavikular kemikleşme ile başlar. 9. haftada mandibula, vertebra korpusları ve nöral arklar, 10-11. haftalarda frontal kemik ve uzun kemikler izler. İleum ve skapula 12. haftada; metakarpal ve metatarsallar 12–16 hafta boyunca kemikleşir (26,27). (Şekil 4).



Şekil 4. Fetal kemik gelişimi (ref, Copyright by Pearson Education inc)

Sekonder (epifizeal) kemikleşme merkezleri radyograflar tarafından yaklaşık 20 hafta gebelikte ultrasonografi ile görülür (Şekil 5).



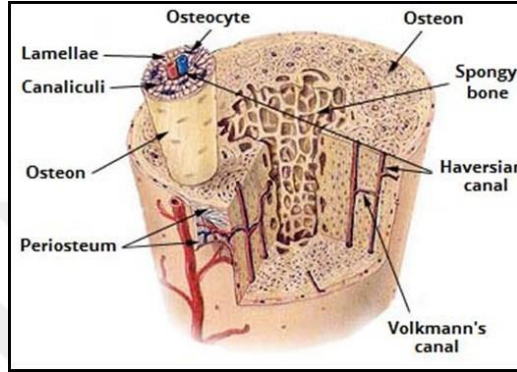
Şekil 5. Fetal haftaya göre kemik radyolojisi (Ref. 'Atlas of Fetal Ultrasound' dan uyarlanmıştır. T. Kalaycı, 2017)

İskeletogenezi etkileyen tüm bu mekanizmalar sonucunda, kemik boyunda uzama ve eklem yüzey çaplarında artış meydana gelir; bu yolakları kodlayan genlerde ve büyüme plağındaki bozukluklar iskelet displazilerine neden olur. (28)

2.2.2. Kemik biyokimyası

Kemik, mineralize kollajen çatısı ile özelleşmiş dinamik bir bağ dokusudur. Kemiğin başlıca görevi vücut için mekanik destek sağlamak, kasların hareket etmesine izin vermek, özel eklem yapılarında hareket etmek, beyin ve spinal kord (omurilik) gibi önemli yapıları koruyarak başta kalsiyum olmak üzere birçok mineral için depo görevi yapmaktır (21). Kemiklerin boyut ve şekillerinin, tüm bu fonksiyonları sağlamak için dikkatlice koordine edilmesi gerekir. Bu koordinasyon hem lokal hem de sistemik faktörler tarafından sağlanır (238).

Kemik, katı bir dış (kortikal) katman ve içindeki boşluğu dolduran gözenekli bir trabeküler ağdan oluşur. Kortikal kemik havers sistemleri veya osteon olarak adlandırılan silindirik şeklindeki birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Kortikal kemik kütlesinin %70'ini inorganik madde, %5-8'ini su, geri kalanını da organik veya ekstrasellüler matriks oluşturur. Organik matriksin %98'ini kollajen ve nonkollajen tipte proteinler (proteoglikanlar, glikoproteinler, Gla proteini, osteopontin, kemik sialoproteini gibi), kalan %2'sini ise kemik hücreleri oluşturur.



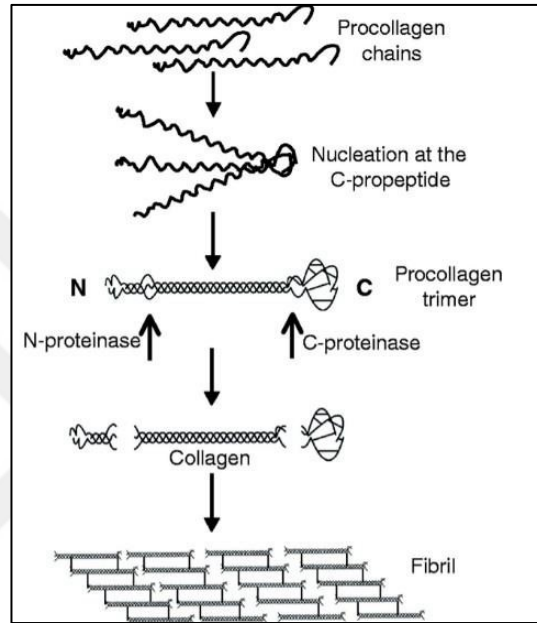
Şekil 6. Kortikal kemik kesiti (ref. Embryology.med.unsw.edu.au)

Hücresel kısımda yer alan osteoblastlar, osteoid adı verilen kemik matriksin tip I kollajenini ve bazı non-kollajen proteinlerin sentez ve salgılanmasından sorumludur. Kemik matriks matür kemiğin oluşumunda gerekli mineralizasyon için adeta bir kalıp görevi sağlar. Kemikteki diğer bir mezenkimal kaynaklı hücre bazı transkripsiyon faktörlerinin aracılığı ile osteoblasttan gelişen osteositlerdir. Komşu osteositler, yüzeyde yerleşmiş osteoblastlarla ve birbirleriyle uzantıları sayesinde, yaygın bir iletişime sahiptirler. Osteositlerdeki bu uzantılar, kimyasal ve mekanik sinyallerin iletilmesiyle, kemik homeostazını sağlar (34,35). Osteoklastlar ise kemik homeostazında, sürekli yeniden yapılanma, yeniden şekillenmede etkindirler. Bu durum insanlarda her yıl kemiklerin %4-10'unun yenilenmesine neden olur.

Kemiğin temel organik bileşenleri, tip I kollajen ve hidroksiapatit kristalleridir (30). Bu kristaller hidroksi apatit ve Ca-CO_3 birleşimi olan kalsiyum tuzlarıdır. Kemiğin sert yapısını ve yoğunluğunu sağlarlar. Kemiğin mineral fazındaki hidroksiapatit kristallerinin boyutları ve dizilimleri kemiğin yüklenmeye cevabında önemli rol oynamaktadır. Tek tip kristal bulunması kemik rezistansını azaltarak, kırılabilirliğe neden olur.

Kollajen, çekme mukavemetinden, hücre adezyonunun düzenlenmesinden ve doku gelişiminin yönetiminden sorumlu olup, mineralize olma özelliğine sahiptir. (31). Kollajen lifleri arasında bulunan boşluklarda nonkollajen proteinler veya mineral birikimleri yer alır. Non-kollajenöz proteinlerin bazıları kollajen fibrilleri organize ederken, diğerleri minerallerin matrikse bağlanmasını ve mineralizasyonunu sağlarlar (29).

Kollajen, bir ekstrasellüler protein olmakla birlikte, olgun bir kollajen lifi haline gelmeden önce bağ doku fibroblastlarında, intrasellüler prekürsör molekül halinde sentezlenir. (Şekil 7).

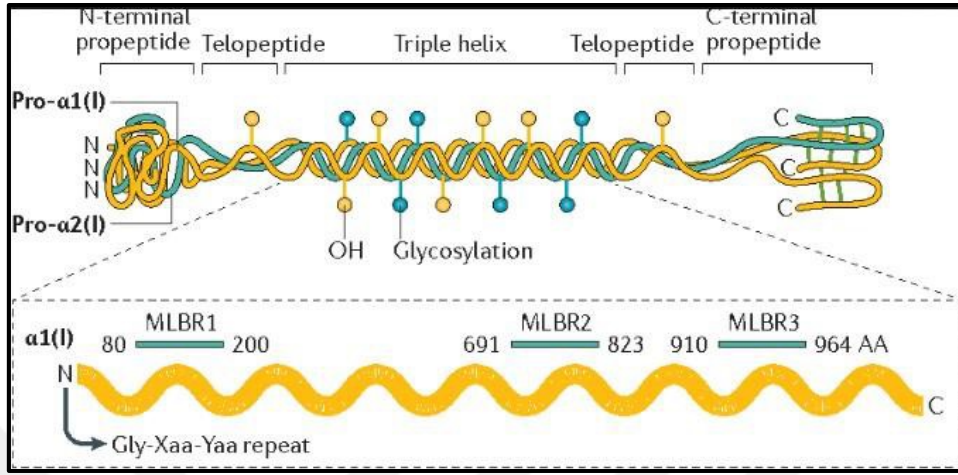


Şekil 7. Kollajen sentezi (Ref, 'Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis' Elizabeth G.

Canty)

Fibroblastlarda en önce ortaya çıkan kollajen prekürsörü, N-terminalinde yaklaşık 100 amino asitlik bir sinyal dizisi içeren preprokollajendir. Devamında oluşan prokollajen, endoplazmik retikulumun veziküler aralığında modifiye edilir. Bu modifikasyon, polipeptit yapısı içindeki prolin ve lizin kalıntılarının hidroksillenerek hidroksiprolin ve hidroksilizin haline dönüşmesiyle başlar, prolin kalıntılarının hidroksiprolin kalıntısına dönüşümü, prolil-4-hidroksilaz veya prolil-3-hidroksilaz enzimleri tarafından katalizlenir. Hidroksillenme yapıyı stabilize eder. Kollajenin polipeptit zincirlerinin her iki ucunda (N-terminal ve C-terminal), sistein rezidüleri içeren alanlar vardır. N-terminal sistein rezidüleri zincir-içi disülfür bağlarını oluşturur. C-terminal sistein rezidüleri ise, hem zincir içi, hem de zincirler-arası disülfür bağlarını oluşturarak, 3 polipeptit zincirinin birbiri üzerinde sarılmasına aracılık eder; böylece triple heliks (üçlü sarmal) yapı şekillenir (Şekil 8). İntrasellüler modifikasyondan sonra, hidroksillenmiş ve glikozillenmiş prokollajen molekülü, Golgi kompleksi yoluyla hücre dışına salgılanır ve hücre dışında prokollajenin N- ve C- terminal

uçları (propeptit) enzimatik olarak kırılır polimerize olan protein birimi olan tropokollajen oluşur. Böylece kollajen, polimerleşmeden önceki son halini almış olur.



Şekil 8. Tip 1 kollajenin yapısı (ref, Osteogenesis imperfecta. Nat Rev Dis Primers. 2017 Aug)

2.2.3. Kemığın biyo-mekanik özellikleri

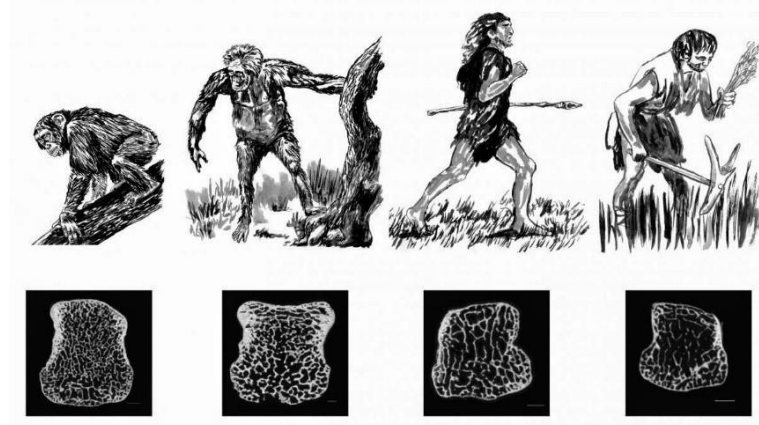
Kemik oldukça viskoelastik bir malzemedir. Fizyolojik veya mekanik ortamdaki değişikliklere sürekli olarak adapte olma yeteneğine sahiptir. Bu yetenek sadece kemik dokusunun miktarına değil, kalitesine de bağlıdır. Kemik mineral yoğunluğu (Bone mineral density-BMD) kemik gücünü gösteren önemli bir parametredir, ancak ek olarak kemiklerin şekli ve geometrisi, trabeküllerin üç boyutlu organizasyonu ve matrisin mineral ve kollajen içeriğinin özellikleri (mineral ve kollajen) de kemik gücüne katkıda bulunan yapılardır (41).

Kemik anisotropik özelliktedir yani longitudinal olarak uygulanan yükleri çok iyi karşılar, dik olarak uygulanan yükleri karşı direnci düşüktür. Viskoelastik olarak hızlı bir yüklenmede daha dayanıklı iken, yavaş hızda yüklenildiğinde aynı dayanıklılığı gösteremez. Yüklenmenin başlangıcında kemiğin şeklinde deformasyon oluşur, %3 den daha az deformasyona uğradığında yük kaldırıldığında orijinal şekline geri döner. Bu elastik cevabın sonlandığı noktadan sonra kemik dokusunun dış lifleri değişikliğe uğrar ve kemik yıkımı oluşur. Kemikte kalıcı deformite meydana gelir ve yüklenme devam ederse kemik kırılır. Yük kaldırılrsa bile kemik orijinal haline geri dönemez. Mineral kaybı kemikte kırılmaya, kollajen kaybı ise kırığa sebep olur.

2.2.4. Kırığın evrimi

İnsanlar, en yakın yaşayan akrabalarımıza (şempanzeler) ve insanımsı atalarımıza kıyasla, nispeten ince bir iskelete sahiptir. Binlerce yıllık insan evrimi hakkındaki yeni araştırmalar, modern insanların, bacak eklemlerinin daha düşük trabeküler yoğunluğa sahip olduğunu ve iskeletlerimizin daha hafif ve kırılabilir hale geldiğini göstermektedir. Holosen öncesi (>11.000 yıl) Homo sapiens dahil olmak üzere soyu tükenmiş homininlerin, insan dışı primatlarda görülen yüksek seviyede kemik kitlesini korudukları bildirilmiştir. (42)

Tarıma geçiş, tek ekin üzerine kurulu beslenme biçiminin insan sağlığında bir düşüşe neden olduğu düşünülse de 7.000 yaşındaki ilk toplayıcılar kendilerinden 6300 yıl sonraki çiftçilerden çok daha güçlü kemiklere sahiplerdi (Şekil 9). Yaşam boyunca mekanik yüklenme artışının kemiklerdeki trabeküler kemik mineral yoğunluğunu, göreceli olarak kemik gücünde artışa yol açtığını gösteren çok sayıda kanıt sunulmuştur (43). Yeni modern insanın şempanzeler ve orangutanlarla karşılaştırıldığında humerus ve metakarpal kemiklerinde düşük trabeküler kemik fraksiyonu (TBF) ve mineral yoğunluğuna sahip olduğu gösterilmiştir (44,45,46). Bu durum doğal olarak insanların şempanzelere kıyasla hareket için üst ekstremitelerini kullanmamasıyla direkt ilişkilidir.



Şekil 9. Kemik organizasyonunun evrimi (Ref. Image Courtesy Of © Amnh/J. Steffey And Brian Richmond)

Sonuç olarak kemiğin mikroyapısındaki değişikliklerin yaptığı katkıyla birlikte azalan kemik kütlesi, yapısal proteinlerdeki evrimsel farklılıklar ve matriks içeriği nedeniyle bozulan kemik geometrisi modern insanın kemiklerini kırılmaya karşı daha hassas hale getirmiştir. (47)

2.3. İntrauterin fetal kırıklar

İntrauterin kırıklar ise, maternal travma, konjenital psödartoz, idiopathic juvenile osteoporosis geçici kırılğan kemik fenotipi, fetal akinezi gibi nedenler ve kemiğin yapısal letal hastalıklarıyla oluşabilir (48,49).

Fetüs amniyotik sıvı ile korunduğundan, çoğu vakada fetal yaralanmaya neden olmak için ciddi maternal travma gereklidir. Spontan izole kırıklar, kallus formasyonu ile birlikte in-utero iyileşme potansiyeline sahiptir. İzole bir kırığın doğum öncesi yönetimi, travma veya iskelet displazileriyle ilişkili intrauterin kırıkların yönetiminden büyük ölçüde farklılık gösterdiğinden, ciddi iskelet displazilerinden ayrılmalıdır. Kırığın lokalizasyonu, şekli, ek USG anomalisinin eşlik etmediği, letalite değerlendirmesi, eğrilik ve kısalık bulguları gibi tüm değerlendirmeler uygun bir algoritmayla profesyonel bir ekip tarafından yapılmalıdır. Tanısal doğruluk hem mevcut gebeliğin devamı hem de olası gebeliklerde prenatal tanı seçenekleriyle ilgili doğru bir genetik danışma sürecinin uygulanabilmesi açısından önemlidir.

2.4. Letal İskelet Displazileri

İskelet displazilerinde doğum öncesi tanı kuşkusuz aile öyküsü ve fenotipin bilinmesi durumunda daha kolaydır, ancak vakaların çoğunda, anormal bir iskelet bulgusu ilk kez rutin sonografik incelemede farkedilir. Görüntüleme yöntemleri ve moleküler testlerde elde edilen gelişmeler ve birçok ülkede 2. trimester USG'sinin konjenital anomali taramasında rutine girmesi sonucunda, iskelet displazilerinin prenatal dönemde tanınabilirliği hızlı bir artış göstermiştir (50). Bu oran letal iskelet displazileri için displaziye bağlı olarak %31-65 arasındadır (51).

Özellikle USG'de yapılan ölçümlerde femur uzunluğu gebelik haftasına göre 5 p. veya -2 standart sapma (SD) altında ise karın çevresi oranı, dar toraks ve azalmış kemik dansitesi letalite olasılığı açısından mutlaka tespit edilmelidir. Dar toraks, pulmoner hipoplaziye yol açarak ölüme neden olabilir. Göğüs çevresi / abdomen çevresi $<0,6$, femur uzunluğu/abdomen çevresi $<0,16$ ise, mortalite için artmış risk söz konusudur (52,53). 2. trimesterde 0.16 ile 0.22 arasındaki *borderline* vakaların özellikle 25. haftadan önce farkedilmesi durumunda 24-28. gebelik haftaları arasında orta biyometrik tarama ile yeniden değerlendirilmesi önerilmektedir (54,55). Uzun kemiklerin değerlendirilmesine ek olarak, değerlendirilmesi gereken, yardımcı USG parametreleri arasında, kraniyal şekil, mineralizasyon, eğrilik, skapulanın şekli, kırık, fetal yüz profili, akrall bulgular, vertebra cisimlerinin varlığı ve şekli gibi ek bulgular araştırılmalıdır (7). Çoğu prenatal başlangıçlı iskelet displazileri, kranyum ile karşılaştırıldığında göreceli orantısızlık gösterir. Sonuçlar, rutin midtrimester taramasında

“borderline” femur kısalığı bulgusunda uzman bir hekim tarafından düzenli takibin gerektiğini göstermektedir. Femur boyu / ayak oranı özellikle FL uzunluğunun <10p olduğu her durumda ölçülmelidir (55,56).

İskelet displazisinin erken saptanmasının hasta ve ailesinin farkındalık düzeylerini arttırarak hazırlık yapmalarına olanak sağlaması, gerekli konsültasyonların planlanması ve moleküler tanıya yönelik yeterli ve gerekli materyallerin elde edilmesi gibi avantajları vardır. Bu durum, özellikle letal olmayan ama yenidoğan döneminde ağır klinik ile karakterize bir iskelet displazisi durumunda daha da önem arzeder.

2.4.1. Letal iskelet displazilerinde sınıflama, radyolojik ve histopatolojik bulgular

2.4.1.1. FGFR3 grubu

FGFR3’ün aktive edici mutasyonlarıyla ilişkili iskelet displazileri genellikle üçüncü trimester rutin ultrasonunda uzun kemiklerde kısalık farkedilerek tanı alır (57). Bu gruptaki letal displaziler, tanatoforik displazi tip 1 ve tip 2 (TD1; OMIM 187600, TD2; OMIM 187601) ve *SADDAN* displazisidir. (ağır akondroplazi ve akantoz nigricans, OMIM # 616482). Letal formlar femurlarda açılanma bulgularıyla daha erken haftalarda bile tanınabilir (58). Radyolojide kısa kotlar, dar toraks, makrosefali, şiddetli platyspondili ve küçük kısa iliak kemikler izlenir. Tip 1 ve *SADDAN* displazisinde eğri femur (*telephone receiver*) ve tibiaların varlığı, tip 2’de ise yonca yaprağı şeklinde kafatası şekli dikkat çekicidir.

2.4.1.2. Tip II kollajen grubu

Bir çok tipi OD kalıtım (spondiloepifizeal displazi konjenitada OR kalıtım bildirilmiştir) (59,60). gösteren birkaç farklı kolajen tip II bozukluğu vardır. Şiddetine göre tipleri akondroenez tip II (akondroenez imperfekta, Langer-Saldino; OMIM# 200610), platyspondilik displazi Torrance tipi (OMIM# 151210), hipokondroenezis (OMIM# 200610) ve konjenital spondiloepifizyal displazi (OMIM#183900)’dir. Akondroenezis tip II’de vertebraların ve sakrumun ossifikasyonu neredeyse tamamen yoktur veya gecikmiştir. Tübüler kemikler kısa ve metafizyel *cupping* izlenir. İskelet bulgularına düz yüz profili, Pierre Robin sekansı (PRS) ve ödem / hidropik görünüm eşlik edebilir. Hipokondroenezisde, servikal vertebral cisimlerin ve pubik kemiklerin ossifikasyon kaybı izlenir. Ekstremiteler kısalığı akondroenezis II kadar şiddetli değildir. Platyspondilik displazi Torrance tipi’nde vertebra cisimleri oldukça incedir. Uzun süreli sağkalımı olan birkaç olgu bildirilmişse de olguların çoğu doğumda veya doğumdan kısa bir süre sonra kaybedilir. (61,62)

2.4.1.3 Sülfasyon bozuklukları grubu

Sülfatlama, sülfotransferazlar (ST'ler) olarak bilinen bir enzim sınıfı tarafından düzenlenen ve glikan omurgası içindeki çeşitli pozisyonlarda ortaya çıkabilen, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri gibi hücre dışı sinyalleri modüle eden bir post-translasyon modifikasyondur (63). Sülfatlanma derecesindeki değişiklikler, Akondrojeniz tip 1B; (OMIM# 600972), atelosteogenez tip II (OMIM# 256050) ve diastrofik displazi (OMIM# 222600) gibi farklı bozukluklar ile ilişkilidir. Akondrojeniz Tip 1B'de vertebral cisimlerin ve sakrumun ağır ossifikasyon kaybı, mikromeli ve hidropik görünüm izlenirken Atelosteogenezis tip II, vertebral cisimlerin koronal klefi, abdukte başparmak ve PEV ile daha hafif fenotipe sahiptir (64). Bu grubun histolojisi, 12. GH'daki bir fetusta bile görülebilen epifiz plağı istirahat zonunda izlenen non spesifik kist benzeri dejenerasyon ile karakterizedir (5).

2.4.1.4 Filaminopatiler

Filamin ailesi, hücre çoğalması, farklılaşması ve göçünü düzenleyen çoklu reseptörler ve hücre içi proteinlerle etkileşime giren aktin bağlayıcı özellikte bir protein grubudur. Atelosteogenezis tip I (AOI, OMIM# 108720), atelosteogenezis tip III (AOIII, OMIM# 108721) ve Boomerang displazisi (BOOMD, OMIM# 112310) (65) bu gruptaki letal displazilerdir. Özellikle humerus ve femurda dislokasyon, vertebrada koronal klef ve azalmış ossifikasyonla karakterizedirler. Boomerang displazide femurda eğrilik, omfalosel ve ensefalosel gibi iskelet dışı bulgular gözlenir (66). Kıkırdak histolojisinde çok çekirdekli büyük kondrositler izlenir.

2.4.1.5 Kısa kot polidaktili grubu

Çoğunda kısa ekstremiteler ve çok kısa kotlara genellikle böbrek kistleri, polidaktili, konjenital hepatik fibroz ve pankreas fibrozu gibi birçok iskelet dışı malformasyon eşlik eder (67). Primer silier defekte bağlı oluşurlar. Bazılarında beyin ve kalp malformasyonları bulunabilir. Kıkırdak histolojisi normaldir.

2.4.1.6 Mineralizasyon bozuklukları

Perinatal letal hipofosfatasya, tübüler kemiklerin kısa ince ve bazen eğri, toraksın dar izlendiği, stres kırıklarının görülebildiği yaygın hipomineralizasyon ile karakterizedir. Metafizal ossifikasyon, osteogenezis imperfektadakinin aksine, düzensizdir. Kemik *spurları* ve pretibial gamzelenme eşlik edebilir. Serum alkalin fosfataz (ALP) düzeyi düşüktür. Histoloji, epifiz büyüme plağında düzensiz bir transformasyon bölgesi ile kemiğin kusurlu mineralizasyonunu gösterir. Azalmış penetrans ve ekspressivite değişikliği görülebilir.

2.4.1.7 *Bent bone* displaziler-Kampomelik displazi

Kampomelik displazi (CD), Pierre Robin sekansı, ekstremitelerde kısalık ve eğrilik, *club foot* ve ambigu genitalya ile karakterize bir iskelet displazisidir. Tübüler kemiklerde eğrilik yoksa antenatal US'de gözden kaçabilir. Diğer letal iskelet displazileri ile karşılaştırıldığında, CD'deki ölüm nedeni dar toraks değil, trakeo-bronşiomalazi veya servikal omurga instabilitesi ile ilişkilidir. Bununla birlikte hayatta kalabilen, bazı CD'li olgular da bildirilmiştir. (68)

2.4.1.8 OI ve azalmış kemik dansitesi grubu

"Uluslararası İskelet Displazileri Topluluğu (ISDS)", şiddet sınıflandırmasını evrensel olarak kabul eden Sillence sınıflamasına bağlı kalmayı tercih etmiş, ancak zaman içinde benzer klinik bulguları nedeniyle OI ile klinik olarak örtüşen birkaç nadir sendromun bu grup altında tanımlanmasına ihtiyaç duymuştur.

Örtüşen fenotipler arasında daha önce "konjenital kontraktürlerin eşlik ettiği OI" olarak bilinen Bruck sendromu (OMIM# 259450 ve 609220) "OI oküler formu" olarak tanımlanan osteoporoz-psödoglioma sendromu (OMIM# 603506), kraniyosinostoz, hidrocefali, ayırt edici yüz özellikleri ve OI'yi hatırlatan kemik bulguları ile Cole-Carpenter sendromu (OMIM# 112240) yer alır. Prenatal dönemde Wormian kemikler, kırık ve eklem kontraktürleri bulgularıyla prezente olan Bruck Sendromu muhtemelen doğumda ilk kırıklar ortaya çıkıncaya kadar artrogripozis multipleks konjenita olarak yanlış yorumlanabilmektedir (71). Bruck sendromu, eklem hareketlerinde kısıtlılık bulgularına, işitme kaybı ve DI'nın eşlik etmemesiyle OI tiplerinden ayrılabilir (72,73). Kemik histolojisi OI'ye benzemekle birlikte farklı olarak değişik çaplarda kollajen fibrillerinin izlenmesiyle OI'den ayrılabilir.

Cole-Carpenter sendromu ilk kez 1987 yılında tanımlanmış olup, kraniyosinostoz, oküler proptosis, hidrocefali, ayırt edici yüz özellikleri ve kemik kırılganlığı ile karakterizedir. (74)

Ehler Danlos/OI fenotipinde hastalar tipik bir OI fenotipi göstermezler. Esas olarak şiddetli eklem hiperlaksitesi, yumuşak ve esnek bir cilt, anormal yara iyileşmesi, kolay morarma ve bazen de arteriyel fragilite belirtileri gösterirler. Ek olarak, mavi sklera, görece kısa boy ve osteopeni veya kırıklar gibi OI belirtileri gösterirler.

2.5. Osteogenezis İmperfekta

OI kavramı, primer olarak yaşam boyu kırılmaya yatkınlıkla karakterize heterojen bir bağ dokusu sendromu grubu için ortak kullanılan bir terimi olarak kabul edilirse tarihte çok sayıda eponimi olduğu görülür. (Tablo 2).

Tablo 2. OI eponimleri (ref, Baljet, B. (2002). Aspects of the history of Osteogenesis imperfecta (Vrolik's syndrome).

Ekman sendromu (Ekman 1788)
Mavi sklera sendromu (Axman 1831)
Lobstein's hastalığı (Lobstein 1833)
Osteogenesis imperfekta konjenita [Vrolik] (Vrolik 1844- 1849)
Fetal rikets (Kaufman 1892)
Spurway sendromu (Spurway 1896)
Osteomyopathia
Osteoporosis fetalis
Osteitis parenchymatosa chronica
Porak-Durante hastalığı
Rachitis congenital
Dark sclerotics and fragilitas osseum (Eddowes 1900)
Adair-Dighton sendromu (Adair and Dighton 1912)
Fragile bones (Ostheimer 1914)
Hereditary hypoplasia of the mesenchyme (Voorhoeve 1918)
Van der Hoeve-De Kleyn sendromu (Van der Hoeve and De Kleyn 1918)
Fragilitas ossium heriditaria tarda (Caniggia et al. 1958)
Ekman-Lobstein sendromu (Caniggia et al. 1958)

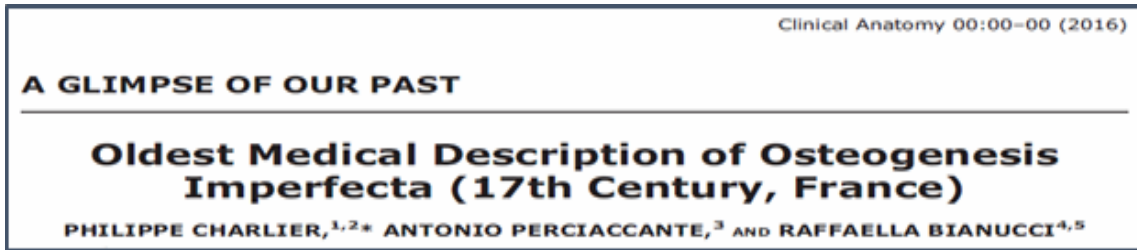
2.5.1. Tarihçe

Paleomedikal çalışmalar, hastalığın ve dolayısıyla insanlığın tarihine ve evrimine benzersiz bir bakış olanağı verir (76). OI'nin bu yolla elde edilen en erken kanıtları M.Ö. 1000 yılında Mısır'da bulunan bir çocuk mumyasına aittir. 1967'deki radyolojik değerlendirmede alt ekstremitelerde eğrilik, çok sayıda kırık ve kraniyal tabanın enine katlanmasına bağlı kafa kubbesinin düzleşmesi ile oluşan 'tam-o-shanter deformity' görünümü saptanan mumya, en eski OI olgusu olarak halen British Museum'da korunmaktadır (Şekil 10). (77)



Şekil 10. M.Ö. 1000 yılında Mısır'da bulunan bir çocuk mumyasına ait kalıntılar (Ref. (Gray P (1969) A case of osteogenesis imperfect, associated dentinogenesis imperfect, dating from antiquity.)

Hastalığın ilk kez tıbbi bir metinde bildirilmesi 17. yy Fransa'sına denk gelir. Metinde “yirmili yaşlarının sonunda bir kadının, vücudun her tarafında yaygın ağrısı olduğu, yeni kırıklara neden olmadan ona dokunmanın imkansızlaştığı anlatılır. Otopside çok sayıda kırığı olduğu, kemiklerinin ince ve manipülasyon sonrası, çürümüş ağaç kabuğu gibi dağıldığı, kafatasının.15 günlük bir yenidoğanda bulunanlara benzediği kayıtlıdır (Şekil 11).

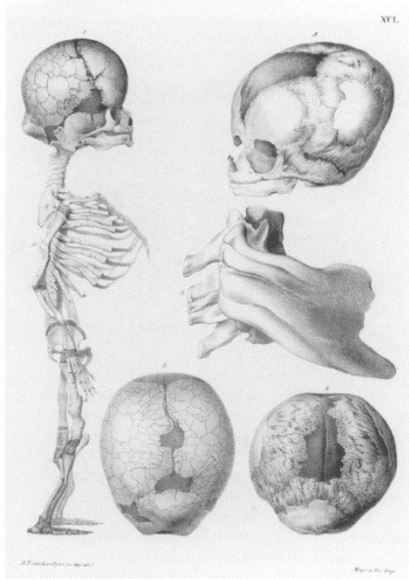


Şekil 11. Ol'nin bildirildiği ilk tıbbi metin (ref. Oldest medical description of osteogenesis imperfecta (17th Century,

1788'de ilk bilimsel çalışma, Uppsala Üniversitesi'nde İsveçli bir askeri cerrah olan Olof Jakob Ekman tarafından üç kuşakta etkilenmiş olgularla “osteomalacia congenita” adıyla doktora tezi olarak sunulmuştur.

1831'de Almanyada Westheim'daki Edmund Axmann, kırıklara eğilime ek olarak mavi skleradan ilk kez bahsetmiştir. 1849'de konjenital anomalilerin patolojisiyle ilgilenen Anatomi Profesörü Willem Vrolik (Amsterdam Üniversitesi), Patolojik Anatomi ve Tabula (Tabulae ad illustrandam embryogenesis hominis et mammalium, naturalem tam abnormem) notlarında hidrocefali ve sayısız kırık ile doğup 3 gün sonra kaybedilen bir infant

tanımlamıştır (Şekil 12). Vrolik metinde osteogenezis imperfekta terimini ilk kez kullanan kişi olmuştur. İnfanın yıllar sonra tekrar değerlendirilmesinde büyük bir kafatası, geniş ve yüksek bir alın, sığ orbitalar, protrüde oksiput, çok sayıda Wormian kemiği azalmış mineralizasyon saptandı (78). Tübüler kemikler hafif kavisli olmasına rağmen normal uzunlukta iken kaburgalar oldukça ince idi. Tüm iskelet yapıları bir veya daha fazla kırık ve kırık sonrası kallus oluşumu gösterdi. Willem Vrolik, iskelet bulgularının çağdaşlarının inandığı gibi, "raşitizm" veya "osteomalazi" gibi doğum sonrası edinilmiş bir hastalığın sonucu olmadığını ilk fark edenlerden biriydi (79).



1906'da E Looser (Mittlg Grenzgebiete Med Chir, 1906) hastalığı ağırlığına göre "conjenita" (Vrolik) ve "tarda" (Lobstein) olarak iki forma ayırdı (81).

Van der Hoeve and de Kleyn, kemik kırılganlığı ve presenil

sağırılık ilişkisine vurgu yaparken (82), Bell, mavi sclera, kemik kırılganlığı ve otosklerotik sağırılığın ortak bir ilişkisi olduğunu ve OD kalıtıldığını vurguladı (83).

Şekil 12. Willem Vrolik tarafından tanımlanan fetusa ait illüstrasyon (ref. Aspects of the history of Osteogenesis imperfecta (Vrolik's syndrome) B. Balje 2002

Seedorf 1949'da kaburgaların "tespih" görünümüne sahip olduğunu ve uzun kemiklerin, armonika körükleri gibi, eksenel olarak birbirine bastırılmış gibi görünümüyle letal perinatal tip OI'yi açıkça tanımladı (84). Bauze dominant OI aile öyküsü ve hafif bulguları olan bir grup hastada, in vitro kimyasal prosedürlerle kollajenin azaldığını gösterdi (87). Remigio ve Grinvalsky (88), Wilson (89) ve Tsuruta ve Sugiura (90) tarafından, normal anne babalı etkilenen kardeş olgulara, akrabalığın da eşlik ettiği OR kalıtım ile uyumlu soyağaçları gösterdiler.

2.5.2. Klinik Sınıflama

OI, ilk kez 1979 yılında Sillence tarafından klinik şiddet baz alınarak 4 alt grupta sınıflandırıldı (91). Bu çalışmada yıllık doğum hızı 1/60.000 olan Avustralya'nın Victoria eyaletinde, 1965-1977 yılları arasında OI tanısı alan 180 hastanın sağlık kayıtları, aile öyküsü, kırık zamanı, x-ray görüntüleri, histopatolojik örnekler ve pedigree analizleri değerlendirilmiş, 91'i muayene edilmişti. Olgular klinik bulgular temelinde 4 ayrı grupta değerlendirildi.

OI Tip I mavi skleranın eşlik ettiği OD formda tekrarlayan kırıklarla gözlenen hafif formdur. DI'nın yokluğuna veya varlığına bağlı olarak A ve B alt tipleri vardır. Ergenlikten sonra kırıkların sıklığı azalır. Olguların çoğu okul öncesi dönemde ilk kırıklarını geçirirken, nadiren doğumda bildirilen olgular mevcuttur. Skolyoz, ilk dekatta saptanmazken ergenlik döneminde progresyon gözlenmiştir. Etkilenen Tip 1 olgularının sadece % 7'sinin doğum boyu 10p'den düşükken, yetişkinlerin %50'sinde boy 3p'nin altında saptanmıştır. Bu kısalığın ilerleyici platisspondili, spinal osteoporoz ve deformasyonlara sekonder olduğu düşünülmüştür.

Olguların % 18'inde baş çevresi 97p'den fazla olduğu gösterilmiş, % 75'inde aileler çocuklarının kolayca yaralandığını bildirmişlerdir. Ciddi işitme bozukluğu olanların % 20'sinde, bulgular 20 yaşından önce belirginleşmiştir. Çalışma sırasında sadece 3 hastanın (2 çocuk ve 1 yetişkin) tekerlekli sandalye kullandığı kaydedilmiş, ailesel ve *de novo* olgular arasında fenotipik bir farklılık izlenmemiştir.

OI Tip II'de, 12 aileden kaybedilen 16 olgu tespit edildi. 10'u sporadikti. Hepsinin üst ve alt ekstremitelerinde kısalık ve eğrilığe sahip olduğu kaydedilmiş, 8 vakanın 7'sinde mavi sklera, X-ray'de akordiyon benzeri femur, üst ekstremitte kemiklerinde kırıklar, mineralizasyonu azalmış kısa tübüler kemikler, deformasyon, platyspondili, kaburgalarda *beading* ve azalmış kraniyal ossifikasyon bildirildi.

Tip III 'te, normal skleralı progresif deforme tip olarak tanımlanan 21 olgudan 14'ü çocuk, biri yeni doğan döneminde kaybedildi. Üçte ikisi doğumda kırığı olan bu grupta, ekstremitte ve omurgada ilerleyici deformasyon izlendiği bildirildi. Skleral maviliklerin yoğunluğunun, tip I'e göre daha az gözüktüğü, benzer yüz görünümünün izlendiği, kraniyumun, boydaki ağır kısalığa ve ince yapılara göre daha büyük olduğu kaydedildi. Yaşayan 7 olgunun hepsinde 15 aylıkken kırık tespit edilmiş ve iskelet deformasyonlarının ergenlik döneminde ilerlediği görülmüş, 6 erişkin hastanın 5'inde ciddi kifoskolyoz ve göğüs deformitesi olduğu bildirilmişti. Tüm çocukların % 50'sinde özellikle metakarpo-falangeal ve interfalangeal eklemlerde belirgin ligament gevşekliği, % 45'inde DI gösterildi. Kolay morarma, grup I'deki hastaların %75'inin aksine, 19 kişiden sadece 5 (% 26, 3) ile ilişkili bulundu. 14 yaşın üzerindeki 6 hastanın sadece 1'inde işitme kaybı tespit edilmiş, 2 yaşın üzerinde olan 17 hastadan 15'inin (%88) belirgin şekilde yürüme zorluğu yaşadığı kaydedildi. 6 yetişkinin 2'sinde bağımsız hareketlilik olduğu gösterildi.

Tip IV OI normal skleranın eşlik ettiği OD tipidir. Bu olgularda, uzun kemiklerin değişken derecede deformite ve kırığına normal skleranın eşlik ettiği, hastalarda veya aile üyelerinde işitme bozukluğunun tip I'e göre nadir olduğu bildirildi.

1981 de Sillence, hastalığa dair yaptığı genişletilmiş revizyonda, bazı gruplarda kollajen sentezinin düzensizliğine dair kanıtlar olsa da, bazı durumlarda primer kusurun iskelet-hücre metabolizmasında olabileceğini, OD ve OR kalıtıma ek olarak X'e bağlı OI çeşitliliğiyle klinik olarak tanımlanan bu grupların moleküler sınıfları temsil etmesinin muhtemel olduğuyla ilgili bir dizi benzersiz değişkenden bahsetti. (14)

1983-85 yıllarında, kollajen tip I'in sırasıyla alfa-1 ve alfa-2 zincirlerini kodlayan *COL1A1* ve *COL1A2* genlerinde ilk mutasyonlar tanımlanmış (92,113), ilerleyen yıllarda, mutasyonlar tüm OI tiplerinde tespit edilmeye devam etti.

2.5.3. Genişletilmiş Sillence sınıflaması

1995-2003 yılları arasında o tarihe kadar yayınlanmış 680 yayın incelenerek 3 ek grup daha tanımlandı (tip VI, VII, VIII) (93). (Tablo 3)

Tablo 3. Genişletilmiş Sillence sınıflaması (Ref, Rauch, F. & Glorieux, F. H. (2004). *Osteogenesis imperfecta. The Lancet*, 363(9418)

Tip	Klinik Şiddeti	Tipik Özellikleri	Tipik Mutasyonlar
I	Hafif	Hafif kısa boy, mavi sklera	<i>COL1A1</i> erken stop
II	Perinatal letal	Doğumda çoklu kemik kırıkları, belirgin deformite, azalmış kraniyal mineralizasyon	<i>COL1A1</i> ve <i>COL1A2</i> 'de glisin değişimleri
III	Ağır deforme	Belirgin kısalık, üçgen yüz, ağır skolyoz, DI	<i>COL1A1</i> ve <i>COL1A2</i> 'de glisin değişimleri
IV	Orta düzeyde deformasyon	Orta düzeyde kısalık, orta-ağır skolyoz, gri-beyaz sklera, DI	<i>COL1A1</i> ve <i>COL1A2</i> 'de glisin değişimleri
V	Orta düzeyde deformasyon	Hafif-orta kısalık, radius bası dislokasyonu, mineralize interosseöz membran, hiperplastik kallus, normal sklera	Bilinmiyor
VI	Orta-ağır deformasyon	Orta düzeyde kısalık, skolyoz, balık pu	Bilinmiyor

VII	Orta düzeyde deformasyon	Hafif kısa boy, kısa humerus ve femur, normal sklera	Bilinmiyor
-----	--------------------------	--	------------

Her iki kolajen tip I geninin mutasyon taramasının normal sonuçlanması ile kolajen tip I mutasyonları ile ilişkili görünmeyen yeni bir otozomal dominant OI şeklinde sınıflamada yerini aldı (69). Bu gruplara ait moleküler çalışmalar devam ederken, 2006 yılında, letal OI'nin ilk OR nedeni, yani *CRTAP* (*cartilage associated protein*) geninde protein işlevinin tamamen kaybına neden olan bi-allelik varyantlar OI tip VII ile ilişkilendirildi (94,95) ve sırasıyla *PPIB* (96,97), *SERPINH1* (98), *FKBP10*(99), *SP7* (100) ve *SERPINF1* (101) genleri tanımlandı. Moleküler tekniklerdeki gelişmelerin ilerlemesiyle 2010'dan sonra oluşan yeni terminoloji, spesifik klinik özellikler ve kalıtım paterni nedeniyle Sillence'in beş OI tipini tanımlamasında olan temel unsurları gözeterek moleküler patogeneze temelinde yeni genlerle genişlemeye devam etti.

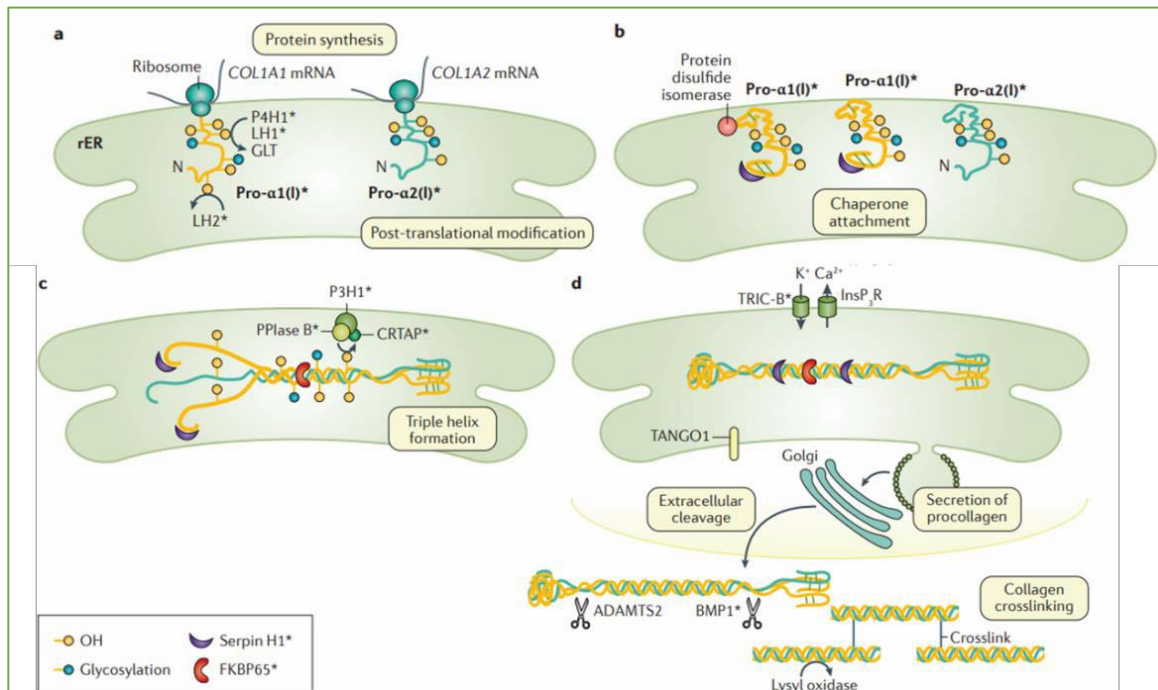
2.5.4 Moleküler Patogenez

Klasik OI mekanizmaları hücresel, matriks (ECM) ve doku seviyelerinde kollajen değişikliğini ve disfonksiyonu kapsar. Matrisin bileşim ve organizasyonu, kemik hücrelerinin artması ve farklılaşması için önemli olan büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin varlığıyla kemik sertliğini veren mineralleşmeyi etkiler (102,103). Dominant tip I-IV OI, tip I kollajeni kodlayan iki gendeki (*COL1A1* veya *COL1A2*) mutasyonlardan kaynaklanır. Mutasyonlar, tip I kollajenin yapısal olarak normal olduğu ancak normal miktarın yaklaşık yarısının sentezlenebildiği nicel kusurlar ve şiddeti değişen yapısal kusurlar olarak iki kategoriye ayrılabilir. Hafif OI formları tipik olarak normal tip I prokollajenin azalan sentezinden kaynaklanırken, orta derecede şiddetli veya letal OI formları ise, genellikle tip I prokollajen zincirlerinden birindeki yapısal kusurlardan kaynaklanır,

2.5.4.1 Tip 1 kollajenin sentez ve işleme defekti

Kollajenler, üçlü heliks yapı oluşturmak üzere üç polipeptid zincirin bir araya geldiği, tekli moleküllerden (monomerler) oluşan bir protein ailesidir. Kollajen üçlü sarmalının nispeten basit yapısına rağmen, tip I kollajenin biyosentezi, çok sayıda adım içeren, translasyon sonrası değişiklikler, katlanma, taşınma, salgılanma ve kalite kontrolü için proteinlerin bir araya getirilmesini gerektiren son derece karmaşık bir sistemdir (36)

Üçlü heliksteki her üçüncü aminoasit bir glisin rezidüsü olup, genel olarak zincir yapısı Gly-X-Y olarak gösterilir. Gly en küçük amino asittir ve her zaman üçlü sarmalın merkezinde yer alır, çünkü daha büyük bir amino asidi barındıracak yer yoktur. X ve Y ise sıklıkla, sırasıyla prolin ve hidroksiprolindir. Gly-X-Y tekrarının Y pozisyonundaki sarmal prolinler C4 pozisyonunda prolin 4 hidroksilaz 1 (*P4H1*) ile hidroksile edilirken, X pozisyonlarındaki spesifik prolinler prolin 3 hidroksilaz 1 (*P3H1*) ve prolin 3 hidroksilaz 2 (*P3H2*) ile hidroksile edilir. Hidroksi lizinlerin glikosilasyonu, prokollajen galaktosiltransferaz 1 ve prokollajen glukosiltransferaz 1 ile katalize edilir. Karboksi-terminal propeptitin sentezinden sonra, zincir içi disülfid bağları oluşturulur ve rER zarına bağlanılır. Üçlü sarmal oluşumu için zincirleri doğru sıraya sokan ve üçlü sarmal oluşumunu başlatan bir çekirdek oluşur. Prolin ve lizin rezidülerinin hidroksilasyonu devam eder ve üçlü sarmal oluşumu, C-terminal ucundan amino-terminal ucuna doğru ilerler. Bu aşamada, *FKBP10-P3H1-CRTAP-PPIaseB* (peptidil- prolin cis-trans izomeraz B) tarafından oluşturulan bir kompleks, hidroksilasyon dışında kollajen fibrilleri, şaperonları veya küçük lösin bakımından zengin proteoglikanların bağlanma bölgesi olarak işlev görmektedir (13, 95,107). (Şekil 13). Sarmalın çoğu katlandığında, N-propeptitler bu alan içindeki küçük üçlü sarmalları birleştirir. Yeni oluşturulan üçlü sarmal Serpin H1 (*SERPINH1*) ve FKBP65 (*FKBP10* tarafından kodlanır.)



Şekil 13. Ol moleküler patogenezi (ref, 2017 Mac millan Publishers Limited, part o f Springer Nature)

tarafından stabilize edilir. *SERPINH1* ayrıca molekülün sarmal kısmı boyunca bağlanma bölgelerine sahiptir ve katlanmış kollajenin Golgi'ye yerleştirilmesine yardım eder (108,109). Bu biyosentetik adımlar, uygun bir rER ortamına bağlıdır. Uygun bir şekilde

katlanmayan molekülleri elimine etmek için ER veya otofaji aracılı lizozomal degradasyon sistemi devreye girer.

Prokollajen propeptitleri, bir kez salgılandığında trombospondin motifleri 2 (*ADAMTS2*) ve kemik morfogenetik protein 1 (*BMP1*) içeren bir disintegrin ve metaloproteinaz ile ayrılır. Bu, kollajen lif oluşumunu başlatır ve bu fibriller, üçlü sarmaldaki çapraz bağ oluşumuyla stabilize edilir.

Ortaya çıkan kemik hastalığının ciddiyeti, hem üç boyutlu fibrillerin yapısındaki değişikliklerin hem de mutasyonun spesifik yerleşiminin bir sonucu olarak görünmektedir. α -1 zinciri boyunca, kolajenin diğer kolajen molekülleriyle veya hücre dışı matriks proteinleri ile etkileşimi ile ilgili spesifik bölgeler, yani majör ligand bağlama bölgesi (MLBR) mevcuttur. Özellikle, tropokollajendeki iki "majör ligand bağlanma bölgesi", tip I kollajen genlerinde mutasyon sonucu etkilendiğinde genellikle ağır veya letal bir OI fenotipine neden olmaktadır. (106). Mutasyonlu tip I kollajeni barındıran osteoblastlardan salgılanan diğer matriks proteinlerinin de anormal ekspresyonu söz konusudur. Bu matriks anormallikleri mineral fazı etkiler, kortikal kalınlık ve trabeküler kemik miktarı azalmıştır. Mineralize OI kemiği daha serttir, mikrohasar birikimi daha fazladır ve daha kolay kırılır.

2.5.4.2 Yapısal ve kantitatif kollajen kusurları

Tip 1 kollajen çoğunlukla bağ dokusunda olmakla birlikte kemik, kornea, dermis ve tendonda da bol miktarda bulunan fibriler bir proteindir. Tip I kollajen endoplazmik retikulumda $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ prokollajen zincirleri olarak sentezlenir. (114). Başlangıçta oluşan polipeptid zinciri, amino (N-) ve karboksil (C-) uçlarında telopeptid adı verilen helix olmayan iki uzantıya sahip sarmal bir moleküldür. Amino terminal uzantısının, molekülün ER'ye girişini yönlendiren bir sinyal dizisi vardır. Pre-prokollajen molekülü, peptidaz tarafından sinyal peptidinin çıkarılmasıyla prokollajen moleküllerine dönüştürülür ve posttranslasyonel modifikasyona uğrar.

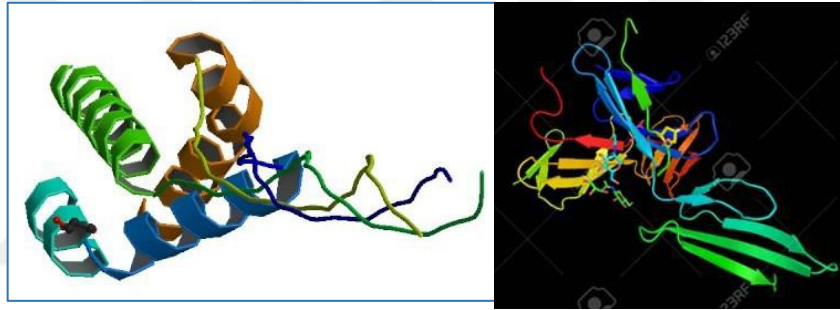
Hidroksiprolin ve hidroksilisin, ER'de prolin ve lisin rezidülerinin hidroksilasyonu ile oluşturulur. Hidroksilasyon için gerekenler başta prolil ve lisil hidroksilaz olan spesifik enzimler, α -ketoglutarat, demir iyonları, moleküler oksijen ve askorbik asittir (C vitamini) Galaktosil ve glukosil transferazlar, bir hidroksil rezidüsüne glukoz ve galaktoz eklenmesini katalize eder. Hidroksilasyon ve glikozilasyonu takiben, polipeptid zincirleri üçlü bir sarmal oluşturur ve interstisyel alana salgılanmadan önce Golgi kompleksine geçer. Hücre dışı alanda amino-peptidaz ve karboksilaz enzimleri prokollagen molekülünün her iki tarafında yer alan telopeptid uzantılarını çıkarır ve tropokollajen oluşur. Spesifik lisil veya hidroksilizil

kalıntılarının lizil oksidaz ile oksidatif deaminasyonu ile fibrillerin çapraz bağlanmasında oluşacak aldehit bağları ve nihayetinde kollajen fiberleri oluşur.

Triple heliksin stabilizasyonu; tekrarlayan glisin amino asidi, yüksek miktarda prolin ve hidroksiprolin içermesi, zincirler arası hidrojen bağların varlığı, elektrostatik etkileşim içeren lizin ve aspartat sayesinde sağlanır.

2.5.4.3. OI'de Kollajen genler

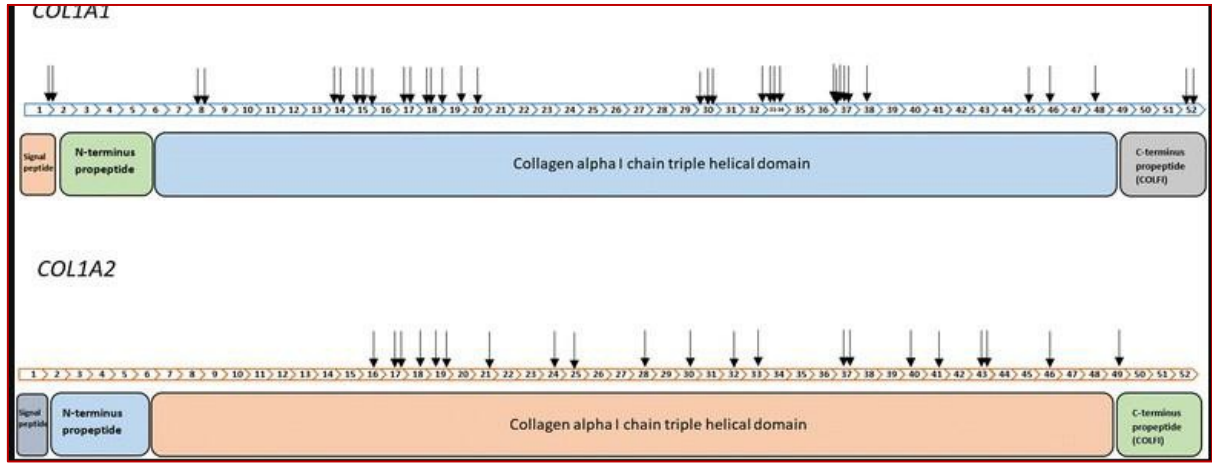
COL1A1 geni, üçlü sarmalın iki α -1 ve bir α -2 zinciri içerdiği tip I kollajende α -1 zincirlerini kodlar. 17q21.33'de lokalize, 18 kb çapında 1464 amino asitlik bir proteini kodlayan 51 ekzonlu bir gendir. Bu gendeki mutasyonlar OI tip I-IV, Ehlers-Danlos sendromu tip VIIA, Ehlers-Danlos sendromu klasik tip, Caffey hastalığı ve idiyopatik osteoporoz ile ilişkilidir (Şekil 14).



Şekil 14. *COL1A1* ve *COL1A2*'nin 3 boyutlu görseli (Ref. Molecular Target Synopsis)

COL1A2, 7q21.3'de lokalize, 36.67 kb 1366 amino asitlik bir proteini kodlayan 52 ekzondan oluşur. Bu gendeki mutasyonlar osteogenezis imperfekta tip I-IV, Ehlers-Danlos sendromu tip VIIB, resesif Ehlers-Danlos sendromu Klasik tip, idiyopatik osteoporoz ve atipik Marfan sendromu ile ilişkilidir

COL1A1 ve *COL1A2*'deki mutasyon türünden ilki miktarı azaltılmış normal tip I kolajene neden olan kantitatif kusurları, ikincisi değiştirilmiş yapıya sahip kolajen moleküllerinin sentezine yol açabilen yapısal kusurları tarifler (106). Kantitatif kusurlar daha hafif fenotiple ilişkili iken kollajendeki yapısal defektler, tipik olarak II-III ve IV gibi orta şiddetten letale kadar uzanan bir dizi farklı fenotipe neden olabilir (91). Yapısal mutasyonlar katlanmış α -1 zincirlerinin ER'de translasyon sonrası modifiye edici enzimlere uzun süre maruziyeti sonucu aşırı modifikasyonuna neden olur (110). Bu aşırı modifiye kollajen molekülleri, bozuk fibriller içinde birleşerek, kemik kırılabilirliğinin altında yatan temel özelliklerden biri olan anormal hücre dışı matriks ile sonuçlanır. Bu durum bazen ER stresine neden olarak otofaji stimülasyonu, apoptoz aktivasyonu ve bozulmuş osteoblast farklılaşması ile sonuçlanır (111,



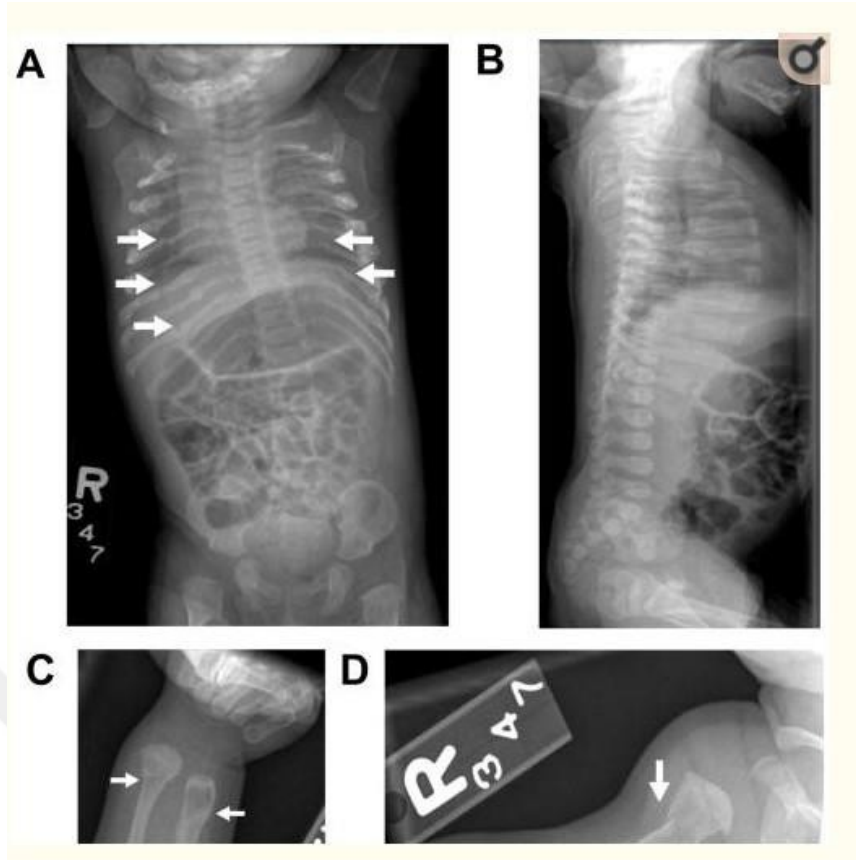
Şekil 16. COL1A1 ve COL1A2 ekzonlarında tanımlanan mutasyon diyagramı

2.5.4.4. OI'de Non-Kollajen genler ve patogenez

2.5.4.5. Mineralizasyon Defektleri (OI Tip V/ OI Tip VI)

OI Tip V ve VI kemik mineralizasyonundaki farklı kusurlarla karakterize klinik fenotiplere sahiptir

OI tip V, orta-ağır şiddette kemik displazisi, artmış kırık insidansı, vertebral kompresyon kırığı skolyoz bulgularının izlendiği *IFITM5*'in dominant mutasyonla ilişkilidir. Özgün radyolojik bulguları arasında radius başı dislokasyonu, ön kol interosseöz membranda ossifikasyon, ön kol metafizlerinde belirgin bant görünümü ve hiperplastik kallus oluşumu yer alır. (Şekil 17). Olgular arasında fenotipik kombinasyon ve zamanlama değişkenlik gösterebilir (69). Tip V hastalarının hiçbirinde mavi sklera veya DI bulunmadığı, ancak ligament gevşekliğinin tip IV olan hastalardakine benzediği, iliak kemiğe ait biyopside, lamellerde ağ benzeri düzensizlik, kantitatif histomorfometride, OI tip IV'te olduğu gibi azalmış kortikal ve süngerimsi kemik miktarları bildirilmiştir (211).



Şekil 17. IFITM5 mutasyonu taşıyan olgunun iskelet bulguları. A) Bilateral iki arka kot kırığı B) Lateral görüntüde vertebral kompresyon kırığı izlenmiyor. C) Akut distal radyal kırılma ve distal ulnar metafizlerin eski kırığa bağlı genişlemesi. D) Sağ humerusun ön-arkadan görünümü ve proksimal metafizyel kırığı (Ref. J. Bone Miner Res. 2013 Nov; 28(11): 2333–2337. Monica Grover)

Tip VI resesif *SERPINF1* mutasyonlarıyla ilişkilidir. Doğumda genellikle kırıkları yoktur ancak yıllar içinde artarak (yılda 10'dan fazla) kemik deformitesine neden olan kırıklar meydana gelir. Olguların çoğunda vertebral kompresyon kırığı ve skolyoz bildirilmiştir. Tip VI'da büyüme geriliği orta ağırlıkta, sklera beyaz ve dişler normaldir (70, 212,213). Kemik histolojisinde, geniş mineralsiz osteoid grupları, polarize ışıktaki balık pulu görünümünde lamellasyon dikkat çekicidir.

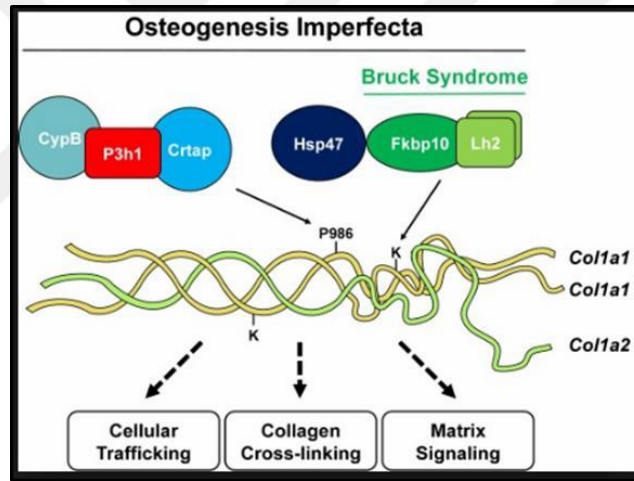
2.5.4.6. Şaperon ve çapraz bağlanma kusurları (OI TİP XI/ Tip X/ Bruck Sendromu)

Kollajenin çapraz bağlanması, kollajen fibrillerinin bitişik fibrillerle güçlü kimyasal bağlar oluşturmasını ifade eder. Fibroziste aşırı miktarda kollajen birikir. Biriken kollajende, telopeptitler içindeki hidroksillenmiş lizin rezidülerinden türetilmiş piridinolin çapraz bağlarında bir artış izlenir. Piridinolin çapraz bağlarındaki artışın, telopeptitlerin (telopeptit lisil hidroksilaz veya TLH) hidroksilasyonundan sorumlu olan enzimin aktivitesindeki eksiklikten kaynaklanabileceği 90'ların sonundan itibaren tartışılmış fenotipik olarak ilk kez

2004'te pterijium, kontraktür ve multipl kırıklarla doğan bir Türk olguda *PLOD2* geninin bulunmasıyla moleküler süreç tanımlanmıştır (192, 193).

SERPINH1 ve *FKBP10* genleri prokollajen moleküllerinin uygun şekilde katlanmasında görev alan şaperonlardan sırasıyla HSP47 ve FKBP65 proteinlerini kodlarlar. Şaperonlardaki mutasyonlar kollajen moleküllerinin hücre içi tutulması veya toplanmasıyla hücre içi kollajen trafiğini bozar ve elektron mikroskopisinde ER'de dilatasyona neden olur (143). Zincirler katlandığında, yeni bir post-translasyonel modifikasyona uğrayamazlar. Ana sarmalın katlanması tamamlandığında, *SERPINH1* ve *FKBP10*, ER içinde erken fibril oluşumunu önlemek için tip I prokollajen ile etkileşime girer. Prokollajen molekülleri ER'den ayrılır, Golgi'ye gider ve salgı veziküllerinde paketlenerek hücre dışı matrikse salınır. *SERPINH1* ve *FKBP10* genlerindeki kusurlar sırasıyla OI Tip X ve OI XI ile ilişkilendirilmiştir

SERPINH1 null fareler, ER'de yanlış katlanmış kollajen, gecikmiş kollajen sekresyonu ve nihayetinde kusurlu kollajen fibrillojenezi nedeniyle embriyonik olarak letaldir. (126,127).



Şekil 18. . OI veya Bruck sendromunda tip I kollajenin mutasyonu sonucu post-translasyonel modifikasyonundaki

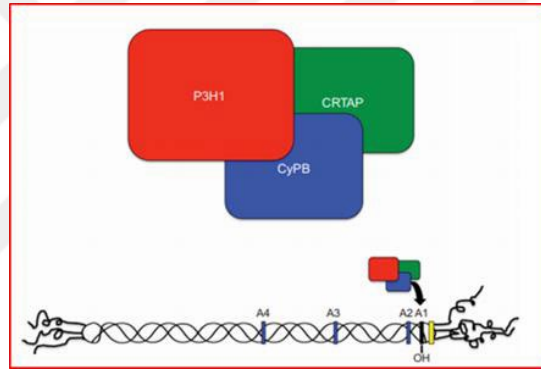
anomalili gösteren illüstratif bir örnek (Ref)

FKBP10'un resesif mutasyonları, ağır osteopeni, kırıklar, ligamentöz gevşeklik, platispondili ve skolyoz bulgularıyla deforme OI bulgularına benzer klinikle ilk kez Türk olgularda bildirilmiştir, *FKBP10* mutasyonları konjenital kontraktürler ile karakterize Bruck sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 18) (128,129).

2.5.4.7. Post-translasyonel kusurlar (OI Tip VII/ Tip VIII/ Tip IX)

Kollajenin post-translasyonel modifikasyonu, kollajen telopeptidi ile helix arasındaki gerilme özelliklerini yöneten kovalent çapraz bağların oluşumunu etkileyebilir. Bu kusurlar post-translasyonel modifikasyonun ve tip I pro-kollajenin uygun şekilde katlanmasında önemli rol oynayan proteinleri şifreleyen genlerdeki *CRTAP* (cartilage-associated protein), *P3H1* (Prolyl3-hydroxylase1 / LEPRE1) ve *PPIB* (siklofilin B /Peptidyl-Prolyl Isomerase) resesif mutasyonlu hastaların tanımlanmasıyla ortaya çıkmış (95,126) ve sırasıyla VII /Tip VIII/ ve Tip IX olarak tanımlanmıştır (Şekil 19).

P3H1, *CRTAP* ve *PPIB* ER'da prolil 3 hidroksilaz adında trimerik bir kompleks oluşturur. (Şekil 19). Bu kompleksin prolil 3-hidroksilasyonu, peptidil-prolil bağlarının cis-trans izomerizasyonu ve şaperon fonksiyonu olmak üzere üç görevi vardır.



Şekil 19. Prolil 3-hidroksilasyon kompleksi ve fibril kollajenler üzerindeki aktivitesi (Ref. Homan, E. P., Lee, B., & Morello, R. (2014))

CRTAP, α -1 zincirinin hidroksilasyonunun azalması, gecikmiş sarmal katlanması ve tip I kollajenin aşırı modifikasyonuna neden olarak kompleksin karmaşık stabilite ve aktivitesi için gerekli olan temel kofaktör gibi görünmektedir (95). *CRTAP* gen varyantları, rizomeli ve neonatal kırıklarla ağır bir tabloya neden olur. Nadir de olsa sağ kalanlar ciddi büyüme geriliğine sahiptir (Şekil 20).



Şekil 20. Kıkırdak ilişkili proteini (*CRTAP*) kodlayan gendeki mutasyonu taşıyan otozomal resesif letal OI tanılı olgu (Ref)

Morello R, Bertin TK, Chen Y, Hicks J, Tonachini L, et al: *CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. Cell 127:291–304 (2006)*

LEPRE1 mutasyonlu olgularda OI II/OI III'e benzer bir fenotipte klasik OI bulgularına ek olarak normal sklera, yuvarlak yüz ve fiçı şeklinde toraks yapısı saptanmıştır (125). *PPIB*'deki kusurlar, rizomeli dışında *CRTAP* ve *P3H1* ile örtüşen klinik ve biyokimyasal fenotip ile sonuçlanır. (58, 61–63). Batı Afrikalıların yaklaşık % 1,5'i ve Afro-Amerikalıların % 0,4'ü *LEPRE1* geninde kurucu bir mutasyon taşır (18, 19). *PPIB* eksikliği, *CRTAP* / *P3H1*'in stabilitesini etkilemez ancak prolil 3-hidroksilaz aktivitesi üzerinde olumsuz sonuçlar doğurur (201,202,96).

2.5.4.8. Kollajen işleme kusurları (OI Tip XIII/ Osteogenesis Imperfecta/Ehlers–Danlos Fenotipi)

C-propeptid veya N-propeptitte ayrılma bölgelerini etkileyen dominant veya ayrılmayı katalize eden enzimleri etkileyen resesif mutasyonlar (*BMP1* ve *ADAMTS2*) kendine özgü fenotiplerde ortaya çıkar.

C-propeptidini prokollojen molekülünden ayıran bölünme bölgesi mutasyonları ciddi OI'den hafif kemik kırılabilirliğine kadar değişen fenotiplerle sonuçlanır. Ayrılmayı sağlayan enzimi kodlayan *BMP1*, tip I ve tip III kollajenin C-propeptitlerini işleyerek hücre dışı matris düzenliğini ve yapısını geniş ölçüde etkiler (122,123,124). Bu mutasyonların bölünme bölgesi mutasyonlarından daha ciddi OI formlarına yol açtığı düşünülmektedir. OI Tip XIII normal dişler, soluk mavi sklera, ağır büyüme geriliği, osteoporoz ve yılda ortalama 10 ila 15 kırıkla

karakterizedir. Aynı zamanda *BMP1* mutasyonları artmış kemik dansitesi (BMD) ve tekrarlayan kırık öyküsü olan Türk kökenli iki kardeş olguda tanımlanmıştır. *BMP1*'deki homozigot p.Gly12Arg'ın neden olduğu mutasyonun yetersiz kollajen işlenmesine ve muhtemelen kemikte ektopik mineral birikimine yol açtığı bildirilmiştir. Kemikte artmış mineralizasyona karşın yetersiz kollajen yapısal olarak kırılmaya eğilim gösterir (203). Artmış kemik mineralizasyonu ve kırık ilişkisine dair patofizyolojideki belirsizliğin daha fazla olgu ve araştırma gerektirdiği kesindir.

Kollajen sarmalının $\alpha 1$ veya $\alpha 2$ zincirinde, N-terminal amino asidini etkileyen dominant mutasyonlar, N-propeptid bölünme bölgesinin tersiyer yapısını değiştirir. *ADAMTS2* (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs-2) adı verilen N-proteinaz terminal bölgeyi prokollejenden ayıramaz (196). Kollajen molekülünde N-propeptidinin tutulumu ayrıca protein fosforilasyonu, kollajen sentezi ve hücre yapışması gibi propeptidin hücre içi fonksiyonlarını tehlikeye atar (120,121).

2.5.4.9. Osteoblast farklılaşması ve işlevindeki kusurlar (OI Tip XII/ OI Tip XIV/ OI Tip XV/ OI Tip XVI)

OR OI için yeni lokuslardan biri kemik hücrelerinin diferansiyasyonunda görev alan ve kemik oluşumu için gerekli olan osteoblast spesifik transkripsiyon faktörünü (*Osx/osterix*) kodlayan *Sp7* genidir. *Sp7/Osx* spesifik olarak kortikal ve trabeküler osteoblastlarda ve daha düşük seviyede büyüme plağının pre-hipertrofik kondrositlerinde eksprese edilir. *SP7* geni null farelerde osteoblast farklılaşması, proliferasyonu ve osteoblast markörlerinin ekspresyonu azalmıştır. Mezenkimal hücreler, osteoklastlar ve kan damarları birlikte endokondral iskeletin mineralize kıkırdak matriksini istila eder, periosteumdaki hücrelerden osteoblastlara farklılaşma gerçekleşmez. Yani hem endokondral hem de intramembranöz kemik oluşumları bozulur. Sınırlı dokuda ekspresyonu nedeniyle sklera normaldir (130,100). Gen, resesif OI'li bir olguda hipomorfik mutasyonun (kısmi fonksiyon kaybı) bildirildiği OI Tip XII fenotipiyle ilişkilendirilmiştir (100).

OI Tip XIV ile ilişkili *TMEM38B*, ER'de yer alan ve katyon kanalından sorumlu protein olan TRIC-B'yi kodlar. Bu kanal hücre farklılaşmasında yer alan, hücre içi kalsiyum akışı için gerekli olan tek değerli bir katyona özgüdür. TRICB $-/-$ fareler azalmış kemik hacmiyle yenidoğan döneminde kaybedilir (133,134).

Osteoblast işlevleriyle ilişkili bir diğer gen *wnt1* (Wingless-type MMTV integration site family member 1) dir. Wnt gen ailesi, embriyo gelişimi, hücre çoğalması ve farklılaşması ile doku yenilenmesi dahil olmak üzere birçok gelişimsel ve homeostatik süreçte yer alan dual aktivite gösteren, amino asit yan zincirlerine kovalent bağ ile oligosakkaritlerin bağlandığı

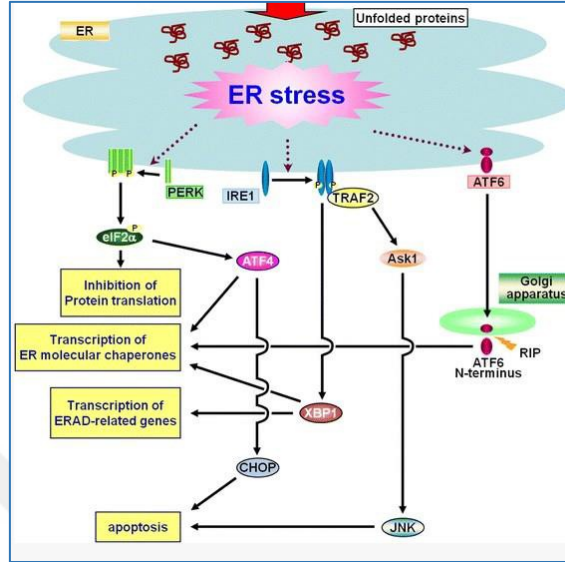
glikoprotein yapıdaki proteinleri kodlamaktadır. Bildirilen mutasyonların genetik çeşitliliği (homozigot/heterozigot) ve bu mutasyonlarla ilişkili farklı fenotipler (erken başlangıçlı osteoporoz/orta derecede şiddetli OI), *Wnt1*'in kemik homeostazındaki rolünü açıklamakta zorlukları da beraberinde taşır (135). *Wnt1* mutasyonlarının iskelet fenotipleriyle ilişkisinden önce, erken beyin gelişiminde kusurlar ve ciddi serebellar anomalilerle kaybedilen hayvan deneyleri bildirilmiştir (138). *Wnt1*'deki homozigot/bi-allelilik mutasyonlar, ilk kez erken başlangıçlı ve tekrarlayan kırıklar, kemik deformitesi, kemik yoğunluğunda belirgin azalma, kısa boy ve mavi sklera bulguları tanıyan bir Türk ailede saptanmış ve yol açtığı fenotip OI Tip XV olarak tanımlanmıştır (135). Genin heterozigot ya da monoallelik mutasyonlarının ise erken başlangıçlı osteoporozla ilişkisi gösterilmiştir (135,136,137). Bu olgualarda, işitme ve diş gelişimi genellikle bozulmamaktadır (199). Osteositlerden aşırı *Wnt1* ekspresyonunun, kısmen mTORC1 sinyalinin aktivasyonuna bağlı osteoblast sayısını ve aktivitesini artırarak kemik oluşumunu uyardığı ve artmış kemik dansitesine neden olduğu bildirilmiştir

Wnt1, lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 5/6 (LRP5/ LRP6) ile kemik oluşumunda etkileşime girer (139). LRP5, Wnt proteinlerini bağlayan doğal bir yardımcı reseptör görevi görür ve mutasyonlarında Wnt sinyal aktivitesi azalır. Son çalışmalar, Wnt sinyallerinin LRP5/6 olmadan doğrudan da düzenlediğini bildirmiştir. Homozigot/bi-allelilik *LRP5*'in fonksiyon kazandırıcı mutasyonları insanlarda yüksek kemik kütlesi (BMD) ile giden fenotiplerle (7,8), heterozigot fonksiyon kazandıran mutasyonları ise van Buchem hastalığı tip 2 ile (endosteal hiperostoza) ilişkilendirilmektedir (140,141,142). *LRP5*'in bi-allelilik fonksiyon kaybı mutasyonlarının ise erken başlangıçlı primer osteoporoz ve osteoporoz-psödoglioma sendromuna (OPPG) yol açtığı bildirilmiştir (9-11). Erken başlangıçlı primer osteoporozda OI'ye ait herhangi bir iskelet bulgusu bulunmaz. Bu mutasyon spektrumunun farklılığı, kemik homeostazında Wnt ligandının dual fenotiplerinden dozaj farklılığının sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

2.5.4.10. Endoplazmik retikulum ve olası metabolik komponentler (OI Tip XVI /OI tip XIX)

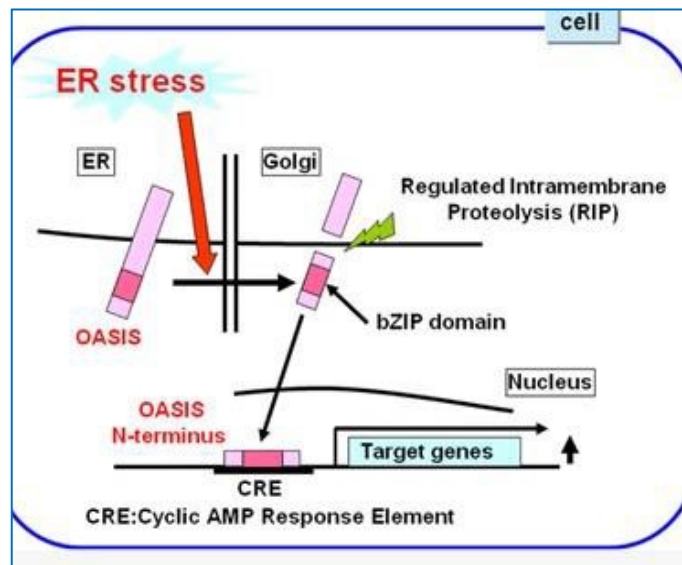
ER fonksiyon kapasitesini aşan fizyolojik veya patolojik durumlarda lümende katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi meydana gelir ve bu durum ER stresi olarak isimlendirilmektedir (204). Ökaryotik hücreler, ER'den sitozol veya çekirdeğe kadar çeşitli sinyaller üreterek ER işlev bozukluğuna adapte olabilir. Bu sinyal yolları toplu olarak katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak bilinir. ER'deki yanlış katlanmış kollajen

zincirleri, UPR'yi aktive eder ya kollajen katlanmasına yardımcı olmak için şaperon aktivitesini tetikler veya alternatif olarak mutant protein yıkımını artırır (Şekil 21) (205).



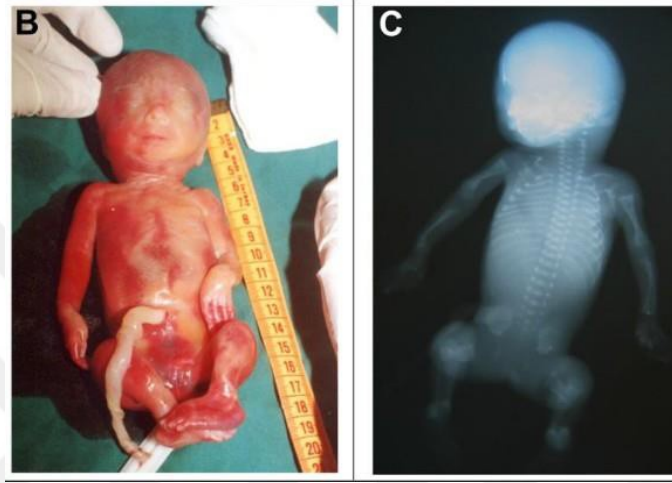
Şekil 21. Endoplazmik retikulum (ER) stresi ve katlanmamış protein yanıtı (UPR) (Ref.Atsushi Saito, January 2014)

CREB3L1 (cyclic AMP responsive element binding protein 3-like 1), UPR ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan OASIS'i (Old Astrocyte Specifically Induced Substance) kodlar. OASIS, gelişim süreçleri, farklılaşma ve olgunlaşma ile ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir ER stres dönüştürücüsüdür. Aktifleşmesi ER'nda katlanma kapasitesini artırır, mutant protein translasyonunu azaltır, yanlış katlanmış proteinlerin bozulmasını hızlandırır ve başarısız olursa apoptoz için sinyaller verir (Şekil 22).



Şekil 22. OASIS'in aktivasyon mekanizmaları. OASIS, düzenlenmiş intramembran proteoliz (RIP) ile transmembran bölgesindeki ER stresine cevap olarak bölünür ve CRE dizisine bağlanma yoluyla hedef genlerin ekspresyonunu teşvik etmek için çekirdeğe geçer (Ref.Atsushi Saito, January 2014)

CREB3L1 nakavt farelerde, spontan kırıklar ve kemikte azalmış tip I kollajen üretimi ile şiddetli osteopeni görülür. (144). *CREB3L1* ilişkili OI tip XVI prenatal başlangıçlı, letal tipte, çoklu kırıklar, mavi sklera, kraniyal mineralizasyonda belirgin kayıp, ağır demineralizasyonun doğum öncesi başlangıcı ile karakterize bulgularla yine ilk kez bir Türk olguda bildirilmiştir. (Şekil 23) (143). Heterozigot mutasyon taşıyan aile üyeleri, minimal travmaya yol açan tekrarlayan kırıklar, osteopeni ve mavi sklera gibi hafif bulgulara sahip olabilmektedir.



Şekil 23. *CREB3L1* mutasyonlu olgu örneği. A. 19. haftalık fetusta eğrilik ve pes ekinovarus B. Fetüsün X-ray bulguları (uzun kemiklerde çoklu kırıklar ve kostalarda 'beading' görünümü) sunulmaktadır (Ref. Symoens, S. et al. 2013)

Osteoblastlardaki düzenlenmiş intramembran proteoliz (intramembrane proteolysis /RIP) yolunun parçası olan proteinlerden biri olan site-2 metalloprotease (S2P)'nin (*MBTPS2* tarafından kodlanır) mutasyonlarıyla ilişkili OI Tip XIX, X linked resesif (XLR) geçişlidir (195, 206). 2 yaşında bir erkek olguda orta boy, mavi sklera, pektus karinatum, alt ekstremitelerde uzun kemiklerde eğrilik, azalmış kemik dansitesi, etkilenen erişkin erkeklerde gebelikten itibaren başlayan kırıklar, tibial angülasyon, osteopeni, kısa boy ve skolyoz saptanmıştır (Şekil 24) (206).



Şekil 24 A. MBTPS2'deki mutasyonu taşıyan mavi sklera, pectus karinatum ve anterior bükülmüş bacaklara sahip 2 yaşında erkek olgu. B. Yaşamın 1. gününde radyografilerde kosta, humerus, femur ve tibiada saptanan kırıklar gösterilmektedir (Ref. Uschi Lindert, Nature 11920 (2016)).

İntramembranöz proteoliz, membranı kapsayan düzenleyici proteinlerin, zarın düzlemi içindeki proteazlarla bölünmesini içerir. MBTPS2'de farklı pozisyonlardaki mutasyonlar, Olmsted sendromu, X-linked keratosis follicularis spinulosa decalvans (KFSDX) ve IFAP Sendromu (foliküler iktiyoz, atrişi ve fotofobi ile karakterize) gibi farklı spektrumlara neden olmaktadır. (207-209). Bazı olgularda özellikle vertebral malformasyonlar ve yarı el gibi çeşitli iskelet malformasyonları bildirilmiştir (210). MBTPS2'deki farklı mutasyonların tamamen ayrı gelişimsel bozukluklara neden olması bozulmuş hidroksilasyon ve kollajenin çapraz bağlanması gibi teorilerle bağlansa da mekanizması belirsizliğini korumaktadır.

2.6. OI'da İskelet Dışı Bulgular

2.6.1. OI' da İşitme Kaybı

İşitme kaybı OI'da tüm olguların yaklaşık % 45 -% 58 sinde izlenir (146,147). Çoğunlukla OI Tip I' e ait bir bulgu gibi görünse de bir miktar Tip III ve IV hastasında da görülebilir (145). Dominant tip iki taraflı, simetrik ve miks tipte işitme kaybıdır. Genellikle yaşamın ikinci ve dördüncü dekadı arasında sıklıkla başlayan ileti tipi işitme kaybı farklı şiddetlerde miks tipe dönüşür (146). Pür sensorinöral kaybın başlaması herhangi bir yaşta olabilmektedir

(145). Erken çocukluk yaşlarında sık otitis media öyküsü olan olguların okul döneminde yaklaşık %10'unda timpanometrede patoloji izlenir. OI'deki sensori-nöral bileşen koklear hücrelerinin ve stria vaskularisin atrofisine, perilenfte kanamaya, mikrofrakturlara, otik kapsülde otosklerotik kemik oluşumuna ve membran bozulmalarına neden olabilir. (147, 148). Pür ileti tipi kayıp sıklıkla, stapes ayağının fiksasyonunu ve temporal kemikteki yaygın otoskleroza bağlanmıştır. (149,150,151).

İşitme kaybının, tipi veya şiddeti, mutasyona uğrayan gen veya mutasyonun yeri ile ilişkili değildir. Ayrıca, aynı mutasyonların, işitme düzeninde kayda değer, inter / intrafamilyal değişkenliğe yol açmaz. Otitis media öyküsü, kafa travması ve gürültüye maruz kalma, işitme engelli OI hastalarında daha sık rapor edilmiş olsa da, bu risk faktörlerinin hiçbirisi işitme kaybı oluşumu ile anlamlı bir şekilde ilişkilendirilmemiştir. (145). OI'ye neden olan mutasyonlar işitme kaybının ifadesi için yeterli değildir. Bu nedenle, ilave bir genetik tetikleyicinin OI'deki işitme kaybından sorumlu olduğu düşünülmektedir (145). Kantitatif veya kalitatif kolajen defekti olan hastalar mutasyon-işitme kaybı tipi, orta kulak operasyonu prevalansı ve işitme cihazı kullanımı açısından karşılaştırıldığında da herhangi bir fark bulunamamıştır. Bağımsız bir faktör olarak yaş artışına bağlı işitme kaybı sıklığının arttığı bildirilmiştir. Miks tip işitme kaybı olan olgulardaki sağırliğin şiddetinin pür olanlardan daha ağır olduğu bildirilmiştir (152).

2.6.2. OI' tada Göz Bulguları

Tip I kollajen, sklera, kornea, trabeküler ağ örgüsü, lens kapsülü, uvea ve lamina kribosa'nın ayrılmaz bir parçasıdır (153). Literatürde OI ile ilgili tanımlanan karakteristik oküler bulgular genellikle mavi sklera, incelmış kornea, miyopi, keratokonus, retina dekolmanı ve glokomdur. Oküler bulgularla ilgili literatür genellikle en yaygın ve en hafif tip olan tip I OI ile sınırlıdır (154, 155). Karşılaştırma yapabilen kıstlı sayıda çalışmada tip I deki korneal kalınlık, tip III ve IV'de göre daha ince bulunmuştur (156). Tip I'deki mavi sklera sıklığının diğer tiplerle kıyaslandığında fazla olması sadece korneal kalınlıktaki azalmayla değil, aynı zamanda korneal stromal farklılıklarlada ilişkilidir. Sklera rengi çocuklukta maviden beyaza doğru zamanla solabilir veya erişkinlikte griye dönebilir (152). Sklera rengi tanısal olarak görünse de şüpheli hafif OI olguların belirlenmesinde santral korneal kalınlığının (CCT) ölçülmesi önerilmektedir (152).

2.6.3. Dentinogenesis İmperfekta

Dentinogenesis imperfekta (DI) dentin matrisinin oluşumunda, bileşiminde veya organizasyonundaki bozukluklardan dolayı oluşan ince, yarı saydam ve grimsi kahverengi renkte disklorasyonun eşlik ettiği anormal bir dentin yapısıdır. Hem primer hem de kalıcı dişleri etkiler. Dentin yaklaşık %70 mineral, %20 organik matriks ve %10 sudan oluşur. Dentinin organik bölümünün %86'sı kollajen tip 1'den oluşur. Zayıf mineralli dentin nedeniyle, diş minesi sık sık çatlaklar, bu da dişlerin diş etinde bile hızlı aşınmasına yol açar. (Şekil 25) (20).



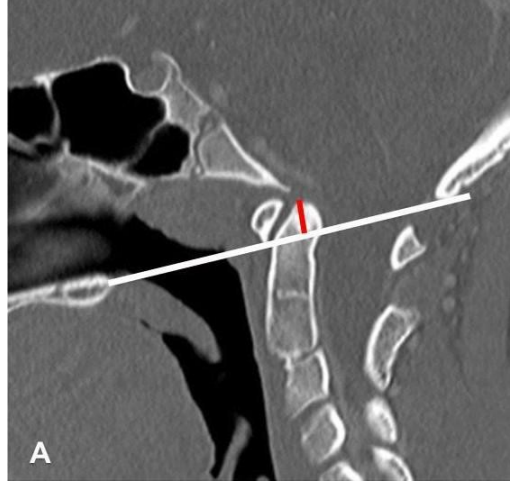
Şekil 25. Dentinogenesis İmperfekta örneği (Ref.Tracy Thomas By Pinterest 2009)

OI tip I hastalarında Dentinogenesis Imperfecta (DI) prevalansı %8 ile %40 arasında değişirken, en yüksek DI insidansı OI tip III ve IV olan hastalarda bulunmuştur (157). Radyografik olarak DI etkilenen dişlerde, dentin birikmesi nedeniyle pulpa odasının ve kök kanallarının tamamen yok olması, bulböz bir taç, kısa ve daralmış kökler ve sürekli dentin üretimi nedeniyle, pulpar daralma izlenir. Gelişmekte olan dişlerde genişlemiş pulpa odaları ve gecikmiş erüpsiyonu, tamamen gelişmiş dişlerde total pulpa obliterasyonu, kısa kökler, servikal daralma, pulpa taşları ve taurodontizm rapor edilmiştir (20).

2.6.4. Kraniyo-spinal anomaliler

OI'lı olgular, frontal bossing ve sıklıkla maloklüzyona yol açan mandibular malformasyonlu üçgen bir yüz şekline sahiptirler. Membranöz ve enkontral kemiğin genel olarak bozulması, anormal derecede ince veya kalın bir kalvariuma, platisbasi, baziller impresyon (BI- Şekil 26), görece ya da gerçek makrosefali, fontanellerin ve süturların erken veya gecikmiş kapanması ile meydana gelen Wormian kemiklerinin oluşmasına yol açar. Birden fazla Wormian kemiği erişkinliğe kadar devam edebilir (158,20).

Nörolojik bulgular genellikle kafatası tabanındaki kemiğin yumuşaması sonucunda üst servikal omurganın ve odontoid sürecin kafatasına doğru göçü ile başlar.



Şekil 26. Baziller İmpresyon (Ref. By Chester J Donnally)

Omurganın yukarı doğru göçü beyin sapının sıkışmasına, beyin omurilik sıvısı dolaşımının kısıtlanmasıyla birlikte kraniyal sinirlerin ve nörovasküler yapıların kompresyonuna neden olabilir. Beyin parankimi, hastalıktan etkilendiğinde; atrofi, hidrosefali ve serebellar hipoplaziye bağlı klinik bulgular izlenir (159). Progresyon kraniyal ve spinal MRI ile takip edilmelidir. OI'deki cerrahi dışı yönetimin genel amacı, kırık insidansını azaltmak ve hareketliliği ve bağımsızlığı arttırmaktır. Bununla birlikte semptomatik BI mevcutsa, yalnızca cerrahi dekompresyon ve stabilizasyon, ilerlemesini durdurabilir (160). Baş ağrısı, kranyal sinir felçleri ve servikal kifozun korda basısına bağlı komplikasyonlar görülen diğer nörolojik bulgularıdır.

2.6.5. 5. Endokrin anomaliler

Kısa boy, OI'nin temel özelliklerinden biridir. Büyüme bozukluğunun ciddiyeti, genel olarak OI'nin ciddiyeti ile de ilişkilidir. Ağır OI tip III olan hastaların yetişkin boyları genel olarak pre-pubertal çocuk seviyesinde kalırken (<100 cm) (161), OI tip IV olan hastalar ortalama yetişkinin final boyuna sahip olabilirler (162). Hafif OI tip I hastalar, standart büyüme eğrilerinde yüzde 5'in altına düşebilirler. OI hastalarında büyüme geriliği etiyolojisi tam olarak anlaşılmamıştır, farklı OI şiddeti olan hastalarda boy gelişiminin değerlendirilmesi günümüzde zordur. Genel olarak, OI'deki zayıf büyümenin, kalitatif kolajen defekti olan hastalarda, nicel defektli hastalardan daha belirgin olduğu görülmekte, böylece OI olan çocuklarda büyümenin incelenmesi, genotip-fenotip korelasyonları için çalışmalar için önemli bir alan haline getirmektedir (163). Kollajen defekti olan çoğu olguda büyüme aksının endokrin değerlendirmesi normaldir. 5 yaşından büyük olgularda, genel olarak IGF-I ve IGFBP-3'te önemli bir değişiklik gösterilmemiştir. Deneysel veriler, büyüme hormonunun kolajen metabolizması üzerinde muhtemel bir pozitif etkisi olduğunu göstermektedir. İnsülin

benzeri büyüme faktörü I (IGF1) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3(IGFBP-3), 'ün osteoblast kültürlerinde ekspresyonu uyardığı ve bunun da tip I kolajen sentezini düzenlediği bildirilmiştir (165,166,167). <5 yaş çocuklardaki çalışmaların beslenme alımı, boyları, ağırlıkları dikkatlice değerlendirilerek IGF-I ve IGFBP-3 seviyelerinin daha fazla olgu ve takiple araştırılması gereklidir. (164).

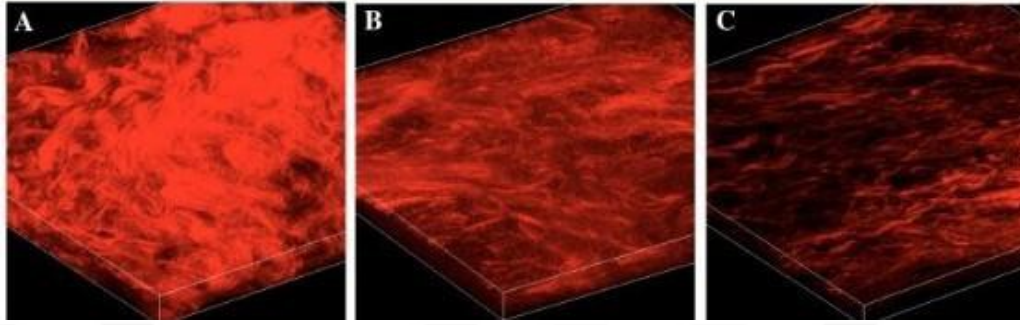
2.6.6. Kardiyovasküler anomaliler

OI ve kardiyovasküler anormallikler arasındaki ilişki yıllardır bilinmesine rağmen kardiyovasküler anormalliklerin spektrumu ve insidansı hakkındaki bilgiler sınırlı sayıda literatürde yer almıştır. Yaygın bağ dokusu bozukluklarının aksine, kardiyovasküler tutulum OI'de nispeten nadirdir. Kardiyovasküler tutulum derecesi, iskelet hastalığının ciddiyeti ile ilişkili değildir (168). Kollajen tip I, miyokarddaki toplam kollajenin yaklaşık %80'ini oluşturur ve aortta bulunan kollajenin %80-90'ı tip I ve III'tür. Kalpte, kollajen tip I kalp kapaklarında, korda tendinealarda, annuli fibrozalarda ve interventriküler septumda bulunur (169). Toplam 499 OI olgusunu kapsayan 45 yıllık literatür taramasında (170) OI'li olgularda kardiyovasküler ilk bulgu dispne veya kalp krizidir. 40 olguda aort kapak yetersizliği, 24 hastada mitral kapak yetersizliği, 2 hastada triküspit yetersizliği saptanmıştır. Bazı hastalarda valvülopati kombinasyonu bildirilmiştir. OI hastalarında kardiyovasküler cerrahi sonrası ölüm oranı %15 civarındadır. Artan doku ve vasküler fragilité, gecikmiş veya zayıf yara iyileşmesinin yanı sıra aşırı kanama ve transfüzyon gereksinimlerine yol açabilmektedir. Bozulmuş trombosit faktörü salınımına bağlı trombosit disfonksiyonu ve trombosit agregasyonundaki anormallikler de kanama sıklığının artmasına katkıda bulunmaktadır. (171,172)

2.6.7. Cilt bulguları

Kolajen, yüksek gerilme özelliklerine sahip lifli proteindir (173). OI hastalarda cilt normale cilde göre daha sert ve incedir, kolay yaralanır. OI hastalarla yapılan çalışmaların hepsinde elastikiyet, duyarlılık ve çekme kuvvetine karşı oluşan enerji kaybı kontroller ile karşılaştırıldığında azalmış olduğu görülmektedir (174,175). Olgulardaki histo-patolojik çalışmalar, yaşlanmış derideki bulgulara benzer şekilde kollajen içeriğinde ve dermal kalınlıkta azalma olduğunu göstermektedir. Hafif OI vakalarından elde edilen örneklerdeki kollajen liflerinin çapı daha ince iken, ağır OI vakalarından gelen kollajen normal bir çapa sahip olmasına rağmen mikro-iplikçikler daha yıpranmış görünmektedir (191).

Cilt biyopsilerinin optik tekniklerle (two-photon excited fluorescence; *TPEF* ve second-harmonic generation; *SHG*) değerlendirilmesinde, kollajen yön dağılım ve lif boyutu gibi özellikler incelenmiş ve sadece normal ciltten değil, aynı zamanda OI alt tiplerini açısından da farklılık gösterdiği saptanmıştır. (176) (Şekil 27).



Şekil 27.OI alt tipleri arasında optik cilt biyopsi farkları gösterilmektedir (Ref. Photograph by James Stevenson/science Photo Library which was uploaded on October 4th, 2018)

2.6.8. Diğer Bulgular

Azalmış kas kuvveti, orta ve ağır OI formlarında önemli olabilir. Eklem gevşekliği sıktır ve özellikle ayak bilekleri, kalça, omuzlar, baş parmaklar ve dirseklerin sık burkulma ve çıkıklarına katkıda bulunur. İskelet deformiteleri hareket kısıtlılığı ve ambulasyon desteği gerektirebilir. Fıtıklar OI'li çocuklarda genel popülasyona göre daha sıktır ve doğumdan itibaren saptanabilir. Hastaların %36'sında görülen hiperkalsiüri böbrek taşlarına neden olabilir. (177).

2.7. TANI

2.7.1. Biyokimyasal tanı

D vitamini, kalsiyum, fosfor ve alkalın fosfatazın kırılmaya cevaben akut yükseklikleri dışında serum konsantrasyonları normaldir (178).

Tip I kollajenin yapı ve miktarının kültüre edilmiş fibroblast analizi OI tip I 'de %90, OI tip II'de % 98, OI tip III ve OI tip IV'de yaklaşık % 84 oranında tanısal bilgi verebilmektedir. Çalışmalarda hem hidroksiprolin üretiminin hem de kolajen çapraz bağlarının azaldığı, osteoid mimarının anormal olduğu, kemikteki kollajen liflerinin ince filamentler veya gevşek biçimde sıkıştırılmış demetler halinde hücre dışında toplanamadığı görülmüştür. (179,180). Elektron mikroskopunda, normal yuvarlak şeklini koruyan kolajen fibrillerinin çapları önemli ölçüde normalden daha küçük kalmaktadır. Translasyon sonrası artmış modifikasyondan

dolayı kollajen zincirinin moleküler ağırlığında artış olduğu ve migrasyonun yavaşladığı saptanmıştır. Bu anormallikler kısmen OI'yı karakterize eden ve sık kırıklarla sonuçlanan kemiğin fiziksel özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri açıklayabilmekte ve muhtemel hastalığın ekstra-osseöz klinik belirtileri, bu kollajen aberasyonlarının kemiğe özgü olmayabileceğini göstermektedir. Ancak kollajen fibrillerinin düzenli lifler halinde toplanmasından sorumlu faktörler tam olarak henüz bilinmediğinden OI'daki anormal kollajen morfolojisinden sorumlu olan biyokimyasal bozulmalar araştırılmaya devam etmektedir.

2.7.2. Prenatal Tanı

Fetal iskelet displazileri fenotipin aile öyküsü ya da rutin ultrason muayenesiyle yapıldığına bağlı olarak, prenatal dönemde farklı gebelik haftalarında tanınabilir. Prenatal USG ile iskelet displazisi şüphesi uyanmışsa, öncelikle mevcut durumun letalite olasılığı sonra da ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Letal iskelet displazileri grubu, tipik olarak letal olmayan gruba göre daha şiddetli fenotipik özelliklere ve daha erken bir başlangıca sahiptir (6). Antenatal 14-16. haftalarda uzun kemiklerde ağır kısalık, düşük femur boyu-karın çevresi oranı, hipoplastik toraks ve belirgin eğrilik veya kırıklar ile letalite kestirilebilir. Bu haftalarda mikromeli ve iskeletin azalmış mineralizasyonu saptanırsa, ayırıcı tanıda OI tip II, tanatoforik displazi, akondrojeniz tipleri ve ağır infantil hipofosfatazya yer alır (181,7). Deneyimli merkezlerde, genellikle sonografik değerlendirmeyle daraltılmış veya spesifik klinik tanıya ulaşılabilir. Prenatal US'de OI'yı hem diğer letal iskelet displazilerinden ayırmak hem de alt tiplendirmesini yapabilmek ailelere verilecek genetik danışma ve test seçimini belirleyecektir. Bu durum, letal olmayan ama yenidoğan döneminde ağır klinik ile karakterize bir iskelet displazisi durumunda ailelerin buna hazırlık yapabilmesinde özellikle önemlidir.

OI'lı olguların tanısında zamansal profil hayati öneme sahiptir çünkü erken yenidoğan döneminde fenotip çeşitli OI alt tipleri arasında benzerlik gösterebilir. OI tip I ve OI tip IV gibi hafif OI formlarında genellikle iskelet deformiteleri 20. GH'ndan sonra bulgu verir (182). OI tip III, 18 haftadan önce nadiren tanımlanır ve tanının doğrulanması için USG takibi gerektirir.

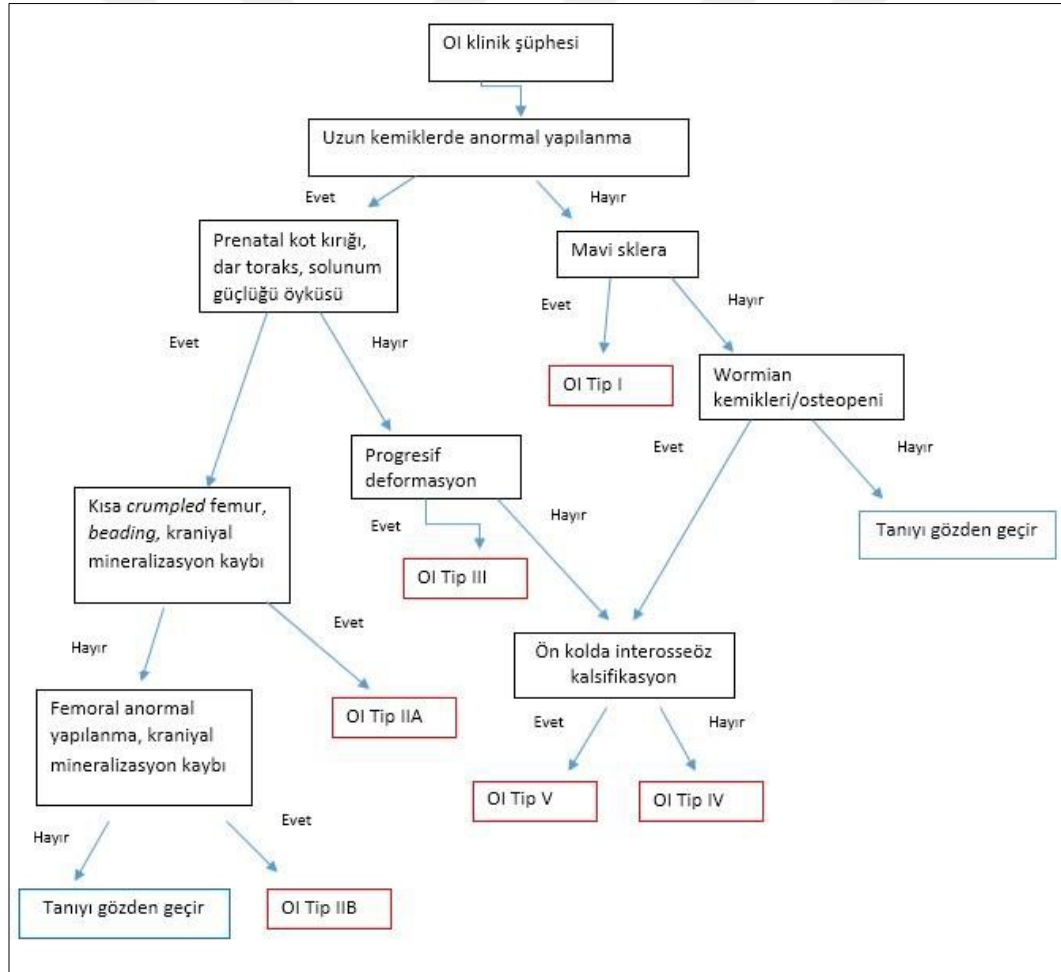
OI tip II çoğunlukla ağır seyreden, genellikle in-utero mikromeli, dar toraks, çok sayıda kırık ve buna bağlı olarak uzun kemiklerin ve kaburgaların düzensiz iyileşmesi bulgularıyla genellikle 20 GH'ndan önce görülür.

OI aile öyküsü ve etkilenmiş kardeş varlığında tekrar riski, gonadal mozaisizm olasılığı nedeniyle %1-50 arasında değişmektedir. Ailede mutasyon biliniyorsa başvuru zamanına göre, CVS hücreleri, amniyositler ya da korddan izole edilen DNA kullanılarak, moleküler analiz yapılabilir.

Gebeliğin doğuma kadar devam etmesi durumunda, genetik değerlendirme ve alt tiplendirmede, yenidoğan döneminde postnatal/postmortem değerlendirme ve radyografi önemlidir.

2.7.3. Postnatal Tanı

Aile öyküsünün olmadığı postnatal dönemde başvuran olgularda kısalık, kırık, mineralizasyon, eğrilik gibi genel iskelet değerlendirmesi klinik ve radyolojik olarak yapılmalı, skleralar, KVS, işitme ve dental anomaliler birlikte değerlendirilmelidir (Şekil 28).



Şekil 28: OI'da postnatal tanı algoritması (Ref) *Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples Molecular syndromology* 2(1):1-20 · December 2011

2.8. OI'de Radyolojik Tanı

2.8.1. TİP I

OI tip I'in, fetal ultrason ile tanımlanması zordur, çünkü OI tip I'de, ekstremiteler uzunluğu çoğunlukla normaldir ve femoral *bowing* nadirdir ve genellikle 20 haftalık gebelikten sonra farkedilir. Bu nedenle, OI tip I için risk altındaki gebeliklerde USG bulgusu olmasa da moleküler tanı önerilmektedir (236) (Şekil 29).



Şekil 29.: Tip I OI fetüs örneği (Refb <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2012.04.020>)

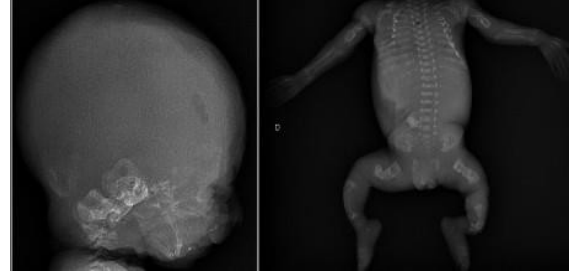
2.8.2. Tip II

Radyolojik kriterlere göre OI Tip II üçe ayrılır. Tip IIA ve IIB arasındaki ortak bulgular, azalmış mineralizasyon, mikromeli, uzun kemiklerde eğrilik ve kırıklardır. OI tip IIC oldukça nadirdir, uzun, ince, yetersiz modellenmiş kemiklere, çoklu kırıklar ve *beading* görünümlü kostalar eşlik eder. Ek olarak kırık yüzeyleri yassı kemiklerin dış marjinaleri ve metafizlerde osteoskleroz izlenir (185)

2.8.3. Tip IIA

OI tip IIA'da kısa geniş ve "*crumpled*" uzun kemikler, tibia da açılanma, femurda akerdeon görünümü ve kostalarda *beading* izlenir. (Şekil 30)

Şekil 30. OI Tip IIA COL1A1 mutasyonlu fetus için örnek görüntü (A-E) (Ref. Radiographic features of osteogenesis imperfecta 'Armelle Renaud).



2.8.4. TİP IIB

OI tip IIB'de, kafatası ve uzun kemiklerdeki bulgular, tip IIA'ya benzer ancak uzun kemiklerin deformasyon derecesi daha az belirgindir. Farklı olarak kaburgalar incedir ve kotlarda *beading* izlenmez. (Şekil 31)

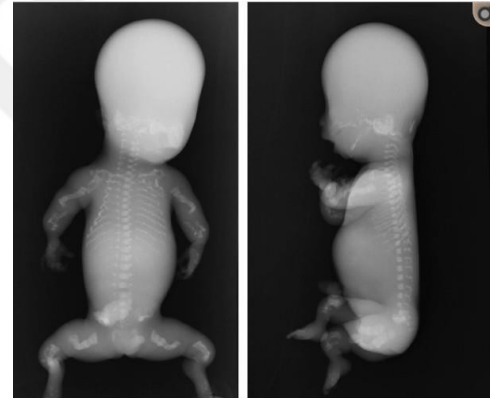
Şekil 31. A. COL1A1 missense mutasyonlu Tip IIB'li olgu, kranial mineralizasyon normal, alt ekstremitelerde bowing, ince kotlar, fraktür yok



2.8.5. TİP IIC

OI Tip II C'de uzun, ince, yetersiz modellenmiş kemiklere, çoklu kırıklar ve *beading* içeren kostalar eşlik eder (18) (Şekil 32)

OI tip II'nin bu üç tipi arasında OI II C, ince, bükülmüş kırıklı uzun kemikler, normal vertebra yüksekliği bulgularıyla fenotipik olarak ayrılır. Ayırıcı ek görünüm olarak, kırık yüzeyleri, yassı kemiklerin dış marjinleri ve metafizlerde osteokleroz izlenmesidir. (185).



Şekil 32. Uzun, ince, yetersiz modellenmiş kemikler, çoklu kırıklar, beading içeren kostalar (Ref. Hum Genome Var.

2014; 1: 140)

2.8.6. Tip III

Belirgin kısalık, üçgen yüz, ağır skolyoz ve DI ile karakterize tiptir. Neonatal dönemde ağır seyreder ve tekrarlayan kırıklara bağlı ekstremit ve vertebral deformasyonlarla progresyon izlenir (Şekil 33).



Şekil 33. Deforme uzun kemikleri gösteren radyografisiyle Tip III olgusu (Ref. Horacio Plotkin, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 85, Issue 5, 1 May 2000, Pages 1846–1850)

2.8.7. Tip IV

Sıklıkla normal sklera, osteopeni ve minimal travma ile kırığın eşlik ettiği bu form pozitif aile öyküsü nedeniyle genellikle prenatal dönemde farkedilir (187). Bazen sadece kırığın eşlik etmediği kısalık ya da eğrilik gibi bulgularla presente olabilir (Şekil 34)



Şekil 34. OI Tip IV 23 haftalık fetüs radyografisi. İnce klavikula ve kısa eğri femurlar görünmektedir (Ref Chih- Ping Chen *abdcdefg* 2012, Pages 271-275)

2.8.8. TİP V

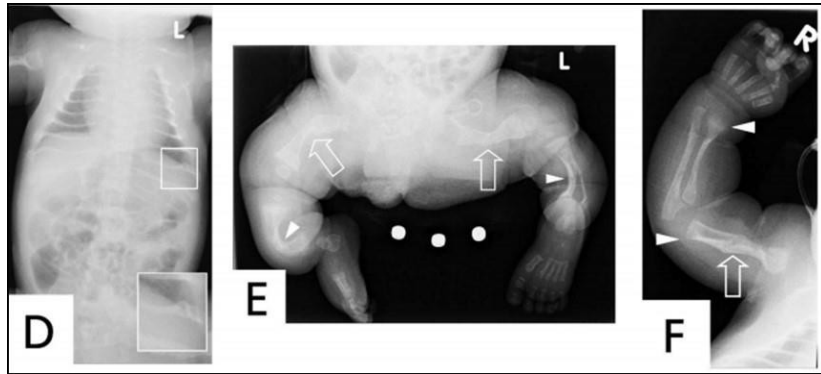
OI Tip V postnatal özgün bulguları (kırıklardan sonra hiperplastik kallus oluşumu; ön kolda interosseöz kalsifikasyon) ile diğer tiplerden ayrılrsa da antenatal dönemde benzer fenotiple ayrılamayabilir. (188) (Şekil 35)



Şekil 35. OI Tip V fetusta sol humerus ve kotlarda kırıklar X-ray görüntüsüne ait bir örnekte 20 haftalık gebelikte polihidramnios, alt ekstremitelerde eğilme ve kısalma bulgularıyla takip edilen olgudan postnatal radyografisi (Ref. Non classical IFITM5 Mutation Located in the Coding Region Causes Severe Osteogenesis Imperfecta With Prenatal Onset)

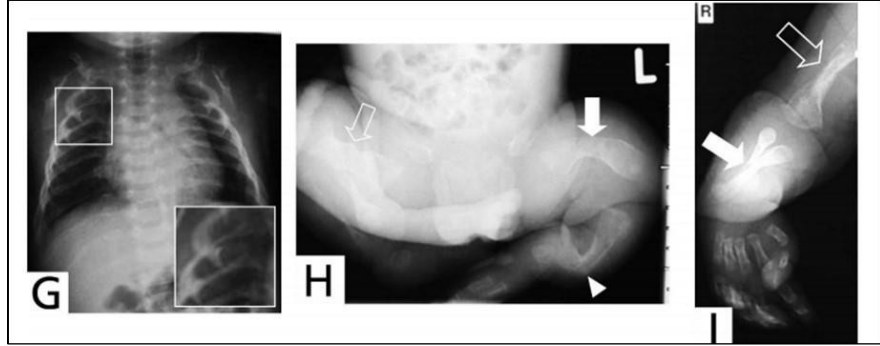
2.8.9. TİP VII

CRTAP ve *LEPRE1* genlerindeki mutasyonlar OI tip II / III'teki gibi ağır fenotipten daha hafif OI tip VII' ve VIII' e kadar geniş bir fenotipik aralığa sahip olabilir (Şekil 36, 37). Prolil 3-hidroksilasyon kompleksindeki defektin ağırlığına göre bazı mutasyonlar prenatal dönemde *COL1A1/COL1A2* genlerinden kaynaklanan ağır olgulara benzer biçimde doğumda uzun kemikler ve kotların çoklu kırıkları, deformasyonlar ve azalmış kalvaryal mineralizasyona sahip olabilir. Radyolojik olarak ayırmak zordur. Özellikle resesif kalıtımı destekleyen akraba ebeveyn varlığında düşünülmelidir (186).



Şekil 36. (D–F) *CRTAP* delesyonundan etiklenmiş 3 haftalık OI olgusuna ait radyolojik görüntüler (Ref Deficiency of Cartilage-Associated Protein in Recessive Lethal Osteogenesis Imperfecta in New England Journal of Medicine 355(26):2757-64 · January 2007)

2.8.10. TİP VIII



Şekil 37. (G–I) Postnatal homozigot *LEPRE1* mutasyonlu (c.401_402delAA) infanta ait radyolojik görüntüler (Ref. Lethal/Severe Osteogenesis Imperfecta in a Large Family: A Novel Homozygous *LEPRE1* Mutation and Bone Histological Findings)

2.8.11. TİP IX

PPIB genindeki OR mutasyonlarına bağlı oluşan ağır OI tipidir (Şekil 38)

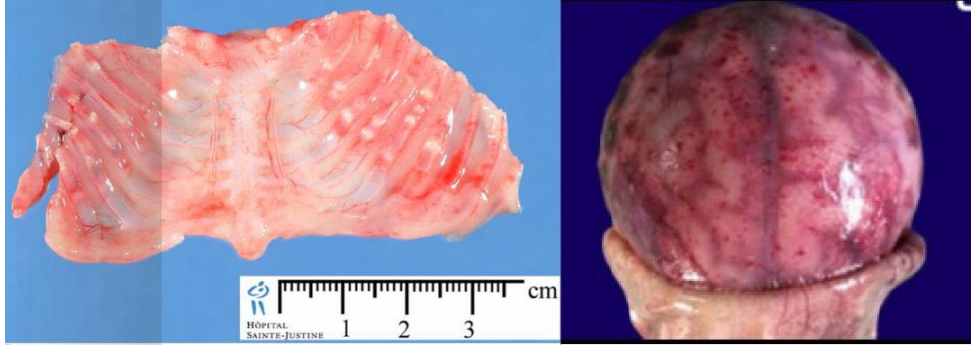


Şekil 38. Kranial mineralizasyon normal, alt ekstremitelerde bowing, ince kotlar, fraktür yok, prox., femur metafizlerinde düzensizlik izlenen *PPIB* geni homozigot delesyonlu olguya ait radyolojik görüntü. (Ref. Van Dijk, F. S 2011)

2.9. Postmortem Histo-patoloji

İskelet hastalıklarının tanısında prenatal ultrasonun görece zayıf kaldığı durumlarda, spesifik tanıda, moleküler genetik analiz, radyografik yöntemlere veya postmortem muayeneye bağlıdır. Ek olarak gebeliğin erken sonlandırılmasında veya güvenilir postmortem radyografik kontrol olmadığı kürtaj materyali gibi bütünlüğü bozulmuş fetal örneklerde, histolojik tanının kullanımı önem kazanmaktadır. Perinatal ölümle sonuçlanan olgularda bu örneklem otopsi ile, diğer hastalarda elektif operasyonlar esnasında alınabilmektedir. Bu inceleme için iliak krestte büyüme plağı bölgesinden biyopsi almak en uygundur.

Tanı süreci makroskobik inceleme ile başlar. Gelişim geriliği, kraniyal ossifikasyon kaybına bağlı yumuşak kıvamda kraniyum, kırıklara bağlı oluşan deformasyonlar, kostalarda nodülarite gibi makroskobik bulgular tanıya yol göstericidir (Şekil 39).



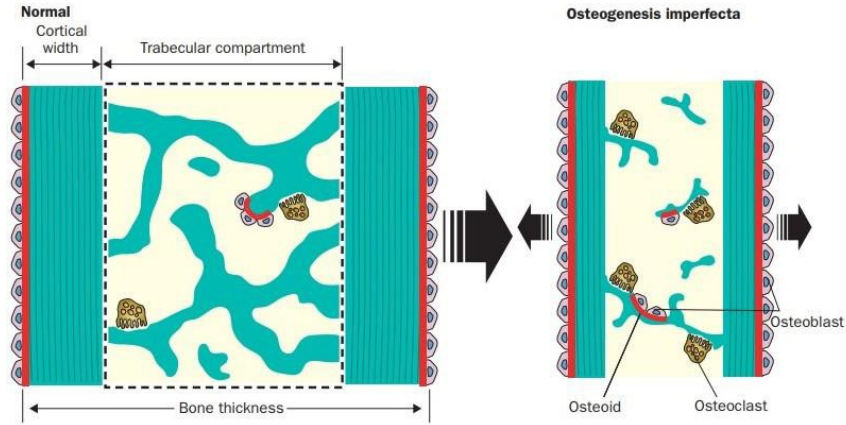
Şekil 39. Postmortem multipl kostal fraktürler (21. GH) ve fetal kraniyumda ossifikasyon kaybı ve beyni saran fibröz dokunun saydamlığı (Ref. Humpath.com - Human pathology / Osteogenesis imperfecta Bruno Kuszniir Vittoria)

Tip 1 kollajen fibroblast, kondroblast, osteoblast, odondoblast, düz kas, Schwan hücreleri, hepatositler ve retiküler hücrelerce sentezlenirler. Kollajen 75 nm lik (20-90 nm) kalın fibrillerden oluşur. Fibriller, lifleri, lifler de paralel dizilerek kollajen demetlerini oluşturur. Kollajen lifleri asidofilik yapıda olup, ışığı çift kırma özellikleri *sirius* kırmızısı ile boyandığında artar. Lifler Eozin ile pembe, Mallory'deki asit anilinile mavi, Massondaki light green ile yeşil, Sirius kırmızısı ile kırmızı boyanırlar.

Formalin fiksasyonu ve dekalsifikasyon işlemi sonrasında, parafin bloklarda kollajen lifleri için rutin H&E ve trikrom boyası, glikojen, kıkırdak yapısı ve sitoplazmik inklüzyonları göstermek içinse PAS ve Alcian mavisi ile boyama yapılır.

Kemik histolojisi, klinik fenotip ile yakın bir korelasyon göstermektedir. OI tip I hafif azalmış lamellar kalınlık, normale yakın mineralizasyon paterni ile histolojik olarak ta en hafif tabloya neden olurken, OI tip II belirgin dağılmış osteoid, incelmış kollajen lifleri, büyüme plağında kusurlu kemik oluşumu ve yamalı mineralleşme paterni ile karakterizedir. Histolojik incelemede tip II'nin, hiperselüler kemik trabekülü, fibrotik kemik iliği ve metafizlerde küçük metaplastik kıkırdak adaları gibi benzer bulgularla alt tiplendirmesi yapılamaz. Tip III kollajen fibrillerinin yapı ve dağılımında daha belirgin anormallikler gösterirken Tip IV, Tip I'e benzer şekilde hafif bulgular gösterir (189). Tip II/III gibi orta-ağır formlarda kalsifiye kıkırdak matriksinden oluşan seyrek trabeküller, artmış subperiosteal

selülerite, tübüler kemiklerde ve kotlarda diyafizyel kırıklar saptanabilir. Zayıf periosteal kemik oluşumu nedeniyle kemik kalınlığı normalden daha incedir (Şekil 40). Trabekül sayısı azalır, lamel paterni bozulur (190). Şekil 41’de polarize ışık altında kemik lamellasyon farklılıkları izlenmektedir.



Şekil 40. Ol’de kemik histolojisi (Ref. Rauch, F., & Glorieux, F. H. (2004). Osteogenesis imperfecta.)



Şekil 41. Polarize ışık altında görülen kemik lamellasyonu farklılıkları; (A) Sağlıklı kontrol. (B) Osteogenez imperfekta tip I; lameller normalden daha incedir ancak laminasyon düzgündür. (C) Osteogenezis imperfekta tip III; lamellasyon hafif düzensizdir. (D) Osteogenez imperfekta tip IV; lamellasyon tip III’e benzer. (E) Osteogenezis imperfekta tip V; ağ benzeri desen. (F) Osteogenez, imperfekta tip VI; balık pulu görünümü. (Ref. Rauch, F., & Glorieux, F. H. (2004). Osteogenesis imperfecta.)

3. MATERYAL – METOD

3.1. Olgu Grubu ve Klinik Değerlendirmeler

Bu çalışma, 2000-2019 yılları arasında, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD ile Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Perinatoloji BD ortak konseyinde ultrason bulguları nedeniyle ayırıcı tanıda OI düşünülen olguların daha önce Tıbbi Genetik AD polikliniğinde hazırlanmış klinik dosyalarının değerlendirilmesi ve saklanmış DNA örnekleri ile yürütüldü.

Olguların klinik dosyaları öykü, üç kuşak aile ağacı, laboratuvar- muayene bulguları fotoğrafları, ek tetkikleri ve grafleri ile klinik olarak ayrıntılı bir şekilde değerlendirildi. Olgu seçim kriterleri; ayırıcı tanıda OI veya mineralizasyon defekti sendromlarının olması, normal karyotip saptanması, ileri incelemeler için olgulara ait prenatal veya postmortem süreçte alınan fetal doku örneklerinden DNA sının izole edilerek bankalanmış olması, ailelerin etkilenmiş fetuslarında gerekli moleküler genetik incelemeye onam vermiş olması idi. Bu kriterleri sağlayan toplam 26 olgu çalışmaya dahil edildi.

Aile içi segregasyon analizi için altı olgunun anne ve babasından ve bir olgunun sadece annesinden periferik kan örneğinden elde edilen DNA örneği kullanıldı.

3.2. Moleküler Yöntemler

3.2.1. DNA Kalitesinin Değerlendirilmesi ve Yoğunluğunun Ölçümü

2000-2019 yılları arasında alınan invaziv yöntemler (CVS, AS, KS, kardiyosentez) veya postmortem fetal deriden izole edilerek elde edilen gDNA manuel/ solüsyon/manyetik boncuk bazlı sistemlere özgün kitler (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche11667327001/Magnapure Large Volume KIT, Roche03730972001 ve EZ1 DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Qiagen 951054) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde izole edildi ve bankalandı. Bankalanmış DNA örnekleri -20°C'den çözüldü ve oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

Çalışmaya alınacak DNA örneklerinin yoğunlukları (ng/μl) ve absorpsiyon ölçümleri (A260/280~1,80 - 1,89) spektrofotometrede ölçülerek kayıt edildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). A260/280 değerleri 1,80'den daha düşük olan DNA örneklerinde protein kontaminasyonu, 1,21'den yüksek olan örneklerde ise RNA kontaminasyonu olabileceği düşünüldüğünden örneklerin temizlenmesi amacıyla manuel çöktürme ile saflaştırma işlemi uygulandı. Saflaştırma işlemi aşamaları; son konsantrasyonu 2mM Ammonium Asetat (NH₄CH₃CO₂)C₂H₃O₂ , 2.5 hacim %100 etanol (C₂H₅OH) ve %2'lik glikojen ile

çöktürüldükten sonra, pellet 2 defa %80'lik ve bir defa %100'lük etanolde yıkandıktan sonra kurutularak, dH₂O veya TE'de (10mM Tris-HCl, pH 8.0 + 1m EDTA, pH 8.0) çözüldü. A_{260/280} değerleri 1.80-1.89'den fazla olan örnekler ise RNase enzimi ile muamele edilerek fazla olan ribonükleik asitler parçalandı. DNA örnekleri, YND ve PZR işlemleri gerçekleştirilinceye kadar +4° C'de saklandı.

3.2.2. Yeni Nesil Dizileme Tabanlı Panel-Gen Testi

Yeni nesil dizileme tabanlı panel gen çalışması Ion Torrent S5 platformunda yapıldı.

3.2.2.1. Hedef Genlerin Belirlenmesi

Güncel literatür, OMIM ve HGMD profesyonel veritabanları kullanılarak, OI kliniği ile ilişkili 26 gen belirlendi (Tablo 4).

Tablo 4: OI panel genleri, kromozomal yerleşimleri ve ilişkili fenotipler

Gen adı		Kromozomal yerleşimi	Transkript numarası	İlişkili hastalıklar
BMP1	Bone morphogenetic protein 1	8p21.3	NM_006129.4	OI, otozomal resesif OI
COL1A1	Collagen type I alpha 1 chain	17q21.33	NM_000088.3	EDS, Gnatodiafizeal displazi, OI Tip I, II, IIA, III, III/IV, dentinogenesis imperfekta
COL1A2	Collagen type I alpha 2 chain	7q22.1	NM_000089.3	EDS, OI tip I, II, IIA, III, IV, juvenil osteoporoz
CREB3L1	cAMP responsive element binding protein 3 like 1	11p11.2	NM_052854.3	Otozomal resesif OI
CRTAP	Cartilage associated protein	3p22.3	NM_006371.4	OI tip III, IV, VII, otozomal resesif OI, non-letal resesif OI
DLX3	distal-less homeobox 3	17q21	NM_005220.2	Trikodentoosseus sendrom, OI & zihinsel yetersizlik
FAM46A (TENT5A)	Terminal nucleotidyltransferase 5A	6q14	NM_017633.2	
FKBP10	FKBP prolyl isomerase 10	17q21.2	NM_021939.3	Bruck sendromu, OI tip IV, otozomal resesif OI

IFITM5	Interferoninduced transmembrane protein 5	11p15.5	NM_001025295.2	OI tip V, prenatal başlangıçlı boy kısalığının eşlik ettiği OI
LRP5	LDL receptor related protein 5	11q13.4	NM_002335.3	Osteoporoz-psödoglioma sendromu
MBTPS2	Membrane bound transcription factor peptidase, site 2	Xp22.13	NM_015884.3	OI
NBAS	Neuroblastoma amplified sequence	2p24	NM_015909.3	OI
NTRK1	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1	1q21-q22	NM_001012331.1	Otozomal resesif OI
P3H1	Prolyl 3-hydroxylase 1	1p34.1	NM_022356.3	OI tip II, III, IV, otozomal resesif OI, non-letal OI
P4HB	Prolyl 4-hydroxylase subunit beta	17q25	NM_000918.3	
PLOD2	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	3q23-q24	NM_182943.2	Bruck sendromu, OI, OI tip III
PPIB	Peptidylprolyl isomerase B	15q21-q22	NM_000942.4	OI tip, II, III, IV, VI, otozomal resesif OI
SCN9A	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 9	2q24	NM_002977.3	OI, otozomal resesif OI
SEC24D	SEC24 homolog D, COPII coat complex component	4q26	NM_014822.3	OI
SERPINF1	Serpin family F member 1	17p13.1	NM_002615.6	OI tip III IV, otozomal resesif OI
SERPINH1	Serpin family H member 1	11q13.5	NM_001235.3	OI, hidransefali ile birlikte seyreden OI
SLC2A2	Solute carrier family 2 member 2	3q26.1-q26.2	NM_000340.1	Otozomal resesif OI
SP7	Sp7 transcription factor	12q13.13	NM_001173467.2	Otozomal resesif OI
SPARC	Secreted protein acidic and cysteine rich	5q31.3-q32	NM_003118.3	OI tip IV
TMEM38B	Transmembrane protein 38B	9q31.2	NM_018112.2	Otozomal resesif OI
WNT1	Wnt family member 1	12q13	NM_005430.3	OI tip IV, otozomal dominant OI, otozomal resesif OI

OI: Osteogenesis imperfecta

EDS: Ehlers-Danlos sendromu

Bu genlerin referans transkriptlerinin kodlayan tüm ekzonik bölgeleri, 10 bazlık intronik (ekzon-intron sınırları) ve varsa mutasyon tanımlanmış diğer kodlamayan ekzonik ve intronik (5'UTR ve 3'UTR, regülatör, derin intronik) bölgeleri hedef olarak belirlendi.

3.2.2.2. Qubit Florometre İle DNA Yoğunluklarının Ölçümü

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin yoğunlukları ng/μl birimi cinsinden ölçüldü. DNA örnekleri ölçülmeden önce, kitin içeriğinde bulunan iki farklı standart örnek kullanılarak *Qubit dsDNA HS Assay Kit* ile kalibrasyon ölçümü yapıldı. Standart örnek başına 199 μl *Qubit® dsDNA HS Buffer* ve 1 μl *Qubit® dsDNA HS Reagent* kullanılarak çalışma solusyonu hazırlandı. On mikrolitre standart örnek 190 μl çalışma solusyonu ile karıştırılarak 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra *Qubit Florometre*'de ölçüm yapıldı. Kalibrasyon ölçümü sonrasında, her bir örnek için aynı şekilde hazırlanmış çalışma solusyonu kullanılarak bir karışım (198 μl çalışma solusyonu + 2 μl seyreltilmiş DNA örneği) hazırlandı. İki dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra ölçüm yapıldı. Örnek DNA yoğunlukları istenen konsantrasyon aralığına (7,5-8,5 ng/μl arası) gelinceye kadar seyreltme ya da deriştirme işlemleri uygulandı ve her defasında ölçümler tekrarlandı.

3.2.2.3. Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması

Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması için primer havuzunun her biri için Tablo 5'de gösterilen miktarlarda solüsyon hazırlanır.

Tablo 5: 2X primer havuzu için hazırlanan miks.

Malzeme	Miktar
5X Ion Ampliseq HiFi Mix	1 μl
2X Ion Ampliseq Primer Havuzu	2,5 μl

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için kullanılan solüsyon Tablo 6'da gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 6: Kullanılan PZR solüsyonları.

2X primer havuzu için hazırlanan karışım	3,5 µl
Seyreltilmiş DNA örneği	1,5 µl
Toplam hacim	5 µl

5X primer havuzu için hazırlanan karışım

Malzeme	Miktar
5X Ion Ampliseq HiFi Mix	1 µl
2X Ion Ampliseq Primer Havuzu	1 µl

5X primer havuzu için hazırlanan karışım	2 µl
Seyreltilmiş DNA örneği	3 µl
Toplam hacim	5 µl

Hazırlanan PZR reaktifleri, Tablo 7’de gösterilen program kullanılarak ve Tablo 8’de gösterilen primer çifti sayısı dikkate alınarak termal döngü cihazında hedef bölgelerin çoğaltılması için kullanıldı.

Tablo 7: Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan termal döngü programı

Evre	Basamak	Sıcaklık	Süre
Bekleme	Enzim aktivasyonu	99 °C	2 dk
Döngü (Havuzdaki primer çiftine göre ayarlanır)	Denatürasyon	99 °C	15 sn
	Bağlanma ve uzama	60 °C	4 dk*
Bekleme	-	10 °C	∞

*Primer havuzu başına ≤1536 primer çifti için 4 dk, 1537-6144 primer çifti için 8 dk, 6145-24576 primer çifti için ise 16 dk ayarlanır.

Tablo 8: Havuzdaki primer çiftine göre döngü ayarlama

Havuz başına primer çifti	Önerilen amplifikasyon döngü sayısı (10 ng DNA/RNA, 3000 kopya)	
	Yüksek kaliteli DNA/RNA	Düşük kaliteli nükleik asit (FFPE DNA/RNA veya cfDNA/RNA)
Sadece gen füzyon panellerinin tespit edilmesi için	27	30
12-24	21	24
25-48	20	23
49-96	19	22
97-192	18	21
193-384	17	20
385-768	16	19
769-1536	15	18
1537-3072	14	17
3073-6144	13	16
6145-12288	12	15
12289-24576	11	14

Durma noktası: PZR sonrası elde edilen ürünler gece boyu termal döngü cihazında 10°C’de bekletilirken, uzun süreli saklama gerektiğinde -20°C kullanıldı.

3.2.2.4. Primer Dizilerinin Kısmi Olarak Kesilmesi

Bu aşamadan önce, her bir DNA örneğinin farklı primer havuzları ile çoğaltılmış olan PZR ürünleri, her birinden 2,5 µl alınarak tek bir tüp içine birleştirildi. Birleştirilmiş ürünlere 0,5 µl *FuPa Reagent* eklenerek (primer havuzu sayısına göre *FuPa Reagent* miktarı değişebilir), Tablo 9’da gösterilen programda termal döngü cihazına konuldu.

Tablo 9: Primer dizilerinin kesimi için kullanılan termal döngü programı

Sıcaklık	Süre
50 °C	10 dk*
55 °C	10 dk*
60 °C	20 dk
10 °C	Bekleme (1 saate kadar)

*1536 primer çiftinden fazla primer içeren havuzlar için 20 dk yapılır.

Durma noktası: Örnekler -20°C’de uzun süre bekletilebilir.

3.2.2.5. Barkod ve Adaptörlerin Bağlanması

Her bir barkod (*Ion Express™ Barcode*), *Ion P1 Adapter* ve nükleazdan arındırılmış su ile karıştırılarak Tablo 10’da gösterildiği gibi 1:4 oranında seyreltilir.

Tablo 10: Örnek barkod adaptör karışımı

İçerik	Hacim
Ion P1 Adapter	2 µl
Ion Xpress™Barcode X ¹	2 µl
Nükleazdan arındırılmış su	4 µl
Toplam hacim	8 µl

1: Seçilmiş barkod

Primer dizilerinin kısmi kesiminden sonra elde edilen ürüne, örnek başına, Tablo 11’de gösterilen miktarlarda *switch solusyonu*, *barkod adaptör karışımı* ve *DNA ligaz* eklenerek, termal döngü cihazında Tablo 12’de gösterilen program kullanılarak barkod – adaptörlerin ligasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 11: Barkod-adaptör ligasyon solusyonu

Malzeme	Hacim
Switch solusyonu	1 µl
Barkod-Adaptör Karışımı	0,5 µl
DNA ligaz	0,5 µl
Toplam Hacim	7,5 µl

Tablo 12: Ligasyon için kullanılan termal döngü programı

Sıcaklık	Süre
22 °C	30 dk
68 °C	5 dk
72 °C	5 dk
10 °C	Bekleme (24 saate kadar)

Durma noktası: PZR sonrası elde edilen ürünler geceboyu termal döngü cihazında 10°C’de bekletilirken, uzun süreli saklama gerektiğinde -20°C kullanıldı.

Barkod – adaptörlerin ligasyonu sonrasında çoğaltılmamış kütüphane ürünlerinin saflaştırılması aşamasına geçildi.

3.2.2.6. Çoğaltılmamış Kütüphane Ürünlerinin Saflaştırılması

Bu aşamada *Agencourt® AMPure® XP Reagent* ve taze hazırlanmış % 75'lik etanol kullanıldı.

Her bir örneğe 11,25 µl (toplam örnek hacminin 1.5 katı) *Agencourt® AMPure® XP Reagent* eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Ardından örnekleri içeren plate manyetik rafa (DynaMag™_96 Side Magnet (Cat.no.12331D) alındı ve solüsyon berraklaşmaya kadar (~2 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon sonrası pellete zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı. Ardından her bir örneğe 37,5 µl taze hazırlanmış % 75'lik etanol eklendi. Plate, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış amplikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması sağlandı ve supernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem ikinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdaki uzaklaştığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Ardından kütüphane ürünlerinin normalizasyonu için kantitasyon aşamasına geçildi. Kütüphane ürünlerinin kantitasyonu;

- *Equalizer kit*,
 - kantitatif PZR,
 - *Qubit* florometre
- ile yapılır.

3.2.2.7. *Qubit* florometre ile kütüphane ürünlerinin kantitasyonu

Kütüphane ürünlerinin bulunduğu plate manyetik raf üzerinden alındıktan sonra, ürün başına Tablo 13'de gösterildiği şekilde hazırlanan *Qubit* karışımından 13 µL *bead* pelletlerin üzerine dağıtıldı ve iyice pipetleyerek karıştırıldı.

Tablo 13: Ürün başına hazırlanan *Qubit* miksi

Malzeme	Hacim
Platinum™ PZR SuperMix HiFi	12,5 µL
Library Amplification Primer Mix	0,5 µL
Toplam	13 µL

Tekrar manyetik rafa alınan plate, 2 dakika beklettikten sonra ~ 12,5 µL süpernatant, pellete dokunmadan alınıp temiz kuyucuklara aktarıldı. Plate, *seal* ile kapatılarak termal döngü cihazında ayarlanan, Tablo 14'deki programa alındı.

Tablo 14: Qubit PZR termal döngü programı

Evre	Sıcaklık	Süre
Bekleme	98°C	2 dk
Döngü (x5)	98°C	15 sn
	64°C	1 dk
Bekleme	10°C	∞

Durma noktası: PZR sonrası elde edilmiş ürünler -20°C'de saklanabilir.

3.2.2.8. Amplifiye kütüphane ürünlerinin saflaştırılması

İlk tur saflaştırma

Her bir örneğe 6,25 µl (toplam örnek hacminin 0.5 katı) *Agencourt® AMPure® XP Reagent* eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Ardından örnekleri içeren plate manyetik rafa alınıp, solüsyon berraklaşmaya kadar (~5 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pellete zarar vermeden supernatant temiz kuyucuklara aktarıldı.

İkinci tur saflaştırma

Her bir örneğe (ilk tur saflaştırmadan elde edilmiş süpernatant) 15 µl (toplam örnek hacminin 1.2 katı) *Agencourt® AMPure® XP Reagent* eklenerek pipet yardımıyla karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bekletildi. Ardından örnekleri içeren plate manyetik rafa alınıp, solüsyon berraklaşmaya kadar (~3 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası pellete zarar vermeden supernatant uzaklaştırıldı. Ardından her bir örneğe 37,5 µl taze hazırlanmış % 75'lik etanol eklendi. Plate, manyetik raf üzerinde her iki yana hareket ettirilerek, barkodlanmış ampikonların bağlı olduğu manyetik boncukların etanol ile yıkanması ve supernatantın uzaklaştırılması sağlandı. İkinci kez tekrarlandıktan sonra alkolün tamamen ortamdan uzaklaştığından emin olmak için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon

yapıldı. Plate manyetik raf üzerinden alınıp her pellet üzerine 12,5 µL *Low TE* eklenerek bead pelletler pipetlenerek karıştırıldı.

3.2.2.9. Kütüphane kantitasyonu ve seyreltme faktörünün hesaplanması

Standart ve kütüphane ürünü başına 199 µl *Qubit® dsDNA HS Buffer* ve 1 µl *Qubit® dsDNA HS Reagent* kullanılarak çalışma solusyonu hazırlandı. Beş mikrolitre standart veya örnek 95 µl çalışma solusyonu ile karıştırılarak 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra *Qubit Fluorometre*'de ölçüm (ng/mL) yapıldı.

Ölçülen değerler panelin ortalama ampikon büyüklüğüne göre Tablo 15'de gösterilen değerlere bölünerek 100 pM'a eşitlendi.

Tablo 15: Ortalama ampikon büyüklüğüne göre seyreltme faktörünün hesaplanması

Ortalama ampikon büyüklüğü	Bir ng/mL'deki konsantrasyon (~100pM)
140 bç	9
175 bç	11
225 bç	15
275 bç	18
375 bç	24

Örnek;

125-175 bç (adaptörlerle birlikte 225 bç) şeklinde tasarlanan bir panel için seyreltme işlemi aşağıdaki şekilde hesaplanır.

- Kütüphane ürünü 450 ng/mL olarak ölçüldüyse,
- Seyreltme faktörü : $450 \text{ ng/mL} / 15 \text{ ng/mL} = 30$
- Bu 10 µL kütüphane ürünün 290 µL *Low TE* (nukleazdan arındırılmış su veya miliQ su) ile seyreltildiğinde yaklaşık 100 pM'a eşitleneceği anlamına gelir.

3.2.2.10. Veri Analizi

Dizileme sonrasında Torrent Server yazılımına (Coverage Analysis v5.6.0.1 (1021)), Torrent Variant Caller v5.6.0.4 (1022) yama programları ekli) aktarılan verilere ait BAM dosyaları, önce çalışmaların kalite incelemeleri, kapsanmayan ya da yeterli tekrar okuma saptanamamış bölgeler araştırıldı ve analiz için Ion Reporter Uploader programı kullanılarak

bulut tabanlı Ion Reporter (v.5.6) varyant analizi, annotasyonu ve raporlama programına aktarıldı.

Hedef bölgelere ait BED dosyası eklenerek ve gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, *Ion Reporter*'da analiz akış şeması oluşturuldu. Her bir hasta, bu akış şeması ile analiz edildi. Elde edilen varyantlar minör allel frekansı (MAF) %1'in altında olacak şekilde, 1000 Genom Projesi veri tabanından, UCSC ve RefSeq veritabanlarından ve çalışma grubumuzda gözlenen sık varyantlar yönünden filtrelendi. Filtrelemelerden sonra amino asit değişikliğine neden olmayan nükleotit değişiklikleri ve ekzon sınırına 10 bp'den uzak olan intronik varyantlar ilk aşamada değerlendirme dışı bırakıldı. Elde edilen tüm homozigot, birleşik heterozigot, heterozigot ve hemizigot varyantlar IGV kullanılarak görüntülendi. Varyant isimlendirmeleri, dbSNP ve HGMD veri tabanlarıyla karşılaştırılarak yapıldı. Varyantlar kodlanan protein üzerindeki etkisi, türler arasındaki korunmuşluk düzeyine göre değerlendirildi. Varyantlar, mutasyon çeşitlerine göre öncelikle stop kodon, çerçeve kayması, kırılma hatası ve missense varyantlar olarak sınıflandırılarak önceliklendirildi. Aday genler Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), ClinVar, Genecards ve UCSC Genome portalları kullanılarak incelendi (194-197). Varyantların toplum sıklığı ExAC (60.706 akrabalık ilişkisi ve çocukluk çağı hastalıkları olmayan, hastalıklara ve topluluklara özgün ekzom verileri) ve GME Variome (Orta Doğudan toplanan 2497 bireye ait tüm ekzom dizi verileri) veritabanlarından kontrol edildi.

Varyantlar, çeşitli tahmin programlarına göre zarar verici lehine olarak değerlendirilenler, sıklıkları, bilinen gelişim yolları ile olan etkileşimleri, içinde bulundukları genin ekspresyonu ve fonksiyonu, diğer kohortlardaki varlığı, sıklığı ve son olarak ailede hastalıkla birlikte segregasyon olma durumları gibi seçim kriterleri uygulanarak yorumlandı. İlk filtrelemede ilişkili genlerdeki varyantlar değerlendirmeye alındı ve aile ağacı değerlendirmesine göre kalıtım modeli esas alınarak segregasyonu incelendi. İkinci filtrelemede ise en az iki *in silico* analizde patojenik özellik gösteren, MAF değeri %1'den az olan ve kalıtım modeli ile uyumlu olan tüm diğer genlerdeki değişimler değerlendirildi.

Daha önce tanımlanmamış değişimlerin *in silico* olarak patolojik olup olmadığı çeşitli veritabanları (*SIFT*, *PolyPhen2*, *MutationTaster*) kullanılarak değerlendirildi. Fenotip ve kalıtım modeli ile uyumlu bulunan tanımlanmamış değişimlerin ko-segregasyon çalışmaları yapıldı.

Çalışma sonrasında fenotipik ilişkili hiçbir varyant saptanmayan olguların “noCall” varyantları görsel olarak incelendi, tek yön okuma, düşük tekrarlı okuma ya da yön uyumsuz okuma gibi nedenlerle “noCall” olarak sınıflanan lokasyonlar IGV ile görsel olarak incelendi, okuma olmaması nedeni ile “noCall” olarak sınıflanan lokasyonlar kapsanmayan bölge çalışmaları kapsamında Sanger dizileme ile tarandı.

3.2.3. YND ile Saptanan Değişimlerin ve Panel-Gen Testi ile Kapsanmayan veya Düşük Okuma Alınan Bölgelerin Sanger Dizileme Çalışmaları

Çalışmada olgularda saptanan değişimlerin doğrulanması ve aile segregasyon çalışmaları ilgili varyantların saptandığı genin ekzonlarına özgün primerler tasarlanarak Sanger dizileme yöntemi ile tarandı.

Ayrıca, YND temelli Panel-Gen Testinde kapsanmayan ve düşük okuma alınan bölgeler belirlenerek, veritabanlarında daha önceden tanımlanmış mutasyon içerenler incelendi. YND kapsamında mutasyon saptanmayan tüm olgularda bu bölgeler tarandı.

3.2.3.1. Sanger Dizileme İçin Primerlerin Tasarlanması

Primerlerin tasarlamasında dikkat edilen hususlar; seçilen primerlerin, dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış herhangi bir SNP veya tekrarlayan dizi içermemesi, ileri, geri primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olmasına (en fazla +/- 2-5°C fark), içerdiği A-T ve C-G nükleotid içeriğinin eşite yakın dağılım göstermesine, uzunluğunun 17-24 nükleotid arasında olmasına ve ilgili bölgede YND ile saptanan mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak bir kapsama sahip olmasına (dizi analizinde ~30-50 bazın iyi okunamayabileceği gözetilerek) özen gösterildi. Özgünlük, UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/index.html>)’den “*in silico* PZR” interaktif sistemi, NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ve Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) ile test edildi.

3.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu; 1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific), 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler, 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific) ve gerektiği durumda % 0-10 DMSO (Biomatik Corporation) kullanılarak hazırlanan ve bidistile su (dH₂O) ile 50 µl’ye tamamlanan karışımda, 200 ng gDNA ile gerçekleştirildi. Tüm çalışmalar buz ya da soğuk tüp

mahfazası üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge DNA içermeyen kontrol PZR (negatif kontrol)'ı ile birlikte çalışıldı.

PZR işlemi; 10 dk süresince 95°C'de gerçekleşen tek aşamalı genomik DNA denatürasyonu, ardından 35-40 defa tekrar eden ve 95°C de 30 sn süren PZR ürün denatürasyonu, 30 sn süren ve primerlerin T_m (Temperature of Melting) değerlerine göre hesaplanan sıcaklıkta (55°C - 65°C aralığında) gerçekleşen primer bağlanma ve 70°C de 45-90 sn (1 kb / 1 dk) süren uzama basamaklarından oluşan üç basamaklı amplifikasyon aşaması ve son olarak 70°C de 10 dk'lık son uzama aşamasından oluşan PZR döğüsünü üreten termal döngü cihazlarında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PZR örneklerinden 5 µl alınarak, 50 bç'lık merdiven markörü (Sigma) paralelinde 8 µg/ml etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 120 V da, 20 dk yürütülerek ürünlerin boyutlarına göre ayrışması sağlandı. Ultraviyole ışık altında elde edilen bant görüntüleri kaydedildi ve boyutlarının doğrulanması yönünde değerlendirildi.

3.2.3.3. Enzimatik Yöntem ile PZR Ürün Saflaştırılması

Saflaştırma işlemi için Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında PZR protokolü ile 37 °C de 30 dakikalık inkübasyon ile gerçekleştirilen saflaştırma işlemi, kullanılan enzimlerin 85°C de 15 dakikalık inkübasyon ile inhibisyonu ardından sonlandırıldı ve 4°C ye getirildi. Saflaştırılan ürünler cihazdan alınarak bir sonraki işlem için -20°C'de karanlıkta saklandı.

3.2.3.4. DNA Dizi Analizi

PZR ürününün saflaştırılması ile elde edilen ampikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapilerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi. Dizi analizi reaksiyonu, saflaştırılan PZR ürünleri ile termal döngü cihazında yapıldı.

3.2.3.5. Dizi PZR Reaksiyonu

5X tampon solüsyonu olan BigDye buffer (PZR için gerekli kimyasalları içerir), BigDye v3.1 (ddNTP leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), Primer (PZR da kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti ayrı yönlü olarak (*dizi okuma kalitesi için seçilir*) saflaştırılmış PZR ürünü ve dH₂O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plate (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazına alınarak, protokol toplam 25 döngüde; 96°C de 10 sn ile denatürasyon, 50°C

de 5 sn ile bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

3.2.3.6. Dizi PZR Reaksiyonu Ürünlerinin Saflaştırılması

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden arındırılması için plate içerisinde ürün başına 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat, 1 µl %2'lik glikojen ve 25 µl %100 soğuk etanol eklendi. Plate alüminyum koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika beklendi. 3810 rpm'de 45 dak. santrifüj edildi. Plate üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plate ters çevrilerek 1100 rpm'de 30 sn.'ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 35 µl %70'lik soğuk etanol eklendi. Plate koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Plate üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plate ters çevrilerek 1170 rpm'de 60 sn.'ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized Formamid) eklendi. Örnekler 95 °C de 5 dak. denatüre edildi ve 2 dak. buz üzerinde bekletildi.

3.2.3.7. Elektroforez Cihazına Yükleme

Plate ABI3500 cihazına yerleştirilip yürütme işlemi seçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Dyeset seçildi.

Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı:1,6 kVolts, yürütme süresi:2.520 sn, ön yürütme süresi:180 sn, injeksiyon zamanı:8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn. 'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

3.2.3.8. Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller Elektroforez sonucunda alınan fasta dosyası ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v.3.0 (34) programlarında bilgisayar ortamında analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanımlan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işlemten sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği olup olmadığı kontrol edilerek değerlendirildi. Belirtilen kontrollerden sonra herhangi birinde farklılık var ise çalışma PZR aşaması veya yeterli örnek mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. SeqScape v.3.0 programında analiz aşamasında, elde edilen

olgu dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak tanımlanmış değişimler NCBI Entrez SNP, ENSEMBL GeneSNPView ve HGMD gibi veritabanları kullanılarak programda işaretlendi. Elde edilen sonuçlar YND ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

3.2.4. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Analizi

Çalışmamızda MLPA testi, **P271** (*Osteogenesis Imperfecta* Lot B2-0516) kiti uygulandı. MLPA kitlerinin kapsadığı **COL1A1** (NM_000088.3), geninin ilgili bölgelerinde (Ekzon 1-51) delesyon/duplikasyon analizi yapıldı.

3.2.4.1. MLPA Çalışması

Tek bir PZR protokolü ile içerisinde uygun sıcaklıkta bekletme ve ekleme gibi işlemleri ile denatürasyon, hibridizasyon, ligasyon ve amplifikasyon aşamaları DNA Engine (BIORAD)-T100 termal döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından *size* standart (Lize 500 (GS500-250)) eşliğinde kapiller elektroforez cihazında fragmanlar yürütüldü.

3.2.4.2. DNA Denatürasyonu ve Prob Karışımı ile Hibridizasyon Aşaması

Denatürasyon öncesinde stok DNA yoğunluğu 25 ng/μl-30 ng/μl olacak şekilde ~25μl miktarda TE tamponu içerisinde çözündürülerek seyreltildi. Prob kitinden SALSA, Prob miks ve SALSA MLPA tamponu çıkarılarak oda ısısında çözülmesi sağlandı. Tampon vorteks ile karıştırıldı ve kısa santrifüjleme ile çöktürüldü. Prob miks pipet yardımıyla iyice karıştırıldı (uzun prob lar çökebileceğinden bu karışım santrifuj edilmez). DNA çözeltisinden her örnek için 5μl DNA etiketlenmiş 200 μl' lik PZR tüplerine alındı ve termal döngü cihazında 98°C'de 5 dak. denatüre edildi. Her bir örnek için 1,5 μl MLPA tampon ve 1,5 μl prob olmak üzere karışım hazırlandı ve 25°C'de beklemeye alınan tüplere cihaz üzerinde 3 μl olmak üzere dağıtılarak pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı. 95°C de 1 dakika kısa prob denatürasyonundan sonra 37 °C de 16 saat (gece boyu) hibridizasyon işleminin gerçekleşmesi için bekletildi. Hibridizasyon sonrası bekletme yapılmadan ligasyon işlemine geçildi.

3.2.4.3. Ligasyon Aşaması

Ligasyon aşamasında hazırlık olarak Ligasyon tamponu A ve Ligasyon tamponu B dondurucudan çıkarılarak oda ısısında çözülmesi beklendi. Her bir örnek için 25 μl dH₂O, 3 μl tampon A, 3 μl tampon B ve 1 μl Ligaz 65 enzimi eklenerek karışım hazırlandı. Termal döngü cihazı 54°C'de bekleme basamağına getirilerek sıcaklık 54°C'de iken her bir tüpe

hazırlanan 32 µl ligasyon karışımı eklendi ve 54°C’de 15 dakika basamağına geçildi. Elde edilen ligasyon ürünü 4°C’de saklandı.

3.2.4.4. PZR Aşaması

Ön hazırlık olarak dondurucuda bekleyen SALSA PZR tamponu, SALSA PZR primeri (FAM boyalı) çıkarılarak çözülmesi beklendi. Karışım için örnek başına ayrı bir tüpe 7,5 µl dH₂O, 2 µl SALSA PZR primeri ve 0,5 µl SALSA polimeraz enzimi eklendi ve iyice pipetle karıştırılarak homojen şekilde olması sağlandı. Ligasyon ürünlerinin üzerine 10’ar µl eklendi. PZR karışımı hazırlanırken, primerler floresan işaretli olduğundan ışıktan korunmasına dikkat edildi. Her bir örnek için eklenen karışımın pipetaj ile karışması sağlandı. 20°C’de bekleme aşamasındaki termal döngü cihazında sonraki basamağa geçiş yapıldı; 35 döngüde; 95°C de 30 saniye, 60°C de 30 saniye, 72°C de 60 saniye, 72°C de 20 dakika ve 4°C de bekleme aşamaları. 4°C’ye gelen örnekler için kapiller elektroforezine yükleme ve fragmanların yürütülmesi aşamasına geçildi. PZR ürünleri saklanacaksa ürünlerin ya ışık almayan kutuda saklanmasına ya da alüminyum folyo ile sarılmasına dikkat edildi.

3.2.4.5. Kapiller Elektroforez Cihazı ile Fragmanların Yürütülerek Ayırıştırılma Aşaması

Boş bir miks tüpüne yürütülecek örnek başına 0.2 µl LIZ size standard (Liz-500, Lot: 0904226, Applied Biosystems) ve 9.5 µl formamid (Highly Deionized - HiDi) konularak karıştırıldı ve kapiller elektroforezine yüklenmek için oluşturulan numaralandırılmış ABI3500 cihazı için uygun olan plate (USA Scientific-800-522- 8477) herbir kuyuya bir örnek başına 9,7 µl dağıtıldı. Üzerine 0,3 µl PZR reaksiyon ürünü plate kuyularına olgu numaralarına göre dağıtıldı. Plate kuyucuklarının üzeri uygun septayla (AB Applied Biosystems-182901S9R) kapatılarak, plate santrifüjünde (BIOSAN LMC300) 4000 rpm de 2 dakika çevrilerek dibe çökmesi sağlandı. Santrifüj bitince, plate ABI3500 cihazına yerleştirildi ve kapiller elektroforez cihazında yürütme ayarları düzenlenerek fragman platformunda yürütme işlemine geçildi. Yürütme voltajı; 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı; 15 kVolts, injeksiyon voltajı; 1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi: 180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi süresi (data delay): 250 sn. Kapiller sıcaklığı 60 °C, fsa formatındaki ham veri Coffalyser.net (v.1400701.0000) programı kullanılarak değerlendirildi.

3.2.4.6. Veri Analizi

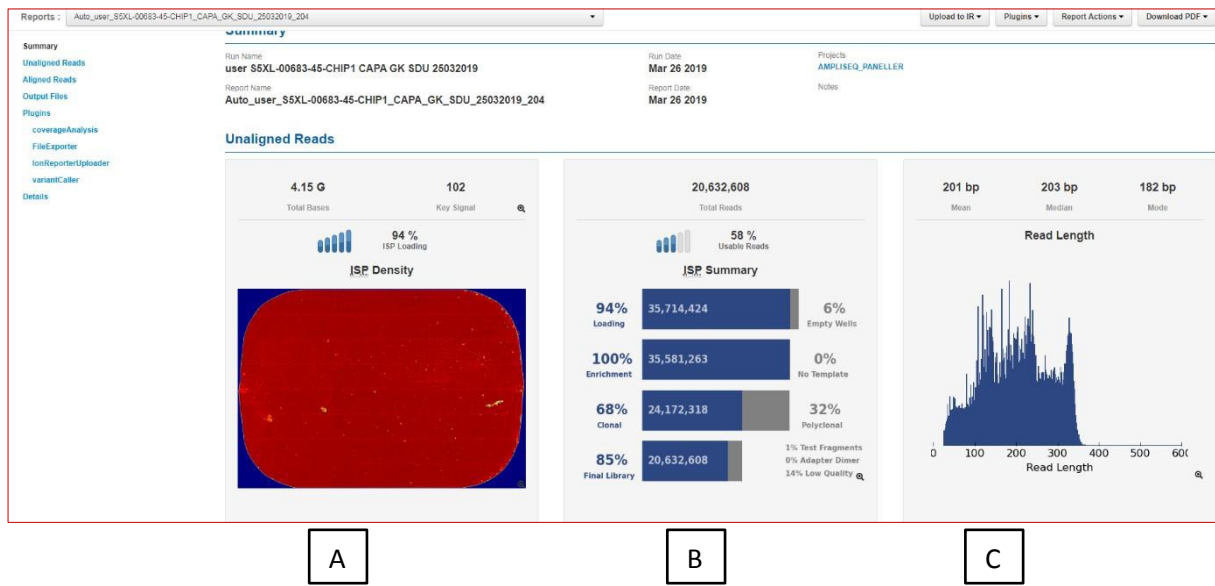
Kapiller elektroforez cihazından fsa formatında elde edilen fragmanlar Coffalyser.Net (MRC-Holland) programına tanıtılarak aktarıldı. Coffalyser.net programının gerekli analiz ayarları (prob türü, örnek türü, kitin lot numarası ve analiz türü, Şekil 3-3) yapılarak örnekler yüklendi. Referans örnekler seçilerek, önce fragman analizi ardından karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapıldı. Analiz işleminden sonra pik değerleri ve bar grafikleri değerlendirilerek var olan kopya sayısı değişiklikleri tanımlandı. Şüpheli sonuç gösteren olgular tekrar MLPA işlemine alındı ve süreç tekrarlandı. Tek ekzonla sınırlı delesyon ve duplikasyonlarda prob ligasyon bölgesindeki varyasyonların dışlanması amacıyla Sanger yöntemiyle dizileme yapıldı.

3.2.5. Ion Torrent Platformunda CNV Analizi

Ion Torrent PGM’de, osteogenezis imperfekta ile ilişkili 26 genin kodlayan ekzon bölgeleri ile ekzonların 10 bç intron sınır bölgelerini içeren 86,94 kb’lik alanda toplam 315 amplikon ile % 98,29 kapsam (coverage)’da yapılan dizileme sonucunda elde edilen veri kullanılarak CNV analizine özgün iş akışı oluşturuldu. Panel-gen testinde nokta mutasyonu saptanan 15 olgunun verileri kullanılarak *Ion Reporter* programında CNV analizi için referans olarak kullanılmak üzere *baseline* oluşturuldu. Ion reporter v5.2 programında yapılan CNV analizinde güvenlik (confidence) skorları (10) ve MAPD değeri (0.3) temel alınarak uygulanan filtreleme işleminden sonra fenotiple ilişkili olan varyantlar önceliklendirdi. Kontrol olarak, Sanger dizileme yöntemi ile klinik tabloyu açıklayabilen mutasyon saptanan, bu nedenle delesyon/duplikasyon taşımaması beklenen hastalar kullanıldı.

4. BULGULAR

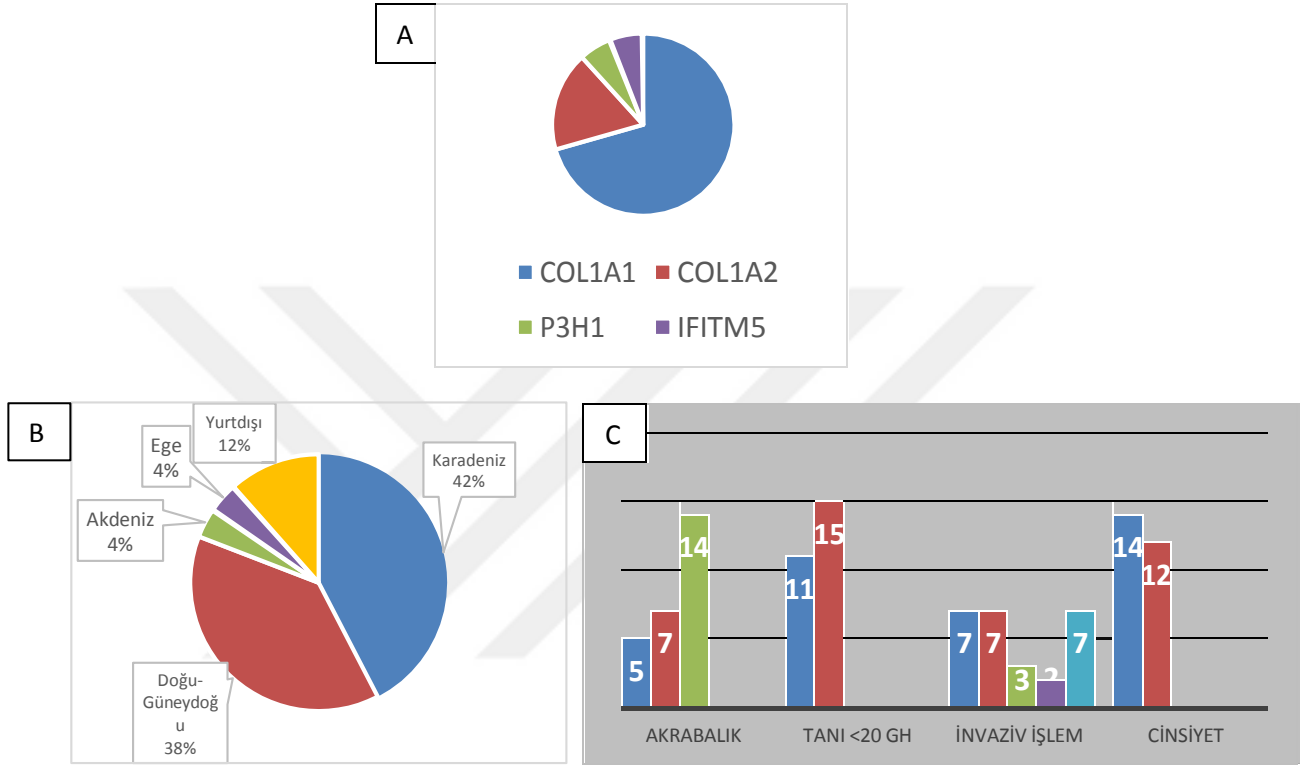
Bu çalışmada, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD polikliniğinde, Ocak 2000-Haziran 2019 tarihleri arasında pre/perinatal dönemde değerlendirilen ve ayırıcı tanıda OI düşünülen 26 fetal olgunun klinik dosyaları değerlendirildi. OI ve azalmış mineralizasyonla giden benzer fenotiplerle ilişkili literatür taramasında saptanan 26 gene özgün panel test hazırlandı, 26 genin kodlayan ekzon ve UTR bölgeleri ile ekzonların 10 bç intron sınır bölgelerini içeren 139,54 kb'lık alan toplam 511 ampikon ile %97,41 kapsam (coverage)'da dizilendi. (Şekil 42)



Şekil 42 A) **Kırmızı:** Çip üzerinde yüklemenin yüksek olduğu yerler, **Sarı:** Çip üzerinde yüklemenin az olduğu yerler, **Mavi:** Yüklemenin olmadığı yerler (Çip dışındaki alanlar) B) Çipin yüklenme ve okunma oranları C) Okunan fragman sayısının fragman uzunluğuna göre dağılımı

Dizileme sonrasında Torrent Server yazılımına (Coverage Analysis v5.6.0.1 (1021)), Torrent Variant Caller v5.6.0.4 (1022) yama programları ekli) aktarılan verilere ait BAM dosyaları, önce çalışmaların kalite incelemeleri açısından araştırıldı ve analiz için Ion Reporter Upload program kullanılarak bulut tabanlı Ion Reporter (v.5.6) varyant analizi, annotasyonu ve raporlama programına aktarıldı. YND sonuçlarının analizinde saptanan varyantlar değerlendirildi ve olası fenotip ilişkisi araştırıldı. Panel-gen testinden elde edilen ve tahmin programlarına göre klinik önemi olduğu öngörülen ya da daha önce literatürde ve veri tabanlarında bildirilmemiş olan değişimler özgün primerler tasarlanarak Sanger dizi yöntemi ile doğrulandı, uygun ailelerde segregasyon analizi ile sonuçlar irdelendi, herhangi bir patojenik varyant ilişkisi saptanmayan olgularda panelin tasarım gereği kapsam dışı bıraktığı ancak HGMD veri tabanında patojenik varyant saptandığı bildirilen bölgeler, özgün primerler tasarlanarak Sanger dizi ile incelendi.

26 olgunun 17'sinde dört ayrı gende (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*) 6'sı daha önce tanımlanmamış ancak *in silico* analizleri patojenik tahmini veren toplamda 17 varyant saptandı. Varyantların % 46,1'i *COL1A1* (12/26), %11,5'i *COL1A2* (3/26), %3,8' i *P3H1* (1/26), %3,8'i *IFITM5* (1/26) geninde gösterildi (Şekil 43A). Olgulara ait antenatal tanı haftaları, invaziv işlem sayıları ve demografik veriler şekil 43 B ve C'de belirtilmiştir.



Şekil 43. A) Patojenik varyant saptanan genler B-C) Olgulara ait demografik veriler ve antenatal tanı haftası

Olgulara ait kalıtım modeli ve panel-gen testinden elde edilen ilişkili ve/veya olası ilişkili varyantlar ve tipleri Tablo 16'da ayrıntılı postmortem muayene bulguları ise Tablo 17'de tanımlanmıştır.

Tablo 16. Saptanan OI ilişkili patojenik variant tipleri

Kalıtım modeli	Zigosite	Gen	Ekzon	Nükleotid	Protein	Varyant tipi	Parental konfirmasyon	Hastalıkla ilişkili kaynak no
OD	Het.	COL1A1	19	c.1282G>T	p.Gly428Cys	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Marini (2007)/ rs#72648331
OD	Het.	COL1A1	35	c.2398-2A>G	p.?	Kırılma hatası(SA)	Anne-baba taşıyor	Yeni/c.2398-1G>A varyantı için Schleit (2015)
OD	Het.	COL1A1	43	c.3145G>A	p.Gly1049Ser	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Lund (1997) /rs#67641695
OD	Het.	COL1A1	35	c.2425G>A	p.Gly809Ser	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Westerhausen (1990) /rs#72651663
OD	Het.	COL1A1	50	c.4238A>G	p.Asp1413Asn	Yanlış anlamlı	Anne-baba taşıyor	Yeni
OD	Het.	COL1A1	25	c.1678G>A	p.Gly560Ser	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Lindahl (2015) /rs#67507747
OD	Het.	COL1A1	44	c.3226G>A	p.Gly1076Ser	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Lindahl (2015) /rs#67394386
OD	Het.	COL1A1	25	c.1678G>A	p.Gly560Ser	Yanlış anlamlı	Anne heterozigot; baba incelenmedi	Lindahl (2015)rs#67507747
OD	Het.	COL1A1	45	c.3316G>C	p.Gly1106Arg	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Yeni
OD	Het.	COL1A1	33	c.2336G>T	p.Gly779Ser	Yanlış anlamlı	Anne-baba taşıyor	Yeni
OD	Het.	COL1A1	16	c.1013G>T	p.Gly338Val	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	No publications/rs#1555574249
OD	Het.	COL1A1	31	c.2101G>A	P.Gly701Ser	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Marini (2007)/rs#68114505
OD	Het.	COL1A2	47	c.3159+1G>A	p.?	Kırılma hatası (SD)	İncelenmedi	Yeni
OD	Het.	COL1A2	47	c.3134G>A	p.Gly1045Asp	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Yeni
OD	Het.	COL1A2	36	c.2152G>A	p.Gly718Ser	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Marini (2007) /rs#72658168
OR	Hom.	P3H1	13	c.1852delC	p.Leu618Glnfs*20	Çerçeve kayması	Anne-baba heterozigot	Yeni
OD	Het.	IFITM5	1	c.119C>T	p.Ser40Leu	Yanlış anlamlı	İncelenmedi	Guillén-Navarro (2014)/rs#786201032

OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant, SA: splicing acceptor, SD: splicing donor

Tablo 17: YND panel gen testinde mutasyon saptanan olguların postmortem bulguları

Olgu	Kraniyal Ossifikasyon	Kısa ekstremiteler	Bowing	Kırık	Beading	Platispondili	Ek anomaliler
OI#1	Azalmış	+	+	Kot	+	-	-
OI#2	Azalmış	+	-	Tibia, fibula, kot	+	-	-
OI#3	Azalmış	+	Femur, tibia	Femur, kot	-	-	-
OI#4	Azalmış	+	femur		+	+	-
OI#5	Azalmış	+	-	Tibia, fibula, kot	-	-	-
OI#6	Azalmış	+	Femur, tibia	humerus	-	-	-
OI#7	-	+	Femur, tibia	-	-	-	-
OI#8	-	+	Femur	-	-	-	-

OI#9	Azalmış	+	Femur, tibia	+	-	+	ekojenik (Grade II) ve dilate barsaklar, minimal asit, VSD ? hipoplazik pelvis
OI#10	Azalmış	+	Femur, tibia	-	+	-	-
OI#11	Azalmış	+	Femur, tibia	Tibia, kot	-	-	Kamptodaktili
OI#12	Azalmış	+	Tibia				
OI#13	Azalmış	+	Humerus, femur, tibia	Femur, humerus, kot	+	-	-
OI#14	Azalmış	+	Humerus, femur	Humerus, femur, tibia, kot	+	-	Ambigus genitalya
OI#15	Azalmış	+	Femur, tibia	Humerus, ulna, radius, kot	+	+	-
OI#16	Azalmış	+	Femur, tibia	Femur, kot	+	-	Yaygın ödem
OI#17	Azalmış	+	Humerus, Radius, femur, tibia	kot	+	+	-

Daha önce patojenik variant saptanmamış ancak *in silico* analizleri patojenik tahmini veren 7 olgu ve herhangi ilişkili bir varyant saptanmayan 9 olgunun dahil olduğu toplam 16 olguda *COL1A1* geni için MLPA analizi yapıldı ve herhangi bir delesyon/duplikasyon saptanmadı. Tüm hasta grubunda YND platformunda yanlış pozitif sonuçlar göz önüne alınarak biyoinformatik istatistiksel hesaplamaya dayalı düşük filtreleme ile güvenlik skoru 10, MAPD skoru 0,3 filtreleme seviyesi ile yapılan CNV analizinde, büyük delesyon ve duplikasyonlar dışlandı.

4.1.1 Aile (OI#1)

4.1.1.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı:26, Baba yaşı: 27, G1TT1 (Şekil 45A)

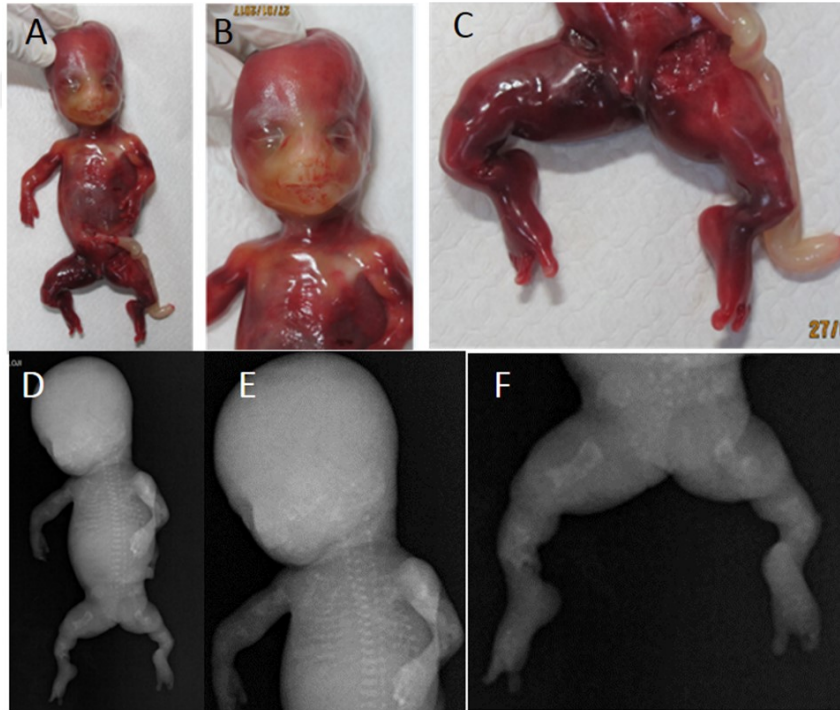
USG bulguları; 18+ GH, kalvaryal hipokalsifikasyon, transduser basısı ile komprese kalvaryum, kısa ve irregüler kostalar, toraks çapı 5-20 p (76 mm), mikromeli, tüm tübüler kemiklerde fraktür lehine dik açılanmalar, vertebra normal görünümde.

Olası klinik tanı; OI Tip II

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: CVS/46,XX

Gebelik akıbeti; 19. GH'da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; boy 16 cm, tartı 150 gr, OFC 13,5 cm, palpe edilemeyen kraniyal kemikler, tüm ekstremiteler belirgin kısa, özellikle tibia ve femurda asimetrik eğrilikler ve bilateral sandal gap (Şekil 44 A-C)



Şekil 44. (Aile OI#1) indeks olgu. (A-C). Ekstremit ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

USG bulguları; OFC ölçümü 19 GH, ekstremiteler ölçümleri 15 hafta ile uyumlu, kranium ossifikasyonu azalmış, skalp ödemi, tüm tübüler kemiklerde ileri derecede kısalık, tibia ve fibulada fraktür, toraks 2.5-5 p, kostalarda fraktür lehine dışa doğru açılanma, kısa nazal kemik ve hafif mikrognați, intrakranial yapılar normal.

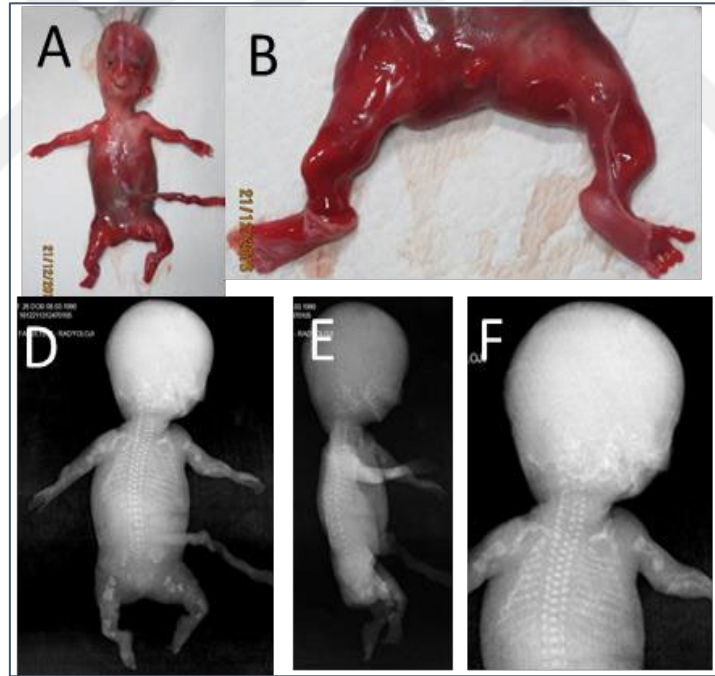
Olası Tanı: OITip II

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Aile işlem yaptırmak istemedi

Gebelik akıbeti; 19. GH ‘da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 18 cm, OFC 14 cm, tartı 200 gr, kulaç boyu 14 cm, alt segment 4 cm, kranium kemikleri palpe edilemedi. Kısa ve yukarı çekik palpebral fissürler, kısa burun, antevort burun delikleri, malar hipoplazi, mikroretrognati, bilateral düşük kulaklar, tüm ekstremitelerde belirgin kısalık, kemik deformitelerine sekonder düzensiz açılanmalar (Şekil 46 A-C)

X-ray bulguları; Kranium ossifikasyonu yok, tüm tübüler kemiklerde azalmış kemik dansitesi, tübüler kemiklerde multipl fraktürlere sekonder ileri derecede kısalık, eğrilik, kalınlaşma ve femurlarda akordeon benzeri görünüm, kostalarda multipl fraktürler, vertebra ossifikasyonu doğal (Şekil 46 D-F).



Şekil 46. Aile (OI#2), indeks olgu. (A-B). İndekse ait ekstremiteler ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

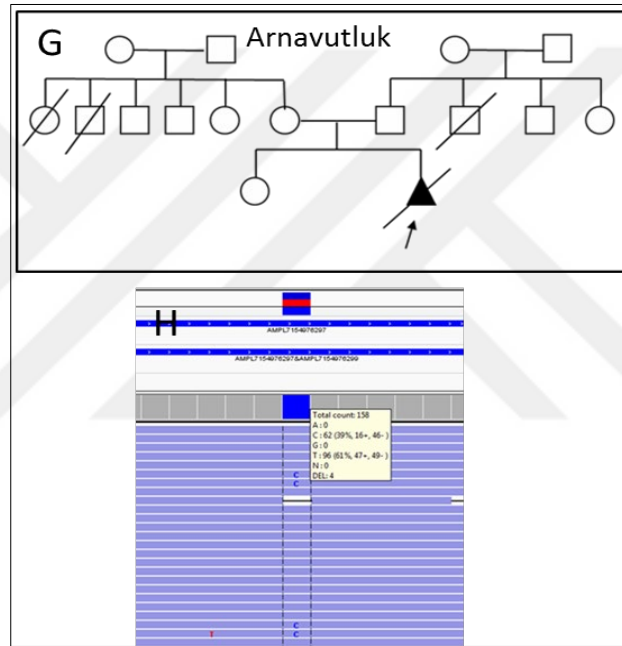
Klinik tanı; OI Tip IIA

4.1.2.2. Moleküler Bulgular

Saptanan variant: *COL1A1* geninde (NM_000088.3) heterozigot c.2398-2A>G (p.?) varyantı (Şekil 47 H)

Varyantın özellikleri; hastalık ilişkisi bildirilmiş, kırılma hatasına yol açması beklenen (SA bölgesi) nokta mutasyonu

Varyant konfirmasyonu; YND okuma derinliği iyi, Sanger konfirmasyonu yapılmadı



Şekil 47. Aile (OI#2), (G) aile ağacı. (H) İndeks olguda *COL1A1* geni c.2398-2A>G (p.?) splicing varyantına ait IGV görüntüsü

4.1.3.Aile (OI#3)

4.1.3.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 31, Baba yaşı:27, G1P1TT1, Akrabalık yok (Şekil 49 A)

USG bulguları; 29 (+) GH, her iki femurda kısalık (39 mm), fraktür lehine sert açılanmalar, çift taraflı tibia-fibulada kısalık ve eğrilik, üst ekstremitte kemikleri 5.p altında, vertebra ve skapulalar normal (uzunlamasına 24 mm), kostalar birbirine paralel, normal uzunlukta ve fraktür yok, toraks perimetresi normal (201 mm, 25-30. p), kalvaryum şekli ve ossifikasyonu normal

Olası ayırıcı tanılar; OI Tip III, OI Tip II, Hipofosfatazya

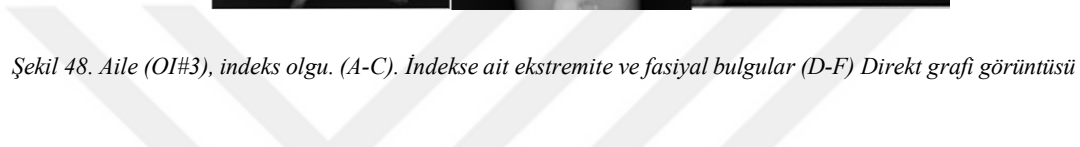
Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Kardiyosentez/46,XX

Gebelik akıbeti; 29. Gh'nda tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 36 cm, tartı 1330 gr, OFC 26 cm, kulaç boyu 37,5 cm, üst/alt oranı: 2,27, kafa kemikleri yumuşak ve basmakla içe çöküyor, hafif hipertelorizm, sınırda düşük kulaklar, ekstremitelerde rizomelik kısalık, bilateral uyluk palpasyonunda krepitasyon, femoral ve tibial bowing, sol elde hokey çizgisi ve bilateral PEV (Şekil 48 A-C)

X-ray bulguları; Kalvaryum mineralizasyonu yetersiz, tübüler kemikler kısa ve osteopenik, sağda sekizinci kot distalinde kırık, humeruslarda hafif, femur ve tibialarda belirgin eğrilik, femur distal metafizlerinde kırık ile uyumlu görünüm, metafizyel genişleme, femurlar kalın ve kısa görünümde, akordeon benzeri *crumpling*, vertebra ossifikasyonu görece normal, korpus yükseklikleri doğal. (Şekil 48 D-F)

Klinik tanı; OI tip II-B



Şekil 48. Aile (OI#3), indeks olgu. (A-C). İndekse ait ekstremite ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

4.1.3.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; COL1A1 geninde (NM_000088.3) c.3145G>A (Gly1049Ser) varyantı (Şekil 49 B).

Varyantın özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinen, yanlış anlamlı nokta mutasyonu

Varyant konfirmasyonu; YND okuma derinliği iyi, Sanger konfirmasyonu yapılmadı.



4.1.4.Aile (OI#4)

4.1.4.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 30, Baba yaşı:39, G2P1TT1, akrabalık yok (Şekil 51 G)

USG bulguları; 17 GH, azalmış kraniyal ossifikasyon, tüm tübüler kemiklerde kısalık, kısa, kırık, düzensiz kotlar, dar toraks, muhtemel VSD, vertebra ossifikasyonu, skapulaları ve parmak sayıları normal

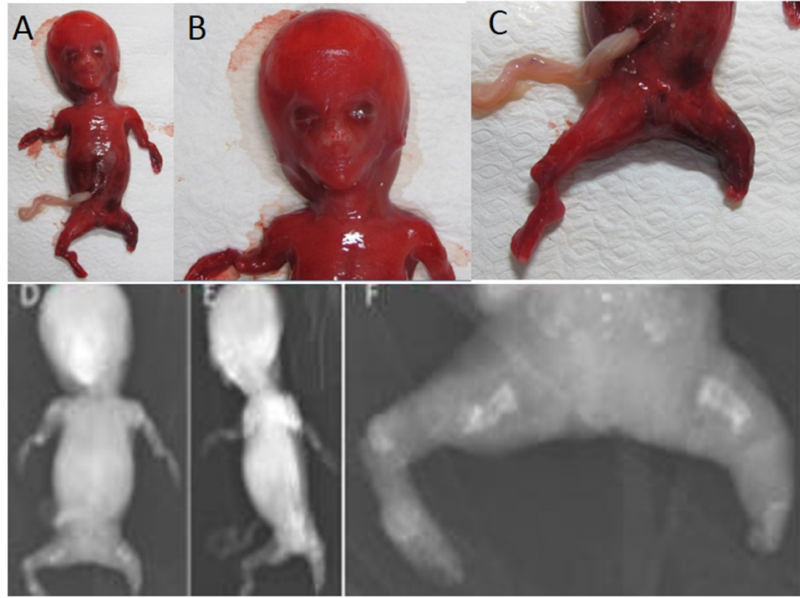
Olası Tanı: OI

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Aile işlem yaptırmak istemedi

Gebelik akıbeti; 17.GH'nda tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 14 cm, tartı 120 gr, OFC 11 cm, kafa kemikleri yumuşak, pinpon topu kıvamında, basmakla içe çöküyor, antevert burun delikleri, bilateral düşük kulaklar, tüm ekstremiteler belirgin kısalık ve deformasyon, sol alt ekstremitte dizden itibaren ampute, sol ayak izlenmedi (travmaya sekonder?) (Şekil 50 A-C)

X-ray bulguları; Tüm tübüler kemik dansitelerinde azalma, üst ve alt ekstremitte tübüler kemikleri belirgin kısa, kalın, eğri ve osteopenik görünümde, akordeon benzeri femurlar, kalvaryum mineralizasyonu yetersiz, kotlarda fraktürler ve *beading*, platispondili (Şekil 50 D-F)



Şekil 50. Aile (OI#4) (A-C). İndekse ait ekstremitte ve fasiyal bulgular (D-F) indeks olguya ait direkt grafi görüntüsü

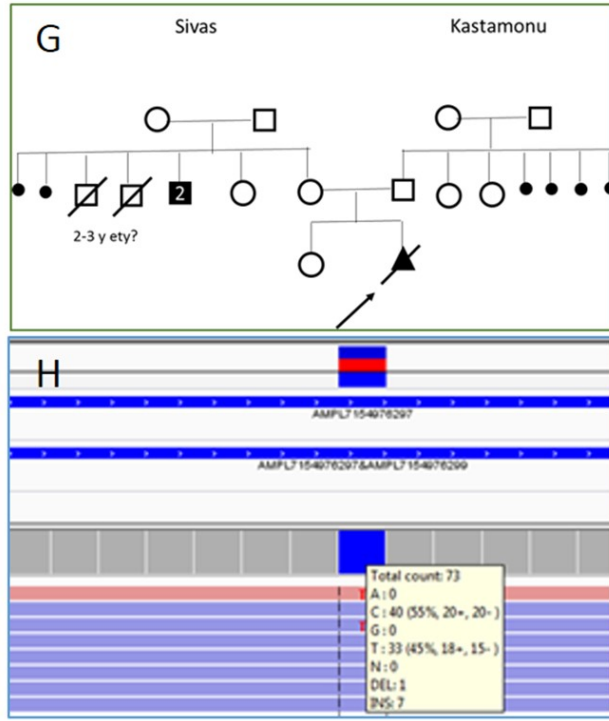
Klinik tanı; OI Tip IIA

4.1.4.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; COL1A1 geninde (NM_000088.3) heterozigot c.2425G>A (p.Gly809Ser) varyantı (Şekil 51 H)

Varyantın özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinen, yanlış anlamlı nokta mutasyonu

Varyant konfirmasyonu; YND okuma derinliği iyi, Sanger konfirmasyonu yapılmadı.



Şekil. 51. Aile (OI#4), (G) aile ağacı. (H) İndeks olguda COL1A1 geni c.2425G>A (Gly809Ser) heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü

4.1.5. Aile (OI#5)

4.1.5.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 34, Baba yaşı 32, G1TT1, akrabalık yok (ICSI gebelik, SMA Tip '1 tanılı kuzen öyküsü) (Şekil 53 G)

USG Bulguları; 22+ GH, kraniyum mineralizasyonu yetersiz, toraks deforme, ekstremitelerde kısalık ve belirgin eğrilik, tibia ve fibulada 90 derece açılanma, vertebraların mineralizasyonu yeterli

Olası Tanı: OI

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Kardiyosentez/46,XX

Gebelik akıbeti; 22 GH'nda tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 27 cm, tartı 600gr, OFC 20 cm, kraniyal kemikler palpasyonda yumuşak kıvamda, hipertelorizm, aşağı çekik palpebral fissürler, bilateral proptozis, geriye yerleşimli kulaklar, her iki humerusta, bilateral ön kolda, bilateral femurlarda fraktür ile uyumlu krepitasyon ve femurlarda açılanma, bilateral ellerde kamptodaktili (2-5) (Şekil 52 A-C)

X-ray bulguları; Kraniyal kemiklerin mineralizasyonu yetersiz, tübüler kemikler

kısa, her iki humerus, sağ radius, her iki femur, tibia ve fibula shaftlarında fraktür, multipl fraktürlü ve ince kotlar, aksiyel iskelet mineralizasyonu nispeten korunmuş (Şekil 52 D-F)



Şekil 52. Aile (OI#5), (A-C). İndekse ait ekstremit ve fasiyal bulgular, (D-F), indeks olguya ait direkt grafi görüntüsü

Klinik tanı; OI Tip IIC

4.1.5.2. MolekülerBulgular

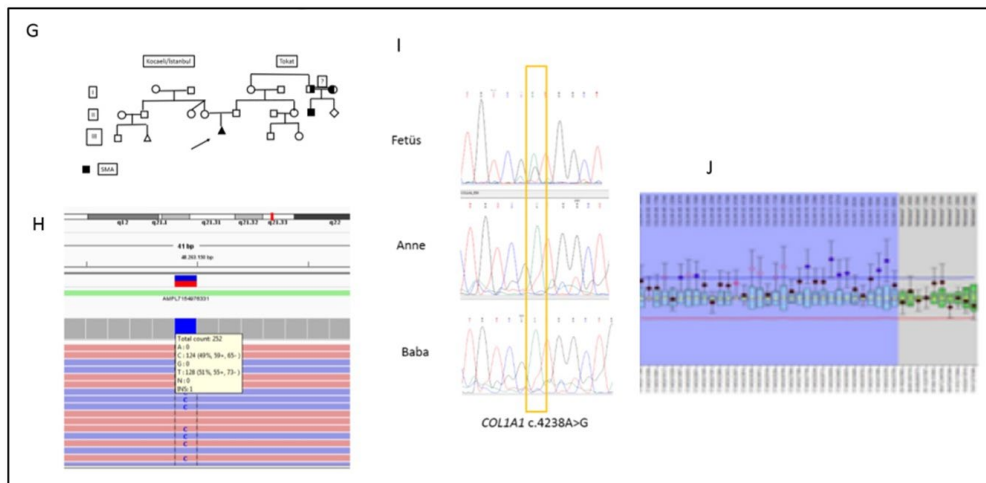
Saptanan varyant; *COL1A1* geninde heterozigot c.4238A>G (p.Asp1413Asn) varyantı (Şekil 53 H).

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinmeyen (novel), yanlış anlamlı *de novo*

Konfirmasyon: Sanger dizileme (Şekil 53I)

Parental analiz: Sanger dizileme ile normal (Şekil 53I)

MLPA sonucu; Normal (Şekil 53 J).



Şekil 53. Aile (OI#5), (G) Aile ağacı, (H) İndeks olguda *COL1A1* geni c.4238A>G heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü, (I) İndeks olguda ve ebeveynlere ait elektroferogram görüntüsü, (J) MLPA görüntüsü

4.1.6. Aile (OI#6)

4.1.6.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 35, Baba yaşı:38, G1TT1, Akrabalık yok, (Şekil 55 A).

USG Bulguları; 22-GH, kraniyum mineralizasyonu yetersiz, sağ radius (5-50p) ve sağ fibula (5-50p) dışında tüm tübüler kemikler 5.p altında, toraks çevresi normal (128 mm, 25-50p), sağ ve sol femoral bowing, deforme toraks, ekstremitelerde kısalık ve belirgin eğrilik, tibia ve fibulada 90 derece açılanma, paralel yerleşimli kotlar, skapulalar normal ekojenitede, vertebraların mineralizasyonu yeterli.

Olası Tanı: OI

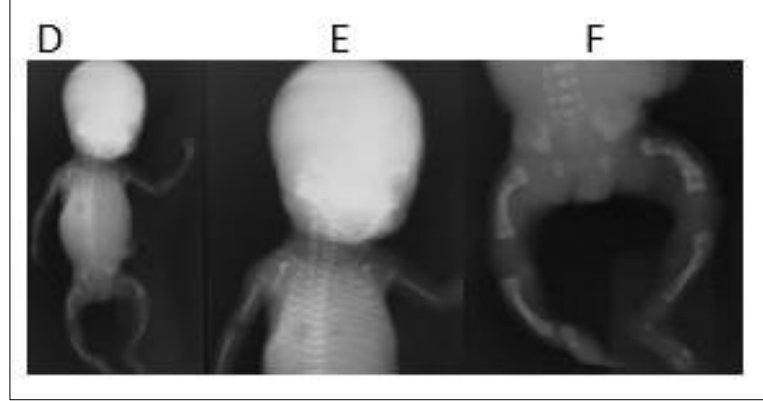
Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Kordosentez/46,XX

Gebelik akıbeti; 24+ GH sında tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 20 cm, kulaç 26 cm, tartı 480 g, OFC 20 cm, kafa kemikleri palpasyonla içeri çöküyor, alın geniş, görece makrosefali, kaş kemerleri çökük, proptozis, üst ekstremiteler orantılı, femurlarda kısalık ve bilateral *bowing*, sağda daha belirgin olmak üzere bilateral hafif tibial *bowing* (Olguya ait resim kayıtlarda bulunamamıştır)

X-ray bulguları; Özellikle lateral grafide kranyum kemiklerinde yer yer ossifikasyon kaybı, ince ve minimal düzensiz kotlar, kostokondral uçlar spatüle görünümde, sol humerusta orta bölümde vertikal, kallus benzeri bir yapı, bilateral femurlarda kısalık, eğrilik, hafif *crumpled* görünümü, tibia ve fibulalar normal uzunlukta, tibialarda hafif bowing (Şekil 54 D-F)

Klinik tanı; OI



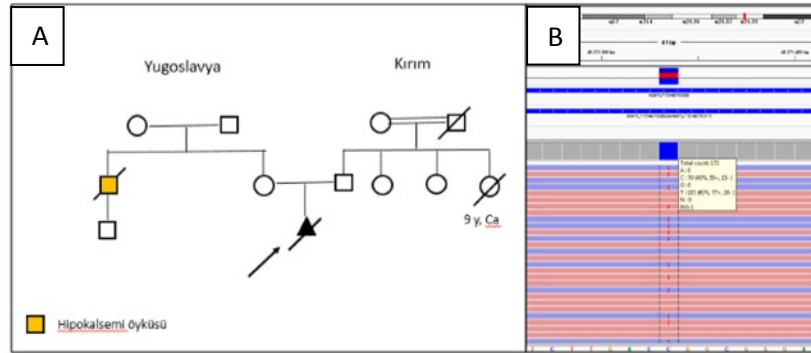
Şekil 54. Aile (OI#6) (D-F) İndekse ait direkt grafi görüntüsü

4.1.6.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; *COL1A1* geninde heterozigot c.1678 G>A (Gly560Ser) variant (Şekil 55 B)

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinen, yanlış anlamlı nokta mutasyonu

Konfirmasyon; YND okuma derinliği iyi, Sanger konfirmasyonu yapılmadı



Şekil 55 Aile (OI#6), (A) aile ağacı. (B) İndeks olguda *COL1A1* geni c.1678G>A heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü

4.1.7. Aile (OI#7)

4.1.7.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 32, Baba yaşı: 35, G1TT1, Akrabalık yok. (Şekil 57 A)

USG Bulguları; 24- GH US, sağ üst ekstremité hariç tüm ekstremiteler kısa ve angüle

Olası Tanı: Letal iskelet Displazisi

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Aile işlem yaptırmak istemedi

Gebelik akıbeti; 24+ GH sında tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 30,2 cm, kulaç 23,5 cm, tartı 680 g, OFC 21 cm, supraorbital kemikler çökük, retrognati, femurlarda kısalık ve bilateral *bowing*, solda daha belirgin bilateral tibial *bowing* (Şekil 56 A-C).



Şekil 56. (Aile OI#7) indeks olgu. (A-C). Ekstremité ve fasiyal bulgular

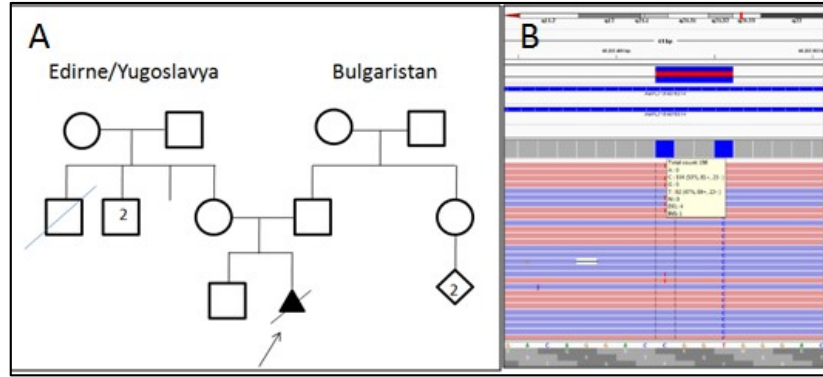
X-ray bulguları; Sol ulna, radius ve alt ekstremitelerde açılanma, sol 8-9. Kotlarda midklavikular hatta kırık izlendi (Olguya ait x-ray görüntüsü kayıtlarda bulunamamıştır).

4.1.7.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; *COL1A1* geninde heterozigot c.3226G>A (Gly1076Ser) varyantı (Şekil 57 B)

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinen, yanlış anlamlı nokta mutasyonu.

Konfirmasyon; YND okuma derinliği iyi, Sanger konfirmasyonu yapılmadı



Şekil 57. (Aile OI#7) A) aile ağacı. (B) İndeks olguda COL1A1 geni c.3226G>A heterozigot varyantına ait IGV

görüntüsü

4.1.8. Aile (OI#8)

4.1.8.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 27, OI klinik tanılı, Baba yaşı: 31, G1P1, 3,5° kuzen evliliği (Şekil 59 G)

Etkilenmiş anne; bilateral femoral fraktürle doğmuş. 5 yaşına kadar 5 kez tekrarlayan kırık öyküsü, yaygın osteopeni bulgularıyla OI tanısıyla kalsitonin tedavisi almış. 14 yaşına kadar alt ekstremitelerde 10-15 kez minimal travmayla kırık öyküsü mevcut. Kemik biyopsisinin polarize ışık mikroskopuyla incelenmesinde kallus formasyonu, histolojisinde yerini fibrozise bırakmış kemik iliği dışında özellik saptanmamış. Primer hipotiriodi nedeniyle L-Tiroksin tedavisi alıyor. Muayenede boyu 135,5 cm (<3SD), tartısı 81 kg (99p), kulaç 153 cm, OFC 56 cm (46p) idi. Sağ alt ekstremitede proksimal femur kısalığını düşündüren 1,5 cm lik kısalık dışında sistemik muayenesi normal idi. (Şekil 58)

USG bulguları; 21. GH, femur ve humeruslar <1p, fibula ve tibia <5p, femurlarda fraktür lehine belirgin açılanma, toraks çapı 10p.

Olası Tanı: OI

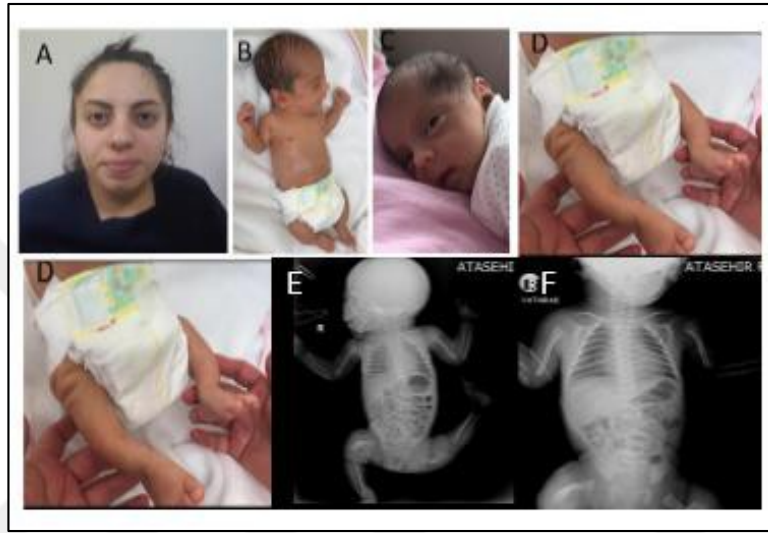
Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Amniosentez/ arr (1-22,X)x2

Gebelik akıbeti; Ayrıntılı genetik danışmayı takiben aile gebeliğe devam kararı verdi. Aileden alınan bilgide 35+6. gebelik haftasında sezeryanla 1975 gr (25-50p) tartı ve 7-9 APGAR la doğan dişi olgunun taşipneleri nedeniyle 2 günü entübe olmak üzere 10 gün yenidoğan yoğun bakımda kalmış. Muayenesinde sol alt ekstremitte kalçadan itibaren

hiperfleksiyon posture, femurda eğrilik ve eklem laksitesi saptanmış. Yatışı sırasında yapılan kraniyal USG'de periventriküler lökomalazi, EKO'da sekundum ASD ve periferik pulmoner stenoz saptanarak sonografik takibe alınmış. Babygramda kırık bulgusu saptanmamış (Şekil

58) Klinik durumunda düzelme sonrası önerilerle taburcu edilmiş. Tez yazım aşamasında olgu henüz genetik polikliniğimizde değerlendirilmemişti.

Klinik tanı; OI Tip IV



Şekil 58. Aile (OI#8), (A-D) indekse ve etkilenmiş anneye ait dismorfik bulgular (E-F) İnfantra ait direkt grafi görüntüsü

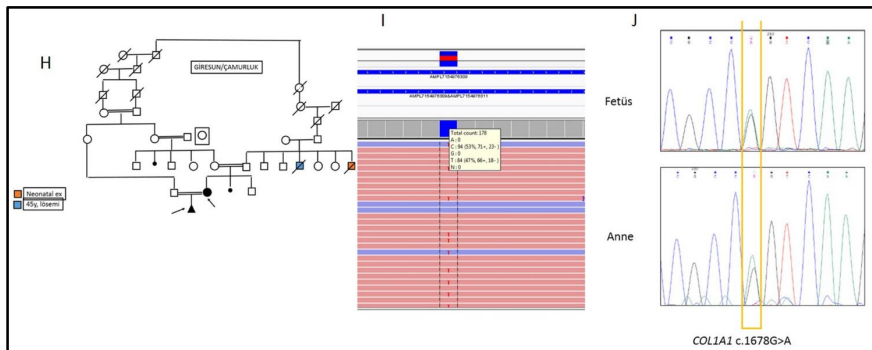
4.1.8.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; *COL1A1* geninde heterozigot c.1678G>A (Gly560Ser) varyantı (Şekil 59 I)

Varyant özellikleri: Hastalık ilişkisi bilinen, yanlış anlamlı nokta mutasyonu

Konfirmasyon; Sanger dizileme (Şekil 59 J)

Etkilenmiş anne; Sanger dizileme ile aynı mutasyon için heterozigot (Şekil 59 J).



Şekil 59. Aile (OI#8) (H) Aile ağacı. I) İndeks olguda *COL1A1* geni c.1678G>A (Gly560Ser) heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü (J) İndeks olgu ve anneye ait elektroferogram görüntüsü

4.1.9. Aile (OI#9)

4.1.9.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 33, Baba yaş 35, G2P1TT1, yakın köyler (Şekil 61 A)

USG Bulguları; 21- GH, kraniyum kemiklerinde azalmış mineralizasyon ve transduser basısı ile komprese kalvaryum, mega sisterna magna (12.1 mm). Tübüler kemikler ileri derecede kısa ve fraktür şüphesi verecek şekilde deforme, her iki alt ve üst ekstremitte fleksiyon postüründe, hareketsiz, toraks çevresi 68 mm (<2.5 p), ileri derecede dar kısa kotlar, belirgin *frontal bossing* ve mikroftalmi, binoküler çap: 24 mm (5 p), interoküler çap 10 mm (5-50 p), oküler çap: 6 mm (<5 p), nazal kemik yokluğu, ekojenik (Grade II) ve dilate barsaklar, minimal asit, VSD ?

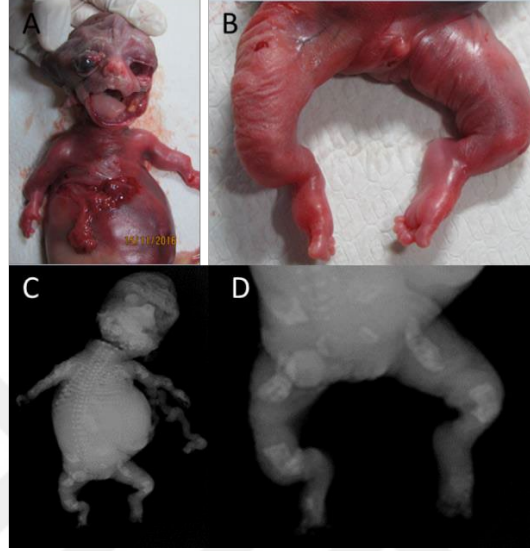
Olası tanı; OI Tip II, Akondrogenezis Tip B

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Kardiyosentez/46,XX

Gebelik akıbeti; 24 GH'da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 23 cm, tartı 220 gr, OFC kraniyal deformasyon nedeniyle değerlendirilemedi. Kraniyum kemikleri palpe edilemedi, her iki palpebral fissür komissürlerinde ve sol ağız komissüründen zigomaya uzanan laserasyon, sağ göz küresi dışarda, sol göz küresi yok, skalpte (oksipito-parietalde), boyunda ve sırtta travmaya sekonder laserasyonlar, tüm ekstremitelerde belirgin kısalık, her iki ön kolda dorsale doğru açılanma el başparmakları opozisyonda, her iki bacakta öne doğru açılanma, bilateral pes planovarus ve femur distallerinde fraktüre bağlı olduğu düşünülen krepitasyon (Şekil 60 A-B)

X-ray bulguları; Kranial kemiklerde ağır mineralizasyon defektine sekonder deformasyon, tübüler kemiklerde ağır mineralizasyon kaybı, kısa, kalın ve deforme tübüler kemikler, femurlar ve tibialarda akordeon benzeri görünüm, sağ ve sol radius ve ulnada açılanma ve hipoplazik pelvis, kısa, kalın kotlar, platyspondili ( ekil 60 C-D)



Şekil 60. Aile (OI#9), indeks olgu. (A-B). İndekse ait ekstremite ve fasiyal bulgular (C-D) Direkt grafi görüntüsü,

Klinik tanı; OI Tip II

4.1.9.2. Moleküler Bulgular

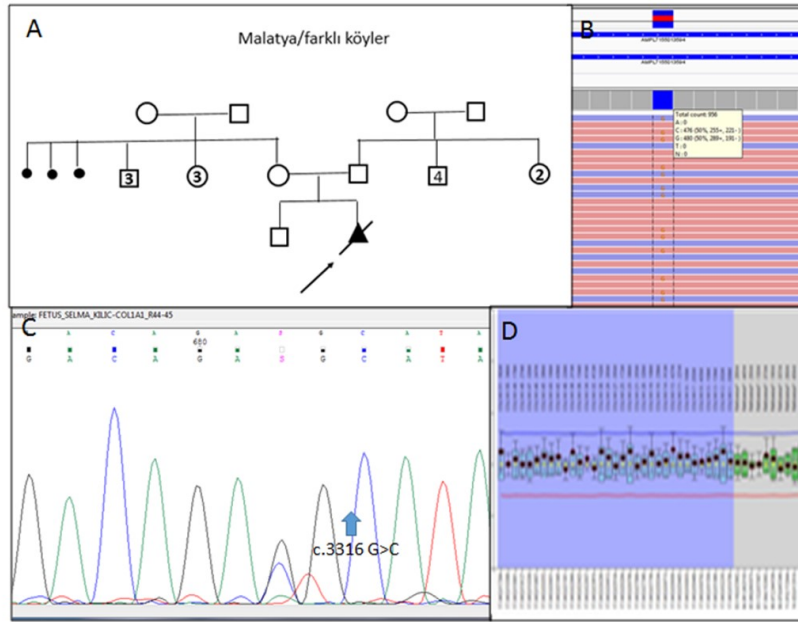
Saptanan varyant; *COL1A1* geninde heterozigot c.3316G>C (Gly1106Arg) varyantı ( ekil 61 B)

Varyant  zellikleri; Hastalık ilişkisi bilinmeyen, *in silico* analiz programları tarafından patojenik tahmini verilen yanlış anlamlı nokta mutasyonu

Konfirmasyon; Sanger dizileme ( ekil 61 C)

Parental analizler; Ebeveynlerden konfirmasyon için kan alınamadı.

MLPA sonucu; Normal ( ekil 61 D)



Şekil 61. (Aile OI#9) (A) Aile ağacı, (B) İndeks olguda COL1A1 geni c.3316G>C (Gly1106Arg) heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü, (C) İndekse ait elektroferogram görüntüsü, (D) COL1A1 MLPA görüntüsü

4.1.10. Aile (OI#10)

4.1.10.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 37, Baba yaşı 37, G2P1TT1, Akrabalık yok (Şekil 63 A)

US bulguları; 19+ GH, brakisefali, kalvaryumda yetersiz mineralizasyon, hipoplazik nazal kemik (2mm), tüm tübüler kemiklerde kısalık ve eğrilik, dar toraks (toraks çevresi: 69mm; <2.5p) ve kotlarda dışa doğru açılanmalar, her iki skapula, vertebra ossifikasyonu normal, el ve ayaklardaki parmak sayıları net değerlendirilememiş.

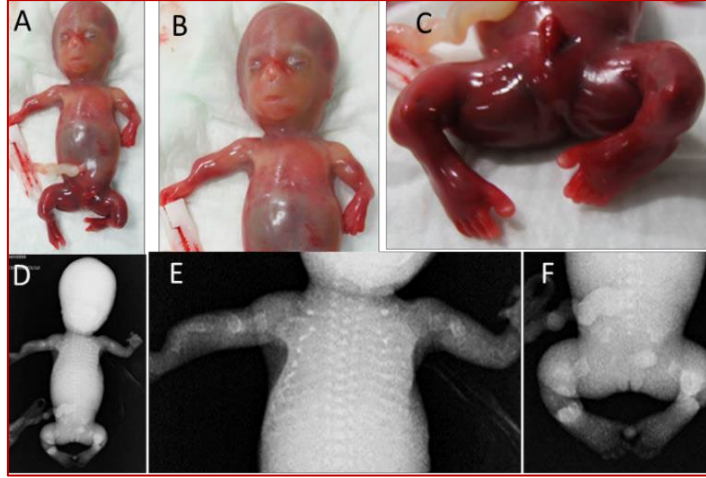
Olası tanı; OI Tip II

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Amniyosentez/46,XY

Gebelik akıbeti; 20+ GH' da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 18 cm, tartı 200 g, OFC 14.5 cm, oksipital kemik hariç kalvarium kemikleri palpe edilemedi. Basık burun kökü, bulböz burun ucu, kısa kolumella, uzun filtrum, dar yüksek damak ve bilateral belirgin traguslar, dar toraks, batin distandü, mikromeli, tüm ekstremitelerde fraktür ile uyumlu açılanma ve krepitasyon, PEV ve sandal gap (Şekil 62 A-C)

X-ray bulguları; Kalvarian kemik ossifikasyonu azalmış, kalın, kısa, eğri ve osteopenik tübüler kemikler, femur ve tibialarda daha belirgin eğrilik, metafizyel genişleme, kotlar nispeten kalın, hipodens ve düzensiz yapıda, *beading* görünümü mevcut (Şekil 62 D-F).



Şekil 62. Aile (OI#10), indeks olgu. (A-C). İndekse ait ekstremit ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

Klinik tanı; OI tip II-A

4.1.10.2. Moleküler Bulgular

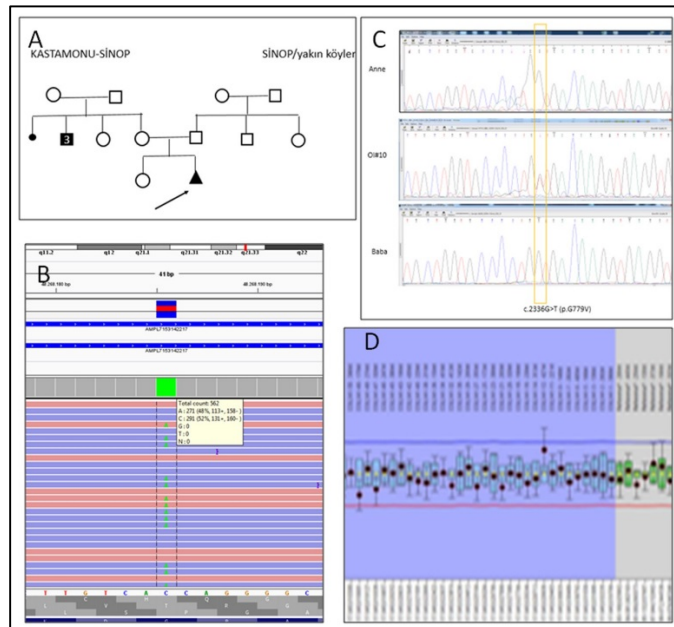
Saptanan varyant; *COL1A1* geninde heterozigot c.2336G>T, (p.Gly779Ser) varyantı (Şekil 63 B)

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinmeyen, *de novo*, *in silico* analiz programları tarafından patojenik tahmini verilen yanlış anlamlı nokta mutasyonu

Konfirmasyon; Sanger dizileme (Şekil 63 C)

Parental analiz; Sanger dizileme ile normal (Şekil 63 C)

MLPA sonucu; Normal (Şekil 63 D)



Şekil 63. Aile (OI#10) (A) Aile ağacı (B) İndeks olguda *COL1A1* geni c.2336G>T heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü (C) İndeks olgu ve ebeveynlerine ait elektroferogram görüntüsü, (D) *COL1A1* MLPA görüntüsü

4.1.11. Aile (OI#11)

4.1.11.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı 36, Baba yaşı: 33, G2P1TT1, Akrabalık yok (Şekil 65 G)

USG bulguları; 22+ GH, toraks çevresi dar, (44 mm, <2.5 p), femur uzunluğu < 3.p, diğer tüm tübüler kemikler 5.p altında, femurda telefon ahizesi görünümü, tüm tübüler kemiklerde angulasyon, skapulalar normal, vertebral mineralizasyon yetersiz, karın hafif protuberan

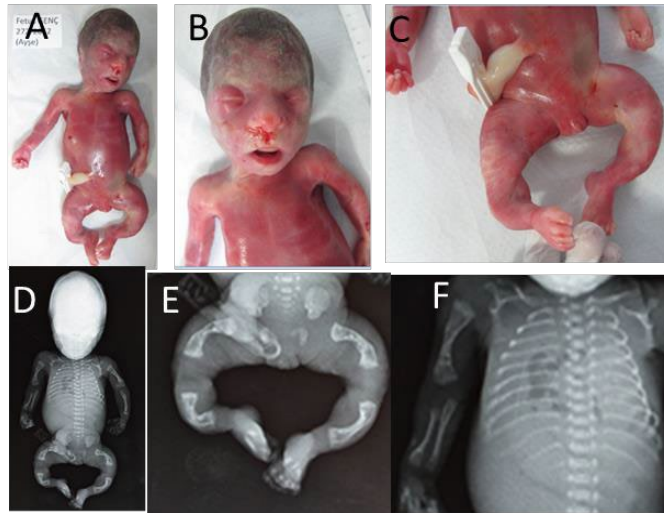
Olası Tanı: OI Tip II

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Amniyosentez/46,XX

Gebelik akıbeti; 24. GH'da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 26 cm, tartı 560 g, OFC 19.2 cm, kulaç boyu 26.5 cm, tüm kranial sutureler açık, kalvaryum kemikleri pinpon topu kıvamında, toraks dar ve batın hafif protuberan, ekstremitelerde kısalık, bilateral kamptodaktili, her iki femur ve tibia da içe doğru açılanma (Şekil 64 A-C)

X-ray bulguları; Kalvaryum mineralizasyonu yetersiz, tüm tübüler kemiklerde dansite belirgin olarak azalmış ve kısa, olası kırıklara bağlı deforme görünüm, kotlar ince, sağ 7. kotta ve sağ klavikulada fraktür, her iki femurda telefon ahizesi görünümü, sağda daha belirgin olmak üzere her iki tibia da *bowing*, (Şekil 64 D-F)



Şekil 64. Aile (OI#11) indeks olgu. (A-C). İndekse ait ekstremit ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

Klinik tanı; OI Tip II B

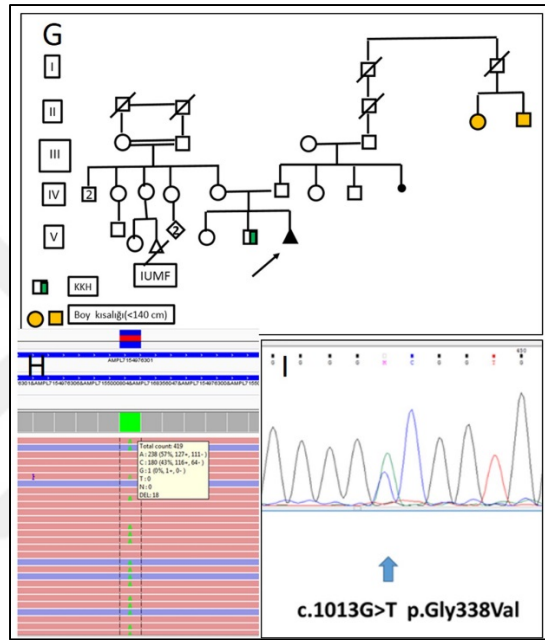
4.1.11.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; *COL1A1* geninde heterozigot c.1013G>T (p.Gly338Val) varyantı (Şekil 65 H)

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinen, rs numarası mevcut ancak yayını yok.

Konfirmasyon; Sanger dizileme (Şekil 65 I)

Parental analiz; Ebeveynlerden konfirmasyon için kan alınmadı.



Şekil 65. Aile (OI#11) ((G) Aile ağacı (H) İndeks olguda *COL1A1* geni c.1013G>T heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü (I) İndeks olguda elektroferogram görüntüsü

4.1.12. Aile (OI#12)

4.1.12.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 24, Baba yaşı: 38, G2P1TT1, Yakın köyler (Şekil 67 G)

US bulguları; 16. GH, bilateral alt ve üst ekstremité túbüler kemiklerde kısalık, tibia, radius ve ulnada eğrilik ve PEV, vertebral kolon, kraniyum kemikleri, skapula, kostalar ve klavikula normal konfigürasyon ve mineralizasyonda, toraks normal görünümünde, (9. p)

Olası tanı; Bent-bone displaziler

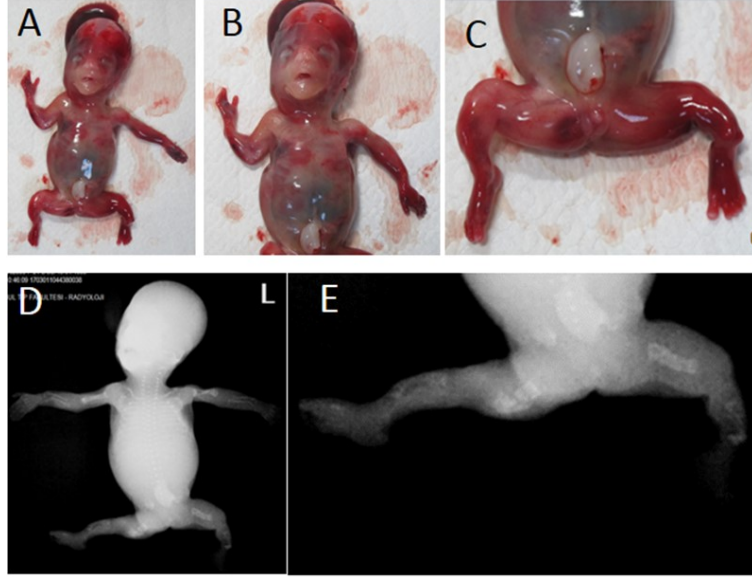
Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: CVS/46,XX

Gebelik akıbeti; 16 GH'nda tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; 16 GH, boy 13 cm, tartı 150 gr, OFC 10 cm, skalp alından

itibaren lasere, kranium kemikleri palpasyon haftasına göre hafif yumuşak, belirgin burun kökü ve malar hipoplazi, bilateral ön kolda, keskin kenarlı içe açılanma, bilateral uyluk distalinde *bowing*, bacak orta hatta 90 derece açılanma, el ve ayaklar normal anatomik görünümde (Şekil 66 A-C)

X-ray bulguları; Tüm kemiklerin ossifikasyonunda azalma, sol humerus, bilateral radius ve ulna distalinde eğrilik, bilateral femurlar kısa ve kalın, sınırları düzensiz ve sağ femurda fraktürle uyumlu açılanma, sağ tibiada kısalık, kalınlaşma ve içe eğrilik, sol tibiada fraktürle uyumlu keskin içe açılanma (Şekil 66 D-F)



Şekil 66. Aile (OI#12) indeks olgu. (A-C). İndekse ait ekstremit ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

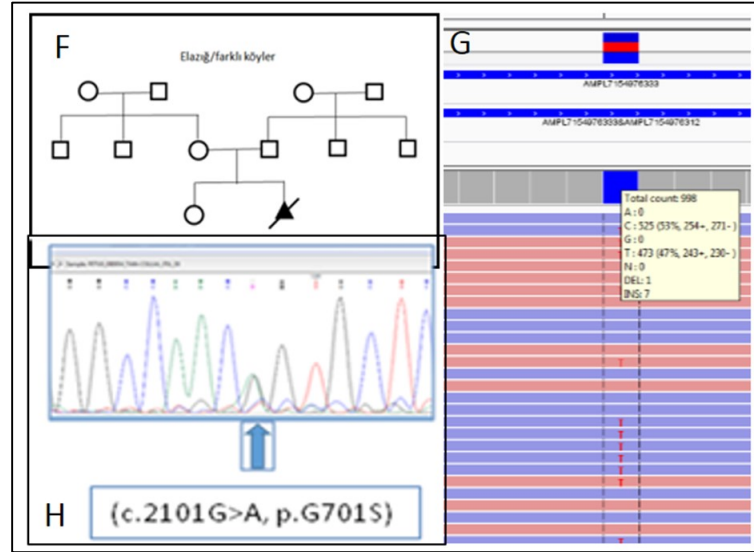
Klinik tanı; OI tip II

4.1.12.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; *COL1A1* geninde heterozigot c.2101G>A (Gly701Ser) varyantı (Şekil 67 G)

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinen, yanlış anlamlı nokta mutasyonu (Şekil 67 G)

Konfirmasyon; Sanger dizileme (Şekil 67 H)



Şekil 67. Aile (OI#12) (F) aile ağacı (G) İndeks olguda COL1A1 geni c.2101G>A (Gly701Ser) heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü, (H) İndekse ait elektroferogram görüntüsü

4.1.13. Aile (OI#13)

4.1.13.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 24, Baba yaşı: 28, G1TT1, Akrabalık yok (Şekil 69 I)

USG bulguları; 18. GH, kraniyum, vertebra ve kostalarda mineralizasyon kaybı, kalvaryum transduser basısı ile komprese, tüm tübüler kemiklerde kısalık, nazal kemik yokluğu, toraks çevresi 82 mm (10-25 p), kostalarda fraktüre bağlı olduğu düşünülen deformasyon, sağ alt ve sol üst ekstremitte distal tübüler kemiklerde öne doğru ileri derecede açılanma

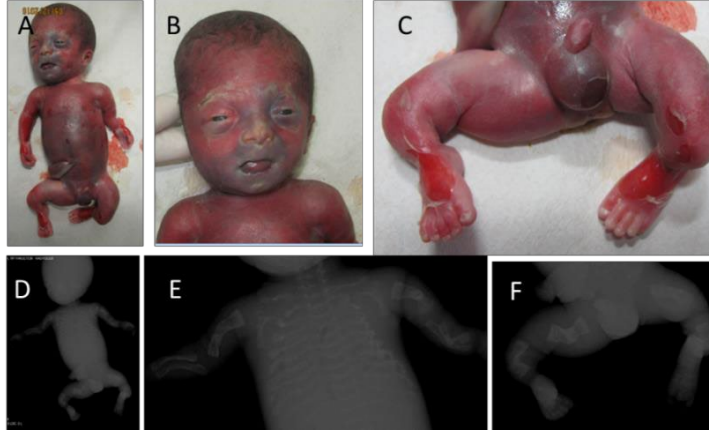
Olası Tanı: OI

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: CVS/46, XY ve SOX9 dizi analizi normal

Gebelik akıbeti; 25. GH'da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 29 cm, tartı 900 gr, OFC 22 cm ve kulaç boyu 25 cm, kraniyal mineralizasyon yetersiz, supraorbital ark deprese, bitemporal basıklık, basık ve geniş burun kökü, kısa burun, malar hipoplazi ve mikroretrognati, tüm uzun kemiklerde belirgin kısalık, sağ kolda krepitasyon, sol ön kolda bowing ve bilateral klinodaktili, bilateral femurlarda dışa açılanma ve krepitasyon, tibial bowing ve bilateral PEV deformitesi (Şekil 68 A-C)

X-ray bulguları; Kalvaryumda yetersiz mineralizasyon, kalın, kısa, korteks devamlılığı bozulmuş ve osteopenik görünümde tübüler kemikler, humeruslarda hafif, femur ve tibialarda daha belirgin eğrilik, sağ humerus distalinde ve bilateral femur proksimallerinde kırık ile uyumlu görünüm, metafizyel genişleme, femurlar kalın ve kısa, akordeon benzeri görünümde, kısa, kalın ve düzensiz görünümde kotlar, *beading*, sağda yedinci kot ortasında kırık ve platispondili (Şekil 68 D-F)



Şekil 68. Aile (OI#13) indeks olgu. (A-C). İndekse ait ekstremite ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

Klinik tanı; OI Tip II A

4.1.13.2. Moleküler Bulgular

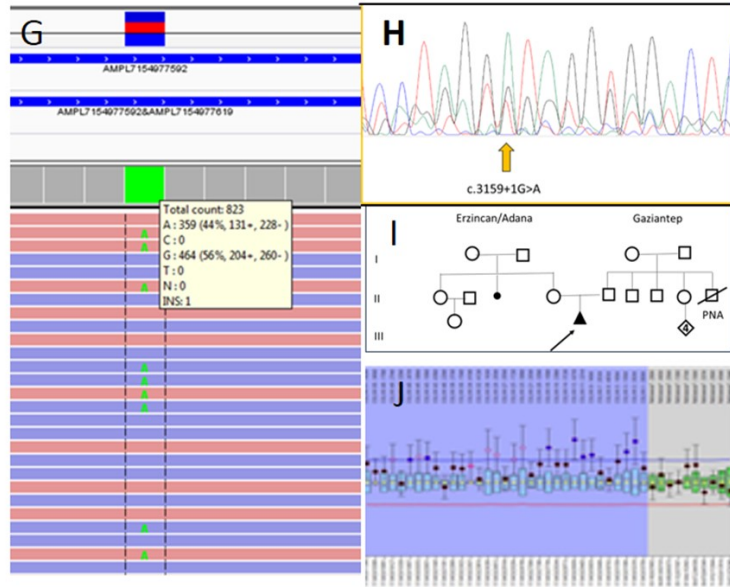
Saptanan varyant; *COL1A2* geninde heterozigot c.3159+1G>A(p.?) varyantı (Şekil 69 G)

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinmeyen, *in silico* analiz programları tarafından patojenik tahmini verilen, SD bölgesinde kırılma hatasına yol açan nokta mutasyonu

Konfirmasyon; Sanger dizileme (Şekil 69 H)

Parental analiz; Ebeveynlerden konfirmasyon için kan alınamadı

MLPA sonucu; Normal (Şekil 69 J)



Şekil 69. Aile (OI#13) (G) İndeks olguda COL1A2 geni c.3159+1G>A (p.?) heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü (H) İndeks olguda elektroferogram görüntüsü (I) aile ağacı, (J) COL1A1 MLPA görüntüsü

4.1.14. Aile (OI#14)

4.1.14.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 25, Baba yaşı:31, G3P1A2, Ovulasyon indüksiyonu, Akrabalık yok (Şekil 71 G)

USG bulguları; 17+ GH, yetersiz kraniyum mineralizasyonu, kısa kotlar ve dar toraks, ekstremiteler ileri derecede kısa ve eğri, skapulalar normal,

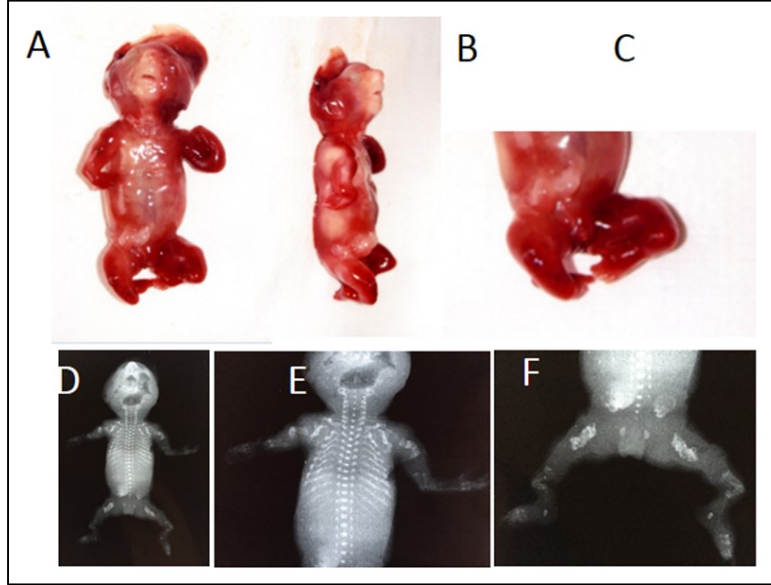
Olası tanı; Hipofosfatazya, akondrojenesis, letal iskelet displazisi grubu

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Amniyosentez/46,XY

Gebelik akıbeti; 18. GH'da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; Boy 12 cm, tartı 90 g, OFC 11 cm, cilt ödemli, temporal kemikler dışında kraniyal kemik palpe edilmedi, verteks üzerindeki deri lasere, beyin dokusunun çoğu ekstrude görünümde, antevort burun delikleri, uzun filtrum, mikrognati, düşük kulaklar, ön kollar ve bilateral tibia ileri derecede kısa, kollar ve femurlarda bilateral *bowing*, bilateral belirgin sandal gap ve pes varus, dış genitalya Prader evre III ile uyumlu (Şekil 70 A-C)

X-ray bulguları; Kafa kemikleri kafa tabanında parçalı ossifikasyon haricinde kemikleşmemiş, kotlarda düzensizlik ve *beading*. Tüm uzun kemikler ve klavikulalarda, kırıklara bağlı kortikomeduller düzensizlik, bilateral margo skapula düzensiz, bilateral iliak kanatlar küçük (Şekil 70 D-F)



Şekil 70. Aile (OI#14) (A-C). İndekse ait ekstremite ve fasiyal bulgular, (D-F) indekse ait direkt grafi görüntüsü

Klinik tanı; OI Tip II

4.1.14.2. Moleküler Bulgular

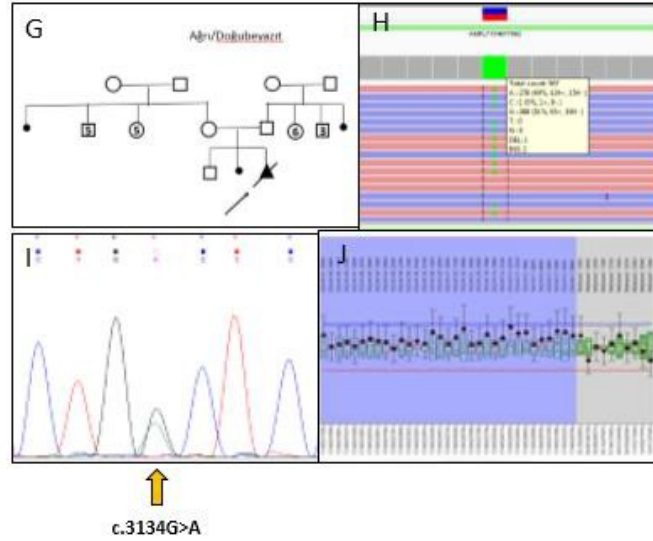
Saptanan varyant; *COL1A2* geninde heterozigot c.3134G>A (Gly1045Asp) değişimi (Şekil 71 H)

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinmeyen, *in silico* analiz programları tarafından patojenik tahmini verilen yanlış anlamlı nokta mutasyonu

Konfirmasyon; Sanger dizileme (Şekil 71 I)

Parental analiz; Ebeveynlerden segregasyon için kan alınamadı. *De novo?*

MLPA sonucu; Normal (Şekil 71 J)



Şekil 71. Aile (OI#14) (G) aile ağacı, (H) İndeks olguda COL1A2 geni c.3134G>A (G1045D) heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü (I) İndeks olguda elektroferogram görüntüsü (J) COL1A1 MLPA görüntüsü

4.1.15. Aile (OI#15)

4.1.15.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 37, Baba yaşı: 47, G3P1Ab1TT1, Akrabalık yok (Şekil 73 A)

USG bulguları; 32(+) GH, toraks çevresi dar (170 mm, <2.5 p). Kalvaryal kemikleşmede azalma, *frontal bossing*, her iki gözde proptozis, tübüler kemiklerde kısalık ve kontürlerinde düzensizlik, kısa ve irregüler kotlar, ulna ve radiusta telefon ahizesi görünümü.

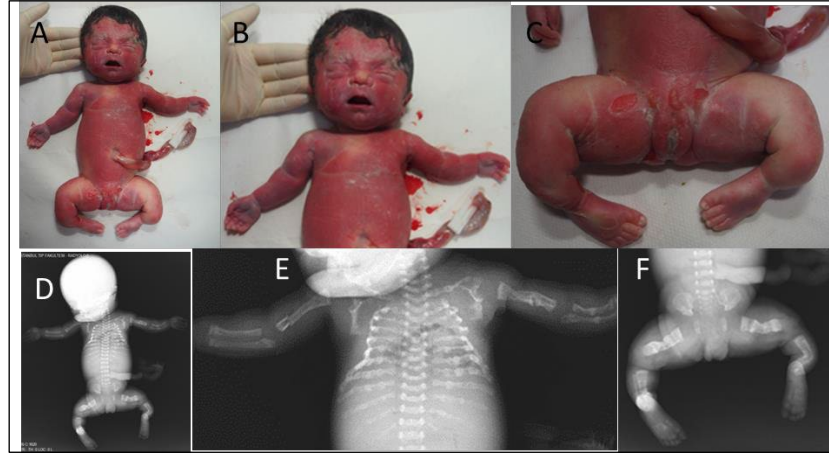
Olası klinik tanı; OI Tip II

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Kardiyosentez/46,XX

Gebelik akıbeti; 33. GH'da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; boy 33 cm, kulaç 33 cm, tartı 1520 g, OFC 29,5 cm ölçüldü. Kafa kemikleri yumuşak ve basmakla içe çöküyor. Yuvarlak yüz, hipertelorizm, proptozis, basık burun kökü, geniş burun ucu, uzun filtrum, mikro-retrognati ve bilateral sınırda düşük küçük kulaklar. Tüm ekstremitelerdeki belirgin kısalığa eşlik eden tibial ve femoral *bowing*, dar toraks, palpasyonla femur, humerus başı ve kotlardan krepitasyon bulgusu (Şekil 72 A-C)

X-ray bulguları; kranium ossifikasyonu yok, kısa, kalın ve multiple kırıklara bağlı deforme ve osteopenik görünümde tübüler kemikler. Humerus distali, ulna proksimali ve radius shaftında kırık. Kotlar kısa, platispondilik, hipomineralize görünümde. Kotlarda kırık ve multiple *beading*. Femurlarda akordeon benzeri görünüm, tibialarda belirgin eğrilik (Şekil 72 D-F).



Şekil 72. Aile (OI#15) indeks olgu. (A-C). İndekse ait ekstremit ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

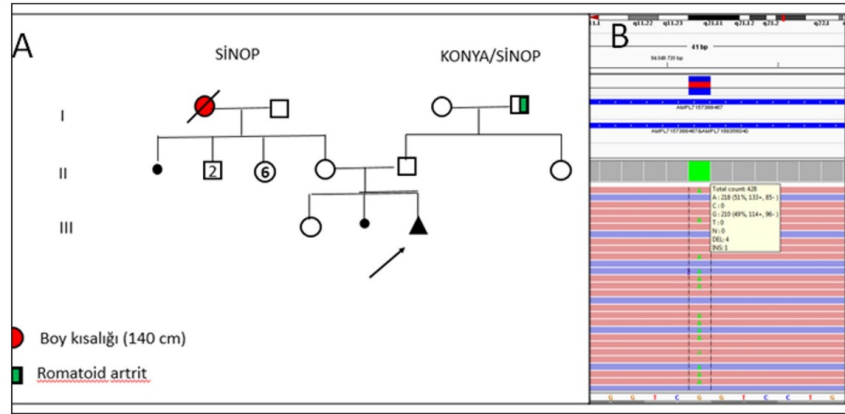
Olası Tanı: OI Tip IIA

4.1.15.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; *COL1A2* geninde heterozigot c.2152G>A (Gly718Ser) değişimi (Şekil 73 B).

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinen, yanlış anlamlı nokta mutasyonu. 73 B).

Konfirmasyon; YND okuma derinliği iyi, Sanger konfirmasyonu yapılmadı.



Şekil 73. Aile (OI#15) (A) aile ağacı. (B) İndeks olguda *COL1A2* geni c.2152G>A (Gly718Ser) heterozigot varyantına ait

IGV görüntüsü

4.1.16. Aile (OI#16)

4.1.16.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı: 34, Baba yaşı:34, G3P2TT1, 1.° Kuzen (Şekil 75 G)

USG bulguları; 20. GH, azalmış kalvaryum ve vertebral ossifikasyonu. Kraniumda prob kompresyonu ile bası bulgusu, toraks çevresi: 110 mm (10-25.p), humerus, ulna, femur, tibia, fibula <1.p, radius 14.p'de ve eğri. Bilateral femoral kırık. Sol ayakta PEV, sağ ayakta *rocker bottom* bulgusu.

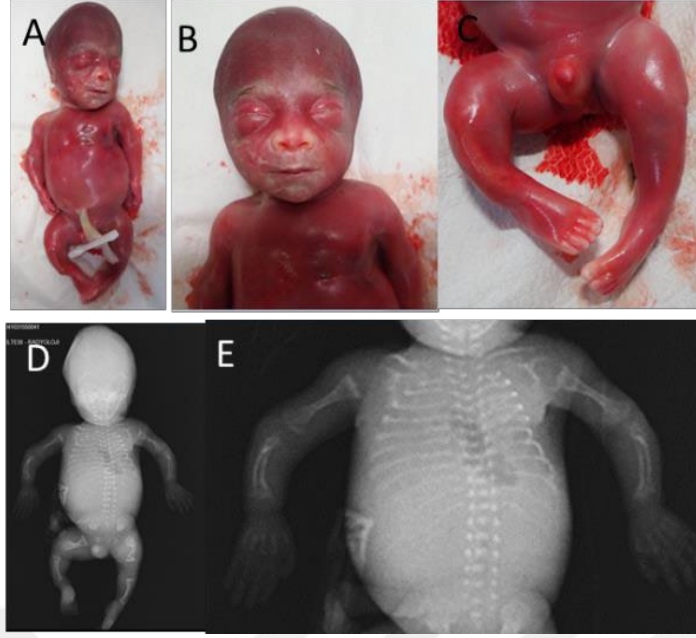
Olası tanı; OI Tip II

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Amniyosentez /46,XY

Gebelik akıbeti; 21. GH'da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; boy 25 cm, kulaç boyu 25,5 cm, tartı 590 gr, OFC 20 cm. Kafa kemikleri pinpon topu kıvamında. Skalp ve tüm vücut ödemli boyun kısa görünümde. Hipertelorizm, bilateral yukarı çekik palpebral fissürler, periorbital ödem, geniş ve basık burun kökü, geniş burun kemeri, uzun filtrum. Tüm ekstremitelerde rizo-mezomelik özelliği belirgin kısıklık ve bowing, sağ dirsekte 20° ekstansiyon kısıtlılığı. Alt ekstremitede, sağda daha belirgin bilateral femoral ve tibial *bowing*, bilateral PEV ve bilateral fırlak topuk. Palpasyonla sol femurda krepitasyon (Şekil 74 A-C)

X-ray bulguları; kalvaryum mineralizasyonu azalmış, tübüler kemikler kısa ve osteopenik görünümde. Ön kol, femur ve tibialarda belirgin eğrilik, metafizyel genişleme, sol femur proksimal metafizde fraktür, multiple kot kırıkları (sağda 6-11 kotlar, solda 8-11 arası distal 1/3'te). Vertebra ossifikasyonu görece normal, korpus yükseklikleri doğal (Şekil 74 D-F).



Şekil 74. Aile (OI#16), indeks olgu. (A-C). İndekse ait ekstremite ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

Klinik tanı; OI Tip II B

4.1.16.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; *P3H1* homozigot c.1852delC (p.Leu618Glnfs*20) (Şekil 75 H).

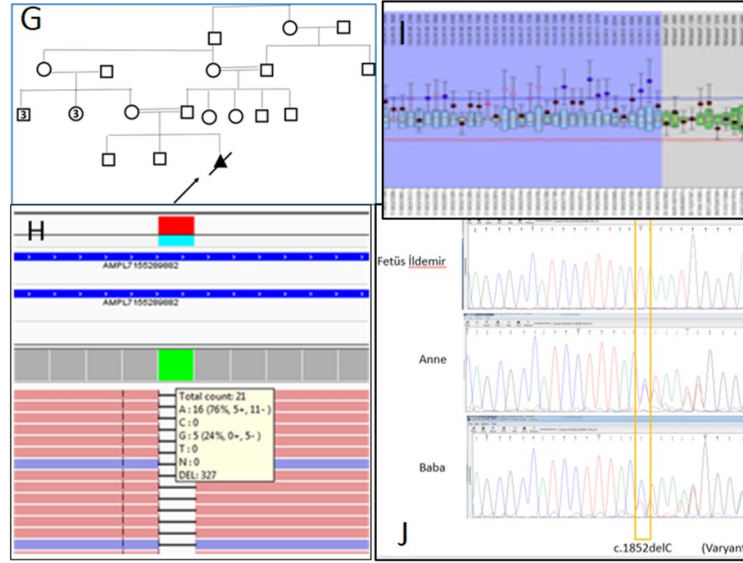
Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinmeyen *in silico* analiz programları tarafından patojenik tahmini verilen delesyon/çerçeve kayması

Konfirmasyon; Sanger dizileme (Şekil 75 J).

Parental analizler; anne-baba Sanger dizileme ile heterozigot (Şekil

75J).

MLPA sonucu; Normal (Şekil 75 I).



Şekil 75. Aile (OI#16) (G) aile ağacı. (H) İndeks olguda P3H1 geni c.1852delC (p.Leu618Glnfs*20) homozigot varyantına ait IGV görüntüsü (I) MLPA görüntüsü (J)İndeks ve ebeveynlerine ait elektroferogram görüntüsü

4.1.17. Aile (OI#17)

4.1.17.1. Klinik Bulgular

Aile öyküsü; Anne yaşı:27, Baba yaşı:32, G1TT1, Akrabalık yok (Şekil 77 G)

USG bulguları; 18(-) G,H tüm tübüler kemikler <5p. FL <3. p altında, ileri derecede açılanma ve eğrilik. Kranium kemiklerinde kompresyonla şekil değişikliği. Vertebra, klavikula ve skapulaların ossifikasyonu normal. Toraks çevresi normal (92 mm, 10-25 p). Kotlar özellikle sağ tarafta olası kırığa bağlı daha açılı ve düzensiz.

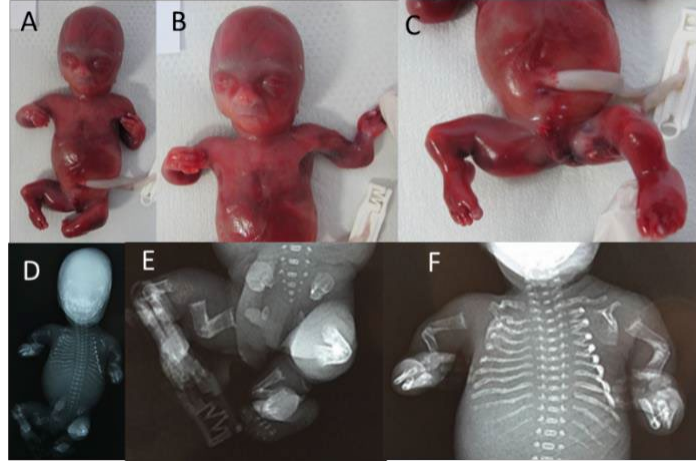
Olası klinik tanı; OI Tip II

Prenatal İnvaziv işlem/Karyotip: Aile işlem yaptırmak istemedi

Gebelik akıbeti; 19. GH'da tıbbi terminasyon

PM fizik muayene bulguları; boy 19 cm, tartı 260 g, OFC 14.6 cm, kulaç 18 cm. Kafa kemikleri yumuşak, pinpon topu kıvamında. Burun kökü düz ve geniş, burun ucu basık ve hafif bifid. Tüm ekstremitelerde kısalık, deformiteler ve *bowing*. Üst ve alt ekstremitelerde distalde daha belirgin olmak üzere ileri derecede açılanma (Şekil 76 A-C)

X-ray bulguları kalvaryum ossifikasyonu azalmış, tüm kemikler osteopenik görünümde. Her iki humerus, radius, ulna, tibia ve fibulada kallus oluşuma sekonder ileri derecede angulasyon. Bilateral femurlar kısa, kalın ve akordeon görünümünde, kotlar düzensiz ve *beading* görünümü. Platispondili, lateral grafide L4-L5 vertebralarda longitudinal kleft. (Şekil 76 D-F).



Şekil 76. Aile (OI#17), indeks olgu. (A-C). İndekse ait ekstremite ve fasiyal bulgular (D-F) Direkt grafi görüntüsü

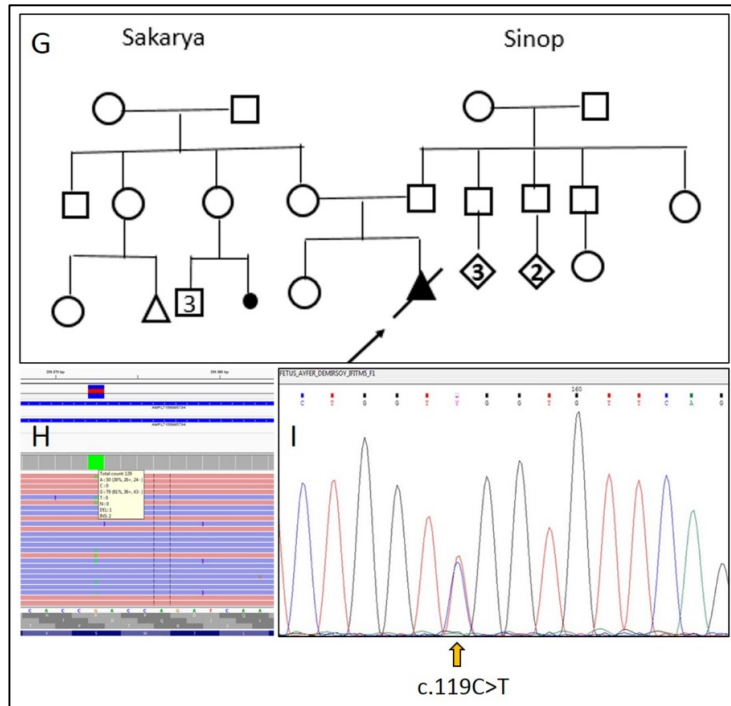
Klinik Tanı; OI Tip IIA

4.1.17.2. Moleküler Bulgular

Saptanan varyant; *IFITM5* geninde heterozigot c.119C>T (p.Ser40Leu) (Şekil 77 H).

Varyant özellikleri; Hastalık ilişkisi bilinen, yanlış anlamlı nokta mutasyonu

Konfirmasyon; YND okuma derinliği iyi, Sanger konfirmasyonu yapılmadı.



Şekil 77. Aile (OI#17) (G) aile ağacı. H) İndeks olguda *IFITM5* geninde c.119C>T (p.Ser40Leu) heterozigot varyantına ait IGV görüntüsü

4.1.18. Mutasyon Saptanmayan Olgular

Herhangi bir patojenik variant saptanmayan olgular dosya bilgileri, antenatal ve postmortem muayene bulgularıyla olası bir yeni projenin oluşturulmasına alt yapı sağlamak amacıyla yeniden değerlendirildi.

Olgu OI#18'de 21. GH'nda HC<3. p, AC<3 p, FL<3.p, humerus <5p ölçülmüş, simetrik IUGR, anhidroamnios, hiperekojenik barsak, uteroplasental yetmezlik saptanmıştı. Post-mortem muayenede simetrik IUGR'a ek olarak, hafif dolikosefali, belirgin alın, üçgen yüz, belirgin burun ve bilateral fırlak topuk yapısı dışında özellik yoktu. Babygramda; kemik mineral dansitesi ve yoğunluğunda ileri derecede azalma ve tübüler kemiklerde kısalık dışında, ek anomali izlenmedi. Olgunun bu özellikleriyle azalmış mineralizasyon grubu içindeki fenotipler açısından WES analiziyle değerlendirilmesi planlandı (Tablo 19).

Olgu OI#19'da post travmatik laserasyonlar ve maserasyon nedeniyle dismorfik değerlendirme suboptimal yapılabiliyordu. Yaygın cilt ödemi ve dev kistik higroma ile uyumlu olarak ileri derecede bol skalp ve ense cildi izlendi. Yarık damak, ptotik/hipoplastik dil, mikroretrognati saptanmıştır. Kranium hipomineralize ve platispondili mevcuttur Tüm tübüler kemiklerde orantılı hafif kısalık, metafizyel radyolüsensi ve cupping izlenmiştir. Olgunun Tip II kollajenopatiler açısından değerlendirilmesi planlanmıştır (Tablo 19).

Olgu OI#20'de 24. GH'nda tüm tübüler kemiklerde kısalık, sağ femurda kırık izlenmişti. Kalvaryum ve vertebra ossifikasyonu normal gözlenmiş, sağ radius diyafizinde radyoopasite, bilateral femur diyafizinde kallus ile uyumlu görünüm bulgularıyla ayırıcı tanısında OI III/IV tanıları yer almaya devam etmektedir (Tablo 19).

Olgu OI#21'de her iki humerusta, sağ ulna ve radiusta belirgin açılanma, her iki kolda fraktür izlendi. Bilateral tibia, ulna ve radiuslarda sağda belirgin şaftta bowing izlendi. Azalmış vertebra - kranium mineralizasyonu ve platispondili izlendi. Pubik ossifikasyon yoktu. Bu bulgularla OI ayırıcı tanıda ön planda yer almaya devam etti (Tablo 19).

Olgu OI#22'de antenatal ultrasonda oligohidramniyos, 10.p.'de femur uzunluğu, grade II hiperekojen barsak, lomber skolyoz, TUA?, mikrognati?, hipoplazik sol böbrek, sağ renal agenezi? saptanmış, postmortem muayenesinde dismorfizm, abdominal kaslarda hipoplazi, ekstremitte kaslarında hipertrofik görünüm, yaygın kontraktürler, kısa ve kalın, modeling anomalileri olan *bowed* femur-tibialar ve mikropenis mevcuttu. Ayırıcı tanıda ilk sırada kaba yüz görünümü, eklem kontraktürleri ve yumuşak doku hipertrofisi ile Caffey-like sendromu düşünüldü (Tablo 19).

Olgu OI#23'te antenatal USG bulguları (kısa tübüler kemikler, dar toraks, tübüler

kemiklerde bowing, kısa kotlar) ve olumsuz prognoz nedeniyle tahliye edilen 20 haftalık dışı fetusun postmortem muayenesinde Pierre-Robin sekansı, hafif dismorfizm kamptodaktili, ekstremitelerde kısalık ve eğrilik izlendi. Fetusun grafisinde ağır platispondili, kısa tübüler kemikler, metafizyel düzensizlikler/*cupping*, uzun kemiklerde *bowing* gibi iskelet sistemi bulgularıyla Bruck Sendromu tip II/ kifomelik displazi düşünüldü (Tablo 19).

Antenatal USG bulguları (IUGR, dar toraks), postmortem fizik muayene ve grafi bulguları (kraniotabes, ekstremitte kısalığı, kalvaryum, tüm tübüler kemikler ve aksiyel iskeletin yetersiz mineralizasyonu, platispondili, femurlarda ve tibiada bowing) ile ayırıcı tanıda Hipofosfatazya (perinatal-letal form) ve ikinci sırada osteogenezis imperfekta tip II düşünülerek panele alınan OI#24 olgusunda panel öncesi *ALPL* dizi analizinde mutasyon saptanmamıştı. Azalmış mineralizasyon grubu içindeki fenotipler açısından WES analiziyle değerlendirilmesi planlandı (Tablo 19).

19. GH'nda kraniyal ossifikasyonu olmadığı, tübler kemiklerde belirgin kısalık saptanan OI#25 olgusunda sol kol, sol ön kol ve sol femurda daha belirgin asimetric kısalık, sağ ön kolda ve bilateral femurlarda *bowing* bulgularıyla ayırıcı tanıda Tip II kollajenopatiler düşünülmüş ve WES analiziyle değerlendirilmesi planlanmıştır (Tablo 19).

USG'ye göre 21. gebelik haftasında kısa kotlar, dar toraks (66 mm), mikromeli ve kranium ossifikasyon kaybı izlenen olgu OI#26 'nın grafisinde kranium ossifikasyonu olmadığı, dar toraks, kotlarda multipl kırıklar ve *beading* saptanmıştı. Tüm tubuler kemiklerde mezomelik kısalık, eğrilik, femurlarda akordeon görünümü ile YND panel testte *CREB3L1* geninde ekzon 5'de saptanan c.605_606insC ve c.659_660insC insersiyonları SD ile doğrulanamadı. Panel-gen test sonuçları geriye dönük değerlendirildiğinde yalnızca geri okumalarda görüldüğü ve kalite skorunun düşük olduğu görüldü OI ön tanısıyla ileri incelemeler planlandı. (Tablo 18)

Tablo 18. YND ile Mutasyon Saptanmayan Olgular

Olgu	Karyotip	Akrabalık	OI ilişkili bulgular	Ek bulgular	Panel-gen testi sonucu *	Ion Torrent platformunda CNV analizi	Olası Tanı
OI#18	46,XX	-	Kemik mineral dansitesi ve yoğunluğunda ileri derecede azalma	simetrik IUGR, anhidroamnios, hiperekojenik barsak, uteroplasental yetmezlik	<i>COL1A2</i> geninde heterozigot c.1514G>C (Gly505Ala) değişimi SD ile doğrulanamadı	N	A/T: Azalmış mineralizasyon fenotipleri
OI#19	46,XY	-	Tüm tübüler kemiklerde orantılı hafif kısalık, metafizyel radyolusensi ve <i>cupping</i>	Hidrops, Yarı damak, ptotik/hipoplastik dil, mikro-retrognati	N	N	A/T: Tip 2 Kollajenopatiler

OI#20	46,XY	1° kuzen	Tüm tübüler kemiklerde kısalık, sağ femurda kırık	yok	N	N	A/T: OI III /IV
OI#21	46,XY	-	Üst ve alt ekstremitelerde fraktür, bowing Azalmış vertebra - kranium mineralizasyonu ve platispondili	Pubik ossifikasyon yokluğu	N	N	A/T: OI
OI#22	46,XY	1° kuzen	Kısa femurlar	oligohidramniyos grade II hiperekojen barsak, lomber skolyoz, TUA?, mikrognaði?, hipoplazik sol böbrek, sağ renal agenezi? kısa ve kalın, bowed femur-tibialar ve mikropenis, eklem kontraktürleri	N	N	A/T: Caffey-like sendromu
OI#23	46,XX	-	Kısa tübüler kemikler, dar toraks, tübüler kemiklerde <i>bowing</i> , kısa kotlar	Pierre-Robin sekansı, kamptodaktili, ağır platispondili, metafizyel düzensizlikler/cupping	N	N	A/T:Bruck Sendromu tip II
OI#24	46,XY	2° kuzen	Kraniotabes, ekstremitelerde kısalığı, kalvaryum, tüm tübüler kemikler ve aksiyel iskeletin yetersiz mineralizasyonu, platispondili, femurlarda ve tibiada <i>bowing</i>	IUGR	N	N	A/T: Kifomelik displazi
OI#25	46,XX	1° kuzen	Kraniyal ossifikasyon kaybı, tübüler kemiklerde belirgin kısalık ve <i>bowing</i>	sol femurda belirgin asimetrik kısalık	N	N	A/T: Azalmış mineralizasyon fenotipleri A/T:Hipofosfatazya(ALP L dizi analizi :N)
OI#26			Mikromeli ve kranium ossifikasyon kaybı kotlarda multipl kırıklar ve <i>beading femurlarda akordeon görünümü</i>		<i>CREB3L1</i> geninde ekzon 5'de saptanan c.605_606insC ve c.659_660insC insersiyonları SD ile doğrulanamadı	N	A/T: Tip II kollajenopatiler

5. TARTIŞMA

Osteogenezis imperfekta, OD, OR ve X'e bağlı kalıtım modelinin görüldüğü nadir genetik bir hastalıktır. Perinatal dönemde letal formlardan, ilerleyen yaşlardaki hafif formlara kadar klinik bulguları değişkenlik gösterir. Hastalığın genetik etyopatogenezinde, çoğunlukla tip I kollajeni kodlayan *COL1A1* ve *COL1A2* genlerinin dominant kalıtılan mutasyonları rol oynar. Bu genlerin kodladığı proteinlerin her biri, amino ve karboksil terminal uçlarından propeptitlerle çevrili (Gly-Xaa-Yaa)_n tripeptidinin kesintisiz tekrarlarından oluşan alfa zincirlerini kodlar (106). Tripeptidi kodlayan 43 eksonun her biri bir glisin (Gly) kodonu ile başlar ve bir Y-pozisyonu kodonu ile biter (116). 2000' li yılların başından itibaren, OI fenotipi ile ilişkilendirilen genlerin tanımlanması hastalığın moleküler etyolojisinin gelişmesine neden olmuş, iskelet sistemi hastalıklarının 2015 yılında revize edilen son nozolojisinde azalmış kemik dansitesi grubunda 20 den fazla genle ilişkili OI fenotipi tanımlanmıştır (2, 11).

OI'nin genetik heterojenitesi ve Tip 1 kollajeni kodlayan genlerin ekzon sayılarının çok ve intronlarının büyük olması nedeniyle Sanger yöntemi ile dizilenmesi yüksek maliyet ve yoğun emek gerektirmektedir. Dünyadaki birçok merkezde etyolojisinde çok sayıda ve büyük genin tanımlandığı hastalıklarda YND temelli panel testler kullanılmaktadır. 2017 yılında Liu ve ark. tarafından yapılan ve *Osteoporos Int* 2017'de yayınlanan kohortta 101 aileden 103 olguda YND panel tekniği kullanılarak OI ile ilişkili 14 gende patojenik dizi varyantları araştırılmış, genotip fenotip korelasyonu irdelenmiş, 43'ü daha önce tanımlanmamış 75'i OD, 15'i OR, toplam 79 farklı mutasyon tariflenmiştir. 2016 yılında *Kristof Arvai* ve ark. tarafından OI ile ilişkili 19 gende YND tekniği kullanılarak yapılan analizde olguların yaklaşık % 90'ında saptanan 4 gene ait

(*COL1A1*, *COL1A2*, *CRTAP* ve *LEPRE1*) 126 ekzon aynı anda incelenmiş ve 3'ü yeni olmak üzere 23 farklı varyant tespit edilmiştir. Bu çalışmada özellikle klinik olarak hafif etkilenmiş OI tanılı olguların moleküler tanı alması mümkün olmuş OI alt tiplerine ait fenotipik bulgular genişletilmiştir. Çalışma OI'nın gelişiminde rol oynayan gen ve varyasyonların her geçen gün sayıca artması, konvansiyonel yöntemlere kıyasla hızlı, kapsamlı ve varyant bulmadaki yüksek potansiyeliyle YND teknolojisinin özellikle prenatal tanı sürecindeki önemine vurgu yapmış, aile öyküsü olmayan, klinik OI tanılı olgularda kollajen genlerinde mutasyon tespit edilememesi durumunda OI ile ilişkili tüm genlerin dahil edildiği genişletilmiş panellerin kullanılması önerilmiştir. Hedefli panel-gen testi tüm ekzom analizi yaklaşımı ile kıyaslandığında, belli bir fenotip ile ilişkisi bilinen genler daha yüksek kapsam ve okuma derinliğinde analiz edilebildiğinden, bu çalışmada OI ile ilişkisi tanımlanmış 26 geni çeren panel-gen testi yaklaşımı tercih edilmiş ve olgular moleküler genetik açıdan değerlendirilmiştir.

YND ile panel-gen tekniğinde kütüphanenin hazırlanması ve biyoinformatik analizlerin tasarımı kaliteli sonuçlara ulaşmanın en önemli araçlarındandır. Ancak, kapsanmayan ve düşük tekrarlı okunan bölgelerdeki varyantların atlanması, tekrar bölgelerindeki artışların saptanamaması ve özel analizler hariç delesyon/duplikasyon bölgelerinin tespit edilememesi testin duyarlılığının düşmesine neden olmaktadır. Öte yandan YND yöntemi yüksek tekrarla okunan bölgelerde klasik yöntemlerle saptanamayan düşük oranlı mozaizmin gösterilmesinde çok başarılıdır. İyi kalitede ve derinlikte okunmuş olan varyantların Sanger dizileme ile doğrulanmasına gerek duyulmazken, orta kalitedeki varyantların varlığı mutlaka doğrulanmalı, kapsam dışı kalan ya da düşük kapsamda okunan bölgeler, Sanger dizi yöntemi ile taranmalıdır. Analiz sonrasında bilinen genlerde kalıtım modeline uygun olarak yeni tanımlanan ve *in silico* analiz programları ile patojenik /olası patojenik olarak yorumlanan değişimlerin de Sanger dizileme yöntemi ile doğrulanması ve ailede segregasyon analizi ile desteklenmesi gerekmektedir. YND ile saptanan varyantların hastalık ilişkili olup olmadığının değerlendirilmesinde özellikle önemi bilinmeyen varyantların (VUS, *variant of unknown significance*) yorumlanması veritabanları ve güncel literature ragmen kolay olmayıp aile içi ko-segregasyon çalışmaları ile desteklenmelidir.

Bu çalışmada antenatal dönemde, ayırıcı tanıda OI düşünülen 26 olguda OI ile ilişkili hedef genlerin özgün tasarlanmış panel-gen testi ile dizilenmesi, *COL1A1* genine özgü MLPA yöntemi ile delesyon/duplikasyonların araştırılması ve YND ile elde edilen verilere dayanan kopya sayısı değişikliklerinin *i s t a t i s t i k s e l y ö n t e m l e r l e* araştırılması planlandı ve sonuçlar demografik, klinik, ultrasonografik, radyolojik ve fenotipik özellikler açısından

yorumlandı.

Olgulara ait demografik verilerin incelenmesinde 26 olgunun 11'inin Karadeniz bölgesinden, 10'unun Doğu-Güneydoğu Anadolu bölgesinden, birer olgunun Ege ve Marmara bölgesi, üç olgunun da Yugoslavya- Moldovya-Arnavutluk kökenli oldukları bildirildi. Akraba olan ebeveyn sayısı 5/26, yakın yerleşim yerinden olan ebeveyn sayısı 7/26 iken, akrabalık ilişkisi olmayan olgu sayısı 14/26 olarak saptandı. OI'de OD kalıtılan tipler için etnik-bölgesel ya da cinsiyet temelli farklılıklar bildirilmemiştir. Literatürle benzer olarak patojenik variant tanımlanan 17 olgunun kliniği ile etnik kökeni ve cinsiyeti arasında da anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (9 erkek/8 dişi). Letal iskelet displazilerinde klinik genellikle erken gebelik haftalarında ve daha ağır bulgularla ortaya çıktığından gebelikte tanı alma zamanı açısından olgular incelendiğinde 11 olgunun 20. gebelik haftasından önce tanı aldığı belirlendi.. Son üç ayda patolojik USG bulgusuyla iki olgu (OI# 3 ve OI#16) *COL1A1*'de saptanan mutasyonları ile tanı alırken, non-kollajenöz genlerle (*P3H1* ve *IFITM5*) patojenik değişimler taşıyan olgular (OI#17 ve OI#18) sırayla 20. ve 18. gebelik haftalarında tanı almıştır. 3. trimestırda tanı alan iki olgudan (OI#3 ve OI#16) birinin erken dönem USG'sinde patolojik bulgu saptanmadığı, diğerinde ise takipsiz gebelik öyküsü nedeniyle tanı gecikme olduğu raporlanmıştır. Prenatal dönemde invaziv işlem seçiminde olguların 7'sinde CVS, 7'sinde AS, 3'ünde kardiyosentez, 2'inde KS yapılmış, hiçbir olguda işleme bağlı herhangi bir komplikasyon bildirilmemişti. İnvaziv işlem yaptırmak istemeyen aile sayısı 7 idi. Patojenik variant saptanan 17 olgunun tamamına yakınında antenatal USG'de azalmış kraniyal ossifikasyon ve tüm tübüler kemiklerde kısalık saptanırken, hastalığa ait klasik bulgulara ek olarak bir olguda ekojenik (Grade II) ve dilate barsaklar, minimal asit, VSD şüphesi hipoplazik pelvis bulguları, bir olguda ambigu genitalya, diğer bir olguda ise yaygın vücut ödemi tespit edilmiştir.

26 olguda 4 ayrı gende (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*) 7'si daha önce tanımlanmamış ancak *in silico* analiz programlarından patojenik/olası patojenik yorumuna ulaşılmış, toplam 17 değişim (% 69,2; 18/26) saptanmıştır. Değişimlerin % 46,1'i *COL1A1* (12/26), %11,5'i *COL1A2* (3/26), %3,8'i *P3H1* (1/26), %3,8'i *IFITM5* (1/26) geninde yer aldı.

OI'de genotip-fenotip ilişkisini anlamlandırmaya çalışan birden fazla model geliştirildi. Modelleme çalışma verileri, iki kollajen zincirinin matris bütünlüğünde farklı roller oynadığını, *COL1A1*'deki mutasyonların genellikle *COL1A2*'deki mutasyonlardan daha sık görüldüğü ve daha şiddetli bir fenotip ile ilişkili olduğunu göstermekle birlikte her iki gendeki benzer mutasyonlar, geniş ölçüde değişken fenotipler sergileyebildiğinden, genotip-fenotip korelasyonu tam olarak açıklanamamaktadır (244). Olgu serimizde de patojenik varyantlar literatüre benzer şekilde çoğunlukla *COL1A1* geninde saptanmıştır. *COL1A1* geninde letal değişimlerin dağılımı tüm zincir boyunca eşit değildir. İlk 200 amino asitteki yer değişimleri genellikle katlanma ve sarmal stabilitesini etkilemediğinden letal değildir. Peptidin ilk 22 amino asiti, transkripti endoplazmik retikuluma yönlendirmek, 23-161 arasındaki amino asitler ise propeptid domainini oluşturmakla görevlidir. (UniProt; *COL1A1_HUMAN*-P02452). Olgu grubumuzda ilk 200 amino asit içinde herhangi bir patojenik varyant saptanmamıştır.

Kollajen peptidlerinin mekanik özelliklerinin, glisin mutasyonlarına değişen derecelerde bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Değiştirilen amino asitlerin hidropati endeksi (*H endeksi*, bir amino asitin hidrofobik veya hidrofilik olmasını tanımlar) ve kalıntı hacmi (*V*) gibi bazı özelliklerinin OI hastalığının ciddiyet derecesi ile ilgili peptidin mekanik özelliklerini değiştirdiği ve molekülün sertliğinin bu iki faktörün fonksiyonuyla ilişkisini gösteren çalışmalar vardır (244, 245). Mutasyon tipleri açısından her iki gende glisinin yerine serin, sistein ve arjinin gelmesiyle oluşan yer değiştirmelerin tahmin edilenden daha sık meydana geldiği ve tüm α -1 substitüsyonlarının % 78.6'sını, sisteinle ikame edilmesi, her iki zincirdeki vakaların yaklaşık % 25'inde oluşturduğu bildirilmiştir. Olgu grubumuzda glisin değişimlerinin 12'si *COL1A1* geni, üçü ise *COL1A2* geninde yer almaktadır. *COL1A1*'deki 12 glisin değişiminin 7'si serin, biri valin (p.Gly338Val) diğeri ise sistein (p.Gly428Cys) değişimleridir (Tablo 19). *COL1A2* geninde saptanan iki yanlış anlamlı (p.Gly1045Asp ve p.Gly718Ser) değişimin biri aspartat, diğeri ise serin olup, bu değişimlerin ikisi de daha önce tanımlanmamıştır. Serin yan, karşıt zincir veya su ile hidrojen bağı yapabilen hidrofilik bir amino asittir. *COL1A1*'de aynı kodonda saptanan serin değişimi (c.1678G>A; p.Gly560Ser), olgu grubumuzda iki farklı olguda (OI#6 ve OI#8) gösterilerek klinik tablolarının literatür ile uyumlu olduğu saptanmıştır (236). Olgu OI#6'da, femurlarda hafif *telefon ahizesi* görünümü, sol humerusta kallus görünümü ve kafatası kemikleşmesinde azlık nedeniyle terminasyon sonrası ayırıcı tanıda OI düşünülmüş, ancak, kırıklara bağlı *crumpled* görünümün letal tipte saptanan yoğunlukta olmaması nedeniyle alt tiplendirme yapılamamıştı. OI#8'de ise OI tanılı annenin gebeliğinin, 21. haftasında USG'de; tüm tübüler kemiklerde kısalık, femurlarda belirgin açılanma ve fraktür bulguları ile takibe alınmıştı. Anne adayının postnatal femoral fraktür öyküsü ile

doğduğu, normal skleraya sahip olup, ergenlikten sonra kırıklarında azalma olması nedeniyle OI Tip IV tanısı almıştı. USG takibi sonrası aile, süregelen gebelik için devam kararı vermişti. Tez yazım aşamasında doğumu gerçekleştiren ancak postnatal muayenesi yapılamayan OI#8 ile ilgili aileden alınan bilgide sol alt ekstremitede kalçadan itibaren hiperfleksiyon postürü, eğri femur ve eklem laksitesi bulgularıyla doğduğu, radyolojik değerlendirmesinde kırık saptanmadığı öğrenilmiştir.26 olgunun içinden canlı doğumla sonuçlanan bu tek olgudaki süreç yönetiminde; aile öyküsü varlığında ayırıcı tanının kolaylaştığı ancak fenotipik variabilitenin prenatal dönemde verilen genetik danışmada zorluklara neden olduğu ve yaşayan olguların postnatal dönemde klinik, radyolojik ve biyokimyasal olarak yeniden değerlendirmesinin önemli olduğu birkez daha vurgulanmış oldu.

Aspartik asit, arjinin ve valin gibi yüklü ya da dallı bir yan zincire sahip olan amino asit kalıntıları, genellikle $\alpha 1$ zincirinde meydana geldiğinden öldürücü fenotiplerle sonuçlanmaktadır. $\alpha 1$ olgularının % 73'ünde letal değişim valin ile, %15'i alanin ile ilişkili bulunmaktadır (106). Valin, $\alpha 2$ ile ilişkili değişimlerin sadece %17'sinde öldürücüdür. $\alpha 2$ zincirinin amino-terminalindeki glisin değişikliklerinin %30'u letal seyrederken, $\alpha 2$ karboksil terminalindeki değişiklerin %60'ı letal sonuçlar doğurur. Çalışmamızda OI#9'da *COL1A1* geninde (p.Gly1106Arg) bir adet arjinin değişimi, olgu #11'de *COL1A1* geninde valin değişimi (p.Gly338Val) ve olgu #15'te *COL1A2* geninde p.Gly1045Asp değişimi saptanmıştır. Olgu grubumuzda, toplamda her iki gende sadece dört olguda glisinin serin dışındaki amino asitlere değişim olduğu gözlenmiştir.

OI şiddetinin kollajen molekülü boyunca serpiştirilmiş önemli ve önemli olmayan bölgeleri yansıttığını belirten bir diğer model olan bölgesel modelde ligand bağlanma yerlerini temsilen '*lethal cluster*'lar tanımlanmıştır (106, 221, 222, 223). Çalışmalar, $\alpha 1$ veya $\alpha 2$ zincirlerinde aynı glisinin çoklu değişimlere uğradığını ve bunun $\alpha 1$ zincirinin uzunluğu boyunca dağılan CpG dinükleotitleriyle ilişkili olabileceğini varsaymaktadır. Ancak $\alpha 1$ veya $\alpha 2$ zincirlerinde glisinin yer değişikliği yapmadığı iki bölge (484-493 ve 721-736 arası) tanımlanmıştır. Bu alanlarda patojenik varyant saptanmamasının nedeni değişimlerin eksik kapsanması ya da klinik olarak tespit edilmeyen embriyonik letal sonuçları yansıtması nedeniyle olabilir (220). Literatürle uyumlu olarak, bizim olgularımızın da hiç birinde bu amino asit bölgelerinin bulunduğu kümelerde (484-493 ve 721-736 arası) patojenik bir değişime rastlanmamıştır. Yalnızca iki letal bölge (691-823 ve 910-964), ana ligand bağlanma bölgeleriyle (MLBR'ler) hizalanarak kollajen monomerlerinin veya fibrillerin integrinler, matris metaloproteinazlar (MMP'ler), fibronektin ve kıkırdak oligomerik matriks proteini (MMP'ler) ile önemli etkileşimlerini

gösterir. (106). Çalışmamızda OI#4'te *COL1A1*'de ekzonda p.Gly809Ser varyantı, OI#10'da 33. ekzonda p.Gly779Ser değişimi, OI#12'de ise ekzon 31'de p.Gly701Ser değişimlerinin bu tanımlanan letal bölgeler içinde yer aldığı tespit edilmiştir.

Tablo 19. *COL1A1 ve COL1A2 genlerinde saptanan Glisin>Serin dönüşümüne neden olan patojenik değişimlerin antenatal, postnatal ve moleküler tanı ile birlikte klinik sınıflandırması gösterilmektedir.*

Olgu	Gen	Protein	Antenatal Tanı	Postnatal Tanı	Moleküler Tanı
OI#3	<i>COL1A1</i>	p.Gly1049Ser	OI tip III	OI Tip II B	OI Tip III
OI#4	<i>COL1A1</i>	p.Gly809Ser	OI Tip II	OI Tip II A	OI Tip II
OI#6	<i>COL1A1</i>	p.Gly560Ser	OI Tip II	OI Tip II	OI Tip IV
OI#7	<i>COL1A1</i>	p.Gly1076Ser	OI Tip II	OI Tip II	OI Tip II
OI#8	<i>COL1A1</i>	p.Gly560Ser	OI Tip IV	OI Tip IV	OI Tip IV
OI#10	<i>COL1A1</i>	p.Gly779Ser	OI Tip II	OI Tip II A	OITip III/IV
OI#12	<i>COL1A1</i>	P.Gly701Ser	OI Tip II	OI Tip II	OI Tip III
OI#16	<i>COL1A2</i>	p.Gly718Ser	OI Tip II	OI Tip II A	OI Tip II

Kollajen genlerinde glisinin yanlış anlamalı değişimlerinden sonra, en sık görülen varyant tipi kırılma bölgesi değişiklikleridir (216). Bu tür değişimler, ekzon atlama, intronların okunan bölgeye katılmasına, intron veya ekzonlardaki kriptik alanların aktivasyonuna yol açabilir. Kırılma hatası değişimlerinin mRNA ve protein üzerindeki etkisi, bu değişikliklerin çerçeve içinde olup olmaması veya translasyonel değişimler üretip üretmemesine bağlıdır. OI varyant veri tabanında 300'ün üzerinde kırılma hatasına neden olan değişim bildirilmiştir (233). *COL1A1* ve *COL1A2*'deki kırılma hatası mutasyonları nadiren letaldir. *COL1A1* donör bölgesinde gözlenen en yaygın dizi değişikliği G>A geçiştir (230). *COL1A1*'de intronların alıcı bölgelerindekinin aksine, verici tarafta G>A değişimi farklı OI fenotiplerine yol açabilir. Aynı intronda aynı mutasyonlara sahip kişilerin genellikle benzer fenotiplere sahip olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda daha önce bildirilmemiş, biri *COL1A1* geninde SA (*splicing acceptor*) bölgesinde (c.2398-2A>G), diğeri *COL1A2* geninde SD (*splicing donor*) bölgesinde (c.3159+1G>A) olan iki kırılma hatası değişimi saptanmıştır. Literatürde *COL1A1* genindeki SA bölgesindeki c.2398-1G>A değişimi daha önce Schleit ve ark. (2015) tarafından OI ile ilişkilendirilmiştir (230).

Mutasyonların fenotiple ilişkisini anlamlandırmaya çalışan fenotip-gradyan modelinde, mutasyonun üçlü sarmal üzerindeki konumu, hastalık şiddetini belirleyen temel faktördür. Propeptidler prokollajenin her iki ucunda yer alır ve peptidin çözünürlüğünü artırır, translasyon sonrası modifikasyon işlemi sırasında hareketini sağlar. Bu modelde katlanma C-terminalden başlayıp N-terminale doğru ilerlediğinden, N-terminale yakın yerleşim gösteren mutasyonların, C-terminale yakın yerleşim gösteren mutasyonlardan daha hafif fenotip göstermesi beklenmektedir (224). Amino terminal propeptid (N-propeptid) bölgesinde meydana gelen değişimler defektif çapraz bağların olduğu OI/EDS fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir (196). Eklem laksitesi ve ciltte hiperekstansibilitenin klasik OI fenotiplerine eşlik ettiği bu hafif tabloda, mutasyon nedeniyle N-propeptid bölgesi çıkarılamaz, olgunlaşmamış çapraz bağlar ve stabilitesi azalmış prokollajenin katlanması bozulur (196). Olgu grubumuzda N- propeptid bölgesinde herhangi bir patojenik değişim saptanmamıştır. Karboksil- terminal propeptid (C-propeptid) bölgesini etkileyen değişimler ise genellikle, sisteinin yan zincirindeki *thiol* ile kurulan disülfid bağlarının bozulması ile ortaya çıkar. Bu bölgeki mutasyonlar üçlü heliks mutasyonlarına göre oldukça nadir gözlenir. C-propeptid mutasyonları ile ilgili literatürde, gecikmiş trimerizasyon, azalmış sekresyon ve azalmış prokollajen üretimine neden oldukları (117) ve bu görevlerine ek olarak osteoblastların erken farklılaşma döneminde, TGF- β ve kollajen sentezini modüle eden bir sinyal molekülü gibi davrandıkları bildirilmiştir (185). Ek olarak *COL1A1* ve *COL1A2* genlerinin C-propeptid ayrılma bölgesinde yer alan değişimlerin saptandığı bazı olgularda (p.Asp1441Tyr, p.Thr1416RfsX10, p.Ala1387Val), tipik OI bulgularına ek olarak artmış kemik yoğunluğunun saptandığı farklı fenotipler de bildirilmiştir. Olgu grubumuzda olgu#5'te *COL1A1* geni ekzon 50'de saptanan heterozigot c.4238A>G (p.Asp1413Asn) varyantı C-propeptid bölgesi içinde yer alan ve literatürde daha önce tanımlanmamış bir değişimdir. Literatürde aynı bölgede c.4237G>A (Asp1235Asn) değişimi OI Tip II (234), c.4239T>A (Asp1235Glu) değişimi ise OI Tip I ile ilişkilendirilmiştir (235).

COL1A1 ve *COL1A2*'de saptanan klasik OI değişimlerinin yanı sıra 2000'li yıllardan sonra çoğunlukla otozomal resesif kalıtılan non-kollajenöz genler de OI fenotipleriyle ilişkilendirilmiştir. Olgu grubumuzda *COL1A1*/*COL1A2* genlerinin dışında yer alan diğer 24 genin sadece ikisinde patojenik varyant saptanmıştır. Bunlardan biri *P3H1* diğeri ise *IFTM5* genidir. Bu genler genellikle Tip I kollajen ile etkileşime giren, kollajen sentezi, katlanması ve translasyonel modifikasyon, kollajenin hücre içi trafiği ve kollajen fibrillerinin çapraz bağlanması ile ilişkili farklı fonksiyonlara sahip olan proteinleri kodlar. Çalışma grubumuzda *P3H1* geninde saptanan değişim daha önce tanımlanmamış çerçeve kaymasına

neden olan homozigot (c.1852delC/ p.Leu618Ter) bir delesyon idi. Birinci derece kuzen olan ebeveynlerine yapılan Sanger dizi analizi heterozigot ebeveynlerin taşıyıcı olduklarını göstermiş ve aileye OR tipi kalıtım modeline uygun genetik danışma verilmiştir.

Çalışma grubumuzda OI Tip II fenotipiyle prezente olan bir olguda *IFITM5* geninde heterozigot c.119C>T (p.Ser40Leu) değişimi (OI# 8) saptanmıştır. OD kalıtım gösteren *IFITM5* geni, OI Tip V ile ilişkilidir. Literatürde *IFITM5* geninde c.119C>T mutasyonu saptanan olgunun 20.gebelik haftasında tüm tübüler kemiklerinde kısalık ve eğrilik saptandığı, 40. GH'ında 42,5 cm boy (<3p) ve 9/10 APGAR'la doğduğu, çok sayıda kot kırığı, dar toraks ve kalça dislokasyonu izlendiği bildirilmektedir. Yaygın osteoporozu olan olguya 4 aylıkken pamidronat tedavisi başlandığı, 18 aylıkken diş sürümünde gecikme ve motor geriliğe sahip olduğu, 5 yaş kontrolünde ise 2 kot fraktürü ve 3 kez sağ femur fraktürü öyküsü olduğu bildirilmiştir. Bilişsel fonksiyonları ve dil gelişimi normal olan olgunun beş yaşında iken halen desteksiz yürüyemediği bildirilmiştir. Sonraki yıllarda değişimle ilgili bildirilmiş yeni olgularda (153) OI Tip V'e özgün bulguların (hiperplastik kallus, interosöz kalsifikasyon, radius başı dislokasyonu) tümünün mutasyon bildirilen olgularda bulunmadığı ve fenotipik heterojenitenin gözlemlendiği bildirilmiştir. Olgumuzun postmortem radyolojik incelemesinde heterojeniteyi destekler şekilde hiperplastik düzeyde kallus oluşumları saptanmadı. Değişim Sanger dizileme yöntemi ile doğrulanmış olup, anne babada segregasyon analizi yapılamamış ve değişim bölgesinin türler arasında evrimsel olarak korunması nedeniyle patojenik olarak kabul edilmiştir.

COL1A1'in OI ile ilişkisi ilk kez 1983 yılında, gendeki delesyonla saptanmıştır. (92). Ancak kollajen tip I genlerinin çok ekzonlu büyük delesyonları oldukça nadirdir. Literatürde az da olsa yayınlanmış kısmi ya da tüm gen delesyonlarının varlığı MLPA tekniğinin de tanısal yaklaşımda kullanılmasını önermektedir (23). Genel olarak, *COL1A1* veya *COL1A2* genlerindeki çerçeve içinde kalan delesyonların üçlü sarmalın içine girerek dominant negatif etki ile letal veya şiddetli bir OI fenotipi ile sonuçlanabileceği bildirilmektedir. Kollajen genlerinin delesyonları “dur” kodonu veya çerçeve kayması mutasyonlarına benzer fenotipte de ortaya çıkmaktadır. Ancak yanlış anlamlı mutasyonlar katlanmayı bozduğu için null mutasyonlardan daha ağır fenotipe yol açmaktadır. Tüm *COL1A1* genini içeren 17q21.33 lokusundaki delesyonda *COL1A1* alelinin tamamen silinmesinin, *COL1A1* ekspresyonu üzerinde yukarıda tarif edilen dominant negatif etkiyi ortadan kaldırdığı ve daha hafif bir klinik tablo ile sonuçlandığı görülmüştür (232). Mavi sklera, doğumda kırık öyküsü, osteopeni, mikrognati, yarık damak ve marfanoid özelliklerle *COL1A1*'in tümünü içeren 17q21.33-q23.1 delesyonu bildirilmiştir (235). Mikroarray analiziyle incelenen diğer bir örnekte, sadece *COL1A1*'in değil komşu genlerin (*DLX3* ve *DLX4*) de dahil olduğu ardışık gen

sendromu tablosunda dişlerde diskolorasyon ve kemik kırılabilirliğinde artış bulguları saptanmıştır (234). Bu nedenle *COL1A1/COL1A2* dizi analiziyle herhangi bir patojenik değişim saptanmamış özellikle kollajen genleriyle ilgili kalıtım paterni veya klinik bulguları varlığında MLPA ile olası delesyon ve duplikasyonların dışlanması önerilmektedir (234). Olgu grubumuzda *COL1A1* genindeki CNV'ler için MLPA kitlerinin kapsadığı genin ilgili bölgelerinde (Ekzon 1-51) delesyon/duplikasyon analizi yapılmıştır. Referans örnekler seçilerek, önce fragman analizi ardından karşılaştırmalı istatistiksel analiz yapılmış, böylelikle gendeki olası delesyon veya duplikasyonlar dışlanmıştır.

Olgularımızda, panel-genlerde olası CNV'ler, IonTorrent platformunda yapılan YND verileri kullanılarak geniş hassasiyetli güvenlik (*confidence*) skorları (10) ve MAPD değerleri (0.3) temel alınarak incelendi ve dışlandı.

Üçlü sarmal alan içindeki herhangi bir ekleme veya silinme üçlü sarmalın düzgün bir şekilde katlanmasını bozar. Çalışmamızda OI#26'da *CREB3L1* geninde YND ile saptanan iki farklı insersiyon Sanger dizileme ile doğrulanamamıştır. Her ikisi de *CREB3L1* geni ekzon 5'de bulunan c.605_606insC ve c.659_660insC insersiyonları veri tabanlarında daha önce tanımlanmamış ancak, *in silico* tahmin programları tarafından patojenik olarak değerlendirilmişti. Sanger dizi ile doğrulanamayan bu değişimler için panel-gen test sonuçları benzer şekilde geriye dönük değerlendirildiğinde çift yönlü okumalarda görülmediği, kalite skorunun düşük olduğu ve saptanan mutasyon bölgesini kapsayan ampikon açısından da panelin hassasiyetinin düşük olduğuna karar verilmiştir.

Sonuç olarak letal OI formlarının altında yatan mekanizmaların çeşitliliği göz önüne alındığında, genotip ve fenotip arasındaki ilişkinin anlaşılması, hali hazırda mevcut olandan daha fazla sayıda klinik veriyi ve patojenik varyantın tespitini gerektirmektedir. Karmaşık modelleme sistemlerinin olduğu, genetik heterojenitesi olan hastalıklarda ailelere verilecek genetik danışmada en doğru strateji yukarıda bahsedilen ve her biri ayrı bir yaklaşımın parçası olan moleküler modellerin temsil ettiği bilgiyi çoklu tahmin araçlarıyla birleştirerek yorumlamaktır. Umuyoruz ki çalışmamızdan çıkan yeni varyantlar, genotip-fenotip ilişkilerini incelemek için mevcut bilinen bu moleküler/klinik modellere katkı sağlar.

6. KAYNAKLAR

1. Rimoin DL, Cohn D, Krakow D, Wilcox W, Lachman RS, Alanay Y. The skeletal dysplasias: Clinical-molecular correlations. *Skeletal Biology and Medicine*, Pt B. 2007;1117:302-9. PubMed PMID: WOS:000252266600026
2. Spranger J. International classification of osteochondrodysplasias. The International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. *Eur J Pediatr* 1992; 151: 407e15.)
3. Bonafe L. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet Part A* 167A:2869–2892
4. Rasmussen SA, Bieber FR, Benacerraf BR, Lachman RS, Rimoin DL, Holmes LB. Epidemiology of osteochondrodysplasias: changing trends due to advances in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet*. 1996;61:49–58.
5. Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *DPAm J Med Genet A*. 2012 May; 158A(5):1038-45.
6. Peter GJ Nikkels Diagnostic approach to congenital osteochondrodysplasias at autopsy 2009
7. Ngo C, Viot G, Aubry MC, et al. First-trimester ultrasound diagnosis of skeletal dysplasia associated with increased nuchal translucency thickness. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30:221.)
8. Deborah Krakow, MD,1,2,3,7 Ralph S. Lachman, MD,1,4,5 and David L. Rimoin Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias, 2009.
9. Doray B, Favre R, Viville B, et al. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. A report of 47 cases. *Ann Genet* 2000; 43:163.
10. Hall CM. International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *Am J Med Genet* 2002; 113:65.].
11. Warman ML1, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin DL, Robertson S, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision.. *Am J Med Genet A*. 2011 May;155A(5):943-68
12. David Sillence, Nosology and Classification of Osteogenesis Imperfecta 230 Years of Discovering Genetic Heterogeneity, 13th International Conference on Osteogenesis Imperfecta, 2017

13. OMIM Update new List 2019 Jun
14. Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Jun 14;7(9):540-57
15. Sillence D. Osteogenesis imperfecta: an expanding panorama of variants. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 1981 Sep;(159):11-25.
16. Shapiro F. Consequences of an osteogenesis imperfecta diagnosis for survival and ambulation. *J Pediatr Orthop*. 1985 Jul-Aug;5(4):456-62,
17. Jain M, Tam A, Shapiro JR, Steiner RD, Smith PA, Bober MB, Hart T, Cuthbertson D, Krischer J, Mullins M, Bellur S, Byers PH, Pepin M, Durigova M, Glorieux FH, Rauch F, Lee B, Sutton VR, , Members of the Brittle Bone Disorders Consortium, Nagamani SCS. Growth characteristics in individuals with osteogenesis imperfecta in North America: results from a multicenter study. *Genet. Med*. 2019 Feb;21(2):275-283]
18. Surabhi Subramanian; Vibhu Krishnan Viswanathan, Osteogenesis Imperfecta Last Update: February 3, 2019.)
19. Sillence DO, Barlow KK, Garber AP, Hall JG, Rimoin DL Osteogenesis imperfecta type II delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity *Am J Med Genet*. 1984 Feb; 17(2):407-23)
20. Obafemi AA, Bulas DI, Troendle J, Marini JC. Popcorn calcification in osteogenesis imperfecta: incidence, progression, and molecular correlation. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A:2725–2732
21. Antonella Forlino, PhD, Dr Joan C Marini, MD Osteogenesis imperfecta, *The Lancet* Volume 387, Issue 10028, P1657-1671, April 16, 2016)
22. Cassandra A., Thomas A.E., 2001, *The Bone Organ System: Form and Function*. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (Eds): *Osteoporosis*, San Diego, Academic Press, (Vol 1)3-20
23. Kiper Pelin, Overall evaluation of skeletal dysplasias *TOTBİD Dergisi* 2016; 15:247–278)
24. Eames BF, de la Fuente L, Helms JA Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003 May; 69(2):93-101
25. Olsen BR, Reginato AM, Wang W *Annu Rev Bone development. Cell Dev Biol*. 2000; 16():191-220)
26. Michigami T. Current understanding on the molecular basis of chondrogenesis. *Clin Pediatr Endocrinol* 2014;23(1):1–8

27. Larson WJ, Sherman LS, Potter SS, Scott WJ. Human embryology. New York: Churchill Livingstone; 1993. pp. 281–310
28. Van Zalen-Sprock RM, Brons JT, van Vugt JM, van der Harten HJ, van Geijn HP Ultrasonographic and radiologic visualization of the developing embryonic skeleton *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997 Jun; 9(6):392-7))
29. Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008;9:183–96.)
30. Gong JK, Arnold JS, Cohn SH. Composition of trabecular and cortical bone. *Anat Rec* 1964;149:325–32
31. David R. Eyre Bone Collagen: New Clues to Its Mineralization Mechanism from Recessive Osteogenesis Imperfecta
32. Rozario T1, DeSimone DW, The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 2010 May 1;341(1):126-40
33. Canalis E., 1993, Insulin like growth factor and local regulation of bone formation. *Bone*, 14:273-76.
34. Gowen M., 1991, Cytokines regulate bone cell function. *Rheumatology Review*, 1:43-50
35. Tate M, Adamson JrTA, Bauer TW. Cells in focus. The osteocyte. *IJBCB.* 2004;36:1-8.
36. Franz-Odena TAl, Hall BK, Witten PE. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006; 235:176-90
37. Joan C. Marini, Antonella Forlino, Hans Peter Bächinger, Nick J. Bishop⁴, Peter H. Byers, Anne De Paepe⁶, Francois Fassier, Nadja Fratzl-Zelman, Kenneth M. Kozloff ⁹, Deborah Krakow¹⁰, Kathleen Montpetit¹¹ and Oliver Semler Osteogenesis imperfecta 2017
38. Prockop DJ J Mutations that alter the primary structure of type I collagen. The perils of a system for generating large structures by the principle of nucleated growth. *Biol Chem.* 1990 Sep 15; 265(26):15349-52.
39. McLaughlin SH, Bulleid NJ Molecular recognition in procollagen chain assembly. *Matrix Biol.* 1998 Feb; 16(7):369-77.)
40. Prockop DJ, Sieron AL, Li SW, Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.* 1998 Feb; 16(7):399-408.

41. Cay M. Kielty, The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils, 1993
Volume 336, number 2, 323-326
42. S. Viguet-Carrin Æ P. Garnero Æ P.D. Delmas, The role of collagen in bone strength Osteoporos Int (2006) 17: 319–336 DOI 10.1007/s00198-005-2035-9
43. Habiba Chirchir Recent origin of low trabecular bone density in modern humans
Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jan 13; 112(2): 366–371.)
44. Ruff C, Holt B, Trinkaus E Who's afraid of the big bad Wolff?: "Wolff's law" and bone functional adaptation. Am J Phys Anthropol. 2006 Apr; 129(4):484-98.
45. Scherf H, Harvati K, Hublin JJ A comparison of proximal humeral cancellous bone of great apes and humans. J Hum Evol. 2013 Jul; 65(1):29-38
46. Tsegai ZJ, Kivell TL, Gross T, Nguyen NH, Pahr DH, Smaers JB, Skinner MM
Trabecular bone structure correlates with hand posture and use in hominoids. PLoS One. 2013; 8(11):e78781
47. Zeininger A, Richmond BG, Hartman G J Metacarpal head biomechanics: a comparative backscattered electron image analysis of trabecular bone mineral density in Pan troglodytes, Pongo pygmaeus, and Homo sapiens. Hum Evol. 2011 Jun; 60(6):703-10.
48. Vashishth, D. (2007). The role of the collagen matrix in skeletal fragility. Current Osteoporosis Reports, 5(2), 62–66. doi:10.1007/s11914-007-0004-2)
49. Miller ME: Temporary brittle bone disease: a true entity? Spontaneous Isolated Midtrimester Fracture of Tibia and Fibula in a Normal Fetus with in utero Healing and Good Long-Term Outcome) Semin Perinatol 1999;23:174– 182]
50. Hefti F, Bollini G, Dungal P, Fixsen J, Grill F, Ippolito E, Romanus B, Tudisco C, Wientroub S: Congenital pseudarthrosis of the tibia: history, etiology, classification, and epidemiologic data. J Pediatr Orthopaed 2000; 9:11–15
51. Bahado-Singh RO, Raymond M The 20-week scan: beyond biometry and anatomy. Clin Obstet Gynecol. 2007 Jun; 50(2):478-86)
52. Schramm T, Gloning KP, Minderer S, Daumer-Haas C, Hortnagel K, € Nerlich A, Tutschek B. 2009. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. Ultrasound Obstet Gynecol 34:160–170.)
53. Krakow D, Alanay Y, Rimoin LP, Lin V, Wilcox WR, Lachman RS, Rimoin DL. 2008. Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: A retrospective and prospective analysis. Am J Med Genet Part A 146A:1917–1924.

54. Rahemtullah A, McGillivray B, Wilson RD. 1997. Suspected skeletal dysplasias: Femur length to abdominal circumference ratio can be used in ultrasonographic prediction of fetal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 177:864–869
55. Kataoka S, Sawai H, Yamada H, Kanazawa N, Koyama K, Nishimura G, Morikawa M, Sakuragi N, Minakami H. 2004. Radiographic and genetic diagnosis of sporadic hypochondroplasia early in the neonatal period. *Prenat Diagn* 24:45–49)
56. Hatzaki,A., Sifakis,S. Apostolopoulou,D., Bouzarelou,D., Konstantinidou,A., Kappou,D Velissariou,V(2011). FGFR3 related skeletal dysplasias diagnosed prenatally by ultrasonography and molecular analysis: Presentation of 17 cases. *American Journal of Medical Genetics Part A*,155(10),2426–2435)
57. Campbell J, Henderson A, Campbell S. 1988. The fetal femur/foot length ratio: A new parameter to assess dysplastic limb reduction. *Obstet Gynecol* 72:181–184)
58. Boulet S, AlthuserM, Nugues F, Schaal JP, Jouk PS. 2009. Prenatal diagnosis of achondroplasia: New specific signs. *Prenat Diagn* 29:697–702.)
59. Alanay Y, Krakow D, Rimoin DL, Lachman RS. 2007. Angulated femurs and the skeletal dysplasias: Experience of the International Skeletal Dysplasia Registry (1988–2006). *Am J Med Genet Part A* 143A: 1159–1168.
60. Tham E, Nishimura G, Geiberger S, Horemuzova E, Nilsson D, Lindstrand A, Hammarsjö A, Armenio M, Mäkitie O, Zabel B, Nordgren A, Nordenskjöld M, Grigeliuniene G. Autosomal recessive mutations in the COL2A1 gene cause severe spondyloepiphyseal dysplasia. *Clin Genet*. 2015;87:496–8,
61. Barat-Houari M, Baujat G, Tran Mau Them F, Fabre A, Geneviève D, Tóuítou I. Confirmation of autosomal recessive inheritance of COL2A1 mutations in spondyloepiphyseal dysplasia congenita: lessons for genetic counseling. *Am J Med Genet A*. 2016a;170A:263–5
62. Nishimura G, Nakashima E, Mabuchi A, Shimamoto K, Shimamoto T, Shimao Y, Nagai T, Yamaguchi T, Kosaki R, Ohashi H, Makita Y, Ikegawa S. Identification of COL2A1 mutations in platyspondylic skeletal dysplasia, Torrance type. *J Med Genet*. 2004;41:75–9.
63. Spranger JW, Brill PW, Nishimura G, Superti-Furga A, Unger S. Type 2 collagen group: spondyloepiphyseal dysplasia Torrance type. In: Spranger JW, Brill P, Superti-Furga A, Unger S, Nishimura G, eds. *Bone Dysplasias: An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development*. 3 ed. New York: Oxford University Press. 2012e)

64. Superti-Furga A, Rossi A, Steinmann B, Gitzelmann R. A chondrodysplasia family produced by mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter gene: genotype/phenotype correlations. *Am J Med Genet* 1996; 63: 144-7)
65. Nikkels PGJ. The skeletal system. In: Keeling JW, Khong TY, eds. *Fetal and neonatal pathology*, 4th edn. London: Springer, 2007 p. 770-94)
66. Feng Y, Walsh CA. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 1034-8)
67. Bicknell LS, Morgan T, Bonafé L, Wessels MW, Bialer MG, Willems PJ, Cohn DH, Krakow D, Robertson SP. Mutations in FLNB cause boomerang dysplasia. *J Med Genet*. 2005;42:e43
68. Elcioglu NH, Hall CM. Diagnostic dilemmas in the short rib-polydactyly syndrome group. *Am J Med Genet* 2002; 111: 392-400.)
69. Mansour S, Offiah AC, McDowall S, Sim P, Tolmie J, Hall C. The phenotype of survivors of campomelic dysplasia. *J Med Genet*. 2002;39:597–602
70. Glorieux FH, Rauch F, Plotkin H, Ward L, Travers R, Roughley P, Lalic L, Glorieux DF, Fassier F, Bishop NJJ *Bone Miner Res*. 2000 Sep; 15(9):1650-8. 12. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease.
71. Ward LM, Rauch F, Travers R, Chabot G, Azouz EM, Lalic L, Roughley PJ, Glorieux FH Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. *Bone*. 2002 Jul; 31(1):12-8],
72. Berg, C., Geipel, A., Noack, F., Smrcek, J., Krapp, M., Germer, U., Gembruch, U. (2005). Prenatal diagnosis of Bruck syndrome. *Prenatal Diagnosis*, 25(7), 535–538. doi:10.1002/pd.801
73. Breslau-Siderius EJ, Engelbert RH, Pals G, van der Sluijs JA (1998) Bruck syndrome: a rare combination of bone fragility and multiple congenital joint contractures. *J Pediatr Orthop B* 7:35–38
74. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, Aktas D, Alikasifoglu M, Tuncbilek E, Orhan D, Bakar FT, Zabel B, Superti-Furga A, Bruckner-Tuderman L, Curry CJ, Pyott S, Byers PH, Eyre DR, Baldrige D, Lee B, Merrill AE, Davis EC, Cohn DH, Akarsu N, Krakow D (2010) Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 86:551–559

75. Cole, D. E., & Carpenter, T. O. (1987). Bone fragility, craniosynostosis, ocular proptosis, hydrocephalus, and distinctive facial features: A newly recognized type of osteogenesis imperfecta. *The Journal of Pediatrics*, 110(1), 76–80.)
76. Lutz Garbes,^{1,2,3,14} Kyungho Kim,^{4,14} Angelika Rieß,^{5,14}Stefan K. Bohlander,¹¹ Jinoh Kim,^{4,*} and Christian Netzer¹ Mutations in SEC24D, Encoding a Component of the COPII Machinery, Cause a Syndromic Form of Osteogenesis Imperfecta *Am J Hum Genet*. 2015 Mar 5; 96(3): 432–439
77. Eve J. Lowenstein Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy May 2009, Volume 25, Issue 5, pp 515–516
78. Gray, P H. K. (1970Gb). A case of osteogenesis imperfecta associated with dentinogenesis imperfecta dating from antiquity. *Clinical Radiology* 21, 106-108
79. B. Baljet Aspects of the history of Osteogenesis imperfecta (Vrolik's syndrome) *Ann Anat* 184: 1-7 (2002)
80. Smith R, Francis MJO, Houghton GR. The brittle bone syndrome. London: Butterworths; 1983)
81. John Spurway, M.B., C.M.Edin., Tring, Hereditary Tendency To Fracture. *Br Med J* 1896 Sep 26; 2(1865): 844.
82. King JD, Boblechko WP. Osteogenesis imperfecta: an orthopaedic description and surgical review. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 1971;53B:72–89
83. Van de Hoeve, J., and de Kleyn, A. (1918). Blaue Sclerae Knochenbrüchigkeit und Schwerhörigkeit. *Archiv für Ophthalmologie*, 95, 81-93.)
84. Bell, J. (1928). Blue sclerotics and fragility of bone. In *Treasury of Human Inheritance*, Vol. 2, part 3. Cambridge University Press, Cambridge and London.
85. Seedorf, K. S. (1949). *Osteogenesis Imperfecta: A Study of Clinical Features and Heredity Based on 55 Danish Families Comprising 180 Affected Members*. Universitetsforlaget i Århus, Copenhagen.
86. Smars, G. (1961). *Osteogenesis Imperfecta in Sweden*. Scandinavian University Books, Stockholm
87. Schroder, G. (1964). *Osteogenesis imperfecta. Eine klinisch-erbbiologische Untersuchung des Krankengutes in Westfalen. Schätzung der Mutationsraten für den Regierungsbezirk Münster (Westfalen)*. Zeitschrift für Menschliche Vererbung und Konstitutionslehre, 37, 632-676)

88. Bauze, R. J., Smith, R., and Francis, M. J. O. (1975). A new look at osteogenesis imperfecta. A clinical, radiological and biochemical study of forty-two patients. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 57B, 2-12.
89. Remigio, P. A., and Grinvalsky, H. T. (1970). Osteogenesis imperfecta congenita. *American Journal of Diseases of Children*, 119, 524-528.),
90. Wilson (Wilson, M. G. (1974). Congenital osteogenesis imperfecta. *Birth Defects-Original Article Series*, 10 (12), 296-298. The National Foundation-March of Dimes, New York
91. Tsuruta, T., and Sugiura, Y. (1977). Lethal short-limbed dwarfism in Japan. *Proceedings of the Fifth International Conference of Birth Defects. Excerpta Medica (Congress Series)*, 426, 118 (Abst)
92. Sillence DO, Senn A, Danks, Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *DM J Med Genet*. 1979 Apr; 16(2):101-16,)
93. Chu ML, Williams CJ, Pepe G, Hirsch JL, Prockop DJ, Ramirez F: Internal deletion in a collagen gene in a perinatal lethal form of osteogenesis imperfecta. *Nature* 304:78–80 (1983).]
94. Frank Rauch, Osteogenesis imperfecta *Lancet* 2004; 363: 1377–85
95. Barnes AM, Chang W, Morello R, Cabral WA, Weis M, et al: Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 355:2757–2764 (2006)
96. Morello R, Bertin TK, Chen Y, Hicks J, Tonachini L, et al: CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* 127:291–304 (2006)
97. Van Dijk FS, Nesbitt IM, Zwikstra EH, Nikkels PG, Piersma SR, et al: PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 85:521–527 (2009b)
98. Barnes AM, Carter EM, Cabral WA, Weis M, Chang W, et al: Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. *N Engl J Med* 362:521–528 (2010).
99. Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, AlSwaid A, Al Balwi M, et al: Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 86:389–398 (2010)

100. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, et al: Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 86:551–559 (2010)
101. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparrós Martin JA, Valencia M, et al: Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 87:110–114 (2010)
102. Becker J, Semler O, Gilissen C, Li Y, Bolz HJ, et al: Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis impe)
103. Chavassieux P, Seeman E, Delmas PD. Insights into material and structural basis of bone fragility from diseases associated with fractures: how determinants of the biomechanical properties of bone are compromised by disease. *Endocr Rev.* 2007;28:151-164.
104. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci.* 2005; 118:1341–1353
105. Burnei G, Vlad C, Georgescu I, Gavrilu TS, Dan D. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 2008;16(6):356-66
106. Osteogenezis İmperfekta HEKİMSOY Z. *Tur kiy e Klin ik le ri J Endocrin* 2009;4(3):85-91
107. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat.*2007; 28(3):209–21.)
108. Hudson, D. M., Kim, L. S., Weis, M., Cohn, D. H. & Eyre, D. R. Peptidyl 3-hydroxyproline binding properties of type I collagen suggest a function in fibril supramolecular assembly. *Biochemistry* 51, 2417–2424 (2012)
109. Saga, S. Nagata, K., Chen, W. T. & Yamada, K. M. pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J. Cell Biol.* 105, 517–527 (1987)
110. Thomson, C. A. & Ananthanarayanan, V. S. Structure–function studies on hsp47: pH-dependent inhibition of collagen fibril formation in vitro. *Biochem. J.* 349, 877–883 (2000)
111. Ishikawa, Y. & Bachinger, H. P. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2479–2491 (2013)

112. Ishida, Y. et al. Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. *Mol. Biol. Cell* 20, 2744–2754 (2009)
113. Gioia, R. et al. Impaired osteoblastogenesis in a murine model of dominant osteogenesis imperfecta: a new target for osteogenesis imperfecta pharmacological therapy. *Stem Cells* 30, 1465–1476 (2012).
114. Myers, J. C. Chu, M.-L., Faro, S. H., Clark, W. J., Prockop, D. J., Ramirez, F. Cloning a cDNA for the pro- α -2 chain of human type I collagen. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78: 3516–3520, 1981
115. Prockop DJ, Kivirikko KI, Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64():403–34
116. S Shawn M. Sweeney, Candidate Cell and Matrix Interaction Domains on the Collagen Fibril, the Predominant Protein of Vertebrates 2008
117. Chu, M. & Prockop, D. J. in *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects* 2nd edn (eds Royce, P. M. & Steinmann, B.) 223–248 (Wiley-Liss, 2002).
118. Symoens, S. et al. Type I procollagen C-propeptide defects: study of genotype–phenotype correlation and predictive role of crystal structure. *Hum. Mutat.* 35, 1330–1341 (2014).
119. Cabral, W. A. et al. Type I collagen triplet duplication mutation in lethal osteogenesis imperfecta shifts register of α chains throughout the helix and disrupts incorporation of mutant helices into fibrils and extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 278, 10006–10012 (2003)
120. Orgel, J. P., San Antonio, J. D. & Antipova, O. Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions. *Connect. Tissue Res.* 52, 2–17 (2011)
121. Wiestner, M. et al. Inhibiting effect of procollagen peptides on collagen biosynthesis in fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.* 254, 7016–7023 (1979).
122. Oganesian, A. et al. The NH₂-terminal propeptide of type I procollagen acts intracellularly to modulate cell function. *J. Biol. Chem.* 281, 38507–38518 (2006).
123. Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M. & Greenspan, D. S. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 271, 360–362 (1996)////////

124. Li, S. W. et al. The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 5127–5130 (1996).
125. Vadon-Le Goff, S., Hulmes, D. J. & Moali, C. BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling. *Matrix Biol.* 44–46, 14–23 (2015).
126. Cabral, W. A. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat. Genet.* 39, 359–365 (2007)
127. Nagai, N. et al. Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J. Cell Biol.* 150, 1499–1506 (2000).
128. Zeng, B. et al. Chicken FK506-binding protein, FKBP65 a member of the FKBP family of peptidylprolyl cis–trans isomerases, is only partially inhibited by FK506. *Biochem. J.* 330, 109–114 (1998)
129. Caparros-Martin, J. A. et al. Clinical and molecular analysis in families with autosomal recessive osteogenesis imperfecta identifies mutations in five genes and suggests genotype–phenotype correlations. *Am. J. Med. Genet. A* 161A, 1354–1369 (2013)
130. Schwarze, U. et al. Mutations in FKBP10, which result in Bruck syndrome and recessive forms of osteogenesis imperfecta, inhibit the hydroxylation of telopeptide lysines in bone collagen. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1–17 (2013)
131. Nakashima, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17–29 (2002)
132. Volodarsky, M. et al. A deletion mutation in TMEM38B associated with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum. Mutat.* 34, 582–586 (2013)
133. Cabral, W. A. et al. Absence of the ER cation channel TMEM38B/TRIC-B disrupts intracellular calcium homeostasis and dysregulates collagen synthesis in recessive osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet.* 12, e1006156 (2016).
134. Yamazaki, D. et al. Essential role of the TRIC-B channel in Ca²⁺ handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development* 136, 2355–2361 (2009)

135. Yazawa, M. et al. TRIC channels are essential for Ca²⁺ handling in intracellular stores. *Nature* 448, 78–82 (2007).
136. Keupp, K. et al. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 565–574 (2013)
137. Laine, C. M. et al. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N. Engl. J. Med.* 368, 1809–1816 (2013)
138. Palomo, T. et al. Skeletal characteristics associated with homozygous and heterozygous WNT1 mutations. *Bone* 67, 63–70 (2014)
139. Thomas, K. R., Musci, T. S., Neumann, P. E. & Capecchi, M. R. Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell* 67, 969–976 (1991)
140. Willert, K. & Nusse, R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007864 (2012)
141. Gong, Y. et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513–523 (2001)
142. Lara-Castillo, N. & Johnson, M. L. LRP receptor family member associated bone disease. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16, 141–148 (2015)
143. Scopelliti, D., Orsini, R., Ventucci, E. & Carratelli, D. Van Buchem disease. Maxillofacial changes, diagnostic classification and general principles of treatment [Italian]. *Minerva Stomatol.* 48, 227–234 (1999).
144. Symoens, S. et al. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 154 (2013)
145. Murakami, T. et al. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat. Cell Biol.* 11, 1205–1211 (2009).
146. Osteogenesis imperfecta: the audiological phenotype lacks correlation with the genotype Freya KR Swinnen *Orphanet J Rare Dis.* 2011; 6: 88
147. Kuurila K. PhD thesis. University of Turku, Department of Otorhinolaryngology; Hearing loss, balance problems and molecular defects in osteogenesis imperfecta. 2003.
148. Shapiro JR, Pikus A, Weiss G, Rowe Hearing and middle ear function in osteogenesis imperfecta. *DW JAMA.* 1982 Apr 16; 247(15):2120-6)

149. Berger G, Hawke M, Johnson A, Proops, Histopathology of the temporal bone in osteogenesis imperfecta congenita: a report of 5 cases. *D Laryngoscope*. 1985 Feb; 95(2):193-9.)
150. Riedner ED, Levin LS, Holliday, Hearing patterns in dominant osteogenesis imperfecta. *MJ Arch Otolaryngol*. 1980 Dec; 106(12):737-40.
151. Pedersen U, Hearing loss in patients with osteogenesis imperfecta. A clinical and audiological study of 201 patients. *Scand Audiol*. 1984; 13(2):67-74
152. Garretsen AJ, Cremers CW, Huyg  n PL, Hearing loss (in nonoperated ears) in relation to age in osteogenesis imperfecta type I. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997 Jul; 106(7 Pt 1):575-82.)
153. Hald, J. D., Folkestad, L., Swan, C. Z., Wanscher, J., Schmidt, M., G  r  rup, H.Langdahl, B. (2018). Osteogenesis imperfecta and the teeth, eyes, and ears—a study of non-skeletal phenotypes in adults. *Osteoporosis International*. doi:10.1007/s00198-018-4663-x)
154. Chau FY, Wallace DJ, Vajaranant T, et al. Osteogenesis imperfecta and the eye. In: Shapiro JR, Byers PH, Glorieux FH, Sponseller PD, eds. *Osteogenesis Imperfecta: A Translational Approach to Brittle Bone Disease*. Cambridge, MA: Academic Press; 2013:289-303)
155. Thomas IH, DiMeglio LA. Advances in the classification and treatment of osteogenesis imperfecta. *Curr Osteoporos Rep* 2016;14:1-9
156. Van Dijk FS, Sillence DO. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature, and severity assessment. *Am J Med Genet A* 2014;164A:1470-81.
157. Blumcke S, Niedorf HR, Thiel HJ, Langness U. Histochemical and fine structural studies on the cornea with osteogenesis imperfecta congenita. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1972;11:124-32
158. Lund AM, Jensen BL, Nielsen LA, Skovby F. Dental manifestations of osteogenesis imperfecta and abnormalities of collagen I metabolism. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1998; 18:30-37
159. Ashok Raghavan, Paul D. Griffiths, Nigel Hoggard *RadioGraphics* 2012 Vol. 32, No. 7
160. Nader Khandanpour, Daniel J. A. Connolly *Craniospinal Abnormalities and Neurologic Complications of Osteogenesis Imperfecta: Imaging Overview* 2012 Nov-Dec;32(7):2101-12. doi: 10.1148/rg.327125716.

161. Kyriakos Papadimitriou Ali A.Baaj Jean-Paul Wolinsky, Osteogenesis Imperfecta A Translational Approach to Brittle Bone Disease 2014, Pages 343 348
162. Zeitlin L, Rauch F, Plotkin H, Glorieux FH. Height and weight development during four years of therapy with cyclical intravenous pamidronate in children and adolescents with osteogenesis imperfecta types I, III, and IV. *Pediatrics* 2003;111(5 Pt 1):1030–6,)
163. Marini, JC, Bordenick, S, Heavner, G, Rose, S, Chrousos, GP 1993 Evaluation of growth hormone axis and responsiveness to growth stimulation of short children with osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet* 45: 261– 264.)
164. Emily L.Germain-Lee, Douglas J.Di Girolamo Horacio Plotkin, Growth and Growth Hormone Use in Osteogenesis Imperfecta Osteogenesis ImperfectaA Translational Approach to Brittle Bone Disease 2014, Pages 267-280
165. Heike Hoyer-Kuhn, Laura Höbing, Julia Cassens, Eckhard Schoenau and Oliver Semler Children with severe Osteogenesis imperfecta and short stature present on average with normal IGF-I and IGFBP-3 levels DOI 10.1515/jpem-2015-0385
166. Willing MC, Deschenes SP, Scott DA, et al. Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles O f type I collagen. *Am J Hum Genet* 1994;55:638-47. 4
167. Ernst M, Rodan GA. Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presence of growth hormone (GH): positive correlation with the presence of the GHinduced IGF-binding protein BP-3. *Endocrinology* 1990;127: 807-14.
168. Matin JC, Bordenick S, Heavner G, et al. The growth hormone and somatomedin axis in short children with osteogenesis imperfecta. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:251-6.9)
169. Hortop J, Tsipouras P, Hanley J, et al: Cardiovascular involvement in osteogenesis imperfecta. *Circulation* 1986;73:54–61
170. C. Millington-Sanders, A. Meir, L. Lawrence, C. Stolinski, Structure of chordae tendineae in the left ventricle of the human heart, *J. Anat.* 192 (Pt 4) (1998) 573–581.
171. H. Ashournia, F.T. Johansen, L. Folkestad, et al. Heart disease in patients with osteogenesis imperfecta - a systematic review, *Int. J. Cardiol.* 196 (2015) 149–157

172. Badmanaban B, Sachithanandan A, Mac Gowen, S: Aortic valve replacement in osteogenesis imperfecta – technical and practical considerations for a successful outcome. *J Card Surg* 2003;18:554–556
173. Alfirevic A, Insler S: Deep hypothermic circulatory arrest in a patient with osteogenesis imperfecta. *J Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2007;21:245–249
174. Grahame R A method for measuring human skin elasticity in vivo with observations of the effects of age, sex and pregnancy. *Clin Sci.* 1970;39:223-239
175. Birgitte Hansen, MD; Gregor B. E. Jemec, MD, DMSc, The Mechanical Properties of Skin in Osteogenesis Imperfecta *Arch Dermatol.* 2002;138(7):909-911.
176. Oxlund H Andreassen TT The roles of hyaluronic acid, collagen and elastin in the mechanical properties of connective tissue. *J Anat.* 1980;131 (Pt 4) 611- 620)
177. Javier Adur,# 1 , 2 , * Lilia DSouza-Li,# 3 Marcus Vinícius Pedroni, 3 Carlos E. Steiner, 4 Vitor B. Pelegati, 5 Andre A. de Thomaz, 1 Hernandez F. Carvalho, 5 , 6 and Carlos L. Cesar 1 The Severity of Osteogenesis Imperfecta and Type I Collagen Pattern in Human Skin as Determined by Nonlinear Microscopy: Proof of Principle of a Diagnostic Method PLoS One. 2013; 8(7): e69186.)
178. Justin Easow Sam Guide to Osteogenesis Imperfecta for Pediatricians and Family Practice Physicians. Gaithersburg, MD: Osteogenesis Imperfecta Foundation.(*Osteogenesis Imperfecta*, 2017
179. Robert D Steiner, MD, Jessica Adsit, MS, CGC, and Donald Basel, MD. COL1A1/2-Related Osteogenesis Imperfecta, Initial Posting: January 28, 2005; Last Update: February 14, 2013
180. Brown, D. M.: Collagen metabolism in fibroblasts from patients with osteogenesis imperfecta (abst.). In: Clinical aspects of metabolic bone disease (Frame, B., Parfitt, E. M., Duncan, H., eds.), p. 303-307. Amsterdam: Excerpta Medica. International Congress Series No. 270 (1973)
181. Teitelbaum SL, Kraft WJ, Lang R, Avioli LV: Bone collagen aggregation abnormalities in osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Res* 17:75–79 (1974)
182. BM John,* SK Patnaik and RW Thergaonkar Multiple Fractures in Neonates and Osteogenesis Imperfecta *Med J Armed Forces India.* 2006 Jan; 62(1): 73–74

183. Peter H. Byers, MD1, Deborah Krakow, MD2 , Mark E. Nunes, MD3 , and Melanie Pepin, MS, Genetic evaluation of suspected osteogenesis imperfecta (OICGC June 2006 Vol. 8 No. 6 ACMG Practice Guideline)
184. Thompson EM, Young ID, Hall CM, Pembrey ME. Recurrence risks and prognosis in severe sporadic osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 1987;24:390-405.
185. Pfützenreuter N, Panzer F, Bastert G. Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta congenita; a case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990;34:189-94.
186. Masaki Takagi, Mitsuru Matsushita, Gen Nishimura, and Tomonobu Hasegawa Osteogenesis imperfecta IIC caused by a novel heterozygous mutation in the C-propeptide region of COL1A1 *Hum Genome Var.* 2014; 1: 14025.
187. Dustin Baldrige,1,* Ulrike Schwarze,2,* Roy Morello,1 Jennifer Lennington,1 Terry K. Bertin,1 James M. Pace,2 Melanie G. Pepin,2 MaryAnn Weis,3 David R. Eyre,3 Jennifer Walsh,4 Deborah Lambert,4,5 Andrew Green,4,6 Haynes Robinson,7 Melonie Michelson,7 Gunnar Houge,8 Carl Lindman,9 Judith Martin,10 Jewell Ward,11 Emmanuelle Lemyre,12 John J. Mitchell,13 Deborah Krakow,14 David L. Rimoim,14 Daniel H. Cohn,14 Peter H. Byers,2,15 and Brendan Lee Crtap And Leprel Mutations In Recessive Osteogenesis Imperfecta *Hum Mutat.* 2008 Dec; 29(12): 1435–1442
188. Chih- Ping Chenabcdefg Shuan-Pei Lin chi Yi-Ning Suj Schu-Rern Chernc Ming-Huei Linb Jun-Wei Subk Wayseen Wang, Osteogenesis imperfecta type IV: Prenatal molecular diagnosis and genetic counseling in a pregnancy carried to full term with favorable outcome *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* Volume 51, Issue 2, June 2012, Pages 271-275
189. Heike Hoyer - Kuhn Oliver Semler Lutz Garbes Katharina Zimmermann Jutta Becker Bernd Wollnik Eckhard Schoenau Christian Netzer ,A Non classical IFITM5 Mutation Located in the Coding Region Causes Severe Osteogenesis Imperfecta With Prenatal Onset 2013
190. P. Sarathchandra F. M. Pope M. V. Kayser S. Y. Ali ,A light and electron microscopic study of osteogenesis imperfecta bone samples, with reference to collagen chemistry and clinical phenotype 2000

191. Rauch, F., & Glorieux, F. H. (2004). Osteogenesis imperfecta. *The Lancet*, 363(9418), 1377–1385. doi:10.1016/s0140-6736(04)16051-0
192. Francis MJ, Smith R. Polymeric collagen of skin in osteogenesis imperfecta, homocystinuria and Ehlers–Danlos and Marfan syndromes. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1975;11(6):15–21)
193. Bank, R. A., Robins, S. P., Wijmenga, C., Breslau-Siderius, L. J., Bardoel, A. F. J., Van der Sluijs, H. A., Pruijs, H. E. H., TeKoppele, J. M. Defective collagen crosslinking in bone, but not in ligament or cartilage, in Bruck syndrome: indications for a bone-specific telopeptide lysyl hydroxylase on chromosome 17. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 1054-1058, 1999
194. Ha-Vinh, R., Alanay, Y., Bank, R. A., Campos-Xavier, A. B., Zankl, A., Superti-Furga, A., Bonafe, L. Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (osteogenesis imperfecta with contractures of the large joints) caused by a recessive mutation in PLOD2. *Am. J. Med. Genet.* 131A: 115-120, 2004
195. Kyu Sang Joeng Yi-Chien Lee Ming-Ming Jiang Terry K. Bertin Yuqing Chen Annie M. Abraham Hao Ding Xiaohong Bi Catherine G. Ambrose Brendan H. Lee ,The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations *Human Molecular Genetics*, Volume 23, Issue 15, 1 August 2014, Pages 4035–4042,
196. Lindert, U., Cabral, W. A., Ausavarat, S., Tongkobpetch, S., Ludin, K., Barnes, A. M., Yeetong, P., Weis, M., Krabichler, B., Srichomthong, C., Makareeva, E. N., Janecke, A. R., and 9 others. MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. *Nature Commun.* 7: 11920, 2016.
197. W.A. Cabral, E. Makareeva, A. Colige, A.D. Letocha, J.M. Ty, H.N. Yeowell, et al. Mutations near amino end of alpha1(I) collagen cause combined osteogenesis imperfecta/Ehlers–Danlos syndrome by interference with N-propeptide processing *J Biol Chem*, 280 (2005), pp. 19259-19269)
198. Aken, B. L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Searle, S. M. J. (2016). The Ensembl gene annotation system. *Database*, 2016, baw093
199. Joeng, K. S., Lee, Y.-C., Lim, J., Chen, Y., Jiang, M.-M., Munivez, E., Lee, B. H. (2017).cabral *The Journal of Clinical Investigation*, 127, 2678–2688.)
200. Aldinger, K. A., Mendelsohn, N. J., Chung, B. H., Zhang, W., Cohn, D. H., Fernandez, B., ... Curry, C. J. (2016). Variable brain phenotype primarily affects the

- brainstem and cerebellum in patients with osteogenesis imperfecta caused by recessive WNT1 mutations. *Journal of Medical Genetics*, 53, 427–430
201. Joeng, K. S., Lee, Y.-C., Jiang, M.-M., Bertin, T. K., Chen, Y., Abraham, A. M., Lee, B. H. (2014). The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations. *Human Molecular Genetics*, 23, 4035–4042.
 202. Baldrige D, Lenington J, Weis M, Homan EP, Jiang MM, Munivez E, et al. Generalized connective tissue disease in *Crtap*^{-/-} mouse. *PloS One* 2010;5(5):e10560.
 203. Homan, E. P., Lee, B., & Morello, R. (2014). Recessive Osteogenesis Imperfecta Due to Mutations in CRTAP, LEPRE1 and PPIB. *Osteogenesis Imperfecta*, 141–150. doi:10.1016/b978-0-12-397165-4.00014-9
 204. Asharani Katharina Keupp Oliver Semler Peter Nürnberg Bernd Wollnik Thomas J. Carney, Attenuated BMP1 Function Compromises Osteogenesis, Leading to Bone Fragility in Humans and Zebrafish P.V. *AJHG* volume 90, Issue 4, P661-674, 2012)
 205. Kapoor, A., Sanyal, A.J., 2009. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clin. Liver Dis.* 13, 581-590
 206. Atsushi Saito, January 2014, Volume 89, Issue 1, pp 11–20 Physiological functions of endoplasmic reticulum stress transducer OASIS in central nervous system
 207. Uschi Lindert, Wayne A. Cabral Surasawadee Ausavarat Siraprapa Tongkobpetch Katja Ludin Aileen M. BarnesPatra Yeetong Maryann Weis, Birgit KrabichlerChalurmpon SrichomthongElena N. MakareevaAndreas R. Janecke, Sergey Leikin, Benno Röthlisberger, Marianne Rohrbach,Ingo Kennerknecht David R. Eyre Kanya Suphapeetiporn Cecilia Giunta Joan C. Marini & Vorasuk Shotelersuk MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta *Nature Communications* volume 7, Article number: 11920 (2016)
 208. Naiki, M., Mizuno, S., Yamada, K., Yamada, Y., Kimura, R., Oshiro, M., Okamoto, N., Makita, Y., Seishima, M., Wakamatsu, N. MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 158A: 97-102, 2012.
 209. Yaghoobi, R., Omidian, M., Sina, N., Abtahian, S.-A., Panahi-Bazaz, M.-R. Olmsted syndrome in an Iranian family: report of two new cases. *Arch. Iran. Med.* 10: 246-249, 2007

210. Van Osch, L. D. M., Oranje, A. P., Keukens, F. M., van Voorst Vader, P. C., Veldman, E. Keratosis follicularis spinulosa decalvans: a family study of seven male cases and six female carriers. *J. Med. Genet.* 29: 36-40, 1992.
211. Pietrzak, A. *et al.* IFAP syndrome with severe cutaneous, neurologic and skeletal manifestations due to a novel MBTPS2 mutation in a Polish patient. *Eur. J. Dermatol.* **22**, 467–472 (2012).
212. Cho, T.-J., Lee, K.-E., Lee, S.-K., Song, S. J., Kim, K. J., Jeon, D., Lee, G., Kim, H.-N., Lee, H. R., Eom, H.-H., Lee, Z. H., Kim, O.-H., Park, W.-Y., Park, S. S., Ikegawa, S., Yoo, W. J., Choi, I. H., Kim, J.-W. A single recurrent mutation in the 5-prime UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V. *Am. J. Hum. Genet.* 91: 343-348, 2012.
213. Roughley PJ, Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta—clinical and molecular diversity. *Eur Cell Mater.* 2003; 5:41–7; discussion 47.
214. Rauch F, Hussein A, Roughley P, Glorieux FH, Moffatt P. Lack of circulating pigment epithelium - derived factor is a marker of osteogenesis imperfecta type VI. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(8):E1550–6
215. Von Bubnoff, A. Next-generation sequencing: the race is on. *Cell* 132, 721–3 (2008)
216. Chu ML, Prockop DJ. Collagen: gene structure. In: Royce PM, Steinmann B, editors. *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects.* New York: Wiley-Liss; 2002. pp. 223–248)
217. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat.* 1997;9:300–315.
218. van der Rest M, Garrone R, Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991 Oct; 5(13):2814-23
219. Engel J, Prockop DJ, The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1991; 20():137-52.
220. Schorderet DF, Gartler SM, Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Feb 1; 89(3):957-61

221. Xu Y, Gurusiddappa S, Rich RL, Owens RT, Keene DR, Mayne R, Hook A, Hook M. Multiple binding sites in collagen type I for the integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. *J Biol Chem.* 2000;275:38981–38989
222. Marini, J. C., Lewis, M. B., Wang, Q., Chen, K. J., and Orrison, B. M. (1993) Serine for glycine substitutions in type I collagen in two cases of type IV osteogenesis imperfecta. Additional evidence for a regional model of OI pathophysiology. *J. Biol. Chem.* 268, 2667–2673.
223. Sztrolovics, R., Glorieux, F. H., van der Rest, M., and Roughley, P. J. (1993) Identification of type I collagen gene (COL1A2) mutations in nonlethal osteogenesis imperfecta. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1319–1321
224. Byers, P. H. (1989) Inherited disorders of collagen gene structure and expression. *Am. J. Med. Genet.* 34, 72–80.
225. Bachinger, H. P., Morris, N. P., and Davis, J. M. (1993) Thermal stability and folding of the collagen triple helix and the effects of mutations in osteogenesis imperfecta on the triple helix of type I collagen. *Am. J. Med. Genet.* 45, 152–162.
226. Noel AE, Brown RN. Advances in evaluating the fetal skeleton. *Int J Womens Health.* 2014;6:489-500. PubMed PMID: 24868173. Pubmed Central PMCID: PMC4027851.).
227. Goncalves L, Espinoza J, Mazor M, Romero R. Newer imaging modalities in the prenatal diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.* 2004;24(2):115-20.
228. Berge LN, Marton V, Tranebjærg L, Kearney MS, Kiserud T, Øian P. Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica.* 1995;74(4):321-3
229. Sanders, J.E., (2009), Age Estimation of Fetal Skeletal Remains from the Forensic Context, Montana Üniversitesi, Lisans Tezi)
230. Jennifer Schleit,* Samuel S. Bailey, Thao Tran, Diana Chen, Susan Stowers, Ulrike Schwarze, and Peter H. Byers, Molecular Outcome, Prediction, and Clinical Consequences of Splice Variants in COL1A1, Which Encodes the pro $\alpha 1(I)$ Chains of Type I Procollagen)
231. Stefan Mundlos, Danny Chan, Yi Ma Weng, David O. Sillence‡, William G. Cole§ and John F. Bateman, Multiexon Deletions In The Type I Collagen Col1a2 Gene In Osteogenesis Imperfecta Type Ib Molecules Containing The Shortened

- A2(I) Chains Show Differential Incorporation Into The Bone And Skin Extracellular Matrix* J Biol Chem. 1996 Aug 30;271(35):21068-74.
232. Fleur S van Dijk, Margriet Huizer, Ariana Kariminejad, Carlo L Marcelis, Astrid S Plomp, Paulien A Terhal, Hanne Meijers-Heijboer, Marjan M Weiss, Rick R van Rijn, Jan M Cobben & Gerard Pals, Complete COL1A1 allele deletions in osteogenesis imperfecta Genetics in Medicine volume12, pages736–741 (2010)
 233. Naixiang Zhai, 1 , 2 ,§ Yanqin Lu, 1 , 2 ,§ Yanzhou Wang, 3 Shie Zhang, 1 , 2 Chuanming Peng, 1 , 2 Shanshan Zhang, 1 , 2 Tianyou Li, 3 Mei Chen, 4 Junlong Liu, 4 Fengling Fang, 4 Xiuzhi Ren, 4 ,* and Jinxiang Han 1 , 2, Splice receptor-site mutation c.697-2A>G of the COL1A1 gene in a Chinese family with osteogenesis imperfecta
 234. Bardai G, Lemyre E, Moffatt P, Palomo T, Glorieux FH, Tung J, Ward L, Rauch F.Osteogenesis Imperfecta Type I Caused by COL1A1 Deletions. Calcif Tissue Int. 2016 Jan;98(1):76-84.
 235. Lindahl K, Åström E, Rubin CJ, Grigelioniene G, Malmgren B, Ljunggren Ö, Kindmark A, Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. Eur J Hum Genet. 2015 Aug;23(8):1042-50. doi: 10.1038/ejhg.2015.81. Epub 2015 May 6.
 236. Chen, C.-P., Su, Y.-N., Chang, T.-Y., Chern, S.-R., Chen, C.-Y., Su, J.-W., & Wang, W. (2012). Osteogenesis imperfecta type I: Second-trimester diagnosis and incidental identification of a dominant COL1A1 deletion mutation in the paucisymptomatic father. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 51(2), 276–279
 237. Kristóf Árvai,a,1,2,* Péter Horváth,1,* Bernadett Balla,1,2 Bálint Tobiás,1,2 Karina Kató,1,2 Gyöngyi Kirschner,1 Valéria Klujber,2 Péter Lakatos,1,2,* and János P. Kósa, Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice Sci Rep. 2016; 6: 28417.
 238. Henry M. Kronenberg, Developmental regulation of the growth plate, Endocrine Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02114-2696, USA
 239. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM, Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels, Dev Cell. 2010 Aug 17; 19(2):329-44.

240. Zhong Z, Ethen NJ, Williams BO. WNT signaling in bone development and homeostasis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. 2014;3(6):489-500.
241. Baldridge D, Shchelochkov O, Kelley B, Lee B. Signaling pathways in human skeletal dysplasias. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2010;11:189-217. PubMed PMID: 20690819.
242. Lyons K, Ezaki M. Molecular regulation of limb growth. J Bone Joint Surg Am. 2009;91(Supplement 4):47-52
243. Kaneko, H; 1Kitoh, H, 1Matsuura, T; 1Masuda, A; 1 Ito, M; 2Mottes, M; 3Rauch, F; 1 Ishiguro, N; 1Ohno, K + 1Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan, 2University of Verona, Verona, Italy, 3 Shriners Hospital for Children and McGill University, Montréal, Québec, Canada Phenotypic variability of osteogenesis imperfecta is not accounted for by disruption of splicing cis-elements
244. J, Doolittle RF, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol. 1982 May 5; 157(1):105-32.
245. Beck K, Chan VC, Shenoy N, Kirkpatrick A, Ramshaw JA, Brodsky B, Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11; 97(8):4273-8. Byers PH. Folding defects in fibrillar collagens. Philos Trans Royal Soc Lond B Biol Sci. 2001;356:151–157

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1142

Tarih : 17.10.2017

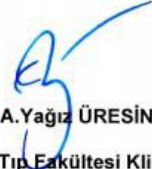
Konu: Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER hk.

Sayın Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İlgi :Tıbbi Genetik Anabilim Dalının 02/10/2017 gün ve 363603 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Dr. Leyli ŞENTÜRK' ün yürüteceği 2017/1116 dosya numaralı "Pre-perinatal dönemde ayırıcı tanıda osteogenezis imperfekta düşünülen olgularda yeni nesil dizilemenin kesin tanıya katkısı" başlıklı çalışma kurulumuzun 13/10/2017 tarih ve 16 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

EK-2: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067)

MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Proje Adı: Pre-perinatal dönemde ayırıcı tanıda osteogenezis imperfekta düşünülen olgularda yeni nesil dizilemenin kesin tanıya katkısı

Proje No.:

Projenin başlama tarihi:

Projenin bitiş tarihi:

Doktorlarımız ailenizde yaptıkları değerlendirmeler sonucunda temel bağ dokusu proteinlerinden biri olan tip 1 kollajenin yapı ve/veya sentezinde bir sorun olduğunu düşündüler. Sizde de sağlık sorunlarına yol açabilecek bu hastalık, “Osteogenezis Imperfekta” olarak adlandırılmaktadır. Bu hastalığa yol açan onlarca gen vardır ve her ailede bunlardan hangisinin sorumlu olduğunu belirlemek bu hastalıkların tedavisi, ailedeki diğer olguların erken tanısı ve hatta sağlıklı çocuk sahibi olmak için gereklidir. Size ve ailenize yardımcı olmak amacıyla bu hastalıkların tanısında kullanılan çok özel laboratuvar testleri kendi laboratuvarımızda yaparak öncelikle size ve sizin gibi diğer hastalarda da kolaylıkla uygulanmasını sağlamak istiyoruz. Bu çalışmada sizin aileniz gibi sağlık sorunları olan kişilerden kan ve/veya deri örnekleri alınarak bu dokularda testler yapmayı planlıyoruz. Proje için ayrıca bir girişim yapılmayacaktır.

Bu çalışmaya katılmaya davet edildiniz fakat karar vermeden önce çalışmanın riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz. Bilgilendikten sonra anne babanızla birlikte **Moleküler Araştırmalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu** okuyup katılmayı kabul ediyorsanız formu imzalamanız gerekmektedir.

1. Projeye Katılım için Gerekli Kriterler; Projeye katılım için en önemli kriter İstanbul Üniversitesi Tıp fakültesi Tıbbi genetik ABD polikliniği’nde klinik ve radyolojik testlerle “Osteogenezis Imperfekta” klinik tanısı konulmuş ya da ailesinde OI tanılı olgu olmasıdır.

2. Yapılacak işlemin tanımı: Klinik değerlendirmede projeye katılım kriterleri sağlandığında bu çalışma için yaklaşık 2 ml kan örneği ve/veya deri örneği (4mm büyüklüğünde) alınması gerekecektir. Örnekler sadece bu çalışma kapsamında çalışılmak üzere özel koşullarda saklanacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır.

3. Örnek Alımının Olası riskleri:

a. Kan Örneği alımı; Rutin testler amacıyla kan örnekleri alınırken K₃EDTA lı mor kapaklı tüpe alınan örneğin 2 ml si bu çalışma amacıyla kullanılacaktır. Bu işleme bağlı; (1) iğne-batması sırasında hafif bir acı duyulabilir, (2) iğne batması sonrasında çok nadiren de olsa enfeksiyon gelişebilir.

c. Deri Biyopsisi alınması; Bölgesel anestezi altında uygulanır. Biyopsi alınacak bölge saptandıktan sonra bu alan önce temizlenir, tek bir enjeksiyon ile lokal anestezi yapılır. Bu işleme bağlı olarak; (1) anestezi iğnesinin girişine bağlı hafif bir acı hissedilebilir, biyopsi alanı uyuştuktan sonra 4 mm kesi yapılarak deri dokusu alınır ve bu alan steril bir flasterle kapatılır, (2) biyopsi sonrasında çok nadir enfeksiyon gelişebilir.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:

Yapılacak testler, sizin ve ailenizdeki diğer bireylerin gelecekte bu genetik hastalıktan etkileneneğini ortaya çıkarabilir ve bu bilgi sizde psikolojik sorun yaratabilir. Bu bilgiyi öğrenmeyi tamamen ret edebilirsiniz. Bu çalışma ile elde edilecek genetik bilgiler kesinlikle gizli kalacaktır ve sizin dışınızda başkaları ile paylaşılmayacaktır, bilginin paylaşımı sadece sizin izninize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır. Size ait kan ve doku örnekleri sadece bu çalışma için kullanılacaktır.

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı sizde ya da ailenizde saptanan hastalığa neden olan genetik faktörleri öğrenmektir. Biz bu aşamada henüz yapılacak testlerin, size ve ailenize doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını bilmiyoruz. Fakat kesin olan bu çalışmalar tamamlandığında bu hastalığın nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece hem sizlere hem de gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizeyizdir.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına da sahipsiniz.

Hastanın/Katılımcının Beyanı

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

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

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

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

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr.Z. Oya Uyguner'i "+902124142000/32327-32347 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı "dan Dr. Leyli Şentürk'ü arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Tarih :

İmzası:

Katılımcıların:	<u>Adı Soyadı</u>	<u>Doğum tarih</u>	<u>İmza</u>	<u>Ebeveyn</u>
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----
Aile üyesi	-----	-----	-----	-----

*Araştırma amaçlı DNA için kan ve /veya deri örneği alınan hastalara imzalatılmalıdır

EK-3: HASTA İZLEM FORMU

İTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Osteogenezis imperfekta hasta takip formu		
ADI SOYADI/ DOĞUM TARİHİ: ANNE ADI SOYADI/DOĞUM TARİHİ:		MUAYENE TARİHİ: PROT NO:
Aile Ağacı		
Antenatal USG bulguları:		
Fizik Muayene: Tartı: Boy: OFC:		
Grafi bulguları:		
Patoloji sonucu:		
Sitogenetik/moleküler siyogenetik/moleküler analiz sonuçları:		
Yorum:		
Tanı:		
Plan:		

EK 4: ÖZGEÇMİŞ**ADI SOYADI: LEYLİ ŞENTÜRK****1.GENEL**

DÜZENLEME TARİHİ	09.10.2017		
T.C. KİMLİK NO	25202271652		
DOĞUM YERİ VE YILI	Malatya-1977		
GÖREV YERİ	Tıbbi Genetik AD.		
GÖREV UNVANI	Tıpta Uzmanlık Öğrencisi		
YAZIŞMA ADRESİ	İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Cerrahi Monoblok binası poliklinik katı, Millet caddesi 34390, Çapa, İstanbul		
TEL	02124142000- 32564	GSM	05058546527
E-POSTA	leylidr44@yahoo.com	FAX	02125348440

2. EĞİTİM

MEZUNİYET TARİHİ	ÜNİVERSİTE-FAKÜLTE-BÖLÜM/ANABİLİM DALI
29.11.2001	Ondokuz Mayıs Üniversitesi- Tıp Fakültesi

3. ARAŞTIRMA PROJELERİ DENEYİMİ

PROJE ADI	KURUM	TARİH	GÖREV*	PROJE TÜRÜ**

* (Yürütücü, Araştırmacı/Uzman, Danışman, Bursiyer, Diğer)

** (Kurumsal, Ulusal, Uluslararası)

4. ARAŞTIRMA KONUSU İLE İLGİLİ YAYINLARI**(EL YAZISI İLE)**

Özgeçmiş Sahibinin Adı ve Soyadı:

Tarih: .../.../.....

İmza:

Not:

1. Gerekğinde ilgili başlık altındaki satırların sayısı arttırılabilir.
2. Varsa, görev alınan tüm klinik araştırma projeleri yazılmalıdır.
3. Bilgiler, tarih sıralamasına göre, en eski tarihten yeniye doğru sıralanmalıdır.
4. Tüm sayfalar imzalanmalıdır.