

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

**FETAL LENFATİK DİSPLAZİLERE ALGORİTMİK
YAKLAŞIM; KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER
KARYOTİP NORMAL SAPTANDIĞINDA YENİ
NESİL DİZİ ANALİZİ İLE RASOPATİ GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. LALE YILMAZ ÇELİK**

**TEZ DANIŞMANLARI
PROF. DR. ESRA TUĞ
PROF. DR. MERAL YİRMİBEŞ KARAOĞUZ**

**ANKARA
AĞUSTOS 2023**

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**FETAL LENFATİK DİSPLAZİLERE ALGORİTMİK YAKLAŞIM;
KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER KARYOTİP NORMAL
SAPTANDIĞINDA YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ İLE RASOPATİ
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. LALE YILMAZ ÇELİK**

**TEZ DANIŞMANLARI
PROF. DR. ESRA TUĞ
PROF. DR. MERAL YİRMİBEŞ KARAOĞUZ**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TTU-2022-8125 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
AĞUSTOS 2023**

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Savunma Sınav Tutanağı

08/08/2023

Adı ve Soyadı	Lale Yılmaz Çelik
Baba Adı	
Doğum Yeri/Tarihi	
Diploma Tarihi/Diploma No	
Mezun Olduğu Fakülte	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	4 yıl 1 ay
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: "Fetal lenfatik displazilere algoritmik yaklaşım; konvensiyonel ve moleküler karyotip normal saptandığında yeni nesil dizi analizi ile rasopati genlerinin araştırılması"

JÜRİ KARARI: Başarılı

JÜRİ ÜYELERİ:

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

TEŞEKKÜR

Fetal lenfatik displazilere algoritmik yaklaşım; konvansiyonel ve moleküler karyotip normal saptandığında yeni nesil dizi analizi ile rasopati genlerinin araştırılması konulu, BAP tarafından TTU-2022-8125 proje numarası ile desteklenen bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı sorumluluğundaki Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezinde yapılmıştır.

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, öneri ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan; ilgi, sabır ve desteğini daima hissettiğim tez yöneticilerim ve danışmanlarım Sayın Hocalarım Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoguz ve Prof. Dr. Esra Tuğ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca sitogenetik, moleküler ve prenatal tanı alanında bilgi ve tecrübelerini paylaşan hocalarıma bir ömür teşekkürü borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgilerinden faydalandığım, genetikte güncel yaklaşımları takip etmemizi sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e şükranlarımı sunarım. Asistanlık eğitimim ve öğrenimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, özellikle dismorfik hasta yaklaşımını kendisinden öğrenme şansı yakaladığım, şuan emekli olan Sayın Hocam Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e teşekkür ederim. Bu tezin gerçekleşmesinde ve uzmanlık eğitimim süresince ilgi, sabır ve desteğini benden esirgemeyen, moleküler genetik alanında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Kayhan'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hocalarıma uzmanlık eğitimim süresince kendilerinden öğrendiğim, meslek yaşantım boyunca her zaman başvuracağım tüm etik ve mesleki değerler için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışma imkanı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve akademik-teknik personele teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak karşılıksız sevgi ve ilgileri ile her zaman yanımda olduklarını hissettiğim, her koşulda bana tüm desteklerini sunan anneme, babama, kardeşlerime ve eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prenatal lenfatik displaziler	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Prenatal lenfatik displazi patofizyolojisi	6
2.1.3. Prenatal lenfatik displazinin etiyolojisi ve prognostik önemi	12
2.2. Ras-MAPK yolağı	21
2.2.1. Ras-MAPK yolağı ve Ras-MAPK yolağında görev alan proteinler.....	21
2.2.2. Rasopatiler.....	31
2.2.3. Rasopatilerde prenatal bulgular	59
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1. Olguların Bilgileri.....	62
3.2. Deneysel Basamaklar.....	68
3.2.1. Rasopati panel kiti ile analiz yöntemi	68
3.2.1.1. Islak laboratuvar aşaması.....	69
3.2.1.1.1. Genomik DNA izolasyonu	69

3.2.2.1.2. Genomik DNA’da kalite-miktar tayinleri	71
3.2.1.1.3. Kütüphane hazırlanması	71
3.2.1.2. Biyoinformatik Analizler	80
3.2.1.2.1. Anotasyon ve Filtreleme.....	84
3.2.1.2.2. Varyant yorumlama ve sınıflandırma	85
4. BULGULAR	87
4.1. Demografik ve Klinik Özellikler	87
4.2. Rasopati Panel Analizi Sonuçları	90
4.2.1. Olgu 1.....	93
4.2.2. Olgu 2.....	98
4.2.3. Olgu 5.....	100
4.2.4. Olgu 6.....	103
4.2.5. Olgu 10.....	105
4.2.6. Olgu 11.....	108
4.2.7. Olgu 14.....	110
5. TARTIŞMA.....	114
5.1. Genotip-fenotip korelasyonları	119
5.1.1. Olgu 1.....	119
5.1.2. Olgu 5.....	126
5.1.3. Olgu 11.....	131
5.1.4. Klinik Önemi Belirsiz Varyant Saptanan Hastalar	135
5.2. Prenatal/Postnatal Klinik Bulgular ve Genetik Danışmanlık	139
6. SONUÇLAR	149

7. KAYNAKLAR.....	151
8. ÖZET.....	176
9. SUMMARY	178
10. ÖZGEÇMİŞ.....	179
11. EKLER	181
11.1. Ek-1: Bilgilendirilmiş Onam Formu-1	181
11.2. Ek-2: Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF).....	183

KISALTMALAR

ACGS	: Association for Clinical Genomic Science
ACMG	: American College of Medical Genetics and Genomics
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut miyeloid lösemi
Arg	: Arjinin
Array-CGH	: Array-comparative genomic hybridization, Array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon,
AS	: Amniyosentez
ASD	: Atriyal septal defekt
ATP	: Adenozin 5'-trifosfat
BAM	: Binary Alignment Map
BH	: Büyüme hormonu
BP7	: Benign Supporting 7
BRAF	: B-raf protooncogene serine/threonine kinase
BrdU	: 5-bromo-2-deoksiüridin
BWA	: Burrows-Wheeler Aligner
CALM	: Cafe au lait macules, kafeola lekeleri

CBL	: Casitas b-lineage lymphoma protooncogene
CFCS	: Cardiofaciocutaneous syndrome, Kardiofasyokutanöz sendrom
CMA	: Chromosomal Microarray Analysis, Kromozomal Mikroarray Analizi
CMEMS	: Congenital myopathy with excess of muscle spindles; Kas içciklerinin fazlalığı ile giden konjenital miyopati
CNV	: Copy Number Variations; Kopya sayısı değişiklikleri
CP	: Sitrat-fosfat Reaktif Tamponu
CRL	: Crown-rump length, baş-popo mesafesi
CS	: Costello sendromu
CUL3	: Cullin 3 proteini
DEHB	: Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu
DGV	: Database of Genomic Variants
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
E	: Erkek cinsiyet
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EEG	: Elektroensefalografi
EGF	: Epidermal growth factor, Epidermal büyüme faktörü
EKO	: Elektrokardiyografi
ERK1/2	: Extracellular signal regulated kinase 1/2, Hücre dışı sinyali regüle edici kinaz 1/2

EY	: Entellektüel yetersizlik
FDA	: U.S. Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FISH	: Fluorescence in situ Hybridisation, Floresans in situ hibridizasyon
FMF	: The Fetal Medicine foundation, Fetal Tıp Kuruluşu
FOXC2	: Forkhead box c2
GAP'lar	: GTPaz aktive edici proteinler; GAPs, GTPase-activating protein
GDP	: Guanosin-5'-difosfat
GEF'ler	: Guanine nucleotide exchange factors; GEFs, Guanin nükleotid değişim faktörleri
GHDM	: Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi
Gln	: Glutamin
GnomAD	: Genome Aggregation Database
Grb2	: Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	: Guanozin-5'-trifosfat
HGMD	: Human Gene Mutation Database
HKMP	: Hipertrofik kardiyomiyopati
HPO	: Human Phenotype Ontology
HPRD	: Human Protein Reference Database
HRAS	: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

IEG'ler	: İmmediate–early genes; IEGS, Çok-erken yanıt genleri
I-FISH	: İnterfaz- Fluorescence in situ Hybridisation
IGV	: Integrative Genomics Viewer
Ile	: İzolösin
IUGR	: İntrauterin gelişme geriliği
IVF	: İn vitro fertilizasyon
K	: Kız cinsiyet
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
KKA	: Konjenital kardiyak anomali
KRAS	: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KVÖ	: Koryonik villus örnekleme
Leu	: Lösin
LOVD	: Leiden Open Variant Database
LZTR1	: Leucine-zipper-like transcription regulator 1
MAP2K1	: Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAP2K2	: Mitogen-activated protein kinase kinase 2
Mb	: Megabaz
Met	: Metiyonin
mm	: Milimetre
mPCR	: Multiplex Polymerase chain reaction, Multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MRAS	: Muscle rat sarcoma viral oncogene homolog

mRNA	: Haberci (Messenger) ribonükleik asit
N	: Normal
NF	: Nükal kalınlık; nuchal fold
NF1	: Nörofibromatosis tip 1
NF2	: Nörofibromatosis tip 2
NGS	: Next-Generation DNA Sequencing, Yeni Nesil DNA Dizileme
NMLS	: Noonan-multipl lentijinöz sendromu, LEOPARD sendromu
NP-1	: Nörofilin 1
NRAS	: Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogen Homolog
NS	: Noonan sendromu
NT	: Nükal saydamlık, nuchal translucency
nt	: Nucleotide, nükleotid
OD	: Otozomal Dominant
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man
OR	: Otozomal Resesif
PCR	: Polymerase chain reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Platelet derived growth factor, Platelet kaynaklı büyüme faktörü
Phe	: Fenilalanin
PI3K	: Phosphatidylinositol-3-kinase pathway, Fosfatidilinositol-3-kinaz yolağı

PM1	: Pathogenic moderate 1
PM2	: Pathogenic moderate 2
PM3	: Pathogenic moderate 3
PM5_P	: Pathogenic moderate 5_supporting
PP1	: Pathogenic supporting 1
PP2	: Pathogenic supporting 2
PP3	: Pathogenic supporting 3
PP4	: Pathogenic supporting 4
PP5	: Pathogenic supporting 5
PROX-1	: Prospero homeobox protein 1
PS	: Pulmoner stenoza
PS1	: Pathogenic strong 1
PS3	: Pathogenic strong 3
PTP	: Protein tirozin fosfataz
<i>PTPN11</i>	: Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type, 11
PVS1	: Pathogenic very strong 1
<i>RAF1</i>	: Raf1 protooncogene, serine/threonine kinase
<i>RASA2</i>	: Ras p21 protein activator 2
Ras-GDP	: Ras proteininin GDP bağlı aktif olmayan formu
Ras-GTP	: Ras proteininin GTP bağlı aktif formu
Ras-GTPaz	: Ras-guanosine triphosphatase, Ras-guanozin trifosfataz
Ras-MAPK yolağı	: Ras-mitojen aktive protein kinaz yolağı
REM	: Ras değiştirici motif

RIT1	: RIC-like protein without caax motif 1
RRAS2	: Related ras viral oncogene homolog 2
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SAM	: Sequence alignment map
SAT	: Son adet tarihi
SFMS	: Schimmelpenning-Feuerstein-Mims sendromu
SH2 domain	: Src homology 2 domain, Src homoloji 2 domain
SHOC2	: SHOC2 leucine-rich repeat scaffold protein
SOS	: Son of sevenless
SOS1	: Sos Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1
SOS2	: Sos Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 2
SPRED	: Sprouty-related evh1 domain-containing protein
SPRED1	: Sprouty-related evh1 domain-containing protein
SPRED2	: Sprouty-related evh1 domain-containing protein 2
STR	: Short Tandem Repeats, DNA profilleme
TE	: Tris-EDTA tamponu
UCSC	: University of California Santa Cruz Genomics Institute
USG	: Ultrasonografi
UTR	: Untranslated region, translasyona uğramayan bölge
VarAft	: Variant annotation and filter tool
VCF	: Variant calling format
VEGF-A	: Vascular endothelial growth factor receptor, Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A

VSD : Ventriküler septal defekt

µl : Mikrolitre

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Ras ile ilişkili GEF ve GAP proteinleri.	24
Tablo 2. Ras-MAPK yolağında yer alan sendromlar ve ilişkili genler.	33
Tablo 3. Noonan sendromunun yaşa göre karakteristik dismorfik bulguları.	38
Tablo 4. Noonan sendromunda genotip-fenotip korelasyonu.	43
Tablo 5. Noonan sendromunun allelik hastalıkları ile ayırıcı tanısı.....	55
Tablo 6. Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezimize refere edilen lenfatik displazili olguların klinik özellikleri.	64
Tablo 7. Olguların konvansiyonel sitogenetik ve moleküler karyotip analiz sonuçları.	64
Tablo 8. i5 ve i7spesifik indeks PCR primerleri.	76
Tablo 9. Rasopati panel kiti dahilinde incelenen 13 gene ait bilgiler.	82
Tablo 10. Panel analiz verilerinin kapsam ve derinlik değerleri.	83
Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen 20 olgunun demografik verileri.	89
Tablo 12. Konvansiyonel ve moleküler karyotip analizleri normal olarak sonuçlanan olguların rasopati analizi sonuçları.....	91
Tablo 13. Olgu 1'in rasopati panel analizinde saptanan varyantları ve ilişkili hastalıklar.	96
Tablo 14. Olgu 2'nin rasopati panel analizinde saptanan varyant ve ilişkili hastalıklar.	99

Tablo 15. Olgu 5'in rasopati panel analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar.	102
Tablo 16. Olgu 6'nın rasopati panel analizinde saptanan varyant ve ilişkili hastalıklar.	105
Tablo 17. Olgu 10'un rasopati panel analizinde saptanan varyant ve ilişkili hastalıklar.	107
Tablo 18. Olgu 11'in rasopati panel analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar.	109
Tablo 19. Olgu 14'ün rasopati panel analizinde saptanan varyant ve ilişkili hastalıklar.	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Guanozin trifosfat (GTP) molekülünün iskelet formu.	26
Şekil 2. Fetal ultrasonografide nukal saydamlık artışı, nukal kalınlık artışı ve/veya kistik higroma endikasyonu ile Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezimize refere edilen prenatal invaziv girişim (koryonik villüs örnekleme veya amniyosentez) materyallerinde bu çalışma için belirlenen işleme ve dışlama kriterleri (KVÖ: Koryonik Villüs Örnekleme, AS: Amniyosentez, GHDM: Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi)	67
Şekil 3. <i>HRAS</i> geninde saptanan c.182A>G p.(Gln61Arg) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.	94
Şekil 4. <i>MAP2K1</i> geninde saptanan c.*88A>C heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.	95
Şekil 5. <i>RAF1</i> geninde saptanan c.171T>C p.(Thr57=) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.	99
Şekil 6. <i>PTPN11</i> geninde saptanan c.211T>C p.(Phe71Leu) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.	102
Şekil 7. <i>RAF1</i> geninde saptanan c.1804-27T>G heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.	104
Şekil 8. <i>MAP2K2</i> geninde saptanan c.-39C>T heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.	107
Şekil 9. <i>RIT1</i> geninde saptanan c.270G>A p.(Met90Ile) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.	109

Şekil 10. *SPRED1* geninde saptanan c.945T>G p.(Pro315=) heterozigot varyantının
BAM verisindeki görüntüsü. 112



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Prenatal dönemde fetal ultrasonografide (USG) nukal saydamlık (nuchal translucency; NT) ve nukal kalınlık (nuchal fold; NF) artışı ile kistik higroma belirlenmesi, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler karyotipleme (kromozomal mikroyarray) yapılması için öncelikli endikasyonlardandır. Artmış NT, NF ve kistik higromada algoritmik olarak ilk aşamada anöploidiler, ardında da kromozomal mikroyarray ile genomdaki kayıp ve/veya kazançlar araştırılmaktadır. Bu testler normal olarak raporlandığında bazı nörogelişimsel sendromlar araştırılmaktadır ki, bunlar içinde rasopatiler ile ilişkili olan sendromlar önceliklidir. Yapılan bu testler ile etiyoloji belirlendiğinde ilerleyen gebelik haftalarında karşılaşılabilecek ek bulgular açısından tedbir alınması, doğum sırasında ya da sonrasında karşılaşılabilecek sorunlar açısından gebelik takibi ve doğum eyleminin yönetiminde uygun koşulların oluşturulabilmesi ile etkin bir genetik danışmanlık verilmesi söz konusu olabilmektedir. Ayrıca belirlenen durumun ailesel veya *de novo* olmasına göre ailenin sonraki gebeliklerinde tekrarlama riskinin belirlenmesi ve aileye prenatal/preimplantasyon genetik tanı seçeneklerinin sunulması da söz konusu olabilmektedir.

Bu amaçla prenatal USG’de kistik higroma ve/veya artmış NT ve/veya artmış NF saptanması nedeniyle Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezimize (GHDM) refere edilen koryonik villus örnekleme (KVÖ) materyalinden veya amniyon sıvısından (AS) yapılan konvansiyonel sitogenetik ve moleküler karyotip analizleri normal olarak sonuçlanan 2022 -2023

yılına ait 20 fetüs retrospektif ve prospektif olarak bu çalışmaya dahil edilmiştir. Dokuz amniyon sıvısı, on koryonik villus örnekleme (KVÖ) materyali ve bir ex fetüse ait cilt biyopsisi örneğinden direkt doku ve/veya kültürden fetal DNA eldesi yapılarak rasopati ile ilişkili *BRAF*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *HRAS*, *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*, *KRAS*, *NRAS*, *SHOC2*, *SPRED1* ve *CBL* genlerinin tüm ekzonları ile birlikte ekzon-intron sınır bölgelerinin yeni nesil dizi analizi yöntemi ile çalışılması gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 20 hastanın üçünde klinik bulguları açıklayan heterozigot patojen varyant saptanmıştır. Hastaların beşinde klinik önemi bilinmeyen heterozigot varyant saptanmış olup, bu varyantlardan ikisi sinonim ve biri intronik varyanttır, iki varyant ise translasyona uğramayan bölgede yer almaktadır. Onüç fetüste ise rasopati ile ilişkili olarak değerlendirilen genlerde klinik bulguları açıklayan patojen/olası patojen varyant saptanmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışma, artmış NT/NF ve/veya kistik higroma nedeniyle invaziv girişim yapılan gebeliklerde, konvansiyonel sitogenetik ve moleküler karyotip normal saptandığında, ileri moleküler bir analiz olarak rasopati ile ilişkili genlerinin incelenmesinin etiyolojiye katkısını göstermesi açısından değerli sonuçlar sunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prenatal lenfatik displaziler

2.1.1. Tarihçe

Fetal ultrasonografide saptanan kistik higroma, artmış NT ve artmış NF lenfatik displaziler olarak ifade edilmektedir (1). Bu lenfatik displazilerin gelişiminde öne sürülen hipotezler; kardiyak nedenler, ekstrasellüler matriks anomalileri, mediastinal kompresyon nedeniyle oluşan venöz konjesyon ve lenfatik sistem anomalileridir (2). Bu hipotezlerden lenfatik sistem gelişim anomalileri günümüzde ön plana çıkmış olup, bunlardan lenfatik sistemde gelişim defekti ya da lenfatik obstruksiyon varlığı en çok kabul gören patofizyolojik nedendir (1-6).

Onbirinci ile 14. gestasyonel haftalar arasında, fetal servikal omurgayı örten yumuşak doku ile fetal ense derisinin subkutanöz saydamlığı arasındaki maksimum mesafenin elektronik pergel yöntemi ile ölçülerek sonucun gestasyonel yaşa veya baş-popo uzunluğuna (crown-rump length; CRL) göre yorumlanmasıyla (7, 8) elde edilen fetal NT değerinin 95-99 persentilin üzerinde olması (3-3,5 mm) NT artışı olarak ifade edilmektedir (9, 10). Nukal saydamlık ölçümü, 1990'ların başında fetal anöploidilerin saptanması amacıyla birinci trimester tarama programlarına girmiştir (11-17) ve fetal anöploidiler ile NT artışı arasındaki ilişki literatürde ilk defa Nicolaides ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (15, 16). Nukal saydamlığın doğru olarak ölçülmesi ve fetal USG kalitesinin değerlendirilmesi için “*The Fetal*

Medicine Foundation” tarafından yayınlanan klavuz, halen çok sayıda ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır (FMF, <http://www.fetalmedicine.com>) (18). Gebeliğin erken döneminde fetal anöploidi riskinin saptanabilmesi için NT’nin tek başına veya diğer parametrelerle (maternal serum biyokimyasal değerleri) birlikte kullanılması günümüzde de önemli bir parametredir (8, 17, 19, 20). İnsidansı 1/285 ile 1/1.000-6.000 olarak bildirilen NT artışı, fetal anöploidilerin yanı sıra kardiyak anomaliler, bazı tek gen hastalıkları ve heterojen bir grup sendromun dahil olduğu çok sayıda fetal malformasyon ile de ilişkilendirilmektedir (11-14).

Benacerraf ve arkadaşları 1985 yılında ilk defa gebeliğin ikinci trimesterinde (14-26. gestasyonel haftalar arası) fetal ense derisinin en dış yüzeyi ile oksipital kemiğin dış yüzeyi arasını elektronik pergel yöntemi ile ölçerek sonografik olarak fetal nukal kalınlığı (NF) belirlemişlerdir (11). Nukal saydamlık ve NF kavramları birbirinin devamı olarak kabul edilmekle birlikte, ölçüm haftaları, ölçüm düzlemleri (NT, midsagittal düzlem; NF, aksiyal düzlem) ve fetal anöploidi risk tayini açısından farklılık göstermektedir, dolayısıyla birbirleri ile karıştırılmaması gerektiği belirtilmektedir (21, 22). Günümüzde 15 - 20. gebelik haftaları arasında fetal USG ile yapılan NF ölçümünün normal standartları ≤ 6 mm olarak kabul edilmektedir (23).

İlk kez 1828 yılında Redenbacher ve arkadaşlarınca tanımlanan kistik higroma, prenatal fetal USG’de sıklıkla saptanan lenfatik displazilerden biridir ve vasküler-lenfatik sistemi tutan makrokistik konjenital bir malformasyonu ifade etmektedir (1, 24-26). Higroma (hygroma) kelimesi Yunanca’da nem anlamına gelen ‘hyros’ ve tümör anlamına gelen ‘oma’ kelimelerinden türetilmiştir (27).

Kistik higromanın canlı doğumda 1.750'de bir, spontan düşüklerde 200'de bir ve düşük riski olan gebeliklerde ise 600-700'de bir sıklıkla saptandığı bildirilmektedir (28, 29). Kistik higroma tanısı genellikle gebeliğin ilk trimesterinin sonlarında fetusun ensesinin transvers ve midsagital USG görüntülerinde yapılan ense sıvısı ölçümlerinin, baş-popo uzunluğuna (CRL, crown-rump length) göre 95. persentil değerine eşit veya üzerinde olması ile ve kistik lezyonun septalı veya septasız olması ile konulmaktadır. Ayrıca, ölçümün güvenilirliği için fetüste sağlam bir kafatası ve omurga bulunuyor olması gereklidir (13, 14, 30).

Geçmiş yıllarda USG'de saptanan artmış NT ve kistik higromanın teşhisi ve önemi konusundaki karmaşa yüksek frekanslı endovajinal problemlerin geliştirilmesiyle ortadan kalkmıştır. Günümüzde artmış NT ve kistik higromanın birbirinden farklı iki ayrı anatomik bulgu olduğu düşünülmeyle birlikte, bir standardizasyonun olmaması nedeniyle kistik higroma tanımı çalışmalar arasında farklılık gösterebilmektedir (14, 31). Fetal anöploidi, kardiyak malformasyon ve antenatal veya neonatal ölüm ile kistik higroma arasında daha fazla ilişki olduğundan, artmış NT'den ayırt edilmesi önemlidir (12). Bu nedenle, daha gelişmiş genetik test yöntemleri uygulanarak kistik higroma ile genetik sendromlar arasındaki ilişkinin ortaya konulmasıyla kistik higromanın tanımı, sınıflandırması ve standardizasyonunun yapılması önem arz etmektedir (14).

Kistik higroma ile kromozomal anomalilerin birlikte görülme oranları %29-60 arasında değişmektedir (12-14, 30). Trizomi 21 (Down sendromu), Turner sendromu (Monozomi X), trizomi 18 (Edwards sendromu) ve trizomi 13 (Patau sendromu) kistik higromanın en sık görüldüğü anöploidiler olarak bilinmektedir.

Bunların yanı sıra kromozomlarda kayıp (delesyon) ve/veya kazançlar (duplikasyon) da kistik higroma etiyolojisinde yer almaktadır. Ayrıca, normal karyotip saptanan kistik higromalı olgular rasopatiler başta olmak üzere Roberts sendromu ve multipl piterjium sendromu gibi genetik sendromlarla da ilişkilendirilmektedir (12-14, 26, 28-30, 32, 33).

2.1.2. Prenatal lenfatik displazi patofizyolojisi

Prenatal dönemde saptanan lenfatik displaziler heterojen etiyolojiye sahip olduğundan, altta yatan patofizyolojik nedenler henüz tam olarak bilinmemektedir (34-36). Anöploid ve öploid fetüslerde yapılan ultrasonografik ve postmortem morfolojik çalışmalarda, lenfatik displazi patofizyolojisine dair çok sayıda hipotez öne sürülmüştür; kardiyak nedenler, ekstrasellüler matriks değişiklikleri, mediastinal kompresyon nedeniyle venöz konjesyon ve lenfatik sistem anomalileri bu hipotezler arasında yer almaktadır (37-40). Kardiyovasküler gelişim defektleri lenfatik displazilerle ilişkilendirilmekle beraber, sebep-sonuç ilişkisi açısından anlamlı veriler elde edilememiştir (34, 36). Kardiyovasküler defektler nedeniyle oluşan venöz konjesyon sonucu bölgesel bir kanlanma artışı oluşabilmektedir. Ancak, venöz/lenfatik drenaj bozulmadığı sürece bu durumun ödeme yol açma olasılığının olmadığı ifade edilmektedir (41, 42). Dolayısıyla, kardiyovasküler gelişim defektlerinin lenfatik displazi gelişiminde rol aldığına dair kesin kanıt bulunmamaktadır (36).

Son zamanlarda lenfatik sistem gelişim anomalilerinin lenfatik displazi patofizyolojisi için yeterli bir açıklama sağladığını ortaya koyan veriler literatürde bildirilmiş olup (3, 4, 6), bunlardan lenfatik sistemde gelişim defekti ya da lenfatik obstrüksiyon varlığı günümüzde en yaygın kabul gören hipotezdir (1-6). Lenfatik sistem, embriyonik sürecin beşinci haftasından itibaren internal juguler ven tomurcuklanmasından juguler lenfatik keselerin oluşması, gebeliğin ilk 10 haftasına kadar lenfatik düğümlerin gelişiminin tamamlanması, torasik duktun internal vene girmesi ve lenfatik damarların birbirine bağlanması yoluyla oluşmaktadır. Dolayısıyla torasik dukt, lenf sıvılarının ana drenaj damarıdır (3, 6, 43). Prenatal dönemde juguler lenfatik keselerin juguler venlere bağlanamaması ve drene olamaması, lenfatik sıvı birikimine ve juguler lenfatik obstrüksiyona yol açmaktadır. Bunun sonucunda juguler lenfatik keseler genişlemekte, lenf damarları ve çevresindeki bağ dokuda sıvı birikmektedir ki bu durum boynun arka kısmında kistik higroma denilen anatomik oluşuma neden olmaktadır. Periferik lenf ödem, ensedeki deri altı dokuları doldurarak üstteki cildin göreceli olarak aşırı büyümesi sonucunda ensede deri katlantısına ve düşük ense saç çizgisi oluşumuna yol açmaktadır. Bu lenfatik drenaj eksikliği, venöz sistemde artmış kan akış hacmine ve kardiyak defekt riskinde artışa neden olabildiği gibi mevcut kardiyak anomali de venöz sistemde kan akış hacminin artışına ve kistik higroma oluşumuna yol açabilmektedir (33). Kistik higroma ile benzer şekilde lenfanjiyogenez sürecindeki aksamaların da NT artışı patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir ve artmış NT'nin lenfatik bir malformasyona veya lenfatik sistemin gelişimsel defektlerine bağlı olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (2, 43, 44).

Rutin prenatal takiplerin 11-14. gestasyonel haftalarında NT ölçümü yapılmakta olup (11-17), sıklıkla 14. gebelik haftasından sonra kaybolma eğilimindedir (15-17, 35, 45). Lenfatik sistem gelişimiyle ilişkili teoriyle uyumlu olarak, lenfatik maturasyonda gecikmenin NT artışına yol açabileceği ve gecikmeli de olsa lenfatik sistem maturasyonunun tamamlanması ile de artmış NT'nin 14. haftada sıklıkla kaybolması açıklanmaktadır (2). Artmış NT'nin, 14. haftadan sonra devam etmesinin ise kistik higroma gelişme riskiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (2, 8).

Anöploidiler ile NT artışı arasındaki ilişki farklı çalışmalarda ele alınmıştır. Trizomi 21 ve Turner sendromunda sıklıkla görülebilen bir bulgu olan NT artışının muhtemelen farklı mekanizmalardan kaynaklandığı; Turner sendromunda juguler lenfatik kesenin yokluğuna ve lenfatik hipoplaziye, trizomi 21'de ise ense derisindeki lenfatik damar ektazisine bağlı olabileceği öne sürülmektedir (2, 43, 46). Nukal ödem bulunan anöploid fetüslerde ve anöploid fare embriyolarında, juguler lenfatik keselerdeki venöz-lenfatik differansiyasyonun aksadığı, bu durumun lenfatik endotelyal hücrelerde lenfatik markerlar olarak bilinen *PROX-1* (Prospero homeobox protein 1) ve podoplanin ekspresyonunda azalma; vasküler markerlar olan *VEGF-A* (Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A) ve *NP-1*'de (Nörofilin 1) anormal ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (6). Ayrıca nukal saydamlığı artmış olan ense derisi patolojik olarak incelendiğinde, juguler lenfatik sistemde anormal genişlemiş düz kas hücrelerinin izlendiği ve bu durumun *FOXC2* (Forkhead box c2) ekspresyonunda azalma ve *PDGF-B* (Trombosit kökenli büyüme faktörü-B) ekspresyonunda artışla ilişkili olabileceği

bildirilmiştir (47). Bu ekspresyon farklılıklarının nukal ödem gelişimine katkıda bulunan nedenlerden olabileceği düşünülmekle birlikte, ekspresyon farklılığına neden olabilecek olası diğer mekanizmalar henüz bilinmemektedir (47).

Anöplöid fetüslerde artmış NT ile konjenital kardiyak anomali (KKA) birlikteliğinin yüksek insidans gösterdiği literatürde sıklıkla ortaya konulmuştur (37, 48-50). Majör kardiyak defekt saptanan fetüslerin yaklaşık üçte birinde, kardiyak anomalinin tipinden bağımsız olarak NT artışı eşlik edebilmektedir (48). Bu nedenle rutin prenatal takiplerde, artmış NT patofizyolojisi değerlendirilirken kardiyak etiyoloji teorisi nedeniyle NT ölçümü $>3,5$ mm olduğunda ekokardiyografi (EKO) ile fetüsün takip edilmesi önerilmektedir. Ancak anöplöidik fetüslerde artmış NT patofizyolojisi kardiyak etiyoloji teorisiyle açıklanabilirken, normal karyotipli fetüslerde bu teori ile yeterli bir açıklama sağlanamamaktadır (35). Artmış NT'si olan ve normal karyotipe sahip fetüslerde KKA insidansı NT boyutuna göre değişmektedir. Artmış NT'si olan Trizomi 21 tanılı fetüslerin yaklaşık %70'inde KKA bildirilmiştir (3). Sonuç olarak kardiyovasküler gelişim defektlerinin artmış NT, artmış NF ve kistik higroma ile ilişkisi sıklıkla değerlendirilmekle birlikte, sebep-sonuç ilişkisi açısından anlamlı veriler elde edilememiştir (34-36). Kardiyovasküler defektlere bağlı olarak venöz konjesyon sonucu bölgesel bir kanlanma artışı olabilir, ancak venöz/lenfatik drenaj bozulmadıkça bu durumun ödeme yol açma olasılığının bulunmadığı ifade edilmektedir (41, 42). Lenfatik obstrüksiyon sonucu oluşan dilate lenfatik kanalların aort ve sol atriya kompresyon yapması nedeniyle de çeşitli kardiyak defektlerin olduğu düşünülmektedir (29, 51). Lenfatik displazi patojenezinde,

lenfatik ve kardiyak sistem anomalileri arasındaki olası ilişkinin aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (4, 35).

Artmış NT ile ekstrasellüler matriks değişiklikleri arasındaki olası ilişki ilk olarak, normal ve trizomi 21’li fetüslerin ense derisindeki ekstrasellüler matriks komponentlerinden kollajen tip VI’nın daha dens ve gelişigüzel yerleştiğinin saptanması ile gündeme gelmiştir (52, 53). Kollajen tip VI proteinini kodlayan *COL6A1* ve *COL6A2* genleri, 21. kromozom üzerinde yer almaktadır ve bu değişikliklerin gen dozaj artışı ile açıklanabileceği ileri sürülmektedir. Trizomi 21’li fetüslerin cilt dokusunda yapılan sonraki çalışmada ise kollajen tip VI alfa-1 zincirini kodlayan mRNA’nın hücre içinde artmış olduğu gösterilmiştir (38).

Kollajen tip VI hiyaluronik asite bağlanan bir glikozaminoglikandır. Trizomi 21’li fetüslerin cilt dokusunda, normal fetüslere ve trizomi 13 ile trizomi 18’li fetüslere göre aşırı miktarda hiyaluronik asit olduğu saptanmış olup (52-54), fazla miktarda bulunan hiyaluronik asit nedeniyle artan interstisyel sıvıya bağlı olarak artmış NT gelişmiş olabileceği öne sürülmüştür (52, 53). Kollajen tip VI, hiyaluronik asit ve diğer ekstrasellüler matriks komponentlerinin normal fetüslerin ve artmış NT’si olan trizomi 21, trizomi 13 ve trizomi 18’li fetüslerin ense cilt dokularının ışık ve elektron mikroskobu incelemelerinde her bir fetüsün ekstrasellüler matriks düzenlenmesinin birbirinden farklı olduğu (52, 54, 55), trizomi 16’lı fare embriyolarında ise intersellüler alanda belirlenen glikozaminoglikan artışının trizomi 21’li fetüslerle uyumlu olduğu saptanmıştır (55). Ancak, anöploidik ve normal fetüslerdeki nukal ödem patojenezi yalnızca değişmiş hücre dışı matriks bileşenleri ile açıklanamamaktadır. Ayrıca, NT artışının

gebeliğin belli bir haftasından sonra gerilemesinin de bu teori ile açıklanması güçtür. Hücre dışı matriks değişikliklerinin hücre göçünün bozulmasına katkıda bulunabileceği düşünülmekle birlikte, bu sonucun yeni çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır (35). Ekstrasellüler matriks değişiklikleri teorisi ile akondrogenesis tip II, tanatoforik displazi, akondroplazi ve zellweger sendromunda görülen artmış NT patofizyolojisinin açıklanabileceği öne sürülmekle birlikte, mevcut verilerin kanıt niteliğinde olmadığı belirtilmektedir (56).

Artmış NT patofizyolojisinde rol alan diğer bir teori ise venöz konjesyon teorisi olup, konjenital diyafragmatik herni ve özefageal atrezisi olan fetüslerde mediastinal kompresyona bağlı olarak boyun ve bacaklarda venöz konjesyonun artabileceği ifade edilmektedir (40, 57, 58). Özellikle iskelet displazilerinde dar göğüs kafesi nedeniyle oluşan venöz konjesyon sonucu artmış NT gelişebileceği öne sürülmektedir (51). Ancak bu teori ile normal ve anöploidik fetüsler ile konjenital diyafragmatik hernisi ve özefageal atrezisi olmayan genetik sendromlarda artmış NT'nin varlığı açıklanamamaktadır (40, 57, 58).

Gebeliğin 15-20. haftalarında belirlenebilen NF'nin patofizyolojisiyle ilişkili teoriler, NT artışı için öne sürülen teorilerle benzerlik göstermekle beraber, artmış NF'li fetüslerin anatomik özelliklerine ilişkin daha az sayıda çalışma olduğundan yeterli kanıt elde edilememiştir (59). Nukal saydamlığın ve NF'nin birbirinin devamı niteliğinde antiteler olabileceğini ileri süren çalışmalar olduğu gibi etiyolojik ve patofizyolojik olarak tamamen bağımsız olabileceklerini de öne süren çalışmalar mevcuttur (59). Nukal kalınlık ve saydamlık arasındaki olası patofizyolojik benzerliğe rağmen trizomi 21'li fetüslerde, bu iki parametre değişik

oranlarda korelasyon göstermektedir. Bu durum NT ve NF'nin oluşumunda farklı mekanizmaların söz konusu olabileceğini düşündürmektedir (22, 59, 60). Trizomi 21 dışındaki anöploidiler için ise NT ve NF değerleri arasındaki korelasyonun yorumlanabilmesi için güncel literatürde yeterli veri bulunmamaktadır.

2.1.3. Prenatal lenfatik displazinin etiyolojisi ve prognostik önemi

Gebeliğin 11.-14. haftalarında yapılan NT ölçümü ile NT değeri 95.-99. persentil arasında olan ve normal karyotip saptanan fetüslerin %93'ünün sağlıklı bir yenidoğan olarak doğduğu bildirilmektedir (61). Ancak, 95. persentil ve üzerinde (≥ 3 mm) NT ölçümüne sahip fetüslerde, majör konjenital anomali görülme sıklığı önemli oranda yüksektir (62). NT ölçüm değerindeki her 1 mm'lik artış ile fetüste majör konjenital anomali riskinin %13 oranında arttığı bildirilmektedir. Doksan beş persentil ve üzerinde NT'ye sahip fetüslerde, %11.4-87.5 oranında kromozomal anomali saptandığı (63) ve bu fetüslerin ortalama NT değerlerinin 6 mm (ortalama 2-26 mm) olduğu, aynı çalışmada artmış NT'si olan ve normal karyotipli fetüslerde ise ortalama NT değerlerinin 4.1 mm (ortalama 1.9-12 mm) olduğu bildirilmektedir (64).

Nukal saydamlık ölçümü tek başına veya maternal serum biyokimyasal belirteçler gibi diğer parametrelerle birlikte değerlendirildiğinde, fetal anöploidilerin yanı sıra kardiyak anomaliler, intrauterin enfeksiyon, majör konjenital anomaliler, bazı tek gen hastalıkları ve heterojen bir grup sendrom dahil olmak üzere çok farklı fetal malformasyon için önemli bir parametre olarak

kullanılmaktadır (11-14, 58, 65). Başta kardiyak anomaliler olmak üzere iskelet sistemi anomalileri, genitoüriner sistem anomalileri, gastrointestinal sistem anomalileri ve santral sinir sistemi anomalileri de sıklıkla artmış NT'ye eşlik edebilmektedir (62, 66-68).

Gebeliğin 11-14. haftalarında saptanan artmış NT, sıklıkla 14. gebelik haftasından sonra gerileme eğiliminde olup, bu durumun nedeni tam olarak açıklanamamaktadır (15-17, 35, 45). İlerleyen gestasyonel haftalarda artmış NT'nin devam etmesi ve/veya hidrops fetalis gelişmesi ise konjenital enfeksiyon veya genetik sendrom olasılığını düşündürmektedir (7).

Normal konstitüsyonel karyotip belirlenen NT artışı olan fetüslerde, submikroskopik kromozomal değişiklikleri veya kopya sayısı değişikliklerini belirlemek amacıyla kromozomal mikroarray veya array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array-comparative genomic hybridization; array-CGH) tekniği kullanılmaktadır ki bu teknik ile fetüslerin %4.1-12.8'inde etiyolojide kopya sayısı değişikliklerinin saptandığı bildirilmektedir (61, 69-71). Bazı çalışmalarda submikroskopik kromozomal değişiklikler açısından NT ölçümü için cut-off değer 95. persentil ve üzeri olarak önerilmektedir (58, 72-74). Bir meta-analizde, ≥ 3 mm (≥ 95 . persentil) izole NT'si olan fetüslerde genomda kopya sayısı değişiklikleri (Copy Number Variations, CNV) saptanma oranı %3,89 iken izole NT $\geq 3,5$ mm (≥ 99 . persentil) olan fetüslerde ise %4,1 olarak bildirilmiştir (75). Gebeliğin birinci trimesterinde NT ölçümünün de içinde olduğu rutin taramalar, ikinci trimester ve sonrasında yapılan taramalara göre daha erken aylarda prenatal tanı yapılabilmesi ve ailelerin gebeliğin prognozu açısından karar verebilmesinin sağlanması

açısından değerlidir. Fetal Tıp Derneği (*The Fetal Medicine Foundation, FMF*)'ne göre anne yaşı ve NT artışının birlikte kullanılarak elde edilen 1/300 risk oranı, tekil gebeliklerdeki trizomi 21 olasılığını %8,3 yanlış pozitiflik ve %82,2 duyarlılıkla sunmaktadır (73). Dikoryonik ikiz gebeliklerde NT ölçümü ile yapılan risk değerlendirmesinde, yanlış pozitiflik ve duyarlılık oranı tekil gebelikler ile benzerdir. Monokoryonik ikiz gebeliklerde ise artmış NT, ikizler arası transfüzyon nedeniyle de olabileceğinden, yanlış pozitiflik oranı tekil gebeliklerden yüksektir (63).

Artmış NT'nin spontan düşükler veya intrauterin fetal kayıplarla ilişkisi iyi bilinmektedir ve artmış NT'de intrauterin fetal kayıp riski %5-63 arasında değişebilmektedir (20, 26, 62, 64). Artmış NT saptanan fetüslerin %30'u 12. gestasyonel haftadan önce kaybedilmekte iken 16. haftadan önce saptanan artmış NT ve anöploidi birlikteliğinde ise fetal kayıp oranı %20 olarak bildirilmektedir (63). İntrauterin fetal kayıp/kendiliğinden düşük görülen artmış NT'li fetüslerin büyük çoğunluğunda, etiyolojide eşlik eden majör kardiyak defektlerin ve/veya fetal hidropsa ulaşabilecek düzeyde sıvı birikimlerinin bu durumdan sorumlu olabileceği ifade edilmektedir (35, 76).

Nukal saydamlık ölçümü 6,5 mm'nin üzerinde olan ve majör konjenital anomalisi olmayan gebeliklerin üçte birinde, fetüsler normal olarak doğabilmektedir (20). Ancak, artmış NT'ye sahip normal karyotipli fetüslerde neonatal ve infantil dönem bebek ölümleri %1 oranında bildirilmektedir (20). Prenatal dönemde artmış NT saptanan gebeliklerin postnatal takiplerinde nörogelişimsel bulguların saptanma oranı %0,4-5,6 oranında değişmekle birlikte,

postnatal süreçte geç çocukluk dönemine kadar belirti vermeme ihtimali nedeniyle artmış NT'li gebeliklerdeki nörogelişimsel bulguların prevalansı tam olarak ortaya konulamamaktadır (20). Fetal USG'de artmış NT saptanan gebeliklerde, izlenen prognostik süreçlerin bu kadar geniş spektrumu olması nedeniyle verilen genetik danışma süreçleri de zorlu olmaktadır (77).

Artmış NF, Down sendromu başta olmak üzere diğer anöploidiler ve kromozomal kayıp veya kazançlarla ilişkili en hassas ve spesifik izole USG belirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir (78). Artmış NF, fetal hidrops veya kistik higromanın erken bir bulgusu olabileceği gibi (79) diğer anöploidiler, triploidiler, kromozomlarda kayıp (delesyon) ve/veya kazançlar (duplikasyon) ve rasopatiler ile de ilişkilendirilmektedir (11, 61, 80). Ayrıca, artmış NF varlığında alkol, aminopterin ve trimetadion gibi teratojenlere maruziyet durumu da göz önünde bulundurulmalıdır (33). Artmış NF saptanan fetüslerde trizomi 21 saptanma oranı %4-36 arasında değişmekle beraber, NF değeri ≥ 6 mm olduğunda Down sendromu lehine duyarlılık %25-100 ve özgüllük %94-100 olarak bildirilmektedir (11, 23, 81).

Artmış NF'nin artmış NT'ye göre çok daha güvenilir bir ultrasonografik belirteç olduğunu ortaya koyan çalışmalar (82, 83) mevcut olmakla beraber, NT'nin ilk trimester belirteci olması onu halen değerli kılmaktadır. Artmış NF'de gebelik haftası ile birlikte spontan rezolüsyon bildirilmiş olup, prognoza olumlu ya da olumsuz katkısı bulunmamaktadır. Ayrıca, fetal USG ile takibinde NF'de rezolüsyon görülmesi normal karyotip veya anöploidi ile ilişkilendirilmemiştir (84). Artmış NF'li fetüslerde kromozomal mikroarray analizi (Chromosomal

Microarray Analysis, CMA) ile CNV'lerin değerlendirildiği bir çalışmada, patojenik CNV saptanma oranı %16,1 olarak belirtilmiştir (78). Nukal kalınlık değeri ≥ 6 mm olduğunda patojenik CNV saptanma olasılığı anlamlı derecede artmaktadır (78). Patojenik CNV saptanan artmış NF'li fetüslerin yer aldığı bir kohortta en sık santral sinir sistemi anomalileri ve konjenital kalp defektlerinin eşlik ettiği ve prognozun saptanan CNV'nin boyutuna, kapsadığı genlerin sayısına ve o bölgede yer alan genler tarafından kodlanan proteinlerin görevlerine bağlı olarak farklılık gösterdiği belirtilmektedir (78).

Prenatal dönemde sıklıkla rastlanan kistik higroma majör anomalilerden olup, birinci trimesterin son haftaları ile ikinci trimesterin başlarına kadar saptanma sıklığı plato çizerek artış göstermektedir. Daha ileri gebelik haftalarında ise nadiren tespit edilmektedir (26, 28, 29). Tekil gebeliklerde görülme sıklığı %0,35 olarak bilinmektedir (28, 29). Fetal prognoz, kistik higromanın başlangıç zamanına ve septalı ya da septasız oluşuna göre farklılık gösterebilmektedir. İlk trimesterde saptandığında, septasız olduğunda ve normal karyotip varlığında iyi prognoz ile ilişkilendirilirken, ikinci trimesterde saptandığında anöploidilerle ilişkili olma ihtimali daha fazla olup, prognoz daha kötü olduğu düşünülmektedir (33). Ayrıca, septalı kistik higromada, septasız forma göre prognoz daha kötü olduğu kabul edilmektedir (12, 33).

Sıklıkla boyun (%75), aksiller (%20) ve daha az sıklıkla (%5) retroperitoneal bölgede bulunan ve fetal USG'de bu bölgelerden birinde kistik lenfanjiomlar saptanması ile tanı konulan kistik higromalar, şekil olarak tek (monoloküle) veya çok sayıda (multiloküle) septasyonlu olabilmektedir (24).

Boyun bölgesini tutan servikal kistik higromaların %20-25'inin servikal lenfatik tümörler ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir (26). Kistik higromalı fetüslerin %15-20'sinin sağlıklı bir bebeğin doğumuyla sonuçlandığı bilinmektedir (12). Ancak, fetal USG'de izole kistik higroma saptanan fetüslerde KVÖ materyalinden veya amniyon mayiinden yapılan karyotip analizinin normal olması durumunda dahi ebeveynlere prognozun belirsiz olduğu konusunda danışmanlık verilmesi gerekmektedir. Gebelik devam ediyorsa detaylı USG serileri ile fetüsün yakından takip edilmesi önerilmektedir (33).

Kistik higroma sıklıkla birinci trimesterdeki fetal USG takiplerinde saptandığından, invaziv tanı testi olarak 10.-14. gebelik haftalarında uygulanan KVÖ, amniyosenteze göre daha sık tercih edilmektedir (85). Yapılan çalışmalarda, anormal USG bulgularının KVÖ endikasyonları arasında en yüksek pozitif prediktif değere sahip olduğu, anöploidi ile ilişkili en güçlü sonografik belirtecin ise kistik higroma olduğu bildirilmektedir (86). Septalı kistik higromalar 10. gebelik haftasından önce transvajinal USG ile belirlenebilirken, septasız kistik higromaların 13. haftadan daha erken dönemde teşhisi zordur (77). Literatürde kistik higromaların %26-83 oranında septasız olduğu, ancak septasyon varlığı ile anöploidiler arasında pozitif korelasyon bulunduğu bildirilmektedir (14, 33). Trizomi 21 (Down sendromu), Turner sendromu (Monozomi X), trizomi 18 (Edwards sendromu) ve trizomi 13 (Patau sendromu) kistik higromanın en sık görüldüğü anöploidilerdir. Bunların yanı sıra kromozomlarda kayıp (delesyon) ve/veya kazançlar (duplikasyon) ve rasopatiler başta olmak üzere genetik sendromlarla da ilişkilendirilmektedir (12-14, 26, 28-30, 32).

Fetal USG’de konjenital anomali saptanan fetüslerde normal karyotip oranları %25-53 arasında değişmektedir (13). Kistik higroma bulgusu olan fetüslerde ise normal karyotip saptanma oranı %22-32’dir (29). Ancak, normal karyotipe sahip kistik higromalı fetüslerde artmış fetal kayıp riskinin yanı sıra kardiyak, iskelet, pulmoner anomaliler ve Noonan sendromu gibi postnatal başlangıçlı bozukluklar görülebilmektedir (30). Özellikle birinci trimesterde kistik higroma varlığı belirlenen normal karyotipe sahip fetüslerin üçte birinde ek majör yapısal anomaliler bildirilmiş olup, bu durum kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (12, 14). Benzer olarak, kistik higroma saptanan fetüslerde anormal karyotip saptanmasının da kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (12, 14, 29). Ayrıca, gelişimsel hastalıkların saptanma oranları %5.9 olarak rapor edilmektedir (13). Bu nedenlerle kistik higroma varlığında genetik etiolojinin belirlenmesinin, aileye verilecek genetik danışmanlığa yön vermesinde, prognozun belirlenmesinde, ailenin gebeliği sürdürme kararında ve gebeliğin klinik yönetiminde büyük önemi vardır (29). Prenatal dönemde invaziv girişim endikasyonu olan 2373 gebe ile yapılan bir çalışmada, prenatal invaziv tanıyı en çok kabul eden endikasyon grubunun fetal USG’de kistik higroma saptanan gebeler olduğu bildirilmiştir (87) ki bu durum, kistik higroma tanısı sonrasındaki genetik danışmanlık ve prognoz tayininin anne/ebeveyn anksiyetesi açısından önemini vurgulamaktadır.

Konjenital kardiyak anomalilerin toplum insidansı %0,34 iken kistik higroma saptanması durumunda bu risk %4,3’e yükselmektedir (26). Kistik higroma ile birlikteliği en sık rapor edilen yapısal anomaliler kardiyak

malformasyonlardır (12, 14). Daha sonra iskelet sistemi başta olmak üzere ürogenital sistem, sinir sistemi ve karın duvarı anomalileri sıklıkla yer almaktadır (14, 64). Persistan sol superior vena kava, intestinal malrotasyon, duodenal atrezi ve imperfore anüs gibi prenatal USG’de tespit edilemeyen bazı malformasyonlar da kistik higromaya eşlik edebilmektedir (33).

Fetal USG’de kistik higroma belirlenen ve normal konstitüsyonel karyotip tespit edilen fetüslerde submikroskopik kromozomal değişiklikleri veya kopya sayısı değişikliklerini belirlemek amacıyla CMA veya array-CGH tekniği kullanılmaktadır ki bu teknik ile fetüslerin %3,1–7,9’unda kopya sayısı değişikliklerinin saptanabildiği bildirilmiştir (12-14, 88). Minör genetik varyantların kistik higroma fenotipinde rol oynadığını düşündüren normal karyotipe sahip ailesel kistik higroma vakaları da tanımlanmıştır (13).

Literatürde fetal USG’de kistik higroma saptanan vakaların %40-60’ı Turner sendromu ile ilişkilendirilirken, bu sendroma sahip gebeliklerin yaklaşık %99’u kendiliğinden düşükle sonlanmaktadır (28). Tüm gebeliklerin %1-2’sinde saptanan Turner sendromu, spontan fetal kayıpların %7-10’undan sorumlu tutulmaktadır. Turner sendromunda, periferik lenfatik damarların aplastik veya hipoplastik olabildiği gösterilmiş ve bu nedenle, fetüste artmış NT ve kistik higroma gelişebileceği belirtilmiştir. Ancak, Turner sendromlu tüm fetüslerde kistik higroma bulunmayabileceği gibi kistik higroma saptanan Turner sendromlu birçok fetüste eşlik eden aort kapak defektleri ve septal defektlerin de dahil olduğu kardiyak gelişim anomalileri de izlenebilmektedir (33).

Kistik higromada, septada/septalarda biriken proteinden zengin sıvının fetüste fetal hipoproteinemiye bağı jeneralize ödem ve nonimmün hidrops fetalis nedeni olabileceğı belirtilmektedir. Hidrops fetalis gelişmesi %96.5 oranında fetal kayıpla sonuçlanmakla birlikte, alternatif bir drenaj yolunun gelişmesi veya juguler venlerle juguler lenfatik keseler arasında bağlantı oluşması durumunda hidrops ve kistik higromaların gerileyebileceğı, hatta nadiren tamamen iyileşebileceğini gösteren raporlar da bulunmaktadır (14, 29, 33). Kistik higromanın spontan rezolüsyonu iyi bir prognostik gösterge olarak kabul edilmekle birlikte, bu durum kesin kural değildir (32, 33). Anöploidik fetüslerin %10'unda ve öploidik fetüslerin %17,6'sında regresyon olduğu bildirilmektedir (26, 29). Kistik higromanın 14. haftadan önce gerilemesinin, olumlu prognozun bağımsız bir göstergesi olup olmadığı konusunda ise daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır (32).

Normal karyotip saptanan kistik higromalı olgular rasopatiler başta olmak üzere Roberts sendromu, Angelman sendromu, iskelet displazileri, nörofibromatozis, serebromandibular sendrom, Fryns sendromu ve multipl piterjium sendromları gibi bir grup sendrom ile de ilişkilendirilmektedir (33, 64, 89, 90). Bu olgularda prognoz, postnatal saptanabilecek ek bulgular ve eşlik edebilecek diğer sistem anomalileri ve ilişkili sendroma göre değişkenlik göstermektedir. Bu sendromlar saptandığında özellikle sendromla ilişkili genin ve kalıtım paterninin bilinmesi genetik danışmanlık ve sonraki gebelikler için büyük önem arz etmektedir.

2.2. Ras-MAPK yolağı

2.2.1. Ras-MAPK yolağı ve Ras-MAPK yolağında görev alan proteinler

Rasopatiler ile ilişkilendirilmiş olan Ras ve MAPK/ERK (Ras-MAPK) sinyal yolağı; Ras, Raf, mitojenle aktive protein kinaz (MEK) ve ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) proteinlerinin görev aldığı bir sinyal yolağıdır. Lenfatik displaziler normal karyotipli fetüslerde bir çok sendrom ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte, en sık saptanan hastalık grubu rasopatilerdir. Rasopatiler, hücre içi sinyal yolaklarından Ras/mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yolağında görev alan proteinlerin veya yolağın düzenleyicilerini kodlayan genlerin germ hattı mutasyonlarının neden olduğu bir grup gelişimsel hastalık sınıfı olarak bilinmektedir (14, 91). Nörogelişimsel bulgular, nörokognitif bozukluk, hipotoni, makrosefali, nöbet, kraniyofasiyal anomaliler, kardiyak anomaliler, kutanöz bulgular, kas-iskelet sistemi anomalileri ve oküler anomaliler bu gruptaki hastalıkların ortak klinik özellikleridir (92). Rasopatilerle ilişkili genler tarafından kodlanan proteinlerde yapılan fonksiyonel çalışmalar, rasopatiler için ortak hastalık yapıcı mekanizmanın Ras-MAPK yolağının aktivasyonu ve/veya disregülasyonu olduğunu göstermektedir (93). Ras-MAPK yolağı embriyonik gelişim süreci için esas olup, memelilerde normal gelişim için gerekli olan hücre döngüsü, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücre göçü, hücrel canlılığın sürdürülmesi, apoptozis, hücre-matriks adhezyonu, anjiyogenez ve hücrel yaşlanmanın düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir (94). Ayrıca bu yolakta yer alan genlerdeki

fonksiyon kazanımına (gain-of-function) yol açan somatik mutasyonlar, kanserlerin üçte birinde saptanabilmektedir. Bu nedenle onkojenez için de Ras-MAPK yolağının önemli olduğu bilinmektedir (92). Bu yolda birbirinden farklı genler tarafından kodlanan Ras (Rat sarcoma virus: fare sarkom virüsü) , Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma: hızlı ilerleyen fibrosarkom), MEK (mitogen-activated protein kinase: mitojenle aktive protein kinaz) ve ERK (extracellular signal-regulated kinases: hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz) proteinleri ve bu proteinlerin izoformlarını içeren moleküller bulunmaktadır. *RAS* ve *RAF* genlerinin protoonkogenler oldukları ve somatik hücrelerde ortaya çıkan bu genlerdeki mutasyonların kanserle ilişkisi bilinmektedir (95). *KRAS* ile *BRAF*'taki somatik mutasyonlar da çeşitli malignitelerde gözlenen en yaygın genetik değişikliklerdendir (95). Bu nedenle yolda yer alan genler, kanser araştırmalarının önemli hedeflerindendir (92).

Ras-MAPK yolağının önemli elemanlarından olan Ras proteini, *HRAS*, *NRAS* ve *KRAS*'ı kapsayan bir gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Ras proteini, Ras süper ailesine ait bir proteindir (96). G protein ailesine ait olan Ras süper ailesi, çeşitli hücresel süreçleri kontrol eden beş alt grupta sınıflandırılan en az 154 üyeden oluşmaktadır: Ras, Rho, Rab, Arf ve Ran aileleri (96). G protein ailesinde yer alan proteinler tipik olarak 20-25 kDa büyüklüğe sahiptir ve inaktif form olan GDP-bağlı konformasyon ile aktif form olan GTP-bağlı konformasyon arasında döngü yaparak işlev görürler (97). G proteinlerinin çoğu C terminallerinde, lipid çapaları olarak işlev gören ve G proteinlerinin membranlara lokalizasyonuna katkıda bulunan prenil gruplarının (farnesil ve geranilgeranil gibi) eklenmesiyle

posttranslasyonel modifikasyona uğramaktadır (97). Ras proteini, GTPazların bir üyesi olup (Ras-GTPazlar, Ras-Guanosine triphosphates), GTP bağlı aktif form (Ras-GTP) ile GDP bağlı aktif olmayan form (Ras-GDP) arasında döngüsel olarak işlev gören bir moleküler anahtar gibi davranır; tümör oluşumu ve gelişimsel bozuklarla ilişkili önemli molekülledir (91, 95, 98). Ras-MAPK kinaz yolağı dahil olmak üzere çok sayıda hücre içi sinyal yolağı için merkezi bir sinyal molekülü olarak görev yapan Ras proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyon dengesi hassas bir şekilde düzenlenmektedir (99). Ras proteinlerinin aktif formu olan Ras-GTP'nin hücre içi konsantrasyonu, guanozin nükleotid değıştirici faktörler (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) ve GTPaz aktive edici proteinler (GTPase-activating proteins, GAPs) ile düzenlenmektedir (Tablo 1). İnaktif olan Ras-GDP-bağılı formdan aktif Ras-GTP formuna dönüşüm, GEF'ler tarafından uyarılmaktadır. İnaktif forma geri dönüş ise GAP proteinleri aracılığı ile sağlanmaktadır (100). GEF'ler ve GAP'lar, aktif-inaktif Ras seviyelerinin kontrol edilmesinde rol alan diğere proteinler, lipidler ve düzenleyici moleküllerle etkileşen birden fazla alana sahip büyük proteinlerdir (97).

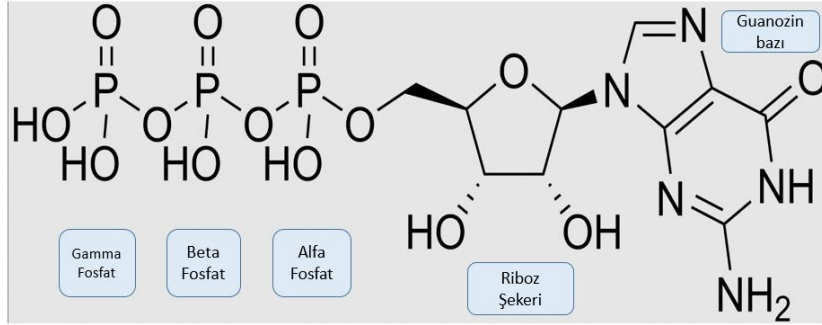
Tablo 1. Ras ile ilişkili GEF ve GAP proteinleri.

GEF'ler	GAP'lar
SOS (SOS1, SOS2)	RASA1
PLCE1	RASA2
RLF	IQGAP1
RAPGEF1	IQGAP2
RAPGEF2	SYNGAP1
RAPGEF3	NF1
RAPGEF4	GAPVD1
RAPGEF5	RAP1GAP
RAPGEF6	SIPA1
RAPGRF2	TSC2
	GARNL3

GEF'ler: Guanozin nükleotid değıştirici faktörler (guanine nucleotide exchange factors, GEFs), GAP'lar: GTPaz aktive edici proteinler (GTPase-activating proteins, GAPs) (97).

İlk keşfedilen Ras genleri olan *HRAS* ve *KRAS* genleri, 1982'de Edward M. Scolnick ve arkadaşları tarafından 'Harvey sarkom virüsü' ve 'Kirsten sarkom virüsü' üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda tanımlanmıştır (101). Ras genlerinin keşfine katkısı olan bu virüslerin ilk olarak 1960'larda Jennifer Harvey ve Werner H. Kirsten tarafından farelerde keşfedilmiş olmasına istinaden 'Ras' kelimesi "**Rat Sarkoma virüs**" baş harflerinden türetilerek oluşturulmuştur (101). Daha sonra Michael Wigler ve arkadaşları tarafından ras gen ailesine ait üçüncü gen olan *NRAS* geni keşfedilmiş, insan nöroblastom hücrelerinde tanımlanmış olması nedeniyle *NRAS* adı verilmiştir (102). Sekonder yapısında altı beta tabakası ve beş alfa sarmalı

içeren Ras proteini, iki domainden oluşmaktadır: birincisi guanozin nükleotidlerini bağlayan 166 amino asitlik (yaklaşık 20 kDa) G-domaindir (103). İkinci domain postranslasyonel modifikasyonda görevli olan enzimler (farnesil transferaz, Protein-S-isoprenylcysteine O-metiltransferaz, CAAX prenyl proteaz 2 gibi) tarafından modifiye edilen bir C-terminal hedefleme bölgesidir (CAAX-COOH; CAAX kutusu olarak da adlandırılmaktadır) (103). G domaini, GDP/GTP'yi doğrudan bağlayabilen evrimsel olarak iyi korunmuş beş adet aminoasit motifi (G1, G2, G3, G4 ve G5 motifleri) içerir (103, 104). G1 motifi, GDP ve GTP'nin beta fosfatını bağlamaktadır (GTP'nin moleküler yapısında yer alan üç fosfat molekülü alfa, beta ve gamma fosfat olarak adlandırılır (Şekil 1). Switch I olarak da adlandırılan G2 motifi, GTP'nin terminal fosfatını (γ -fosfat) ve aktif bölgeye bağlı bulunan iki değerlikli magnezyum iyonunu bağlayan treonin35'i içermektedir (105). Switch II olarak da adlandırılan G3 motifi, bir DXXGQ motifine sahiptir. DXXGQ motifinde D harfi, guanine veya adenin bağlanması için spesifik olan aspartat57'yi ve Q harfi ise GTP'nin GDP'ye hidrolizi için katalitik bir molekülü aktive eden glutamin61'i temsil etmektedir (105). G4 motifi, bir LVGNKxDL motifi içermekte ve guanine spesifik etkileşim sağlamaktadır. G5 motifi ise bir SAK korunmuş dizisi içerir. SAK dizisindeki A harfi, adenin yerine guanin için özgülük sağlayan alanin146'dır (105).



Şekil 1. Güanozin trifosfat (GTP) molekülünün iskelet formu.

Biyokimyada kinazlar, fosfat gruplarını ATP (Adenozin 5'-trifosfat) gibi yüksek enerjili moleküllerden belirli hedef moleküllere (substratlar) aktaran bir enzim türüdür; bu süreç fosforilasyon olarak adlandırılır (106). Bunun tam tersi görev yaparak fosfat gruplarını hedeflerden uzaklaştıran bir enzim ise fosfataz olarak bilinir. Tirozin amino asitlerini fosforile eden kinaz enzimleri tirozin kinazlar olarak adlandırılmaktadır (106). Bir büyüme faktörü, bir reseptör tirozin kinazın (RTK) ekstraselüler domainine bağlandığında, diğer komşu RTK'lar ile dimerizasyonu tetiklenir. Dimerizasyon, proteinin sitoplazmik kinaz domainlerinin hızlı bir şekilde aktivasyonuna yol açar ki bu domainler için ilk substrat reseptörün kendisidir. Sonuç olarak aktive olan reseptör, kendi domainleri üzerinde bulunan çok sayıda spesifik intraselüler tirozin aminoasidini fosforile ederek 'otofosforile' olur (106). RTK'lar çok sayıda polipeptit büyüme faktörü, sitokin ve hormon için yüksek afinitesi olan hücre yüzeyi reseptörleri olup, hücre büyümesi, farklılaşma, adhezyon, apoptozis, metabolizma ve hücre ölümü dahil olmak üzere çeşitli hücresel faaliyetlerde önemli roller üstlenirler. (107). Sadece metazoanlarda bulunan büyük ve çok çeşitli bir multigen ailesi olan protein tirozin kinaz ailesinden RTK'ların temel işlevleri, organizmalarda çok hücreliliğin gerektirdiği özelliklerin

düzenlenmesine dayanır (107). Hücre büyümesi, farklılaşma, adhezyon, motilite ve hücre ölümü ile ilişkili hücreler arası sinyaller genellikle tirozin kinaz reseptörleri ve ilişkili yollar aracılığıyla iletilir. Son 20 yılda protein tirozin kinaz gen ailesi üzerinde yapılan yoğun çalışmalar, bu genlerin ve ürünlerinin yapısı, düzenlenmesi ve işlevi hakkında çok sayıda bilgi üretmiştir (107). İnsan genomunda tanımlanan protein tirozin kinaz ailesine ait 90 farklı genden 58'i reseptör tirozin kinaz proteinlerini kodlamaktadır (108). RTK'ların normal hücresel süreçlerin temel düzenleyicileri olmalarının yanı sıra birçok kanser türünün gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir role sahip olduğu bilinmektedir (109). RTK'ları kodlayan genlerdeki mutasyonlar, transkripsiyonel süreçler ve dolayısıyla protein ekspresyonu ile ilişkili bir dizi sinyal kaskadının aktivasyonuna yol açar (110). RTK'ların çoğu tek subunitli reseptörlerdir, ancak bazıları multimerik proteinler halinde bulunur. Her bir monomer, 25 ila 38 amino asitten oluşan tek bir hidrofobik transmembran domainine, bir ekstrasellüler N- terminal bölgeye ve bir intrasellüler C- terminal bölgeye sahiptir (111). Ekstrasellüler N- terminal bölge, RTK'ların her bir subuniti için karakteristik olan immünoglobulin benzeri veya epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF) gibi, fibronektin tip III tekrarları veya sistein bakımından zengin bölgeler dahil olmak üzere çeşitli iyi korunmuş amino asit dizileri barındırır ki bu alanlar temel olarak ekstrasellüler ligandları bağlayan bir ligand bağlama bölgesi içerir (109). İntrasellüler C- terminal bölgesi en yüksek korunmuşluk seviyesine sahiptir. Bu C- terminal bölge, reseptörlerin işlevi için büyük önem arz eden reseptör otofosforilasyonu ve RTK substratlarının tirozin amino asitlerinin fosforilasyonunu katalize eden alanlar içerir (109). RTK'lar, bir

N-terminal ekstraselüler alan ve bir C-terminal intraselüler alan olmak üzere dimer yapıda bulunan iki reseptör zinciri ile karakterizedir (98). Ekstraselüler alan ligand tanıma işlevi ile ilişkilidir ve RTK sınıfına uygun olacak şekilde çeşitli bölgelerden oluşur. Transmembran-alan, dimerik reseptör zincirlerinin stabilizasyonuna katkıda bulunan bir α -heliks zincirden oluşur (98). Kendisi de dimerik yapıda olan bir ligandın reseptör zincirlerinin ekstraselüler alanlarına bağlanması reseptör zincirlerinin stabilizasyonunu güçlendirir, sonraki adımda reseptörlerin intrasellüler tirozin kinaz alanları aracılığıyla otofosforilasyon gerçekleşerek reseptöre özgün aracı moleküller ile sinyal aktarımı başlar (98). Örneğin yapısında disülfid bağlantılı dimerize zincirler bulunan insülin reseptörü, insülin hormonu varlığında ilişkili ligandların hücre dışı alanına bağlanması ile reseptör dimerlerinin oluşumunu ve stabilizasyonunu indükler (98, 112).

Reseptör tirozin kinazlar, enzimatik efektörleri (PLC γ , PI3K, Src vb.) doğrudan sitoplazmik bölgelerine alarak ya da dolaylı yoldan adaptör proteinler (Grb2, Shc vb.) aracılığıyla hücre içi enzimleri (Ras vb.) aktive edebilen kompleksler oluşturarak işlev görürler ve birçok hücrel sinyal yolağının başlangıç noktası olarak kabul edilirler (98). RTK'lar ile ilişkili sinyal yolları esas olarak Ras-MAPK yolağı, PI3K/AKT/MTOR sinyal yolağı, rkb/PLC γ 1 sinyal yolağı ve JAK/STAT sinyal yolağı olarak sıralanmaktadır (98). RTK'ların aktivasyonunu takiben sinyal iletiminin erken aşamalarında esas olarak tirozin fosforilasyonu gerçekleşir, sinyal iletiminin ilerleyen basamakları ise serin/treonin rezidülerinin fosforilasyonunun yanı sıra ubiquitinasyon, glikozilasyon veya asetilasyon gibi diğer biyokimyasal değişikliklerle ilişkilidir (98, 113). RTK'ların

ilişkili ligandlar tarafından uyarılması ile Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) proteininin SH2 bölgeleri, reseptör zincirlerindeki otofosforilasyona uğramış olan tirozin rezidülerine ve SOS proteininin SH3 bölgelerine bağlanır (98). Bu bağlanma, GDP'yi bir GTP ile değiştiren ve bir GEF proteini olan SOS aracılığıyla küçük G proteini olan Ras'ın aktivasyonunu sağlar. Ras aktive edildiğinde, Raf kinaz A, B veya C'nin (MAP3K olarak da bilinir) fosforilasyonu yoluyla sinyal kaskadında yer alan diğer proteinlerin sırayla 'fosforilasyonunu' başlatır. Aktif (fosforile) Raf proteini, MEK1 ve MEK2'yi (MAP2K1/2 olarak bilinir), fosforile eder. Aktif MEK1/2 proteinleri de ERK1 ve ERK2 (MAPK1/2) fosforilasyonunu katalize eder (98, 114). Fosforile ERK1/2, daha sonra hücrelerin hayatta kalması ve büyümesiyle ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlemede görevli olan transkripsiyon faktörlerini aktive etmek üzere çekirdek zarından geçer ve/veya sitoplazmik efektörleri hedefleyen sitozolik proteinleri aktive eder ve/veya kendisi bir transkripsiyon faktörü görevi yapmak üzere çekirdeğe aktarılır (98, 114). Bu transkripsiyon faktörlerinin hedefleri STAT, ELK1, CREB veya H3 histon gibi transkripsiyonu aktive eden transkripsiyonel regülatörlerdir. Bu transkripsiyonel regülatörler c-Fos, c-Jun veya c-Myc ekspresyonunu aktive ederek, ekspresyonu artan genlerin ve hücrenin G1 fazında ilerleyişi ile G1/S fazları arasında geçişi kontrol eden siklin D1 veya CDK6 gibi diğer genlerin ifadenmesinde artış sağlarlar (98). MAPK yolağı, ayrıca p38, JNK ve ERK5 gibi üç yan yolağı daha aktive etmektedir. Bu yan yolaklar hücre proliferasyonun düzenlenmesi, hücre çoğalması, anjiyogenez, hücre apoptozunun kontrolü ve/veya bağışıklık sisteminin aktivasyonunda görev alırlar.

Reseptör tirozin kinaz aktivitesi, reseptörün aktive ettiği yollar aracılığıyla ligand üretimini indükleyerek ve/veya sinyal amplitüdünün artırılması gibi yollarla çok sayıda pozitif veya negatif moleküler geri bildirim döngüsü ile sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu geri bildirim döngüleri RTK sisteminin stabilizasyonu için gerekli ve önemlidir. Üretilen sinyallerin amplitüdünü ve hücrel aktivitenin stimülasyonunu azaltmak suretiyle sitoplazmada bulunan kinazlar, fosfatazlar ve ubiquitin ligazlar gibi adaptör proteinler, RTK aktivitelerinin ilk ve erken negatif düzenleyicileri olarak rol oynarlar (115). Bu kontrol mekanizmalarından biri de sinyal kaskadını hemen anında düzenleyebilmek için hücre içinde hali hazırda mevcut olan proteinlerin RTK'ların aktivasyonu ile harekete geçmesi ve/veya indüklenmesi şeklindedir (erken negatif geri bildirim). RTK'ların ilişkili ligand (çoğunlukla büyüme faktörleri) ile uyarımından sonraki 30-60 dakika içinde ekspresyonu artan genler acil-erken yanıt genleri (immediate-early genes, IEGs) olarak, yaklaşık 120 dakika sonra ekspresyonu artan genler ise gecikmiş-erken yanıt genleri (delayed-early genes, DEGs) olarak isimlendirilir (116). IEG ve DEG'lerin negatif geri bildirim sağlama mekanizması, ilişkili genlerin mRNA yarı ömürlerinin düzenlenmesi ile sağlanır (116). Buna ek olarak, ERK1/2'nin çekirdeğe taşınması ile MAPK aktivitesini inhibe etme yeteneği olan fosfatazlar gibi transkripsiyonel baskılayıcıların ekspresyonu da aktive edilebilmektedir (geç negatif geri bildirim) (98). Ayrıca E3 ubiquitin ligaz gibi enzimler, RTK'ların ubiquitinasyonu ile reseptörlerin endositozuna ve lizozomal kompartmanda parçalanmasına sebep olarak sinyal üretiminin zayıflaması/azalmasını sağlamaktadır (98). Klatrin bakımından zengin membran bölgelerine yakın bir şekilde kümelenmiş halde

bulunan RTK'ların, ligand tarafından aktive edildikten sonra indüklenen sinyali azaltmak için klatrin bağımlı endositik veziküllere alınarak yıkılması sağlanır (98, 117).

2.2.2. Rasopatiler

Nörokardiyofasiyal kutanöz sendromlar olarak da bilinen rasopatiler, yaklaşık 1000'de 1 prevalans ile dünyada en sık görülen hastalık gruplarından (99) (Tablo 2). Ras-MAPK yolağı, her hücrede bulunmaktadır ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, farklılaşma, büyüme, apoptoz ve hücre yaşlanmasında kritik öneme sahiptir ve türler arasında yüksek oranda korunmuştur (99). Embriyogenezden itibaren postnatal dönemde hücrel homeostazın sağlanması da dahil gelişim sürecinde önemli rolleri olduğundan, Ras-MAPK yolağının işlevini etkileyen germ hattı mutasyonları gelişim sürecinde önemli ölçüde zararlı etkilere sahiptir (99).

Rasopatiler, Ras-MAPK yolağında yer alan genlerdeki patojenik değişimler sonucu ortaya çıkan ve ortak klinik özellikleri olan bir hastalık grubunu tanımlamaktadır. Noonan sendromu (NS) ve varyantları (*PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS*, *RIT1*, *LZTR1*, *SOS2*, *RRAS2*, *MRAS*, *MAPK1*, *BRAF* ve *CBL* genleri) en sık görülen ve en bilinen rasopati olmakla birlikte, Noonan-multiple lentijenöz sendromu (NMLS) (*PTPN11*, *RAF1* ve *BRAF* genleri), Costello sendromu (*HRAS* geni), kardiyofasiyokutanöz sendrom (CFCS, cardiofaciocutaneous syndrome) (*KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1* (*MEK1*) ve *MAP2K2* (*MEK2*) genleri), kapiller

malformasyon-arteriyovenöz malformasyon sendromu (*RASA1* geni), Legius sendromu (*SPRED1* geni) ve Nörofibromatozis tip 1 (*NF1* geni) bu grupta yer almaktadır (94) (Tablo 2). Rasopati ailesinde kraniyofasiyal, kardiyovasküler ve lenfatik anomalilerin yanı sıra nörogelişimsel bulgular ve büyüme problemlerini kapsayan ortak klinik özellikler bulunmaktadır (1). Genitoüriner anomaliler, kutanöz bulgular, hematolojik ve iskelet anomalileri ile maligniteye yatkınlık ise daha az sıklıkta görülen klinik bulgulardır (1).

Tablo 2. Ras-MAPK yolağında yer alan sendromlar ve ilişkili genler.

Sendrom	İlişkili gen/genler	OMIM numarası
NS	<i>PTPN11, KRAS,</i>	163950
	<i>SOS1, RAF1,</i>	609942
	<i>NRAS, RIT1,</i>	610733
	<i>SPRED2, MRAS,</i>	611553
	<i>BRAF, RRAS2,</i>	613224
	<i>SOS2, LZTR1,</i>	615355
	<i>MAPK1</i>	619745
		618499
		613706
		618624
Noonan sendromu benzeri sendromlar	<i>CBL</i>	613563
	<i>PPP1CB</i>	617506
	<i>SHOC2</i>	607721
Costello sendromu (CS)	<i>HRAS</i>	218040
CFCS	<i>BRAF, MAP2K1,</i>	615278
	<i>MAP2K2, KRAS</i>	615279
		615280
		615278
NMLS; LEOPARD sendromu	<i>BRAF, RAF1,</i>	613707
	<i>PTPN11</i>	611554
		151100
Legius syndrome (Nörofibromatozis 1 benzeri sendrom)	<i>SPRED1</i>	611431
Kapiller malformasyon- arteriyovenöz malformasyon sendromu	<i>RASA1</i>	608354
Nörofibromatozis tip 1 (NF1)	<i>NF1</i>	162200

CFCS: Kardiyofasiyokutanöz sendrom; NS: Noonan sendromu; NMLS: Noonan-multipl lentijinöz sendromu; OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)

Rasopatilerde malignensi daha nadir oranda görülmekle beraber, bu yolla rolü olan genlerin kanser gelişimi ile ilişkisi iyi bilinmektedir. Rasopatilere daha sıklıkla rabdomiyosarkom, nöroblastom, ganglionöroblastom, mesane karsinomu, akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve juvenil miyelomonositik lösemiler (JMML) eşlik etmektedir (118, 119). Temel olarak nörogelişimsel süreçler etkilenmekle birlikte, tümörlerin veya tümör benzeri lezyonların görülme riski genel popülasyona göre daha fazladır (120). Yirmi yaşına kadar kümülatif kanser insidansı %4 (NS ve CFCS) ile %15 (CS) arasında değişmektedir (121). Hücre için kritik bir sinyal yolağı olan Ras-MAPK yolağının güçlü aktivasyonun somatik mutasyonlarla kanserlere neden olabildiği bilinmektedir (122). Bu mutasyonlar germ hattında olduğunda ise embriyonik letalite ile ilişkilendirilmektedir. Rasopati hastalarında saptanan germ hattı mutasyonları ile kanserlerdeki Ras-MAPK yolağı somatik mutasyonları kıyaslandığında, rasopatidekilerin fonksiyonel ve biyokimyasal olarak genellikle çok daha zayıf mutasyonlar olduğu bilinmektedir (120, 123). Kanserde sıklıkla saptanan ve *in vitro* deneylerde yüksek oranda aktivasyona yol açtığı gösterilen *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) onkogenindeki klasik hotspot mutasyonların (Gly12, Gly13 ve Glu61 gibi) germ hattında ekspresyonu, kardiyomegali ve anormal beyin gelişimini kapsayan ciddi bir fenotip nedeniyle embriyonik letaliteye yol açmaktadır. Buna ek olarak, NS'li bireylerin germ hattında saptanan *KRAS* mutasyonlarının hiçbir zaman kanser hotspot alleller ile örtüşmediği görülmektedir (124, 125).

Rasopatilerle en çok ilişkilendirilen malignitelerden biri olan JMML, hastaların yaklaşık %10'unda poliklonal kökenli olup, kendiliğinden düzelebilen veya diğer genlerde edinilmiş somatik mutasyonlar ile hastalığın ilerleyebildiği miyeloproliferatif bir bozukluktur (122). Noonan sendromu ve JMML birlikteliğinin en sık görüldüğü genler *PTPN11*, *KRAS*, *NRAS* ve *RIT1* genleri olarak sıralanmaktadır (126). Noonan sendromu ve lösemi ile ilişkili olan *PTPN11* (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11) mutasyonları nadiren overlap edebilir (123). Noonan sendromunda lösemi gelişmesine neden olan mutasyonlar çoğunlukla “proteinde orta seviyede fonksiyon artışına” yol açan mutasyonlardır (123). *CBL* (Casitas b-lineage lymphoma protooncogene) geni ile ilişkili NS benzeri hastalıkta JMML sık olarak görülmektedir (127). Lösemi hastalarında periferik kanda rasopati genlerinde mutasyon saptandığında, hastanın klinik bulgularının rasopati açısından değerlendirilmesi ile birlikte farklı bir dokuda aynı mutasyonun çalışılması önerilmektedir.

Ras izoformlarını kodlayan en önemli üç gen olan *KRAS*, *HRAS* (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) ve *NRAS* (Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogen Homolog) üç farklı gen olmalarına rağmen, kodladıkları transkriptler %90 sekans homolojisi (Core domain ve Effector binding domain) gösterirler (128). Ras izoformları arasında allosterik lob olarak adlandırılan 87-166. aminoasitler arasında %18 sekans farklılığı varken, diğer aminoasitlerde (1-86. Kodonlar) %100 sekans benzerliği bulunmaktadır (129). Sekans farklılıklarının Ras izoformlarının işlevsel farklılıklarına ne derece katkı sağladığı henüz tam olarak bilinmemektedir (129).

Aralarındaki yüksek homolojiye rağmen bu genlerdeki somatik mutasyonların gen içi dağılımı ve kansere neden olma sıklıkları oldukça farklıdır (130).

Rasopatiler içinde en çok çalışılan NS, yaklaşık 1/1000 ila 1/2500 yenidoğanı etkileyen otozomal dominant bir hastalıktır. İlk olarak 1963'te Jacqueline Noonan tarafından pulmoner stenoz (PS), kısa boy, hipertelorizm, inmemiş testisler ve iskelet malformasyonları olan dokuz hasta ile tanımlanmıştır (131). Son on yılda NS'un moleküler genetik nedenlerinin büyük ölçüde bilinmesi, bulguların altında yatan patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılmasına olanak sağlanmıştır. Noonan sendromu, belirgin kraniyofasiyal dismorfik özellikler, kısa boy, konjenital kardiyak anomaliler, kanama bozuklukları ve değişken derecede nörokognitif gelişme geriliği ile karakterizedir (132). Noonan sendromlu bireylerde topluma göre artmış kanser riski mevcuttur.

Günümüzde NS ile ilişkilendirilmiş veya ilişkisi yeni keşfedilen çok sayıda gen mevcut olup, *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*, *SPRED2*, *MRAS*, *BRAF*, *SHOC2*, *RRAS2*, *KRAS*, *SOS2*, *LZTR1*, *MA2PK1* ve *MAP2K2* olarak sıralanan bu genlerin tamamı Ras-MAPK yolağında görev alan proteinleri kodlayan genlerdir (133-143). Bu genlerin heterozigot germ hattı mutasyonları NS ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte, hala tanımlanmamış çok daha fazla genin var olduğu düşünülmektedir (132). Noonan sendromu ile ilişkili olduğu en sık saptanan gen, tüm vakaların yaklaşık yarısını oluşturan *PTPN11* genidir. *PTPN11*'in ürünü olan Shp2 proteini, N-terminal ve C-terminal SH2 (N-SH2 ve C-SH2) bölgeleri ile katalitik bir protein olan tirozin fosfataz (PTP) bölgesinden oluşmaktadır ve bu proteinin katalitik işlevi, N-SH2 ve PTP arasındaki bloke edici bir etkileşim aracılığıyla otoinhibe edilir

(136). *PTPN11* geninde NS'na neden olan yanlış anlamlı mutasyonların çoğu, N-SH2 ve PTP bölgeleri arasındaki bu etkileşimde görevli olan aminoasitlerde kümelenmektedir. Bu bölgedeki mutasyonlar Shp2 proteininin aktif formunun (katalitik etkili), inaktif (katalitik etkili olmayan) konformasyonuna geçişini engelleyerek Ras-MAPK yolağı sinyalizasyonunda artışa neden olmaktadır (136, 144). *PTPN11*-ilişkili NS'da dismorfik yüz özellikleri yaşla birlikte değişkenlik göstermektedir. En sık görülen kraniyofasiyal dismorfik özellikler; yüksek alın, hipertelorizm, aşağı eğimli palpebral fissürler, epikantal kıvrımlar, basık ve geniş burun kökü, anteverte nostriller, derin filtrum, yüksek yerleşimli vermillion, mikrognati, düşük ense saç çizgisi ve gevşek ense derisidir (145-147) (Tablo 3). Fizik muayenedeki karakteristik bulgular, yenidoğan döneminden sonraki birkaç aya kadar tam olarak belirgin olmayabileceği için yaşamın ilk aylarında rasopatilerin fenotipik olarak tanınması zordur.

Tablo 3. Noonan sendromunun yaşa göre karakteristik dismorfik bulguları.

	Alın, yüz, saç	Göz	Kulak	Burun	Ağız	Boyun
Yenidoğan*	Yüksek alın, düşük ense saç çizgisi	Hipertelorizm, aşağı eğimli palpebral fissürler, epikantal kıvrımlar	—	Kısa burun basık ve geniş burun kökü, anteverte nostriller	Derin filtrum, yüksek yerleşimli vermillion, mikrognati	Gevşek ense derisi
İnfanıl dönem (2-12 ay)	Makrosefali, Yüksek ve belirgin alın	Hipertelorizm pitozis, sarkık göz kapakları	—	Kısa burun basık ve geniş burun kökü	—	—
Çocukluk (1-12 yaş)	Kaba yüz, uzun yüz	—	—	—	—	—
Ergenlik (12-18 yaş)	Miyopatik yüz	—	—	İnce ve yüksek burun köprüsü	—	Yele boyun
Yetişkinlik (>18 yaş)	Ayrt edici dismorfik yüz özellikleri belirsiz olabilir, cilt ince ve şeffaf görünebilir	—	—	Belirgin nazolabial çizgiler	—	—
Tüm yaşlarda	—	Mavi-yeşil irisler, kavisli kaşlar	Arkaya dönük ve düşük yerleşimli kulaklar, kalın heliksler	—	—	—

*Bu dönemde özellikler belirsiz olabilir ya da bulunmayabilir (148).

Konjenital kalp hastalıklarının ikinci en sık görülen sendromik nedeni NS'dur (149). Noonan sendromunda en sık görülen kardiyovasküler bulgu pulmoner stenoz (PS) (%50-60) olup, hipertrofik kardiyomiyopati (HKMP) (%20) sekundum atriyal septal defekt (sekundum ASD) (%6-10), ventriküler septal defekt (VSD), aort stenozu, mitral kapak anomalileri, aort koarktasyonu ve koroner arter anomalileri de görülebilmektedir (150). Doğum öncesi dönemden geç çocukluk dönemine kadar değişken yaşlarda ortaya çıkabilen HKMP, hafif veya şiddetli olabilir. Kalp ve göğüs duvarı yapısal olarak normal izlenen hastalarda

elektrokardiyogramda sol prekordiyal derivasyonlarda negatif paternli geniş QRS kompleksleri ve dev Q dalgaları ile sol aks sapması görülebilmektedir (148). Arteriyovenöz malformasyonlar, anevrizmalar, kalpten çıkan damarların hipoplazisi ve moyamoya hastalığı gibi serebrovasküler anomaliler de NS ile ilişkilendirilmiştir (148). Pektus karinatum veya pektus ekskavatum gibi göğüs deformiteleri ile ayırık meme başları, kubitus valgus ve genu valgum da bildirilmiştir (146). Etkilenen bireylerin %95'inde şaşılık, ambliyopi, nistagmus, katarakt, optik sinir drusenleri, optik disk hipoplazisi ve kolobom gibi en az bir göz bulgusuna rastlanmaktadır (146). Noonan sendromlu bireylerin yaklaşık %10-25'inde sensörinöral işitme kaybı vardır (151).

Noonan sendromlu bireylerde çok sayıda pigmente nevüsler, kafeola lekeleri (Cafe au lait macules; CALM) ve lentiginöz lezyonlar dahil olmak üzere anormal pigmentasyon gösteren lezyonlar görülebilmektedir (146). Kollarda ve yüzde sıklıkla görülebilen keratozis pilaris, yüzde olduğunda saç ve kaş gelişimine engel oluşturabilmektedir (146). Saçlar genellikle kalın ve kıvrıkcık olmakla birlikte, ince ve seyrek saçlar da bildirilmiştir. Doğum ağırlığı ve doğum boyu genellikle normaldir. Boy kısalığı NS'nun yaygın bir bulgusu olarak görülmekle birlikte, erişkin boyu her zaman olumsuz etkilenmeyebilir. Pubertal büyüme atağı genellikle yetersiz veya gecikmeli olarak gerçekleştiğinden, NS'da boy kısalığı prevalansı genellikle ergenlik döneminde en yüksek düzeyde izlenmektedir (148). Hastalarda büyüme hormonu (BH) eksikliği ve BH direnci de bildirilmiştir (152). *PTPN11*-ilişkili NS hastalarında genellikle normal veya hafif artmış BH düzeyi ile düşük insülin benzeri büyüme faktörü (IGF1) düzeyi görülebilmektedir (152). *PTPN11*-

ilişkili NS'lu fare modellerinde BH'na yanıt ile ERK1/2 aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir; bu bulgu boy kısalığının tedavisi için umut vericidir (153). NS'da görülen boy kısalığının rekombinant insan BH'u ile tedavisi ABD Gıda ve İlaç Dairesince (U.S. Food and Drug Administration; FDA) 2007 yılından itibaren onaylanmış (148) olmakla birlikte, etkinliği hala tartışmalıdır. Ayrıca, rekombinant insan BH'u ile tedavi edilen çocuklarda HKMP veya hematolojik malignite riskinde artış nedeniyle olumsuz komplikasyonlar açısından hastaların izlenmesi gerekmektedir. Noonan sendromunda ergenliğin ortalama başlangıç yaşı genel popülasyona kıyasla gecikme gösterebilir; erkeklerin %35'i 13,5 yaşından sonra ergenliğe girerken, kızların %44'ü 13 yaşından sonra ergenliğe girmektedir (154).

Noonan sendromlu bebeklerin çoğunda gelişme geriliği ile seyredabilen beslenme güçlükleri, gastroözefageal reflü ve uzun süre nazogastrik tüple beslenme gerekliliği olabilmektedir (148). Bağırsak malrotasyonu, yetersiz bağırsak hareketliliği ve gastrointestinal motor gelişimde gerilik bildirilen vakalar mevcuttur. Noonan sendromu tanılı erkek çocukların %80'inde tek veya çift taraflı inmemiş testis görülmektedir (155). Erkeklerde gonadal disfonksiyon bildirilmiş olup, bu durumun inmemiş testisten ziyade primer sertoli hücre disfonksiyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (155). Noonan sendromu tanılı kadınlarda ise doğurganlık fonksiyonlarının etkilenmesi beklenmemektedir. Hastaların %10'unda böbrek anomalileri olabilmektedir (146).

Noonan sendromlu bebekler geçici infantil monositoz, trombositopeni ve miyeloproliferatif bozukluk gibi çeşitli hematolojik anomalilere yatkındırlar. En sık görülen hematolojik bozukluk pıhtılaşma kusurları sonucunda ortaya çıkan kanama

bozukluklarıdır (156). Faktör eksiklikleri ve trombosit defektleri hastaların yaklaşık üçte birini etkilemektedir (157). Hastaların kanama ve ilişkili komplikasyonlarının en aza indirilmesini sağlamak için invaziv prosedürler öncesinde bir hematolog tarafından değerlendirilmesi gerekmektedir (148). Periferik lenfödem bebeklerde sık görülür, yaşamın ilk birkaç yılında düzelebileceği gibi ergenlik veya yetişkinlik dönemine kadar da devam edebilmektedir (158). Hidrops fetalis, pulmoner, testiküler veya intestinal lenfanjiektazi, plevral boşluk ve peritonda şilöz efüzyonlar, hipoplastik lenfatik damarlar (bacak, inguinal ve iliak lenfatik damarlar), torasik kanalın aplazisi veya yokluğu ve skrotum veya vulvada lenfödem bildirilmiştir (148).

Etkilenen bireylerin çoğunda zeka normal sınırlarda olup, IQ düzeyi genellikle 70 ile 120 arasında değişir (159). Bununla birlikte, NS'lu kohortlarda duygudurum bozuklukları, sosyal zorluklar, iletişim güçlükleri, karar verme fonksiyonunda problemler, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) bildirilmiştir (159, 160).

Noonan sendromlu bireylerde özellikle çocukluk çağında, JMML, akut miyeloid lösemi (AML) ve B hücreli ALL dahil olmak üzere genel popülasyona göre hematolojik kanserlerin oransal olarak arttığı bildirilmiştir (156). Embriyonal rabdomyosarkom, nöroblastom, glial hücreli beyin tümörü, anüler hücre tümörü, pilositik astrositom ve sertoli hücreli tümör vakaları da bildirilmiştir (161-163).

Noonan sendromlu bireylerin yaşam sürelerinin araştırıldığı bir çalışmada ölüm oranı %9, ölüm yaşının ise doğum sonrası ilk birkaç ay ile 61 yaş arasında olduğu belirtilmektedir (150). En sık ölüm nedeni şiddetli HKMP ve iskemik kalp

hastalığı gibi kardiyak komplikasyonlardır (150). Hastalarda normal istirahat kalp debisinin 100 mmHg'dan düşük ve sağ ventrikül tepe basıncı yanı sıra pulmoner arter basıncının normal belirlenmesi olumlu prognostik faktörler olarak kabul edilmektedir (150).

Noonan sendromu tanımlı bireylerin %30 ila %75'i etkilenmiş bir ebeveyne sahiptir. NS'da tam penetrans olmakla birlikte, değişken ekspresyon nedeniyle hastalığın belirtileri sıklıkla silik/hafif olabildiğinden etkilenen birçok yetişkine ancak daha belirgin şekilde etkilenen bir çocuk sahibi olduktan sonra tanı konulabilmektedir (164). Bilinen aile öyküsü olmayanlarda, *de novo* patojenik varyant çoğunlukla baba kaynaklıdır (165). Probandda NS'na neden olan patojenik varyant belirlendikten sonra her iki ebeveyne de moleküler genetik test yapılması önerilmektedir. Moleküler etiyojinin belirlenemediği durumlarda ise NS'nin özellikleri göz önünde bulundurularak ebeveynlere kapsamlı bir fizik muayene yapılması önerilmektedir. Ebeveynlerden biri etkilenmişse kardeşler için risk %50'dir. Klinik bulgular aile içinde önemli derecede değişkenlik gösterebileceğinden, etkilenmiş kardeşler benzer bulgulara sahip olmayabilir (164).

Tablo 4. Noonan sendromunda genotip-fenotip korelasyonu.

Gen	Fenotipik özellikler				
	HKMP	Ektodermal bulgular	EY	PS	Diğer
<i>BRAF</i>		+++			Klasik özellikler
<i>KRAS</i>			+++		Kraniyosinoztozis
<i>LZTR1</i>	+++				
<i>MAP2K1</i>		+++			Klasik özellikler
<i>MRAS</i>	+++				
<i>PTPN11</i>	-			+++	Kısa boy, pektus anomalisi, kolay morarma, kriptorşidizm ve karakteristik dismorfik yüz özelliklerine sahip olma olasılığı↑
<i>RAF1</i>	+++	++			
<i>RIT1</i>	++	++	-		Hastalarda boy kısalığı ve pektus anomalisi görülme olasılığı↓ Perinatal anomaliler, yüksek doğum ağırlığı ve rölatif makrosefali görülme olasılığı↑
<i>SOS1</i>		++	-		Normal boy ve kardiyak septal defektlere sahip olma olasılığı↑
<i>SOS2</i>		++	-		Nadiren boy kısalığı; >%50'sinde lenfatik anomaliler

+, ++, +++: Belirli bir özelliğin mevcut olma olasılığının derecesi (+++: daha olası; ++: daha düşük olasılık). -: Patojenik bir varyantta mevcut özelliğin bulunmadığını ifade etmektedir. Boş hücreler, patojenik bir varyant ile belirli bir özellik arasında bilinen bir korelasyon olmadığını göstermektedir. HKMP: Hipertrofik kardiyomyopati, EY: Entellektüel yetersizlik, PS: Pulmoner stenoz (166).

Noonan sendromunun ikinci en sık rastlanan nedeni *SOS1* (Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 1) genindeki yanlış anlamlı mutasyonlar olup, vakaların yaklaşık %10-13'ünde rastlanmaktadır (134, 167). *SOS1* geni, Ras'ın inaktif GDP-bağlı formundan, aktif GTP-bağlı formuna dönüşümünden sorumlu GEF aktivitesine sahip bir proteini kodlamaktadır. *SOS1* genindeki yanlış anlamlı mutasyonların çoğu, *SOS1* proteinin inaktif konformasyonda tutulmasından sorumlu olan aminoasit rezidülerinde yer almaktadır (134). Bu mutasyonlar *SOS-1* proteinin GEF aktivitesinin otoinhibisyonunu bozarak *SOS-1*'in fonksiyon

kazanımına ve sonuç olarak Ras'ın aktif formunda ve Ras-MAPK yolağı sinyalizasyonunda artışa neden olmaktadır (134). *SOS1* geninde yanlış anlamalı bir mutasyon için heterozigot olan bireylerde, *PTPN11*-ilişkili NS'na göre kognitif yetersizlik, ASD ve kısa boy daha nadir, ektodermal anormallikler ise daha sık görülmektedir (167). Ektodermal tutulumun olması, NS'lu hastalar arasında *SOS1* mutasyonlarının varlığı açısından ayırt edici bir özellik olarak düşünülmektedir (168). Ektodermal bulguların varlığında, klinik benzerliği nedeniyle *SOS1*-ilişkili NS ile CFCS arasında ayırıcı tanı yapılması gerekmektedir.

Germ hattı *KRAS* mutasyonları hem NS hem de CFCS'da etkilenen bireylerin nispeten küçük bir yüzdesini oluşturmaktadır. *KRAS*-ilişkili NS'nda klinik bulgular oldukça değişken olmakla birlikte, genellikle şiddetli klinik bulgularla seyreden NS fenotipine yol açmaktadır (133). Germ hattında hastalık yapıcı *KRAS* mutasyonlarının dağılımı K-Ras proteinin belirli bölgelerinde kümelenme göstermektedir (169). *KRAS* geni, dokuya özgü ifade edilen *KRASA* ve tüm dokularda ifade edilen *KRASB* olmak üzere iki ayrı transkripti kodlamaktadır. Noonan sendromunun etiyolojisinde tanımlanmış *KRAS* mutasyonları, GAP proteinleri tarafından uyarılan GTPaz aktivitesini azaltan ya da GTP'deki guanin nükleotidlerinin bağlanmasını engelleyen olmak üzere iki farklı mekanizmayla Ras-MAPK yolağındaki sinyali artırmaktadır (133, 170). Her iki durumun da K-Ras proteinin GTP-bağlı aktif formunda net bir artışa neden olduğu bilinmektedir. Ras geninde fonksiyon artışına neden olan somatik mutasyonlar genellikle germ hattında olduğunda tolere edilemezler (170). Ras izoformlarını kodlayan *KRAS*, *NRAS*, *RRAS2* (RAS Related 2) ve *MRAS* (Muscle rat sarcoma

viral oncogene homolog) genlerindeki heterozigot germ hattı mutasyonların NS, *KRAS* mutasyonlarının CFCS ve *HRAS* mutasyonlarının ise CS ile ilişkili olduğu bilinmektedir (171-174).

Son yıllarda, Ras izoformlarını kodlayan diğer bir gen olan *NRAS*'ın iki farklı germ hattı mutasyonu (Thr50Ile ve Gly60Glu) NS ile ilişkilendirilmiştir (173). *NRAS*-ilişkili NS hastalarında sıklıkla HKMP olmak üzere vakaların yaklaşık yarısında kardiyak anomaliler bildirilmektedir (148). Bu hastalarda kısa boyun ve/veya yele boyun (%80) ve oküler pitozis (%63) oldukça yaygındır (175). Öğrenme güçlüğü, *NRAS*-ilişkili NS'da diğer genetik etiyolojilere sahip NS'lar ile benzer sıklıkta görülmektedir, motor gelişim geriliği ise nispeten sıktır (148). Kistik higroma, konjenital diyafragma hernisi, multikistik displastik böbrekler gibi prenatal anomalilerde saptanan rasopati genlerinden biri *NRAS*'tır (148, 175, 176). Serin-treonin kinaz ailesinin üyesi olan Raf1, B-Raf ve A-Raf proteinleri, Ras efektörleri olarak işlev gören Raf proteinin izoformlarıdır (177). Bu serin-treonin kinazlar, MAP2K1 (Mitogen-activated protein kinase kinase 1) ve MAP2K2 (Mitogen-activated protein kinase kinase 2) proteinlerini fosforile ederek aktive eder, böylece ERK1/2 aktivasyonunu başlatırlar. B-Raf proteini, Raf1 ve A-Raf'a kıyasla çok daha yüksek kinaz aktivitesine sahiptir, bu proteinler ayrıca kendi işlevlerini kontrol eden düzenleyici mekanizmalar açısından farklılıklar gösterirler (177). *BRAF* (B-Raf Protoonkogen, Serin/Treonin Kinaz) geni ayrıca NS, NMLS ve CFCS ile ilişkilendirilmiştir. Germ hattı *BRAF* mutasyonlarının, B-Raf proteinindeki fonksiyon kazanımını değişken derecede arttırdığı ve kanserde sıklıkla saptanan varyantlara kıyasla daha az aktivasyona neden olduğu

gösterilmiştir (178). *BRAF* genindeki somatik mutasyonlar (en sık mutasyon Val600Glu), insanlarda malign melanom ve kolorektal kanserler dahil olmak üzere tüm kanserlerin %7'sinde tanımlanmıştır (179).

BRAF-ilişkili NS hastalarında hipotoni, büyüme geriliği, hafif-orta derecede kognitif etkilenim, değişken derecede beslenme güçlüğü, sıklıkla dolikosefali, belirgin alın, hipertelorizm ve düşük yerleşimli kulakların görüldüğü dismorfik bulgular ile boy kısalığı ve iskelet anomalileri görülmektedir (178). Konjenital kardiyak defektler ve hiperpigmente deri lezyonları da bildirilmiştir. *BRAF*-ilişkili NMLS'da ise yenidoğan döneminde hipotoni, büyüme geriliği, EY, nöbetler, kraniyofasiyal anomaliler, sensörinöral işitme kaybı, kısa ve yele boyun, toraks defektleri, kemiklerde hipomineralizasyon, pelviste fibröz kistik lezyonlar, hiperkeratozis ve CALM'nin yanı sıra tüm vücuda yayılmış çok sayıda nevüs ve koyu renkli lentiginöz lezyonlar görülebilmektedir (178) (Tablo 3).

Noonan sendromu ve NMLS ile ilişkili *RAF1* (*CRAF*) (Raf1 protooncogene, serine/threonine kinase) geni tarafından kodlanan Raf1 proteini Ras'ın downstream efektörlerindendir. Raf1 proteini CR1, CR2 ve CR3 olarak isimlendirilen 3 fonksiyonel iyi korunmuş alana sahiptir. *RAF1* mutasyonları, CR2'de birbirine komşu rezidülerde (%70), kinaz domaininin aktivasyon segmenti bölgesinde (%15) ve RAF1'in katalitik etkinliğinde görev alan rezidülerde (%15) olmak üzere büyük oranda üç bölgede kümelenmektedir (135). Noonan sendromu ve NMLS ile ilişkilendirilen *RAF1* mutasyonları kanserlerde neredeyse hiç bildirilmemiştir (177). *RAF1* mutasyonlarının varlığında NS ve NMLS olgularında %75 oranla kardiyak etkilenim ön plandadır(135).

İlk olarak 2015 yılında, klinik olarak NS tanısına rağmen bilinen sorumlu genlerde mutasyonu olmayan iki bireyde *SOS2* (SOS ras/rac guanin nükleotid değişim faktörü 2) geninde *de novo* heterozigot yanlış anlamlı mutasyon saptanmasıyla *SOS2* geni ile NS'nin ilişkisi tanımlanmıştır (142). *SOS2* bir GEF protein olup, SOS-1'in homologudur (99). *SOS2* mutasyonları, sıklıkla *SOS2*'nin otoinhibe konformasyonda tutulmasından sorumlu Dbl homolog bölgesinde yer almaktadır. Hastalıkla ilişkisi bilinen *SOS2* geni mutasyonlarının, *in vitro* olarak fonksiyonel GTP-bağlı Ras seviyesinde artışa ve Ras-MAPK yolağında sinyalizasyon artışına neden olduğu gösterilmiştir (99). *SOS2*-ilişkili NS'da dismorfik yüz özellikleri, kardiyak defektler ve cilt bulguları *PTPN11*-ilişkili NS ile benzer sıklıkta görülürken, boy kısalığı ve öğrenme güçlüğü ise daha sıktır (142). Ektodermal tutulum *SOS2*-ilişkili NS'nun belirgin bir klinik özelliğidir (142). Prenatal dönemdeki rasopatilerde, *SOS2* mutasyonları nispeten daha nadir saptanmaktadır (180)

Yakın zamanda NS ile uyumlu bulgulara sahip, ancak bilinen NS genlerinde mutasyon saptanmayan 180 bireyden oluşan bir kohorttaki 17 kişide *RIT1* (RIC-like protein without caax motif 1) geninde dokuz farklı yanlış anlamlı mutasyon tanımlanmıştır (181). Rit1 (Ras benzeri) proteini, Ras ile ilişkili GTPaz proteinleri üyesidir (99). Patojen mutasyonların çoğu Rit1 proteininin Switch I veya II bölgesinde yer almaktadır. *RIT1* mutasyonu taşıyan etkilenmiş bireylerde seyrek ve kıvrıkcık saçlar, supraorbital çıkıntılarda hipoplazi, dismorfik yüz görünümü, konjenital kalp defektleri ve iskelet anomalileri görülebilmektedir. Nispeten yakın zamanda keşfedilen *RIT1* geni prenatal rasopatilerde de önemli bir role sahiptir

(137, 182). *RIT1* geni ile polihidramniyoz, nukal saydamlık ve şilotoraks gibi prenatal anomaliler bildirilmiştir (181). Rasopatilerde tümör yatkınlığı bilinen bir durumdur, ancak *RIT1* geninde işlev kazanımına neden olan mutasyonların tümör oluşumu üzerindeki etkisi net değildir.

Otozomal dominant (OD) ve otozomal resesif (OR) olarak NS ile ilişkilendirilmiş olan bir diğer gen *LZTR1* (Leucine-zipper-like transcription regulator 1) genidir. *LZTR1*-ilişkili NS'nun her iki formunda klinik bulgular benzer olup, rasopatilere özgün dismorfik yüz özellikleri, boy kısalığı, kardiyak anomaliler (özellikle PS), kognitif etkilenim ve ektodermal tutulum görülebilmektedir (142). *LZTR1*-ilişkili NS'da boy kısalığı haricindeki diğer klinik bulguların sıklığı *PTPN11*-ilişkili NS ile benzerdir (142). Ayrıca, *LZTR1*'deki germ hattı işlev kaybı mutasyonlarının schwannomaya yatkınlık oluşturduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (142, 183). *LZTR1*'in, Nörofibromin 1 proteinin yıkımı için Cullin 3 ubiquitin ligaz kompleksleri ile işaretlenmesinde bir adaptör olabileceği de öne sürülmüştür (142). *LZTR1*'deki mutasyonların hangi mekanizma ile NS fenotipi oluşturduğu ise hala belirsizdir. Şimdiye kadar tanımlanan rasopatilerden sorumlu tüm genlere benzer şekilde, *LZTR1*'deki yanlış anlamalı heterozigot veya homozigot varyantların Ras-MAPK yolağında sinyal artışına yol açabileceği varsayılmaktadır (142). Bununla birlikte, *LZTR1*'in etiyolojideki kesin rolünü aydınlatacak ve hem schwannomatozis hem de rasopati kliniğine neden olan *NF1* ve *NF2* genleriyle ilişkisini ortaya koyacak fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ras-MAPK yolağının inhibisyonunda rol alan *SPRED* (Sprouty ilişkili EVH1 domain içeren protein) gen ailesinin *SPRED1*, *SPRED2* ve *SPRED3* olmak

üzere benzer hücresel fonksiyonlara sahip üç üyesi bulunmaktadır (184). *SPRED2* genindeki fonksiyon kaybına neden olan homozigot varyantlar NS'nun OR formu ile ilişkilendirilmiştir (185). *SPRED2* ile ilişkili bulgular klasik NS' nun klinik spektrumuna oldukça benzerdir; kısa boy, kısa ve yele boyun, düşük ense saç çizgisi, EY, kardiyak tutulum ve NS kliniğine benzer kraniyofasiyal ve toraks bulguları görülebilmektedir. Nörofibromatozis tip 1 (NF1) benzeri sendrom olarak da bilinen Legius sendromu, Spred-1 proteininde fonksiyon kaybına neden olan heterozigot mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir (185, 186). Nörofibromatozis tip 1'in hafif bir versiyonu olarak düşünülen Legius sendromunda, çok sayıda CALM, EY, öğrenme güçlükleri ve davranışsal sorunlar sık görülen bulgulardır (185, 186). Ancak, NF1'e özgü bulgular olan Lisch nodülleri, nörofibromlar, optik gliomlar, malign periferik sinir kılıfı tümörleri ve kemik lezyonları Legius sendromunda beklenmemektedir (185). Kafeola lekelerine sahip olup NF1'e özgü başka bulgusu olmayan hastalarda öncelikle *NF1* geninin analiz edilmesi ve normal saptanması durumunda, *SPRED1* analizinin yapılması önerilmektedir (187). *SPRED2* ile ilişkili klinik bulgular, *SPRED1* ile ilişkilendirilmiş olan Legius sendromunda görülen bulgulardan önemli derecede farklılık göstermektedir (185). Klinik bulgular arasındaki bu farklılıkların, hücre içinde Spred-1 ve Spred-2 proteinlerinin birbirinden farklı bilinmeyen ek görevleri olmasından kaynaklanacağı düşünülmektedir. Otozomal resesif karaktere sahip *LZTR1* veya *SPRED2* ile ilişkili NS'ları için homozigot patojenik varyanta sahip etkilenmiş bir bireyin ebeveynlerinin bu varyant için heterozigot olduğu varsayılır. Bu nedenle, homozigot patojenik varyant belirlenen hastanın ebeveynlerine moleküler genetik

test yapılarak sonraki gebeliklerinde hastalığın nüks değerlendirmesine imkan sağlanması önerilmektedir (164).

Noonan sendromu ile ilişkili diğer bir gen *MRAS* genidir. Ras süper protein ailesinin bir üyesi olan M-Ras proteini, reseptör tirozin kinazlar tarafından yapılan ERK1/2 aktivasyonuna katkıda bulunur (188). *MRAS*-ilişkili NS'da etkilenmiş bireylerde dismorfik görünüm, boy kısalığı, gelişme geriliği, EY ve HKMP görülebilmektedir (189). Melanom, akciğer kanseri ve tiroid tümörü dâhil olmak üzere çeşitli tümörlerde varlığı gösterilen somatik *MRAS* mutasyonlarının, kanser hücrelerinde Ras yolağında aktivasyona yol açan sürücü mutasyonlar olduğu bildirilmiştir (189). Germ hattında *MRAS* mutasyonu saptanan hastalarda da yakın tümör takibi önerilmektedir (189).

Noonan sendromu ile ilişkili *RRAS2* geni, NS etiyojisinde nispeten nadir görülmektedir (141). *RRAS2*-ilişkili NS'da artmış NT, ventrikülomegali, polihidramniyoz ve/veya HKMP gibi prenatal bulguların yanı sıra postnatal dönemde hipotoni, gelişme geriliği, EY, makrosefali, işitme kaybı, tipik dismorfik bulgular ve kardiyak bulgular (HKMP ve PS) görülebilmektedir (141, 190, 191). *RRAS2*'deki somatik mutasyonlar, *HRAS*, *KRAS* ve *NRAS* mutasyonlarına kıyasla daha az sıklıkta olmakla birlikte, belirli tipteki sınırlı sayıda tümörlerde onkogeneze katkıda bulunduğu bilinmektedir (141). *RRAS2* geni, Ras ailesinin diğer üyeleriyle ortak efektörleri paylaşmaktadır; ancak Rras2 proteinin hücrel süreçler ve gelişimdeki net rolü tam olarak bilinmemektedir (141). Bununla birlikte, *RRAS2* geninde patojen varyanta sahip hücrelerde artan ERK1/2 fosforilasyonunun Ras-MAPK yolağında aşırı aktivasyona yol açtığını ileri süren çalışma mevcuttur (141).

Tüm hücrelerde eksprese olan *MAPK1* geni, Ras-MAPK sinyal kaskadının son basamağında görev alan bir serin/treonin kinazdır (143). Yapılan çalışmalar, *MAPK1* genindeki patojen mutasyonların protein düzeyinde fonksiyon kazanımına neden olarak Ras-MAPK yolağında sinyalizasyon artışına yol açtığını göstermektedir (143). *MAPK1* mutasyonu saptanan bireylerde rasopati ile uyumlu dismorfik bulguların yanı sıra hipotoni, büyüme ve gelişme geriliği, EY, davranış problemleri, elektroensefalografi (EEG) anomalileri, diş anomalileri, cilt bulguları, kanama diyatezi ve lenfödem görülebilmektedir (143). Sınırlı sayıda hastada ASD ve mitral kapak yetmezliği bildirilmiş, ancak hastaların hiçbirinde HKMP saptanmamıştır (143).

Noonan-mutipl lentijinöz sendromu ile *PTPN11*, *BRAF* ve *RAF1* genlerindeki germ hattı mutasyonlarının ilişkili olduğu bilinmektedir (136, 192, 193). Bu hastalık başlangıçta LEOPARD sendromu olarak adlandırılırken, güncel literatürde NMLS tanımı tercih edilmektedir (194). Noonan-mutipl lentijinöz sendromu; kısa boy, büyüme geriliği, EY, işitme kaybı, hipertelorizm ve pitozis gibi dismorfik yüz bulguları, lentijinöz lezyonlar, HKMP ve PS ile karakterize bir sendromdur (194). Lentijinöz lezyonlar çoğunlukla yüz, boyun ve gövdenin üst kısmında mukozayı tutmayan siyah-kahverengi maküller şeklinde görülmektedir (194). Genel olarak, lentijinöz lezyonlar dört ila beş yaşına kadar ortaya çıkmamaktadır. Bazı hastalarda ergenlik döneminde lezyonların sayısı binleri bulabilirken, bazı bireylerde lentijinöz lezyonlar görülmeyebilir (194). *RAF1*'de patojenik varyantı olan bir bireyde, klasik NMLS bulgularına ek olarak cerrahi düzeltme gerektiren yonca yaprağı kafatası ile uyumlu kraniyosinostoz

bildirilmiştir (195). Noonan-multip l lentijinöz sendromu ve CFCS'yi birbirinden ayırabilecek bir bulgu olmaması nedeniyle atipik vakalarda sınıflandırmada zorluklar mevcuttur. Noonan sendromu ile NMLS birçok ortak özelliğe sahip olmakla birlikte, lentijinöz lezyonlar NMLS için patognomoniktir ve NS'da nadiren görülür. Noonan-multip l lentijinöz sendromunda yele boyun, iskelet defektleri ve kanama/pıhtılaşma bozukluğu gibi bulgular yoktur (193). Hem NMLS hem de NS artmış malignite riski ile ilişkilendirilmiştir; AML ve nöroblastom daha çok NMLS ile ilişkili iken, NS'da JMML ve ALL daha sık görülmektedir (193). *PTPN11*-ilişkili NMLS'da patojen varyantlar dominant negatif etki göstermektedir (193).

Gevşek anajen saçlı Noonan benzeri sendrom, 2003 yılında NS benzeri klinik bulgular ve mikroskopik saç bulguları nedeniyle olası yeni bir sendrom olarak önerilmiş, ancak sonrasında *SHOC2* geni ile ilişkilendirilmiştir (196, 197). *SHOC2* geni, Ras-MAPK yolağının düzenlenmesinde görev alan ve lösün bakımından zengin tekrar kodonları içeren bir proteini kodlar. Gevşek anajen saçlı Noonan benzeri sendromda temel bulgular, NS'nu andırmaktadır. Etkilenmiş bireylerde kolay koparılabilen, seyrek, ince ve yavaş uzayan saçlar gibi saç anomalileri ile birlikte egzema, ihtiyozis, kaşıntılı ve koyu pigmentli cilt, seyrek kaşlar, distrofik veya ince tırnaklar gibi ektodermal anomaliler ile velofaringeal yetmezlik görülebilmektedir (177, 196). Noonan sendromunda seyrek, yünsü veya kıvrıkcık saçlar; CFCS hastalarında ise seyrek, sıklıkla kıvrıkcık ve kabarık saçlar görülebilmektedir. *PPP1CB* genindeki mutasyonlar da gevşek anajen saçlı Noonan benzeri sendrom ile ilişkilendirilmiştir (198). *PPP1CB* proteini, Ras-MAPK yolağındaki çeşitli proteinlerin defosforilasyonunda rol oynayan serin/treonin

protein fosfatazlardan biridir (198). *PPP1CB*'deki patojenik varyantların rasopatiye neden olduğu mekanizma ise tam olarak bilinmemektedir (198).

Germ hattında heterozigot *CBL* mutasyonları “JMML ile birlikte olan veya olmayan Noonan sendromu benzeri hastalık (*CBL*-ilişkili Noonan benzeri sendrom)” ile ilişkilendirilmiştir (199). *CBL*-ilişkili Noonan benzeri sendrom; rasopatilere spesifik dismorfik yüz bulgularının yanı sıra geniş bir kardiyak defekt spektrumu, büyüme geriliği, değişken kognitif etkilenim, ektodermal ve kas-iskelet sistemi anomalileri ile karakterize gelişimsel bir hastalıktır. Hastalarda fenotipik heterojenite ve değişken ekspresyon mevcuttur (199). Çoğunlukla proteinin RING-finger domainini etkileyen küçük çerçeve içi (inframe) delesyonlar veya yanlış anlamlı mutasyonlar bildirilmiş olup, bu mutasyonların *CBL* ubiquitin ligaz aktivitesini bozduğu gösterilmiştir (199). Heterozigot germ hattı *CBL* mutasyonları olan hastalar, klasik NS’lu hastalarda olduğu gibi özellikle JMML olmak üzere belirli maligniteler için artmış riske sahiptir (199).

İlk olarak 1986 yılında tanımlanan CFCS; büyüme ve gelişme geriliği, ciddi beslenme problemleri, belirgin dismorfik yüz özellikleri, cilt, gastrointestinal sistem ve merkezi sinir sistemi anomalileri ile kardiyak defektlerle karakterizedir (167, 200). Genetik olarak heterojen bir sendrom olan CFCS’da, *KRAS*, *BRAF*, *MAP2K1* ve *MAP2K2* genlerindeki patojen mutasyonlar, CFCS kliniği ile uyumlu bulguları olan hastaların yaklaşık %60-90’ında saptanabilmektedir (174, 200). Kardiofasyokutanöz sendromun, klinik olarak NS ile önemli ölçüde örtüşmesi ve sıklıkla "klinik olarak arada kalmış" vakaların görülmesi nedeniyle ayrı bir nozolojik antite veya ekstrem bulgularla giden bir NS varyantı olduğu uzun süre

tartışılmış, nihayetinde CFCS ayrı bir sendrom olarak sınıflandırılmıştır. Yüksek alın, bitemporal darlık, kalın dudaklar, NS'na kıyasla daha kaba yüz ve rölatif/mutlak makrosefali bu sendromun dismorfik bulguları arasında yer almaktadır. Seyrek, kırılğan ve kıvrıcık saçlar, yüzde eritematöz görünüm, seyrek kaş ve kirpikler, hiperkeratozis, keratozis pilaris, ihtiyozis, egzama ve hiperhidrozis gibi ektodermal tutulum sıklıkla görülmektedir. Hastalarda ayrıca, pigment değişiklikleri (CALM, hiperpigmente nevüsler ve/veya lentijinöz lezyonlar) ve hemanjiyomlar görülebilmektedir. En sık PS ve HKMP olmak üzere, etkilenen bireylerin çoğunda kardiyak defektler mevcuttur. Genellikle orta ila şiddetli düzeyde kognitif etkilenim vardır. Sıklıkla nöbetler görülmekte ve refrakter olabilmektedir. Kardiofasyokutanöz sendromlu bireylerde artmış malignite riski açısından yeterli veri bulunmamaktadır [148]. Nadir de olsa CFCS'lu hastalarda ALL, nonHodgkin lenfoma, büyük B hücreli lenfoma gibi maligniteler bildirilmiştir (201).

Noonan sendromu ve CFCS, rasopatiler içinde en sık rastlanan ve en çok bilinen sendromlardandır. Bu sendromlar moleküler etiyojileri açısından kıyaslandığında, her iki sendrom da temelde artmış ERK1/2 aktivitesiyle ilişkilidir. Kardiofasyokutanöz sendromda bildirilen mutasyonlar Ras-MAPK yolağının daha alt basamaklarında görevli B-Raf, MAP2K1 ve MAP2K2 proteinlerini etkiler (134). Noonan sendromu ile ilişkili mutasyonlar daha üst basamaklarda görevli Shp2, SOS-1 ve K-Ras proteinleri etkilemektedir (134) (Tablo 5). Noonan sendromu ile ilişkili genlerdeki mutasyonların Ras ile ilişkili yan yolları da etkileme olasılığı öne sürülmektedir, CFCS'da ise bu durum beklenmemektedir

(134). Bunun dışında, Ras-MAPK kaskadının alt ve üst basamaklarında görev alan proteinlerin farklı düzenleyiciler ile negatif geri bildirim (feed-back) mekanizmaları bulunmaktadır ki bu durum, NS ile CFCS arasındaki fenotipik farklılıkları açıklamaktadır (134, 202).

Tablo 5. Noonan sendromunun allelik hastalıkları ile ayırıcı tanısı.

Gen	Hastalıklar	Yorum
<i>BRAF</i> <i>KRAS</i> <i>MAP2K1</i> <i>MAP2K2</i>	CFCS	CFCS ve NS klinik olarak en fazla benzerliğe sahip rasopatilerdendir. CFCS, NS ile benzer kardiyak ve lenfatik bulgulara sahiptir, ancak CFCS'da şiddetli EY, yapısal MSS anomalileri olasılığı daha yüksektir; cilt bulguları daha belirgindir; GI problemler daha şiddetli ve uzun süreli olabilir; kanama diyatezi nadirdir. Yüz görünümü daha kaba olma eğilimindedir, dolikosefali ve kaş yokluğu daha sıktır, mavi göz rengi daha az görülür.
<i>BRAF</i> <i>MAP2K1</i> <i>PTPN11</i> <i>RAF1</i>	NMLS; LEOPARD sendromu	NMLS'da değişken ekspresyon mevcuttur ve klinik bulgular NS ile önemli ölçüde benzerlik gösterebilir. NMLS fenotipi erken çocukluk döneminde tipik NS olguları ile benzerlik göstermektedir; lentijinöz lezyonlar ve işitme kaybı gibi diğer karakteristik özellikler yaşla birlikte gelişebilir.

CFCS: Kardiyofasyokutanöz sendrom; EY: Entellektüel yetersizlik, NS: Noonan sendromu, NMLS: Noonan-multip lentinöz sendromu; SSS: Santral sinir sistemi, GI: Gastrointestinal (166).

Germ hattı *BRAF* mutasyonları, klinik olarak NS veya NMLS bulgularına sahip bireylerin küçük bir yüzdesinde saptanabilmekte iken (<%2), CFCS'de en sık saptanan mutasyondur (%50-75) (167). Noonan sendromu ile ilişkili *BRAF* mutasyonları, CFCS'da saptanan mutasyonlarla benzerlik göstermemektedir (167, 178). *BRAF*-ilişkili CFCS hastalarının klinik bulguları geniş bir fenotipik değişkenlik göstermekle birlikte; kısa boy, büyüme geriliği, beslenme problemleri, orta-şiddette kognitif etkilenim, epilepsi, dismorfik yüz özellikleri kardiyak anomaliler, cilt bulguları ve iskelet anomalileri görülebilmektedir (178).

Kardiofasyokutanöz sendromlu bireylerin %25'inde *MAP2K1* ve *MAP2K2* genlerinin mutasyonları, %2'den azında ise *KRAS* genindeki mutasyonlar etiyojiden sorumludur. *MAP2K1*-ilişkili CFCS'lu bireylerde, *MAP2K2*-ilişkili CFCS'lu bireylere göre daha şiddetli nörogelişimsel bulgular ve epilepsi görülmektedir (201). *MAP2K1* ve *MAP2K2* genlerindeki somatik patojenik varyantlar, over kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde bildirilmiştir. Somatik *MAP2K1* patojenik varyantları ekstrakraniyal arteriyovenöz malformasyon ile de ilişkilendirilmiştir (201).

Costello sendromu (Fasiyokutanöziskeletal sendrom) ilk olarak 1971 yılında Dr. Costello tarafından EY, artmış doğum ağırlığı, beslenme problemleri, kıvrıkcık saç, kaba yüz ve burun papillomaları bulgularına sahip, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan iki çocukta bildirilmiştir (171). 1991 yılında ise Dr. Costello'nun vakaları ile birlikte, bildirilen benzer hastalardaki klinik bulgular değerlendirilerek Costello sendromu (CS) adını almıştır (171). 2005 yılında Aoki ve arkadaşları tarafından CS ile *HRAS* geni ilişkilendirilmiştir (203). Costello sendromunda fenotipik spektrum hafif bulgulardan, erken yaşlarda ölümcül komplikasyonlara yol açabilen ciddi bir fenotipe kadar uzanan geniş bir yelpazeye sahiptir (204). Costello sendromu, tipik olarak doğum sonrası ciddi beslenme zorlukları, gelişme geriliği, kısa boy, EY, kaba yüz (dolgun dudaklar, büyük ağız, bülböz burun ucu), kıvrıkcık, ince veya seyrek saçlar, derin palmoplantar kırışıklıklar (çamaşırcı eli), yüz/perianal bölgede papillomalar, el parmaklarında ulnar deviyasyon, yaygın hipotoni, eklem laksitesi, HKMP, konjenital kalp defekti (genellikle PS) ve aritmi (supraventriküler taşikardi, kaotik atriyal ritim) ile

karakterizedir (204). Hastalarda rölatif/mutlak makrosefali s k görülmektedir. Makrosefali, doğum sonrası aşırı serebellar büyüme, hidrosefali veya Chiari tip I malformasyonuna sekonder olabilmektedir (204). Costello sendromlu bireyler yaşam boyu, rabdomiyosarkom, nöroblastom, mesanenin transizyonel hücreli karsinomu gibi malign tümörlerin gelişmesi açısından yaklaşık %15 riske sahiptir (204).

Son yıllarda, rasopati sendromlarının fenotipik özelliklerine sahip bireylerde Ras-MAPK yolağı komponentlerini kodlayan genlerde tek nükleotid değişikliklerine kıyasla çok daha nadir olarak kopya sayısı değişiklikleri de bildirilmiştir. Etkilenen genlerdeki duplikasyonların protein ekspresyonunda artışa yol açarak Ras-MAPK yolağında sinyalizasyonda artışa neden olabileceği hastalık yapıcı mekanizma olarak hipotez edilmektedir (205-207). Klinik olarak NS tanısı olan birkaç hastada, *PTPN11*'i kapsayan duplikasyonlar bildirilmiştir (205-207). Bu vakalarda *PTPN11*'deki duplikasyonun gen dozajında artışa neden olarak hücre düzeyinde yanlış anlamlı mutasyonlara benzer etkiyle fonksiyon kazanımına neden olduğu öne sürülmektedir (205-207). Ayrıca, rasopati ile uyumlu hafif klinik bulguları olan hastalarda *SHOC2*, *RAF1* ve *MAP2K2* gen duplikasyonları da bildirilmiştir (208-210).

Ras-MAPK kinaz yolağının negatif düzenleyicileri olan *NF1* ve *SPRED1* genlerindeki fonksiyon kaybı mutasyonlarının rasopatilerle ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (211-214). Ras-MAPK yolağının pozitif düzenleyici genlerindeki fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlarının ise rasopatilerle ilişkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda, rasopati ile ilişkili bir gendeki haployetmezliğin

"rasopati benzeri bir fenotip" ile sonuçlanan yeni bir rasopati modeline yol açabileceği öne sürülmektedir. Ras-MAPK yolağında yer alan diğer genlerde fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar ile rasopati benzeri klinik bulgulara sahip birkaç hasta bildirilmiştir, ancak genotip fenotip korelasyonu net değildir (210, 215, 216). Ras-MAPK yolağındaki genlerde fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların, yolakta görev alan bazı proteinlerinin eksikliğine veya yolağın modülatörlerindeki ifadenin seviyesi değişikliklerine neden olduğu varsayımları ileri sürülmektedir. (215). *MAP2K2* genini kapsayan kromozom 19p13.3'te interstisyel delesyonun bildirildiği iki çalışmada hastaların rasopatilerin temel klinik bulgularına sahip olduğu, ancak CFCS veya diğer rasopatilerden herhangi biri ile tam olarak örtüşmediği ifade edilmiştir (215, 217). *MAP2K2* geninde haployetersizliğe neden olan *MAP2K2* delesyonunun, yolağın modülatörlerinden biri olan sprouty 1 proteinin ifadenin seviyesini artırarak Ras-MAPK yolağında düzensizliğe yol açtığı fonksiyon çalışmaları ile de gösterilmiştir (215, 218). *BRAF* genini kapsayan bir kromozomal delesyonun bildirildiği iki bireyde rasopatilerle örtüşen klinik bulgular kısmen bulunmakla birlikte bu bulgular, *BRAF* genindeki yanlış anlamlı mutasyonlar bildirilen hastalardaki klinik bulgulardan farklılık göstermektedir (216). *PTPN11* geninde ise genotip fenotip korelasyonu daha nettir; heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları germ hattında meydana geldiğinde, gelişimsel bir fenotipe neden olması beklenmemektedir. *PTPN11* genindeki fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar "metakondromatozis" ile ilişkilendirilmiş olup, metakondromatozisteki özgün lezyonlar olan osteokondromlar ise *PTPN11* geninin diğer allelinde ikinci vuruş mekanizmasıyla gelişmektedir (208).

2.2.3. Rasopatilerde prenatal bulgular

Rasopatiler içinde en çok NS'nun prenatal bulguları belirgindir. Artmış NT/kistik higroma (%35), hidrotoraks (%40), renal anomaliler (%23), kardiyak anomaliler (%38), cilt ödemi (%33), polihidramniyoz (%50) ve fetal asit (%14) en yaygın prenatal bulgular arasındadır (219). Polihidramniyoz rasopatilerde sık görülen bir bulgu olup etiyolojisi net değildir, ancak fetal yutma anomalileri (oromotor hipotoni) ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (5, 220). Noonan sendromlu bir çocuğa sahip ailelerin %33'ünde önceki gebeliklerde polihidramniyoz öyküsü bulunabilmektedir (146). Rasopatili gebeliklerde, fetal baş çevresinde artış ve makrozomi görülebilmekte ve yenidoğan döneminden sonra ilerleyen bebeklik döneminde makrozomi çoğunlukla devam etmediği için bu durumun ödem ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (220).

Vakaların yaklaşık %20'sinde prenatal dönemde KKA saptanabilmektedir ve sıklığı göz önünde bulundurulduğunda, hastalarda fetal ekokardiyografi endikedir (220). Bununla birlikte, NS'da en sık görülen kardiyak defektler olan PS ve HKMP'nin fetal USG'de görüntülenmesi zordur. Normal karyotipli fetüslerde artmış NT ile en sık birliktelik gösteren yapısal anomali konjenital kalp defektleridir (34). Anormal fetal USG bulgularının (artmış NT, kistik higroma, fetal asit, hidrops fetalis, plevral efüzyon, polihidramniyoz, KKA ve renal anomaliler) izlendiği 424 fetüsü kapsayan bir çalışmada prenatal tanı amacıyla yapılan moleküler analizde rasopatilerle ilişkili genlerde %9,4 oranında mutasyon saptanmış olup, en sık mutasyon saptanan gen *PTPN11* genidir (182). Prenatal dönemde *PTPN11* mutasyonları belirlenen olguların retrospektif değerlendirmesinde ise artmış NT

(%44) ve kistik higromanın (%48) en yaygın iki endikasyon olduğu raporlanmıştır. Bununla birlikte, prenatal dönemde yapılan *PTPN11* analizi ile izole kistik higromaya sahip fetüslerin %11'ine NS tanısı konulduğu, KKA veya diğer bulgular mevcut olduğunda tanı yüzdesinin arttığı belirtilmiştir (221).

Prenatal bulgular ve postnatal fenotip arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, prenatal bulguların prognoz ile net bir korelasyon göstermediği belirtilmektedir (5). Bununla birlikte prenatal USG anomalilerinin, postnatal JMML veya kognitif etkilenim olasılığında artışa neden olabileceği öne sürülmektedir (5). Noonan sendromu ile ilişkili genlerde prenatal ve postnatal moleküler tanı oranları kıyaslandığında; *PTPN11* geninin prenatal vakaların %37'sinde, postnatal vakaların %55'inde, *SOS1* geninin ise prenatal vakaların %27'sinde ve postnatal vakaların %14'ünde etiyolojiden sorumlu olduğu bildirilmiştir (222, 223).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Prenatal USG’de kistik higroma ve/veya artmış NT ($\geq 3,5$ mm) ve/veya artmış NF (≥ 6 mm) saptanması nedeniyle Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezimize refere edilen KVÖ materyalinden veya amniyon sıvısından yapılan konvansiyonel sitogenetik ve moleküler karyotip analizleri normal olarak sonuçlanan 2022-2023 yılına ait 20 fetüs retrospektif ve prospektif olarak bu çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların kendilerinden ya da birinci derece yakınlarından, önceki gebeliklerinde spontan gebelik kaybı ve ölü doğum/intrauterin gebelik kaybı bilgilerini içeren toplam gebelik sayısı ve öyküsü bilgilerinin yanı sıra yaşayan çocuk sayısı ve çocuklarının sağlığı sorgulanmıştır. Ebeveynlerin yaşları, özgeçmişi ve akrabalık durumu bilgilerinin yer aldığı demografik özellikleri öğrenilmiştir. Ayrıca, ailelerin başta rasopatiler olmak üzere ilişkili olabilecek genetik hastalıklar açısından soygeçmiş özellikleri edinilmiştir. Ek olarak mevcut gebeliğin gestasyonel haftası, fetal USG bulguları, yapılan tarama testlerinin sonuçları ve mevcut gebeliğin spontan veya ikincil üreme yöntemi ile gerçekleşip gerçekleşmediği bilgisi öğrenilmiştir. Tüm olguların son adet tarihine göre ve/veya USG ile doğrulanmış haftaları esas alınarak gebelik haftaları kaydedilmiştir. Fetal USG’de fetüse ait cinsiyetin belirlenebildiği durumlarda cinsiyet bilgisi not edilmiştir.

Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezimize (GHDM) refere edilen her bir olgunun laboratuvarında çalışılacak materyali/dokusu konusunda bilgilendirilmesini içeren uygun “bilgilendirilmiş hasta onam formunu” imzalaması istenmektedir. Amniyosentez ve KVÖ materyalleri için kullanılan “bilgilendirilmiş

hasta onam formunu” Ek-1’de bulunmaktadır. Ayrıca, çalışma hakkında ilave bilgilendirme yapılarak hazırlanmış olan “girişimsel olmayan klinik araştırmalar için bilgilendirilmiş gönüllü olur formu”nu (BGOF) (Ek-2) çalışmaya dahil olan olguların imzalamaları talep edilmiştir. Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’nca 04.07.2022/550 karar numarasıyla onaylanarak Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından TTU-2022-8125 proje kodu ile desteklenmiştir.

Fetal USG takiplerinde kistik higroma ve/veya artmış NT ve/veya artmış NF saptanan olgularda etiyolojiyi araştırmak amacıyla GHDM’mize refere edilen invaziv örnekleme (KVÖ veya AS) materyallerinden ilk olarak, sık görülen ve yaşamla bağdaşan kromozomal anöploidilerin (13, 18, 21, X ve Y kromozomları) I-FISH (interfaz-Floresan *in situ* Hibridizasyon) analizleri yapılmıştır. Eş zamanlı aynı materyallerin uzun dönem doku kültürleri kurulmuş ve kültür sonrası konvansiyonel sitogenetik ve moleküler karyotipleri normal olan olgularda rasopatilere yönelik dizi analizleri yapılmıştır. Olguların beşinde kültür sonrası, beşinde ise KVÖ materyali yeterli olduğundan direkt dokudan DNA eldesi yapılarak gen analizleri tamamlanmıştır.

3.1. Olguların Bilgileri

Endikasyon dahilinde 21 KVÖ materyali, 13 AS materyali ve prenatal dönemde 20. gebelik haftasında eksitus olmuş bir fetüse ait cilt materyali çalışma grubuna seçilmiştir. Olguların klinik bulguları, invaziv örnekleme yapılan

gestasyonel haftası ve kistik higroma ve/veya artmış NT ve/veya artmış NF dışındaki fetal USG bulgularını içeren bilgileri Tablo 6’da sunulmaktadır.



Tablo 6. Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezimize refere edilen lenfatik displazili olguların klinik özellikleri.

Olgular	Materyal	Gestasyonel Hafta (Hafta+Gün)	Cinsiyet*	NT (mm)	NF (mm)	Kistik higroma	Fetal hidrops	Ek USG bulguları
1	KVÖ	12	?	-	-	+	+	Üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü
2	KVÖ	13	?	4,5	-	+	-	-
3	KVÖ	12	?	-	-	+	-	-
4	KVÖ	13+6	?	-	-	+	+	-
5	KVÖ	11+3	?	9	-	-	+	Nazal kemik hipoplazisi
6	KVÖ	13	?	6,9	-	+	-	-
7	KVÖ	12+4	?	6	-	-	-	-
8	KVÖ	13	?	3,8	-	+	-	-
9	KVÖ	21+5	E	-	7	-	-	Nazal kemik hipoplazisi
10	AS	22	E	-	6,5	-	-	-
11	AS	23	K	-	17	-	-	Polihidramniyoz, plevral efüzyon, Fetal EKO'da kardiyak anomaliler (fallot tetralojisi?, perimembranoz VSD, aort dekstropeze, pulmoner darlık)
12	AS	22	K	-	6,5	-	-	Pes ekinovarus
13	AS	22+6	E	-	-	+	-	-
14	AS	21+3	K	-	6	-	-	Bilateral renal pelvis dilatasyonu
15	AS	20+6	E	-	7,1	-	-	Kalpde hiperekoben odak, sağ böbrekte piyelektazi
16	Fetal cilt materyali	20	E	-	6	-	-	Ventrikülomegali, hiperekoben bağırsak
17	AS	21+4	E	-	6	-	-	Nazal kemik hipoplazisi
18	AS	21+2	K	-	7,7	-	-	Lateral ventrikülomegali
19	AS	22+4	K	-	6	-	-	-
20	KVÖ	13+6	E	8,1	-	+	-	-
21	KVÖ	12	?	-	-	+	+	-
22	KVÖ	12	?	-	-	+	-	-
23	KVÖ	12	?	-	-	+	-	Duktus venozusta derin a dalgası
24	KVÖ	12+7	?	3,5	-	+	-	Alobar holoprosoensefali
25	KVÖ	12+3	?	-	-	-	-	Nazal kemik aplazisi
26	KVÖ	13	?	4,6	-	-	+	Klinodaktili, VSD, Nazal kemik aplazisi
27	KVÖ	13	?	4,1	-	-	-	Kalpde hiperekoben odak
28	KVÖ	12	?	-	-	+	+	-
29	KVÖ	12+4	?	-	-	+	-	-
30	AS	21	E	-	6	-	-	Nazal kemik aplazisi
31	AS	16	K	-	-	+	+	Plevral efüzyon
32	AS	17	E	5,9	-	-	-	Kalpde hiperekoben odak
33	AS	28+2	E	-	9	-	-	Plevral efüzyon, pes ekinovarus, perimembranoz VSD, asimetrik gelişim geriliği
34	KVÖ	13	?	-	-	+	+	Kalpde hiperekoben odak
35	KVÖ	14	?	-	-	+	+	Hidrocefali

*: Fetal USG'de E: Erkek, K: Kız cinsiyet belirlendiğini göstermektedir.?: fetal USG ile cinsiyet tayini yapılamamış olguları temsil etmektedir. +: Mevcut; -: Mevcut değil; AS: Amniyosentez materyali; Fetal EKO: Fetal ekokardiyografi; KVÖ: Koryonik villus örnekleme; mm: milimetre; NT: Nükal saydamlık; NF: Nükal kalınlık; VSD: Ventriküler septal defekt).

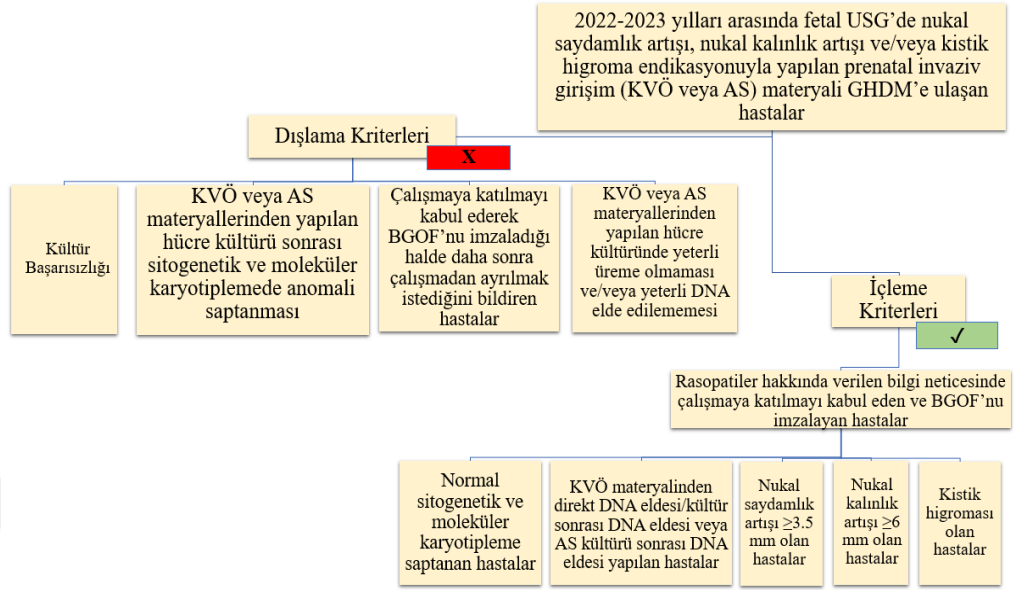
Tüm olguların konvansiyonel ve moleküler karyotip analizlerinin sonuçları Tablo 7’de sunulmuştur. Otuz beş gebeden on üçünde I-FISH tekniği ile tespit edilen ve uzun dönem doku kültürü ile de teyit edilen kromozomal anöploidi belirlenmesi üzerine 13 fetüs çalışma dışı bırakılmıştır. Bu olgulardan altı fetüste regüler tip Trizomi 21, 4 fetüste Turner sendromu, iki fetüste Trizomi 18 ve bir fetüste Robertsonian translokasyon tipi Trizomi 13 saptanmıştır. Sayısal anomali saptanan tüm gebeliklerdeki I-FISH sonucu, konvansiyonel karyotip analizi ile doğrulanmıştır. Tüm ailelere GHDM polikliniğimizde genetik danışmanlık verilmiştir.

İnterfaz FISH ve karyotip analizi normal olarak değerlendirilen 22 olgunun ikisinde (olgu 23 ve olgu 35) array-CGH’de patojen/olası patojen CNV belirlendiği için bu iki olgu çalışma dışı bırakılmış ve array-CGH analizinde kliniği açıklayan CNV saptanmayan 20 olguda rasopatilere yönelik dizi analizi yapılmıştır (Tablo 7). Prenatal invaziv materyaller için kullanılan çalışmaya dahil edilme ve çalışma dışı bırakılma kriterleri şekil 2’de algoritmik olarak şematize edilmiştir.

Tablo 7. Olguların konvansiyonel sitogenetik ve moleküler karyotip analiz sonuçları.

Olgular	Karyotip	Array-CGH	Sonuçların yorumlanması
1	46,XY	N	-
2	46,XY	N	-
3	46,XX	N	-
4	46,XX	N	-
5	46,XX	N	-
6	46,XX	N	-
7	46,XY	N	-
8	46,XX	N	-
9	46,XY	N	-
10	46,XY	N	-
11	46,XX	N	-
12	46,XX	N	-
13	46,XY	N	-
14	46,XX	N	-
15	46,XY	N	-
16	46,XY	N	-
17*	46,XY	Xp22.31 bölgesinde 1609 kb'lık hemizigot delesyon	Bu bölgenin delesyonları rekürrendir. Erkek bireylerde steroid sülfataz eksikliğine bağlı X'e bağlı ihtiyozis (OMIM; #308100) ile ilişkilendirilmiştir. Bu patojen delesyon fetüsün artmış NF (6 mm) ve nazal kemik hipoplazisi bulgularını açıklamamaktadır.
18*	46,XX	9q32 bölgesinde 245 kb'lık duplikasyon	Duplikasyon bölgesinde yer alan COL27A1 geninin biallelik patojen varyantları OR Steel sendromuna, KIF12 geninin biallelik patojen varyantları ise OR progresif intrahepatik kolestaza neden olmaktadır. Tüm gen duplikasyonlarının klinik önemi bilinmemekle birlikte, genin tek kopyasında saptandığı için tek başına bu hastalıklara neden olması beklenmemektedir.
19	46,XX	N	-
20	46,XY	N	-
21	47,XX,+18	-	Trizomi 18
22	45,X	-	Turner sendromu
23	46,XX	3q21-q29 duplikasyonu, 2q37 delesyonu	Saptanan CNV patojen olarak sınıflandırılmıştır. Bu bölgeyi kapsayan parsiyel 3q duplikasyonu saptanan fetüslerde prenatal dönemde lenfatik displazi bildirilmiştir (224, 225).
24	46,XX,+13,der(13;13)(q10;q10)dn	-	Robertsonian translokasyon tipi Trizomi 13
25	47,XY,+21	-	Trizomi 21
26	47,XX,+21	-	Trizomi 21
27	47,XY,+21	-	Trizomi 21
28	45,X	-	Turner sendromu
29	47,XX,+18	-	Trizomi 18
30	47,XY,+21	-	Trizomi 21
31	45,X	-	Turner sendromu
32	47,XY,+21	-	Trizomi 21
33	47,XY,+21	-	Trizomi 21
34	45,X	-	Turner sendromu
35	46,XX	2q11.1q21.1 bölgesinde 35.5 Mb'lık duplikasyon (proksimal 2q duplikasyonu)	Saptanan CNV patojen olarak sınıflandırılmıştır. Bu bölgeyi kapsayan 2q duplikasyonu saptanan fetüslerde prenatal dönemde kistik higroma bildirilmiştir (226)[249].

OR: Otozomal resesif, CNV: Copy Number Variations; Kopya sayısı değişiklikleri. Olgu 17 ve 18'de klinik bulguları açıklayan CNV saptanmadığı için çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 2. Fetal ultrasonografide nuchal saydamlık artışı, nuchal kalınlık artışı ve/veya kistik higroma endikasyonu ile Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezimize refere edilen prenatal invaziv girişim (koryonik villüs örnekleme veya amniyosentez) materyallerinde bu çalışma için belirlenen içleme ve dışlama kriterleri (KVÖ: Koryonik Villüs Örnekleme, AS: Amniyosentez, GHDM: Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi)

3.2. Deneysel Basamaklar

3.2.1. Rasopati panel kiti ile analiz yöntemi

Rasopati paneli ile rasopati sendromlarının ilişkili olduğu bilinen *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1* ve *SPRED1* hedef genlerindeki aminoasit kodlayan ekzon bölgelerinin yüksek verimli sekanslaması ile potansiyel varyasyonlardan kaynaklanan mutasyonların analiz edilmesi sağlanmaktadır. Panel analiz yöntemi, genomik DNA izolasyonunun ardından kütüphane oluşturulması ve dizi analizinden meydana gelen ıslak laboratuvar çalışmaları (wet-lab) sonrası yürütülen ileri biyoinformatik analizlerden ibarettir.

Olguların prenatal invaziv örneklemelerinden elde edilen fetal DNA'lerden hastalıkla ilişkili hedef bölgelere spesifik primerler aracılığı ile Rasopati panel kiti (CleanPlex® NGS (Next-Generation DNA Sequencing) custom Panel Paragon sop V3, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) yöntemi (Biorad Laboratories, T100 Thermal Cycler, Amerika Birleşik Devletleri) ile çoğaltılarak kütüphaneler hazırlanmaktadır. Sekanslama basamağı NextSeq 500/550 platformunda (Illumina, Amerika Birleşik Devletleri) NextSeq 500/550 high output kit v2.5 (300 cycle) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sekanslama sonrası klinik bulgularla ilişkili olabilecek varyantlar, ıslak laboratuvar aşaması sonrasında biyoinformatik analizler ile değerlendirilmiştir.

3.2.1.1. Islak laboratuvar aşaması

3.2.1.1.1. Genomik DNA izolasyonu

Koryonik villus örnekleme materyali yeterli miktarda mevcut olduğunda DNA eldesi direkt dokudan yapılmıştır. Koryonik villus örnekleme materyali yeterli miktarda olmadığı durumlarda ise uzun dönem doku kültüründen DNA eldesi yapılmıştır. Amniyosentez veya KVÖ materyalinden uzun dönem hücre kültürü yapılması amacı ile her gebeye ait örnek iki farklı besi yeri kullanılarak, üç ayrı flaska ekilmiştir. Flasklar 37°C'deki etüvde yaklaşık 10-12 gün süre (optimal mitoz sayısı için ortalama süre) ile takip edilmiştir, hücrelerin üreme durumu invert mikroskop aracılığıyla yapılmıştır. Ekim sonrası optimal üreme oranına erişen (flaskın %40-60'ında hücre doluluğu mevcut olduğunda) flasklardan ikisi kromozom analizinde, bir flask ise fetal DNA eldesi amacıyla DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Flaskların zeminine yapışık halde bulunan hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması için Tripsin-EDTA ile muamele edilmiştir. Flasktan falkon tüpüne aktarılan hücreler iki kez santrifüj edilmiş ve her santrifüj sonrası örneklerdeki süpernatant kısmı atılmıştır. Elde edilen pellet, DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Prenatal invaziv örnekleme ile elde edilen dokudan direkt olarak veya uzun dönem doku kültürü sonrasında fetal DNA eldesi spin kolon tekniği ile yapılmıştır. Bu teknikte, 1,5 mL'lik mikrofüj tüpüne 500 µL tampon AP1 eklenmiştir. Tampon üstüne yaklaşık 250 µL EDTA taşıyan KVÖ (direkt doku veya uzun dönem kültürden elde edilen hücreler kullanılarak) veya amniyon mayii (uzun

dönem kültürden elde edilen hücreler kullanılarak) materyalleri ilave edilmiştir. Mikrofüj tüpünün kapağının kapatılmasının ardından son hızda vorteks ile karıştırılmıştır. Karışımın üstüne 100 µL tampon AP2 eklenmesi akabinde 10 saniye daha vorteks ile karıştırılmıştır. Sonrasında da karışım spin kolonlara (Axygen Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) nakledilmiştir. Ortam sıcaklığında, 12.000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifuj edilerek hücresel atıkların çöktürülmesi sağlanmıştır. 2 µL mikrofüj tüpü içerisine miniprep kolon konularak çöktürme sonrası belirginleşen üst faz miniprep kolonlara nakledilmiştir. 12.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifuj edilmiştir. 2 µL mikrofüj tüpünün alt kısmında kalan süzöntü uzaklaştırıldıktan sonra miniprep kolon 2 µL mikrofüj tüpüne yeniden yerleştirilmiştir. Öncesinde etanol eklenmiş 700 µL W1A miniprep, kolonların üzerine aktararak 2 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilmesi sağlanmıştır. Ardından tekrar 12.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifuj edilmiştir.

Mikrofüj tüpünün altında kalan süzöntü uzaklaştırılmış ve miniprep kolon 2 mL mikrofüj tüpüne tekrardan koyulmuştur. 800 µL tampon W2 miniprep kolon üstüne ilave edilerek 12.000 rpm’de santrifuj tekrar yapılmıştır. Mikrofüj tüpünün alt kısmındaki süzöntü uzaklaştırıldıktan sonra miniprep kolon 2 µL mikrofüj tüpünün içine yerleştirilmiştir. 500 µL tampon W2 miniprep kolonun üzerine aktararak 12.000 rpm’de 1 dakika süreyle santrifuj edilmiştir. Bu şekilde, tampon W2 ile iki defa yıkanarak tuzlardan arındırılması sağlanmış ve enzimatik reaksiyonlar sırasında tuzların varlığı nedeniyle oluşabilecek sorunlar giderilmiştir. Mikrofüj tüpünün altına geçen süzöntü uzaklaştırılmıştır. Miniprep kolon 2 mL santrifuj tüpüne yerleştirildikten sonra yine 12.000 rpm’de santrifuj edilmiştir.

Miniprep kolon 1,5 mL'lik mikrofüj tüpüne yerleştirilmiştir. İşlem  ncesi 65  C sıcaklığa getirilmiş olan 80-200  L tampon TE (Tris-EDTA) tüpe aktarılmıştır. Oda sıcaklığında bir dakika boyunca bekletilmesini takiben 12.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifuj edilerek fetüse ait genomik DNA elde edilmiştir.

3.2.2.1.2. Genomik DNA'da kalite-miktar tayinleri

Dizi analizine başlamadan önce elde edilen genomik DNA'nın kalite parametreleri; seyreltilmiş/seyreltilmemiş sıvı (düşük iyon konsantrasyonlu sıvı tampon) solüsyonlar içindeki DNA numunelerinin ultraviyole ışık altında sahip oldukları absorpsiyon (A) değerleri optik yoğunluktan hareketle belirlenerek değerlendirilmiştir. Bu amaçla, Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kiti (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) cihazında fetal DNA'ların konsantrasyonları ölçülmüştür. Çalışma için gerekli nükleik asit konsantrasyonu 20ng/ l ve üzeridir. Nükleik asit konsantrasyonu, 260 nm dalga boyundaki boş bir örnek (k r) karşısındaki A değeri  l  l r k belirlenmiştir. Nükleik asitlerin saflığını hesaplamak için A260/A280 ve A260/A230 oranlarından faydalanılmıştır.

3.2.1.1.3. Kütüphane hazırlanması

A. Multiplex PCR reaksiyonu:

Genomik DNA örneğinden rasopati paneli için spesifik miktar olan 40 ng eklenerek multiplex PCR (mPCR) karışımı (mixture, mix) hazırlanır. mPCR mix içeriği 6X μ l nükleazdan arındırılmış (nükleaz-free) saf su, 2 μ l 5X multiplex PCR mix, 2 μ l 5X primer havuzu ve ortalama 2 μ l DNA'dan oluşmaktadır. Her bir reaksiyon için hedeflenen total hacim 10 μ l'dir. Elde edilen mPCR mix karışımı yavaş bir şekilde yapılan pipetajın ardından, PCR tüplerine eklenmiştir. Tüpler yapışkan filmle kapatılmış, homojen hale gelinceye kadar en az 5 saniye boyunca kuvvetlice vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Tüpler termal döngü cihazına (Polymerase Chain Reaction, PCR, Thermocycler, Biometra TAdvanced 96, Almanya) yerleştirilmiş ve hedef DNA bölgelerini çoğaltmak için mPCR termal döngü protokolü ile çalıştırılmıştır. MPCR termal döngü protokolü; 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyon aşaması sonrasında 98°C'de 15 saniye denatürasyon ile DNA zincirlerinin ayrılması, 60°C'de primerlerin bağlanması (annealing) ve yeni zincirlerin sentez edildiği 5 dakika uzama aşamasından oluşan 10 siklus olarak gerçekleştirilmiştir.

Multiplex PCR termal döngü protokolü tamamlandıktan sonra elde edilen ampliconların üzerine her bir tüpe 2 μ l Durdurma Tamponu eklenerek kısa bir süre spin edildikten sonra vortekslenerek karıştırılmıştır. Bu aşamada her bir numunenin mevcut hacmi yaklaşık 12 μ l'dir. Durdurma Tamponu eklendikten sonra mPCR sonrası Saflaştırma aşamasına geçilmiştir.

B. Multiplex PCR sonrası saflaştırma:

Saflaştırma aşaması için tüplerin kapağı açıldıktan sonra, her bir numuneye 10 μ l TE (Tris-EDTA) tamponu eklenmiştir. Manyetik boncuk (beads)

süspansiyonu, tüplere eklenmeden önce homojen hale gelinceye kadar vortekslenmiştir. Manyetik beadslerin homojenize olması saflaştırma işlemi için kritik öneme sahiptir ve mutlaka dikkatlice karıştırılması gerekmektedir. Tüplerin içinde yer alan her bir numuneye 29 µl manyetik beads süspansiyonu eklenmiştir. Sonrasında tüpler homojen hale gelinceye kadar en az 5 saniye boyunca kuvvetlice vortekslenerek karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler kısa bir süre spin edildikten sonra, manyetik bir standın üzerine yerleştirilmiş ve sıvı berraklaşana kadar en az 2 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler manyetik standın üzerinde sabit tutularak manyetik beadsler etkilenmeden süpernatant dikkatlice alınarak atılmıştır. Tüpler kapatılmış ve kalan sıvı kısa bir süre spin edilmiştir. Manyetik beadslerin bir araya toplanması için tüpler manyetik standın üzerine yerleştirilmiştir. Pipet ucu kullanarak, kalan tüm süpernatant, beadsleri dağıtmadan tüp içinden dikkatlice alınıp atılmıştır. Bu aşamadan sonra etanol ile yıkama aşamasına geçilmiştir. Her tüpe 180 µl taze hazırlanmış %70 etanol eklenmiştir. Tüplerin şeffaf tarafı (manyetik beads bulunmayan taraf) miknatısın bulunduğu tarafa doğru gelecek şekilde tüpler manyetik standın üzerine tekrar yerleştirilerek manyetik beadslerin etanol içinden diğer tarafa tamamen geçmeleri sağlanmıştır. Manyetik beadsler dağıtılmadan süpernatant dikkatlice çıkarılıp atılmıştır. Bu etanol ile yıkama işleminden sonra, tüpler kısaca spin edilmiştir. Manyetik beadsleri toplamak için tüpler miknatıs standına yerleştirilmiştir. Her tüpte bulunan etanol pipet ile dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tüpler manyetik stand üzerinde tutularak oda sıcaklığında 5 dakika boyunca havayla kurutulmuştur. Her tüpe 10 µl TE tamponu doğrudan pellet

üzerine eklenmiştir. Hava ile kurutulmuş olan manyetik beadsler yeniden süspanse etmek için kısa bir süre spin edilmiş ardından vortekslenmiştir. Bu aşamada saflaştırılmış olan materyallerin 2-8°C'de 1 saate kadar veya -20°C'de 24 saate kadar saklanabilmesi mümkün olabilmektedir.

C. Digestion aşaması:

Digestion aşamasında spesifik bağlanmayan ürünlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan CP (Citate-Phosphate; Sitrat-fosfat) reaktif tamponu çözerken tüp, oda sıcaklığında çözülmüş ve vortekslenmiştir. Bir termal döngü cihazı 37°C'ye ısıtılmıştır. Digestion aşaması için 6 µl nükleaz free saf su, 2 µl CP reaktif tamponu ve 2 µl CP digestion reaktifi kullanılarak toplam 10 µl olan digestion mix içeriği hazırlanarak örnekler üzerine dağıtılmış, ardından en az 5 defa pipetaj ile karıştırılarak homojenizasyon sağlanmıştır. Termal döngü cihazında 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından her tüpe ivedilikle 2 µl durdurma tamponu eklenmiş ve vortekslenerek karıştırılmıştır. Bu aşamada tüpteki her bir numunenin hacmi yaklaşık 22 µl'dir.

D. Digestion sonrası saflaştırma:

Manyetik beads süspansiyonu vortekslendikten sonra digestion ile elde edilen her bir numuneye manyetik beads süspansiyonundan 29 µl eklenerek digestion sonrası manyetik beads bazlı saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Tüpler en az 5 defa pipetaj ile karıştırılarak homojenizasyon sağlanmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra kısa bir süre spin edilen tüpler, manyetik standı yerleştirilmiş ve sıvı berraklaşana dek en az 2 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Tüpler manyetik stand üzerinde iken manyetik beadsler dağıtılmadan

süpernatantı dikkatlice çıkarılıp atıldıktan sonra tekrar spin edilip, manyetik standa yerleştirilmiştir. Tekrar aynı şekilde tüpler manyetik stand üzerinde iken manyetik beadsler dağıtılmadan süpernatantı dikkatlice çıkarılıp atılmıştır. Sonrasında etanol ile yıkama aşamasına geçilmiştir. Etanol ile yapılan yıkama aşaması iki kez tekrarlanmıştır. Her tüpe 180 µl taze hazırlanmış %70'lik etanol eklenmiştir. Tüplerin manyetik beads bulunmayan şeffaf tarafı mıknatısın bulunduğu tarafa gelecek şekilde tüpler manyetik standın üzerine tekrar yerleştirilerek manyetik beadslerin etanol içinden diğer tarafa tamamen geçmeleri sağlanmıştır. Daha sonra manyetik beadsler dağıtılmadan süpernatant dikkatlice çıkarılıp atılmıştır. Etanol ile yıkama işleminden sonra tüpler kısa bir süre spin edilmiştir. Etanol ile yapılan bu yıkama aşaması bir basamak daha tekrarlanmıştır. İkinci kez etanol ile yıkama adımı tamamlandıktan sonra, tüpler kısa bir süre spin edilmiştir. Manyetik beadsleri toplamak için tüpler mıknatıs standına yerleştirilmiştir. Her tüpte bulunan etanol pipet ile dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tüpler manyetik stand üzerinde tutularak oda sıcaklığında 5 dakika boyunca havayla kurutulmuştur. Her tüpe 10 µl TE tamponunu doğrudan pellet üzerine eklenmiştir. Hava ile kurutulmuş olan manyetik beadsler yeniden süspanse edilmek üzere kısa bir süre spin edilip vortekslenmiştir.

E. İkinci PCR reaksiyonu:

İkinci PCR reaksiyonu için spesifik indeks PCR primerleri (i5 ve i7, Tablo 8) oda ısısında çözündürülmüş, vortekslenip ardından kısa bir süre spin edilmiştir. Tüplere eklenmek üzere, 18 µl nükleaz-free saf su ve 8 µl PCR mixi kullanılarak ikinci PCR master mix hazırlanmıştır. Her bir örneğe 26 µl ikinci PCR master mix, 2 µl i5 indeks PCR primerleri ve 2 µl i7 indeks PCR primerleri eklenmiştir. Tüplerin

kapakları kapatılıp kısa bir süre spin edildikten sonra içindeki süspansiyon homojen hale gelinceye kadar en az 5 saniye boyunca kuvvetlice vorteksenerek karıştırılarak termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve ikinci PCR termal döngü protokolü uygulanmıştır. İkinci PCR protokolü şu şekildedir; 95°C’de 10 dakika başlangıç denatürasyon aşaması, 98°C’de 15 saniye ek denatürasyon aşaması ile DNA zincirlerinin ayrılması, sonrasında 60°C’de primerlerin bağlanması (annealing) ve yeni zincirlerin sentez edildiği 75 saniyelik uzama aşamasından oluşan 10 siklus gerçekleştirilerek amplikonlar elde edilmiştir.

Tablo 8. i5 ve i7spesifik indeks PCR primerleri.

	Kod	Primer dizileri
i5*	D501	AGGCTATA
	D502	AGGCTATA
	D503	AGGATAGG
	D504	TCAGAGCC
	D505	CTTCGCCT
	D506	TAAGATTA
	D507	ACGTCCTG
	D508	GTCAGTAC
i7*	D701	ATTACTCG
	D702	TCCGGAGA
	D703	CGCTCATT
	D704	GAGATTCC
	D705	ATTCAGAA
	D706	GAATTTCGT
	D707	CTGAAGCT
	D708	TAATGCGC
	D709	CGGCTATG
	D710	TCCGCGAA
	D711	TCTCGCGC
	D712	AGCGATAG

* Spesifik indeks PCR primerleri

F. İkinci PCR sonrası saflaştırma:

İkinci PCR sonrası saflaştırma aşamasında öncelikle vortekslenerek homojenize edilen manyetik beads süspansiyonu tüplerin içinde yer alan her bir numuneye 40 µl eklenmiştir. Sonrasında homojen hale gelene kadar en az 5 saniye boyunca kuvvetlice vortekslenerek karıştırılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler kısa bir süre spin edildikten sonra, manyetik bir standın üzerine yerleştirilmiş ve sıvı berraklaşana kadar en az 2 dakika inkübe edilmiştir. Manyetik standın üzerinde sabit tutulan tüplerden manyetik beadsler etkilenmeden süpernatantı dikkatlice alınıp atılmış ve kalan sıvı kısa bir süre spin edilmiştir. Manyetik beadslerin bir araya toplanması için tüpler manyetik standın üzerine yerleştirilmiştir. Kalan tüm süpernatant, pipet ucu kullanılarak beadsleri dağıtmadan tüp içinden dikkatlice alınıp atılmıştır. Bu aşamadan sonra etanol ile yıkama aşamasına geçilmiştir. Etanol ile yapılan yıkama aşaması iki kez tekrarlanmıştır. Her tüpe 180 µl taze hazırlanmış %70'lik etanol eklenmiştir. Tüplerin manyetik beads bulunmayan şeffaf tarafı mıknatısın bulunduğu kısma gelecek şekilde tüpler manyetik standın üzerine tekrar yerleştirilerek manyetik beadslerin etanol içinden diğer tarafa tamamen geçmeleri sağlanmıştır. Manyetik beadsler dağıtılmadan süpernatant dikkatli bir şekilde çıkarılarak atılmıştır. Etanol ile yıkama işleminden sonra tüpler kısa bir süre spin edilmiştir. Etanol ile yıkama aşaması bir basamak daha tekrarlandıktan sonra tüpler kısa bir süre spin edilmiştir. Manyetik beadsleri toplamak için tüpler mıknatıs standına yerleştirilmiştir. Her tüpte bulunan etanol pipet ile dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Tüpler manyetik stand üzerinde tutularak oda sıcaklığında 5 dakika boyunca havayla kurutulmuştur. Her tüpe 10 µl TE tamponu doğrudan pellet üzerine eklenmiştir. Hava ile

kurutulmuş olan manyetik beadsler yeniden süspansiyon haline gelmesi için kısa bir süre spin edilmiş, ardından vortekslenmiştir. Bu aşamada sekans aşaması için kütüphaneler kullanıma hazırdır.

G. Sekans Aşaması:

Agilent 2100 Bioanalyzer Cihazı (Amerikan Birleşik Devletleri) ve Agilent Yüksek Hassasiyetli dsDNA Kiti (Amerikan Birleşik Devletleri) gibi yüksek hassasiyetli bir fragman analizörü kullanılarak kütüphane kalitesi ve konsantrasyonu kontrol edilmiştir. Bu işlemten sonra öncelikle kütüphane hazırlama aşamasında elde edilen numunelerin seyreltilmesi ve denatüre edilmesi gerekmektedir. Seyreltme işlemi için yeterli miktarda numuneye (2- 5 µl), mevcut miktarının üzerine toplam hacim 1000 µl olacak şekilde hibridizasyon tamponu eklenir. Sonrasında numuneler kısa bir süre vortekslenir ve ardından 280 × g'de 1 dakika santrifüjlenir. Santrifüj edilen numunedan 750 µl alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır, üzerine 750 µl soğutulmuş hibridizasyon tamponu eklenerek tekrar kısa bir süre vortekslenir ve ardından 280 × g'de 1 dakika santrifüjlenir. Denatürasyon için önceden ısıtılmış inkübatöre yerleştirilen tüpler, 2 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 5 dakika buz üzerinde soğutma işlemi yapılır.

Seyreltme ve denatürasyon sonrası her bir numune, Nextseq 500/550 (Illumina, Amerika Birleşik Devletleri) dizileme platformundaki “flow cell” üzerinde bulunan spotlara yerleştirilmekte ve sekanslama işlemi “flow cell” üzerinde gerçekleştirilmektedir. Birbirinden farklı boylarla işaretli modifiye deoksिनükleotid trifosfatları (dNTP) içeren reaksiyon solüsyonu “flow cell”

içerisine yüklenir. Nextseq 500/550 cihazı ile 'sentez yoluyla dizileme (SBS)' teknolojisi kullanılarak her bir sekanslama kümesi üzerindeki bazların okuması sağlanmaktadır. NextSeq 500/550 cihazında sekanslama çalışması için bir reaksiyon kartuşu ve flow cell hazırlanır, ardından çalışmayı düzenlemek ve başlatmak için cihaz üzerinde yazılım talimatları ayarlanır. Flow cell platformu üzerinde bulunan her bir sekanslama kümesi tek bir şablon DNA ipliği içerir ve küme içinde yaklaşık 1000 kopyaya sahip olana kadar köprü amplifikasyonu yoluyla klonal olarak çoğaltılır. Köprü amplifikasyonunun ilk adımında, tek iplikli bir dizileme ile oluşturulan kütüphane (tamamlayıcı adaptör uçlarıyla) flow cell'e yüklenir ve nükleik asitler flow cell üzerinde "akarken" tamamlayıcı oligonükleotitlere bağlanırlar. 8-12 bp uzunluğunda olan tamamlayıcı adaptör uçları, PCR primerlerinin bir bileşenidir ve kütüphane hazırlama aşamasında nükleik asit parçalarına bağlı olarak bulunur. Illumina flow cell yüzeyinde genellikle "P5" ve "P7" olarak adlandırılan iki farklı tamamlayıcı oligonükleotitten oluşan bir katman bulunmaktadır. PCR'a benzer şekilde gerçekleşen tekrarlayan denatürasyon ve uzatma döngüleri, flow cell yüzeyinde bulunan sekanslama kümelerinde tek zincirli nükleik asit moleküllerinin klonal olarak amplifikasyonu ile sonuçlanır. Her bir uzatma döngüsü sırasında, flow cell üzerinde adaptörlere bağlı olarak duran nükleik asit zincirine floresan etiketli tek bir dNTP eklenir ve sekanslama kümeleri, 2 kanallı sekanslama sistemi ile floresan etiketli zincir sonlandırıcılarına özgü filtre kombinasyonları kullanılarak görüntülenir. Flow cell üzerindeki DNA'ya, floresan işaretli modifiye dNTP'nin eklenmesi sonrasında yüksek çözünürlüklü dijital görüntüleme alınması yoluyla sistem çalışmaktadır.

Flow cell üzerindeki sekanslama kümelerinde bulunan bir spotun görüntülenmesi tamamlandıktan sonra sıradaki diğer spot görüntülenir. Maksimum okuma uzunluğu, her bir okuma için ortalama 150 döngüden (2 x 150) oluşan bir çift taraflı çalışma şeklinde, ortalama 150 bazlık okuma uzunlukları elde edilir. Her sekanslama döngüsü için bu işlem tekrarlanır. Görüntü analizinin ardından yazılım temelli, filtreleme ve kalite puanlaması gerçekleştirilir. Flow cell platformu sayesinde 200X dizileme derinliği ve %75'in üzerinde Q30 kalite skoru ile yüksek veri çıkışlı (high throughput) sekanslama mümkün olabilmektedir.

3.2.1.2. Biyoinformatik Analizler

Panel dizileme sonucunda ham veri elde edilmektedir. Varyasyonların listelenmesi için bir dizi dosya çevrimi sonrasında standart ya da ileri düzeyde biyoinformatik analizin yapılması gerekmektedir.

Panel analizinde, ham veriden son kullanıcıya hitap eden “Variant Calling Format” (VCF) dosyasının oluşumuna kadar geçen basamaklar şu şekilde özetlenebilir:

1. Cihazdan alınan “Fastq” dosyaları “CLEAN DATA” olarak elde edilir.
2. Clean data; “Burrows-Wheeler Aligner” (BWA V0.7.15) kullanılarak referans genome GRCh37/hg19 ile hizalanır (align edilir).
3. Oluşturulan “Sequence Alignment Map” (SAM) dosyası “PICARD TOOLS” ile koordinatlarına göre sıralanır, duplike okumalar işaretlenir.

4. İnsersiyon/delesyonlar (indel) “Genome Analysis Toolkit” (GATK) ile yeniden lokalize edilip “Binary Alignment Map” (BAM) dosyası oluşturulur.

5. “Base Quality Score Recalibration” ile her bir bazın kalite skoru hesaplanır.

6. Hedef “BED” dosyası kullanılarak “Haplotype Caller of GATK” (v3.7) ile tek nükleotid değişiklikleri (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ve indel VCF dosyaları oluşturulur.

7. SNP ve Indeller filtrelenir ve tek bir VCF dosyası haline getirilir.

Rasopati panel kiti kapsamında yer alan 13 gen ve bu genlere (*BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1* ve *SPRED1*) ait “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) veri tabanında yer alan isim, gen ID (kimlik numarası), gen tanımı, kromozom lokasyonu, “Refseq/Ensembl Kanonik” Transkript ID (GRCh37/hg19) ve kalıtım paterni bilgileri Tablo 9’da sunulmuştur.

Tablo 9. Rasopati panel kiti dahilinde incelenen 13 gene ait bilgiler.

NCBI gen ismi (ID)	Gen tanımı	Kromozo m Lokasyon u	Refseq/Ensembl Kanonik Transkript ID (GRCh37/hg19)	Kalıtım Paterni
<i>BRAF</i> (673)	B-Raf ProtoOnkogen, Serin/ Treonin Kinaz	7q34	NM_004333.4 / ENST00000288602.6	OD
<i>CBL</i> (867)	Cbl Proto-Onkogen, E3 Ubikuitin Protein Ligaz	11q23.3	NM_005188.3 / ENST00000264033.4	OD
<i>HRAS</i> (3265)	Harvey Rat Sarkom Viral Onkogen Homolog	11p15.5	NM_005343.4 / ENST00000451590.1	OD
<i>KRAS</i> (3845)	Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogen Homolog	12p12.1	NM_033360.2 / ENST00000256078.4	OD
<i>MAP2K1</i> (5604)	Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 1	15q22.31	NM_002755.3 / ENST00000307102.5	OD
<i>MAP2K2</i> (5605)	Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 2	1913.3	NM_030662.3 / ENST00000262948.5	OD
<i>NRAS</i> (4893)	Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Onkogen Homolog	1p13.2	NM_002524.4 / ENST00000369535.4	OD
<i>PTPN11</i> (5781)	Protein-Tirosin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11	12q24.13	NM_002834.3 / ENST00000351677.2	OD
<i>RAF1</i> (5894)	Raf1 Protoonkoge, Serin/Treonin Kinaz	3p25.2	NM_002880.3 / ENST00000251849.4	OD
<i>RIT1</i> (6016)	CAAX Motifi Olmayan RIC Benzeri Protein 1	1q22	NM_001256821.1 /ENST00000368322.3	OD
<i>SHOC2</i> (8036)	SHOC2 Lösine Zengin Scaffold Protein 2	10q25.2	NM_007373.3 / ENST00000369452.4	OD
<i>SOS1</i> (6654)	Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 1	2p22.1	NM_005633.3 / ENST00000402219.2	OD
<i>SPRED1</i> (161742)	Sprouty ilişkili EVH1 içeren protein 1	15q14	NM_152594.2 / ENST00000299084.4	OD

ID: Kimlik numarası; OD: Otozomal dominant; NCBI: National Center for Biotechnology Information.

Rasopati paneli analiz verilerinin kapsam ve derinlik değerleri Tablo 10’da verilmiştir. Yapılan rasopati panel analizi sonrasında elde edilen verilerin medyan okuma derinliği 147 (44-5989) ve 20x kapsam oranının medyan değeri %99,4 (%98,47-99,99) olarak belirlenmiştir. Kapsam ve okuma derinliği fetal DNA kalitesine, panelde yer alan genlerin ampikon tasarımına, genlerdeki ilk ve son ekzonların translasyona uğramayan bölge (Untranslated region, UTR) içerip içermemesine ve genler arasında homoloji gösterme durumuna göre değişebilmektedir.

Tablo 10. Panel analiz verilerinin kapsam ve derinlik değerleri.

Olgular	Okuma Derinliği	20x kapsam (%)	25x kapsam (%)	30x kapsam (%)	60x kapsam (%)	100x kapsam (%)	200x kapsam (%)
1	223	99,99	99,98	99,97	99,86	99,31	93,08
2	95	99,26	99,13	98,97	97,89	88,28	43,26
3	199	99,79	99,76	99,71	96,62	98,93	89,80
4	2349	98,64	98,64	98,64	98,64	97,76	95,03
5	2166	98,73	98,70	98,70	97,70	89,99	86,76
6	5989	99,25	99,25	99,25	98,64	98,64	96,76
7	1022	99,37	99,37	99,37	98,65	98	95,50
8	246	99,84	99,84	99,83	99,75	99,39	96,66
9	51	99,06	98,52	97,73	90,44	47,67	6,17
10	162	99,66	99,69	99,62	99,21	97,06	77,66
11	138	99,84	99,84	99,83	99,76	97,14	68,21
12	221	99,83	99,83	99,83	99,83	99,60	93,20
13	2724	99,25	99,25	99,25	99,25	98,03	98,03
14	197	99,71	99,66	99,59	99,39	98,69	89,28
15	393	98,70	98,65	98,05	96,64	94,10	81,95
16	193	99,97	99,95	99,92	99,75	98,84	88,60
17	69	99,62	99,42	99,14	96,37	71,30	13,23
18	44	98,47	97,74	96,64	84,74	30,66	2,63

19	74	99,69	99,57	99,41	97,59	74,97	18,98
20	71	99,84	99,67	99,39	96,63	76,38	39,99

3.2.1.2.1. Anotasyon ve Filtreleme

Verilerin anlamlandırılması (anotasyon) ve filtreleme aşamaları için “SOPHiA DDM™” (İsviçre) programından faydalanılmıştır. Elde edilen anote edilmiş veride, varyantlara yönelik olarak sırasıyla aşağıdaki filtreler gerçekleştirilmiştir:

1. RefSeq veri tabanında mevcut olan transkriptler, GRCh37/hg19 referans alınarak gendeki yerleşim yerine göre (ekzonlar ve kırılma (splicing) bölgelerinde (ekzon-intron sınırının +30 ila -30 bp’lik mesafesi dahil olmak üzere) yerleşen varyantlar) filtrelenmiştir. Bu çalışmada spesifik bir hastalık grubu ile ilişkili genlerin değerlendiriliyor olması nedeniyle panel kiti, kırılma bölgelerinde ve UTR bölgesinde yer alan varyantlar ile ampliconların tasarımında kapsanan varyantlar dahil edilerek tasarlanmıştır.

2. “Genome Aggregation Database” (GnomAD) veri tabanında mevcut olan sağlıklı toplum verilerine göre $<0,5\%$ heterozigot alleller ile $<1\%$ homozigot alleller filtrelenmiştir.

3. Belirlenen varyantın değerlendirmesinde, 8 veya daha fazla olgunun birlikte çalışılabildiği bir koşulda 3 ve üzeri sayıda olguda aynı varyantın bulunması durumunda, ilgili varyant dışlanmıştır. Koşulda 8 olgudan daha az olgunun bulunduğu durumlarda bu filtreleme kullanılmamıştır.

4. Panel/ekzom çalışması yapılan olguların da dahil olduğu hasta popülasyonumuzdaki >%3 sıklığı olan varyantlar dışlanmıştır.

5. Panel çalışması aynı 8 olgu ile yapıldığında, analizde belirlenen CNV'ler de değerlendirilmiştir. Aynı koşulda 8 olgudan az olduğu durumda CNV'ler değerlendirilememiştir.

6. Tüm olgularda rasopati çalışmasının kalite skorları (QA) değerlendirilmiş olup, panel çalışmasına en az 20x dizileme derinliğinde %98 ve üzerinde kapsama sahip olgular dahil edilmiştir.

7. Rasopati panel kiti içeriğinde *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1* VE *SPRED1* olmak üzere 13 gen mevcuttur. Bu genlerde yer alan varyantların değerlendirilmesi; “ClinVar”, “Leiden Open Variant Database (LOVD)” ve “Human Gene Mutation Database (HGMD) Public version” varyant veri tabanlarında yer alan sınıflandırmalara ve “Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM” ile “Human Phenotype Ontology (HPO)” veri tabanlarındaki varyantlara göre yapılmıştır (227-231).

3.2.1.2.2. Varyant yorumlama ve sınıflandırma

Filtrelerden geride kalan varyantların sınıflandırması “American College of Medical Genetics and Genomics” (ACMG) 2015 ve Association for Clinical Genomic Science” (ACGS) 2019 yıllarında yayımlanan varyant yorumlama kılavuzları dikkate alınarak yapılmıştır (232, 233). Varyant yorumlama araçları olarak “VarSome” ve “Franklin Genoox” veri tabanlarından faydalanılmıştır (234,

235). Yanlış anlamlı varyantların patojenite tahmininde, “VarSome” ve “Franklin Genoox” veri tabanlarının in silico araçlardan ürettiği toplu tahmin skorları kullanılmıştır (234, 235). Genlerin alternatif transkriptlerine “RefSeq” ve “Ensembl” veri tabanlarından (236, 237), alternatif protein izoformlarına ise “UniProt” veri tabanından (236) erişim sağlanmıştır. Ayrıca, “UniProt” ve “Human Protein Reference Database” (HPRD) veri tabanlarından proteinlerin bilgileri elde edilmiştir (236, 238). Varyantların okuma değerdendirmeleri BAM dosyasından “Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.8.0” yazılımı aracılığıyla yapılmış (239) ve “Human Genome Variation Society” (HGVS) tarafından hazırlanan sekans varyantlarını tanımlama kılavuzu dikkate alınarak yazılmıştır (240). Saptanan varyantların doğrulanması ve aile çalışmaları için Sanger dizi analizi tekniği kullanılmıştır. Sanger dizi analizinde kullanılan primerler “Primer-BLAST” aracı ile tasarlanmıştır (241). Analizler sonunda patojen, olası patojen ve klinik önemi belirsiz olarak yorumlanan varyantlar, olguların mevcut klinik bulguları ve aile hikayesine göre değerdendirilerek genotip-fenotip korelasyonu yapılmıştır.

Saptanan CNV’ler genomik koordinatlarına göre ACMG tarafından 2011 yılında yayınlanan klavuz ve ACMG ile “Clinical Genome Resource” (ClinGen) tarafından 2020 yılında yayınlanan CNV varyant sınıflandırma kılavuzları temel alınarak yorumlanmıştır (242, 243). CNV analizinde, genel toplum verileri için GnomAD ve “Database of Genomic Variants” (DGV) veritabanları kullanılmıştır (244, 245). Benzer yapısal varyanta sahip bireylerin klinik bulguları ve yapısal varyantın içerdđi gen bölgelerinin tanımlanması ve birbirlerine olan mesafelerin belirlenmesi için “Database of genomic variation and Phenotype in Humans using

Ensembl Resources” (DECIPHER) ve “University of California Santa Cruz Genomic Institute” (UCSC) veri tabanlarından yararlanılmıştır (246, 247).

4. BULGULAR

4.1. Demografik ve Klinik Özellikler

Çalışmaya dahil edilen 20 olgunun (10 KVÖ, 9 AS ve eksitus ile gebeliği sonuçlanan bir olgunun postmortem cilt biyopsi örneği) tüm demografik bulguları ve klinik özellikleri Tablo 11’de özetlenmiştir. Gebe kadınların yaş aralığı 19-41 olup, bu kadınların başvuru anındaki ortalama yaşı 29,9 olarak hesaplanmıştır. Babaların yaş aralığı ise 20-53 arasında olup, başvuru anındaki ortalama baba yaşı 35,2 olarak hesaplanmıştır. İnvaziv örneklemeleri alınan fetüslerin 10’u erkek, 10’u kız cinsiyettedir. Olguların USG ile fetal anomalilerinin tespit zamanı net olarak bilinmemekle birlikte, fetal anomalinin/anomalilerin saptanması sonrası prenatal invaziv girişim yapıldığı gebelik haftası 11 hafta 3 gün – 22 hafta 4 gün arasında değişmektedir. Median gebelik haftası 18 hafta 1 gün olarak hesaplanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 20 gebeliğin 19’u spontan gebeliktir, 1 gebelik ise yardımcı üreme yöntemlerinden olan in vitro fertilizasyon (IVF) ile gerçekleşmiştir. İnvaziv örneklemelerin (KVÖ, AS ve postmortem cilt) alındığı ailelerden ikisinde 3. derece akrabalık (olgu 7 ve 11), birinde 4. derece akrabalık (olgu 20), birinde 5. derece akrabalık (olgu 19) ve birinde 6. derece akrabalık (olgu 14) bulunmaktadır. Çalışmaya dahil olan ailelerden olgu 20’nin önceki gebeliğinde prenatal USG anomalisi öyküsü olup (kistik higroma, ekstremité anomalileri, VSD), kız cinsiyette

olan bebek postnatal 21. günde ex olmuştur. Bu gebelik sırasında AS'den sadece sitogenetik analiz yapılmış ve normal konstitüsyonel karyotip olarak raporlanmıştır. Diğer olguların özgeçmişinde rasopatilerle uyumlu olabilecek özellik tariflenmemiştir. Obstetrik öyküde 2 veya 3 spontan abortus ve/veya intrauterin fetal kayıp olan gebelerin sayısı 3'tür.

Olguların kistik higroma ve/veya artmış NT ve/veya artmış NF'ye ek USG bulguları polihidramniyoz, intrauterin gelişme geriliği, hidrosefali, ventrikülomegali, alobar holoprosensefali, nazal kemik hipoplazisi/aplazisi, plevral efüzyon, kalpte hiperekojen odak, kardiyak anomaliler (fallot tetralojisi?, VSD, dekstropeze aort, pulmoner darlık, duktus venosusta derin a dalgası), klinodaktili, üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü, pes ekinovarus, bilateral renal pelvis dilatasyonu, sağ böbrekte piyelektazi ve hiperekojen bağırsaktır. En sık görülen ek USG bulguları kardiyak anomali ve nazal kemik hipoplazisi/aplazisidir.

Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen 20 olgunun demografik verileri.

Olgular	Endikasyon	Anne yaşı	Baba yaşı	Gebelik şekli	Mevcut gebelik gravidesi	Gebelik kaybı sayısı*	Yaşayan sağlıklı çocuk sayısı	Akrabalık
1	Kistik higroma, fetal hidrops, üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü	28	29	S	G1	0	-	Yok
2	Kistik higroma, NT: 4,5 mm	25	28	S	G1	0	-	Yok
3	Kistik higroma	36	36	S	G2	0	1	Yok
4	Kistik higroma, fetal hidrops	28	37	S	G2	1	-	Yok
5	Fetal hidrops, nazal kemik hipoplazisi, NT: 9 mm	27	34	S	G2	1	-	Yok
6	Kistik higroma, NT: 6,9 mm	24	31	S	G1	0	-	Yok
7	NT: 6 mm	41	39	S	G9	6	2	3.derece
8	Kistik higroma, NT: 3,8 mm	31	30	S	G1	0	-	Yok
9	NF: 7 mm, nazal kemik hipoplazisi	40	53	S	G3	0	2	Yok
10	NF: 6,5 mm	35	40	S	G2	0	1	Yok
11	NF: 17 mm, polihidramniyoz, plevral efüzyon, Fetal EKO'da kardiyak anomaliler (fallot tetralojisi?, perimembranoz VSD, dekstropeze aort, pulmoner darlık)	32	38	S	G1	0	-	3.derece
12	Pes ekinovarus, NF: 6,5 mm	19	20	S	G3	2	-	Yok
13	Kistik higroma	33	31	S	G5	2	2	Yok
14	NF: 6 mm, bilateral renal pelvis dilatasyonu	30	29	S	G2	0	1	6.derece
15	NF:7,1 mm, kalpte hiperekoben odak, sağ böbrekte piyelektazi	28	32	S	G1	0	-	Yok
16	Ventrikülomegali, NF: 6 mm, hiperekoben bağırsak	30	33	I	G1	0	-	Yok
17	NF: 6 mm, nazal kemik hipoplazisi	30	39	S	G2	0	1	Yok
18	Lateral ventrikülomegali, NF: 7,7 mm	29	38	S	G3	0	2	Yok
19	NF: 6 mm	31	33	S	G4	1	2	5.derece
20	Kistik higroma, NT: 8,1 mm	22	25	S	G3	0	1	4.derece

I: In vitro fertilizasyon (IVF) ile gerçekleşen gebelik; IUGR: İntrauterin gelişme geriliği; Fetal EKO: Fetal ekokardiyografi; mm: milimetre; NF: Nukal kalınlık, nuchal fold; NT: Nukal saydamlık, nuchal translucency; S: Spontan yolla gerçekleşen gebelik; VSD: Ventriküler septal defekt, (*Gebelik kaybı sayısı, spontan gebelik kayıplarını ve intrauterin kayıplarını birlikte kapsamaktadır)

4.2. Rasopati Panel Analizi Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 20 olgunun rasopati analizi sonuçları tablo 12’de sunulmuştur. Üç fetüste lenfatik displazi bulgularını açıklayan heterozigot patojen varyant saptanmıştır. Dört fetüste rasopati genlerinde heterozigot olarak klinik önemi belirsiz varyantlar belirlenmiştir. Ayrıca patojen varyant saptanan olgulardan birinde (olgu 1), ek olarak klinik önemi belirsiz varyant da saptanmıştır. On üç fetüste rasopati paneli kapsamında incelen rasopati genlerinde klinik bulguları açıklayan klinik önemi belirsiz ve/veya patojen/olası patojen varyant saptanmamıştır.

Tablo 12. Konvansiyonel ve moleküler karyotip analizleri normal olarak sonuçlanan olguların rasopati analizi sonuçları.

Olgular	Rasopati paneli				
	Gen (Transkript ID)	Gen ile ilişkili Hastalıklar (OMIM Numarası), Kalıtım Özelliği	Varyant (HGVS)	Zigosite Okuma sayısı (Yüzdesi)	Yorum*
1	HRAS NM_005343.4	-Costello sendromu, (218040), OD -Nevüs sebase veya yünlü saç nevüsü, somatik, (162900) -Schimmelpenning-Feuerstein-Mims sendromu, somatik mozaik, (163200) -Spitz nevüs veya nevüs spilus, somatik, (137550) -Tiroid kansinomu, foliküler, somatik, (188470) - Mesane kanseri, somatik (109800) -Kas içgiclerinin fazlalığı ile giden konjenital miyopati, (218040), OD	c.182A>G p.(Gln61Arg)	Heterozigot 370 (%45.8)	Patojen (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5_VS)
	MAP2K1 (NM_002755)	-Kardiyofasiyokütanöz sendrom 3, (615279), OD	c.*88A>C	Heterozigot 140 (%56.5)	Klinik önemi belirsiz (PM2, BP7)
2	RAF1 (NM_002880.4)	-Dilate kardiyomyopati, (615916), OD - Noonan-multipl lentijinöz sendromu 2, (611554), OD? -Noonan sendromu 5, (611553), OD	c.171T>C p.(Thr57=)	Heterozigot 137 (%50)	Klinik önemi belirsiz (PM2)
3	Varyant saptanmadı				
4	Varyant saptanmadı				
5	PTPN11 (NM_002834)	- Noonan sendromu 1, (163950), OD -Lösemi, juvenil miyelomonositik, somatik, (607785) -Metakondromatozis, (156250), OD - Noonan-multipl lentijinöz sendromu 1, (151100), OD	c.211T>C p.(Phe71Leu)	Heterozigot 3379 (%48)	Patojen (PM1, PM2, PS1, PM5, PP2, PP3, PP5_S, PM6)
6	RAF1 (NM_002880.4)	-Dilate kardiyomyopati, (615916), OD - Noonan-multipl lentijinöz sendromu 2, (611554), OD? -Noonan sendromu 5, (611553), OD	c.1804-27T>G	Heterozigot 342 (%47)	Klinik önemi belirsiz (PM2, BP7)
7	Varyant saptanmadı				
8	Varyant saptanmadı				
9	Varyant saptanmadı				
10	MAP2K2 NM_030662.4	- Kardiyofasiyokütanöz sendrom 4, (615280), OD	c.-39C>T	Heterozigot 137 (%50)	Klinik önemi belirsiz (PM2, BP7)
11	RIT1 (NM_006912.6)	-Noonan sendromu 8, (615355), OD	c.270G>A p.(Met90Ile)	Heterozigot 479 (%44)	Patojen (PM1, PM2, PS1, PM5, PP2, PP3, PP5_VS)
12	Varyant saptanmadı				
13	Varyant saptanmadı				
14	SPRED1 (NM_152594.3)	-Legius sendromu, (611431), OD	c.945T>G p.(Pro315=)	Heterozigot 227 (%40)	Klinik önemi belirsiz (PM2, BP7)

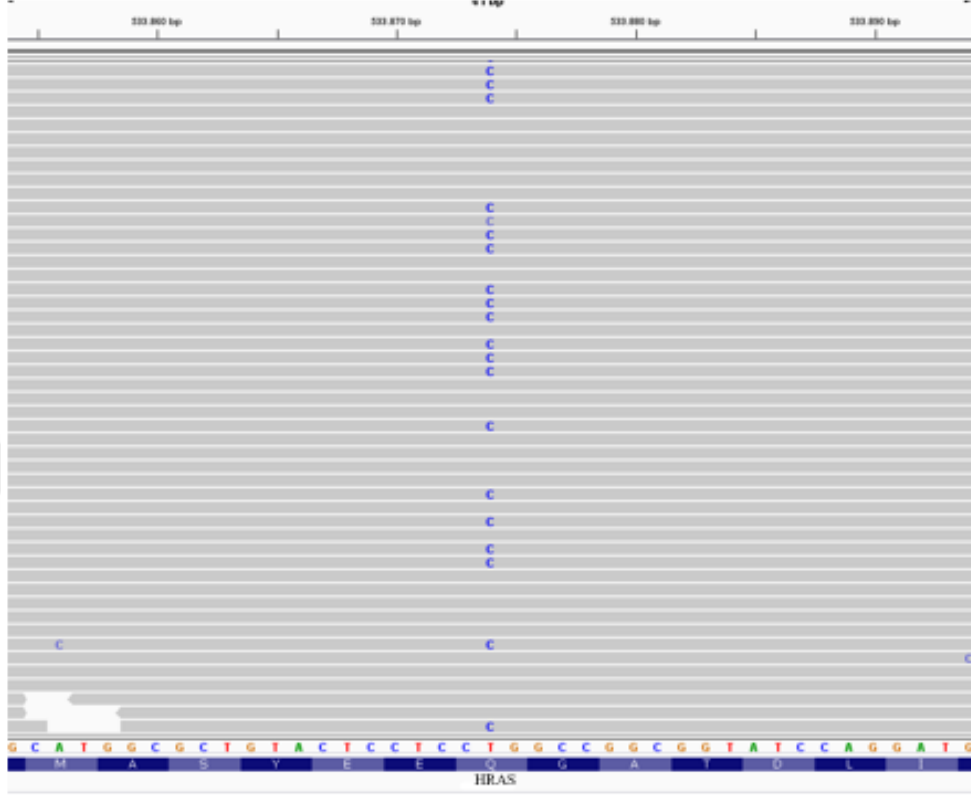
15	Varyant saptanmadı
16	Varyant saptanmadı
17	Varyant saptanmadı
18	Varyant saptanmadı
19	Varyant saptanmadı
20	Varyant saptanmadı

OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif. * Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre yapılmıştır (232, 233). (PM2: Pathogenic moderate 2, PM5: Pathogenic moderate 5, PP2: Pathogenic supporting 2, PP3: Pathogenic supporting 3, BP7: Benign Supporting 7, PP5: Pathogenic supporting 5, PM1: Pathogenic moderate 1, PS1: Pathogenic moderate 1).

4.2.1. Olgu 1

Prenatal USG’de kistik higroma, fetal hidrops, üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü saptanan olgu 1’in son adet tarihine (SAT) göre 12. gebelik haftasında KVÖ materyali GHDM’mize refere edilmiş olup, 13. haftada dış merkezde gebelik termine edildiği için terminasyon sonrası fetüsün klinik değerlendirmesi yapılamamıştır. Gebelik sırasında anne ve baba yaşı sırasıyla 28 ve 29 olan ebeveynleri arasında akrabalık yoktur. Ailenin özgeçmiş ve soygeçmişinde ek özellik bulunmamaktadır ve bu gebeliklerinde herhangi bir prenatal tarama testi yapılmamıştır.

Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 6 heterozigot varyant kriterlendirilerek olgunun klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. Rasopatilerle ilişkili olarak değerlendirilen genlerde homozigot varyant saptanmamıştır. *HRAS* geninde saptanan (NM_005343) c.182A>G p.(Gln61Arg) heterozigot varyantı, patojen olarak (Şekil 3) ve *MAP2K1* geninde saptanan (NM_002755) c.*88A>C heterozigot varyantı, klinik önemi belirsiz olarak (Şekil 4) sınıflandırılmıştır. Bu varyantlara ait bilgiler Tablo 13’te bulunmaktadır. Sanger dizi analizi ile *HRAS* geni c.182A bölgesi her iki ebeveynde normal (wild type) olarak, *MAP2K1* geni c.*88A>C varyantı için ise anne heterozigot olarak saptanmıştır.



Şekil 3. *HRAS* geninde saptanan c.182A>G p.(Gln61Arg) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 13. Olgu 1’in rasopati panel analizinde saptanan varyantları ve ilişkili hastalıklar.

<i>HRAS</i> NM_000454.4	-Costello sendromu, (218040), OD -Nevüs sebace veya yünlü saç nevüsü, somatik, (162900) -Schimmelpenning- Feuerstein-Mims sendromu, somatik mozaik, (163200) -Spitz nevüs veya nevüs spilus, somatik, (137550) -Tiroid karsinomu, foliküler, somatik, (188470) - Mesane kanseri, somatik (109800) -Kas içciklerinin fazlalığı ile giden konjenital miyopati, (218040), OD	c.182A>G p.(Gln61Arg)	Heterozigot 370 (%45.8)	Patojen* (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5_VS)
<i>MAP2K1</i> (NM_002755)	-Kardiyofasiyokütanöz sendrom 3, (615279), OD	c.*88A>C	Heterozigot 140 (%56.5)	Klinik önemi belirsiz* (PM2, BP7)

OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif, *Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre yapılmıştır (232, 233). (PM2:Pathogenic moderate 2, PM1:Pathogenic moderate 1, PP2:Pathogenic supporting 2, PP3:Pathogenic supporting 3, PM5:Pathogenic moderate 5, BP7: Benign Supporting 7, PP5:Pathogenic supporting 5).

Olgu 1’de *HRAS* geninde saptanan (NM_005343) c.182A>G p.(Gln61Arg) heterozigot varyantı genel toplum verilerinde bulunmamaktadır (248). In silico araçlarda bu varyantın hastalık yapıcı nitelikte olduğu tahmin edilmektedir (235). Literatürde bu varyant çok sayıda yayında çeşitli kanserlerde somatik olarak bildirilmiştir (249-253). Olgumuzda saptanan bu varyant, veri tabanlarında rasopatilerle ilişkili olarak üç hastada bildirilmiş olup, bunlardan ikisinde ayrıntılı klinik bilgi sunulmamıştır. Bir hastada somatik mozaizizm ile “Schimmelpenning-Feuerstein-Mims sendromu, somatik mozaik (OMIM; #163200)” olarak

bildirilmiştir (228, 230, 254). Olguda saptanan c.182A>G p.(Gln61Arg) varyantının, genin hidrolitik aktivitesi üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Türler arasında iyi korunmuş bir bölge olarak bilinen genin 61. kodonunda yer alan bu varyant ile Ras proteinin Switch II bölgesindeki katalitik rezidü Gln61'in yokluğu sonucunda intrinsik GTP hidrolizinin bozulduğu düşünülmektedir (255, 256). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *HRAS* geninde saptanan c.A182G p.(Gln61Arg) heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre kriterlendirilerek patojen olarak yorumlanmıştır (232, 233). Böylece olgudaki kistik higroma, fetal hidrops ve üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü bulgularının, *HRAS* geni ile ilişkili “Costello sendromu (OMIM; #218040)” ile uyumlu olduğu düşünülmüştür.

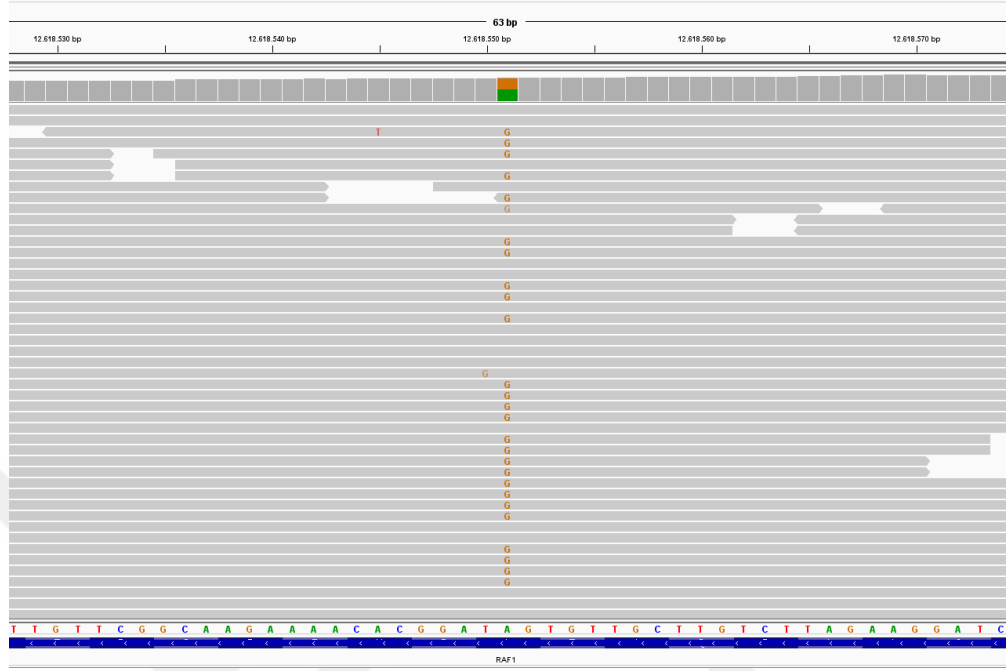
Olguda saptanan diğer varyant olan *MAP2K1* genindeki c.*88A>C heterozigot varyantı genin 3'-UTR bölgesinde yer almakta olup, genel toplum verilerinde bulunmamaktadır (248). Literatürde ve varyant veri tabanlarında daha önce bildirilmemiştir (228, 230, 254). Yirmi dört ayrı in silico aracın birinde bu varyantın benign nitelikte olduğuna ilişkin tahmin verisi sunulmuş olup, diğer in silico araçlarda hastalık yapıcı niteliği açısından veri yoktur (235). *MAP2K1* genindeki hastalık yapıcı değişiklikler heterozigot olarak “Kardiyofasiyokütanöz sendrom 3 (OMIM; #615279)” ile ilişkilendirilmektedir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *MAP2K1* geninde saptanan c.*88A>C heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır (232, 233). Bu varyant, Sanger dizi analizi yöntemi ile yapılan ebeveyn analizinde asemptomatik annede de heterozigot olarak saptanmıştır.

Ebeveyn analiz sonucu ile bu varyant yeniden değerlendirildiğinde, hafif klinik bulgulara sahip CFCS olabileceği yönünde değerlendirilmiş ve varyantın klinik önemi belirsiz sınıflandırması değişmemiştir.

4.2.2. Olgu 2

Nukal saydamlık ölçümü 4,5 mm olan ve kistik higroma belirlenen olgu 2'nin SAT'ne göre 13. gebelik haftasında KVÖ materyali alınmıştır. Eşlik eden kardiyak anomalisi olmayan ve spontan yolla gebeliği gerçekleşen olgu 2'de anne 25 ve baba ise 28 yaşındadır. Aralarında akrabalık bulunmayan ebeveynlerin özgeçmiş ve soygeçmişinde ek özellik yoktur. Herhangi bir prenatal tarama testi yapılmamıştır. Ailenin başvuru sonrası gebelik takibi sürecindeki özellikler bilinmemektedir.

Rasopati panel analiz sonucu, yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 1 heterozigot varyant kriterlendirilerek olgunun klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. Rasopatilerle ilişkili olarak değerlendirilen genlerde homozigot varyant saptanmamıştır. *RAF1* geninde saptanan (NM_002880.4) c.171T>C p.(Thr57=) heterozigot varyantı (Şekil 5) klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyanta ait bilgiler Tablo 14'te bulunmaktadır.



Şekil 5. *RAF1* geninde saptanan c.171T>C p.(Thr57=) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 14. Olgu 2'nin rasopati panel analizinde saptanan varyant ve ilişkili hastalıklar.

<i>RAF1</i> (NM_002880.4)	-Dilate kardiyomyopati, (615916), OD - Noonan-multipl lentijnöz sendromu 2, (611554), OD? -Noonan sendromu 5, (611553), OD	c.171T>C p.(Thr57=)	Heterozigot 137 (%50)	Klinik önemi belirsiz* (PM2)
------------------------------	--	------------------------	--------------------------	--

OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif, PM2:Pathogenic moderate 2. *Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre yapılmıştır (232, 233).

Olguda *RAF1* geninde saptanan c.171T>C p.(Thr57=) (NM_002880.4) heterozigot varyantı genel toplum verilerinde $f = 0.0000437$ (11 kişide) sıklığında heterozigot olarak bildirilmiştir, homozigot bildirim bulunmamaktadır (248). Yirmi dört ayrı in silico aracın ikisinde bu varyantın benign nitelikte olduğu tahmin

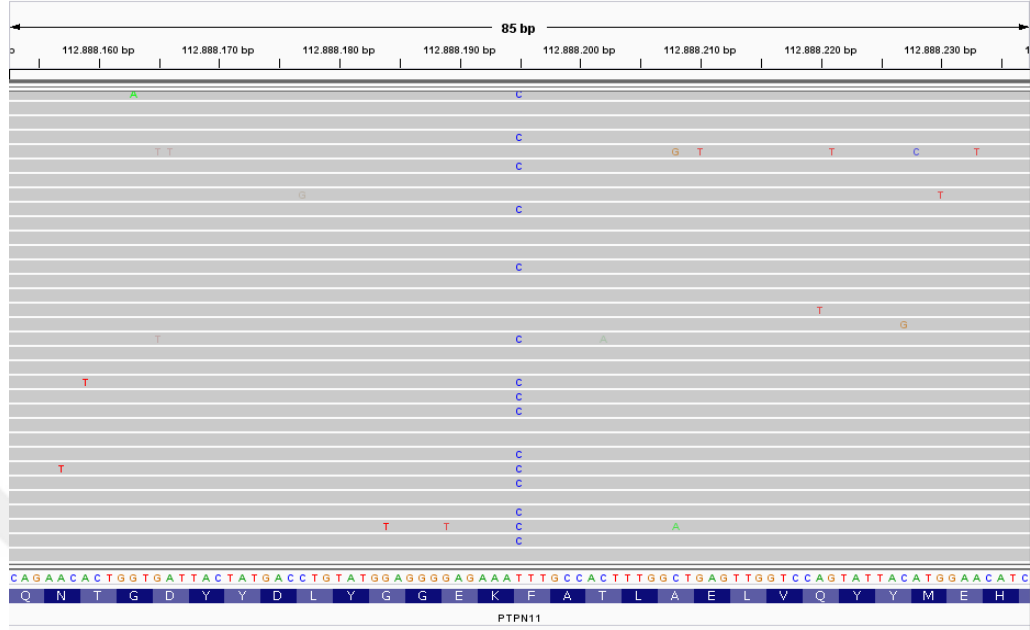
edilmekte olup, diğer in silico araçlarda varyantın hastalık yapıcı niteliği açısından tahmin verisi bulunmamaktadır (235). Literatürde ve varyant veri tabanlarında daha önce bildirilmemiştir (228, 230, 254). Olgu 2’de saptanan c.171T>C p.(Thr57=) varyantı, genin Ras proteinin aktif formu olan Ras-GTP ile inaktif formu olan Ras-GDP arasında değişimde görev alan bir kısım olan “Ras-bağlayıcı (RBD)” bölgede bulunmaktadır (236, 257). *RAF1* genindeki hastalık yapıcı değişiklikler heterozigot olarak “Noonan sendromu 5 (OMIM; #611553)”, “Dilate kardiyomiyopati (OMIM; #615916)” ve “Noonan-multipl lentijinöz sendromu 2 (OMIM; #611553)” ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *RAF1* geninde saptanan c.171T>C p.(Thr57=) heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre kriterlendirilerek klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır (232, 233).

4.2.3. Olgu 5

Prenatal USG’de fetal hidrops, nazal kemik hipoplazisi, NT: 9 mm saptanması nedeniyle SAT’ne göre 11 hafta 3 günlük gebelik haftasında iken KVÖ materyali alınan olgu ailenin spontan gebelikle elde edilen ikinci gebeliğidir. Ailenin 5. haftada abort olan ilk gebeliğine ait abort materyalinden herhangi bir genetik analiz yapılmamıştır. Mevcut gebelik sırasında anne ve baba yaşı sırasıyla 27 ve 30’dur. Aralarında akrabalık bulunmayan ebeveynlerin özgeçmiş ve soygeçmişinde ek özellik yoktur. Mevcut gebelikte herhangi bir prenatal tarama testi yapılmamıştır. Olguda eşlik eden kardiyak anomali saptanmamıştır. On üçüncü

gebelik haftasında ailenin isteği ile termine edilen fetüsün dismorfik muayene bulguları; hidrops fetalis, ensede belirgin ödem, bilateral gözler downslanted görünümde, burun tabanı geniş, retrognati olarak gözlenmiştir. Dismorfik muayene sırasında yapılan ölçümleri ise; baş çevresi 10.5 cm, boy 15 cm, sağ/sol kol 2.5 cm/2.5 cm, sağ/sol ön kol 1.8/1.8 cm, sağ el 1.5 cm, sağ 3.parmak 0.5 cm, sağ/sol uyluk 2.6 cm, sağ/sol bacak 2.4 cm'dir.

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride toplam 13 gende 70 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 12 heterozigot varyant kriterlendirilerek olgunun klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. Rasopatilerle ilişkili genlerde homozigot varyant saptanmamıştır. Olgunun panel çalışması, aynı koşumda CNV analizini mümkün kılabilcek minumum hasta sayısından az hasta sayısı ile yapıldığından panel analizinde CNV'ler değerlendirilememiştir. *PTPN11* geninde saptanan (NM_002834) c.211T>C p.(Phe71Leu) heterozigot varyantı patojen olarak (Şekil 6) sınıflandırılmıştır. Bu varyanta ait bilgiler Tablo 15'te bulunmaktadır. Sanger dizi analizi ile *PTPN11* geninde saptanan varyant için her iki ebeveynin normal (wild type) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 6. *PTPN11* geninde saptanan c.211T>C p.(Phe71Leu) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 15. Olgu 5'in rasopati panel analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar.

<i>PTPN11</i> (NM_002834)	- Noonan sendromu 1, (163950), OD -Lösemi, juvenil miyelomonositik, somatik, (607785) -Metakondromatozis, (156250), OD - Noonan-multipl lentijinöz sendromu 1, (151100), OD	c.211T>C p.(Phe71Leu)	Heterozigot 3379 (%48)	Patojen* (PM1, PM2, PS1, PM5, PP2, PP3, PP5_S, PM6)
------------------------------	--	--------------------------	------------------------------	---

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre yapılmıştır (232, 233). OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif. (PM2: Pathogenic moderate 2, PM3_P:Pathogenic modarate 3_supporting, PP2:Pathogenic supporting 2, PP3: Pathogenic supporting 3, PP5_S: Pathogenic supporting 5_strong, PS1: Pathogenic strong 1, PM1: Pathogenic moderate 1, PM5:Pathogenic supporting 5).

Olguda *PTPN11* geninde saptanan c.211T>C p.(Phe71Leu) heterozigot varyantı genel toplum verilerinde bulunmamaktadır (248). In silico araçlarda bu varyantın hastalık yapıcı nitelikte olduğu tahmin edilmektedir (235). Literatürde ve varyant veri tabanlarında Noonan sendromu ile ilişkili olarak çok sayıda hastada

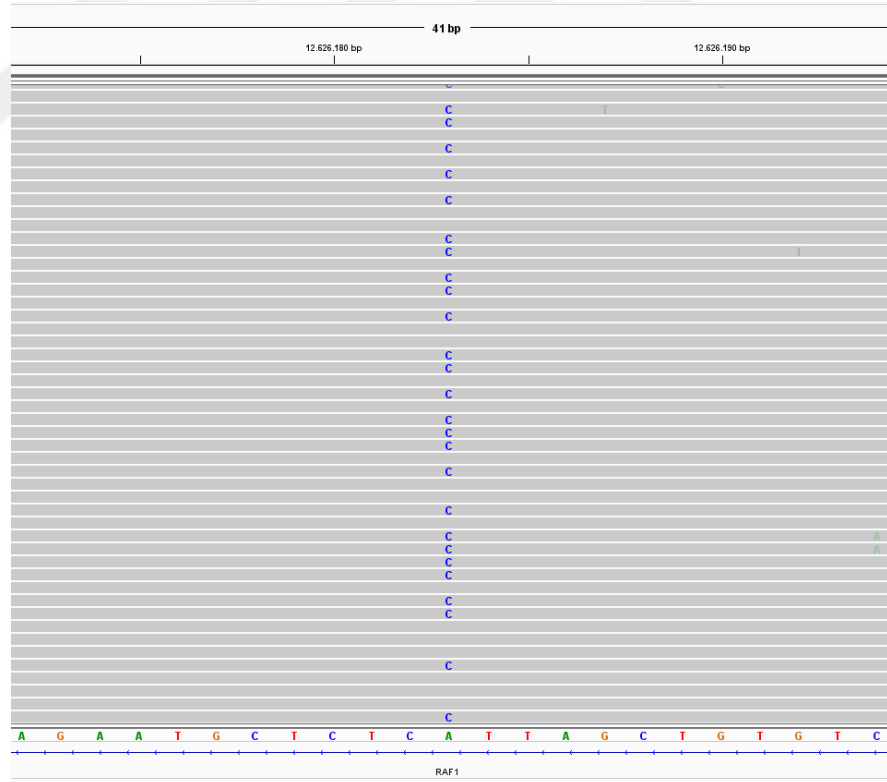
bildirilmiştir (228, 230, 258-261). Ayrıca, JMML ve AML gibi malignitelerde somatik varyant olarak rapor edilmiştir (259, 261-263). Olguda saptanan c.211T>C p.(Phe71Leu) varyantı, türler arasında iyi korunmuş ve hücre içi sinyal iletiminde rol alan birçok proteinde ortak bir bölüm olan “Src homoloji 2 (SH2)” kısmında bulunmaktadır (236). Ayrıca, *PTPN11* geninde NS ile ilişkilendirilmiş patojenik varyantlar çoğunlukla ekzon 3'te yer almaktadır (264). Aynı kodonda aminoasit değişikliğine neden olan (valin değişikliği) ve aynı aminoasit değişikliğine (sinonim) neden olan (c.213T>G) farklı varyantlar birçok hastada ClinVar'da patojen olarak raporlanmıştır (230). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında olguda *PTPN11* geninde saptanan c.211T>C p.(Phe71Leu) heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre kriterlendirilerek patojen olarak yorumlanmıştır (232, 233). Böylece olgudaki hidrops fetalis, artmış NT ve nazal kemik hipoplazisi kliniklerinin, *PTPN11* geni ile ilişkili “Noonan syndrome 1 (OMIM; #163950)” ile uyumlu olduğu düşünülmüştür.

4.2.4. Olgu 6

Fetal USG'de kistik higroma belirlenmesi ve NT: 6,9 mm olması nedeniyle SAT'ne göre 13. gebelik haftasında iken yapılan KVÖ materyali GHDM'mize refere edilen olgu 6'nın spontan olarak gerçekleşen gebeliği esnasında anne 24 ve baba 31 yaşlarındadır. Aralarında akrabalık bulunmayan ebeveynlerin özgeçmiş ve soygeçmişinde ek özellik yoktur. Herhangi bir prenatal tarama testi yapılmayan bu

gebelikte ultrasonografik olarak ek bir kardiyak anomali saptanmamıştır Ailenin başvuru sonrası gebelik takibi sürecindeki özellikler bilinmemektedir.

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride toplam 13 gende 100 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 14 heterozigot varyant kriterlendirilerek olgunun klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. Rasopati ile ilişkili olarak değerlendirilen genlerde homozigot varyant saptanmamıştır. *RAF1* geninde saptanan (NM_002880.4) c.1804-27T>G heterozigot varyantı (Şekil 7) klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyanta ait bilgiler Tablo 16’da bulunmaktadır.



Şekil 7. *RAF1* geninde saptanan c.1804-27T>G heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 16. Olgu 6’nın rasopati panel analizinde saptanan varyant ve ilişkili hastalıklar.

<i>RAF1</i> (NM_002880.4)	-Dilate kardiyomyopati, (615916), OD - Noonan-multipl lentijinöz sendromu 2, (611554), OD? -Noonan sendromu 5, (611553), OD	c.1804-27T>G	Heterozigot 342 (%47)	Klinik önemi belirsiz* (PM2, BP7)
------------------------------	--	--------------	--------------------------	---

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre yapılmıştır (232, 233). OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif. (PM2:Pathogenic moderate 2, BP7: Benign Supporting 7).

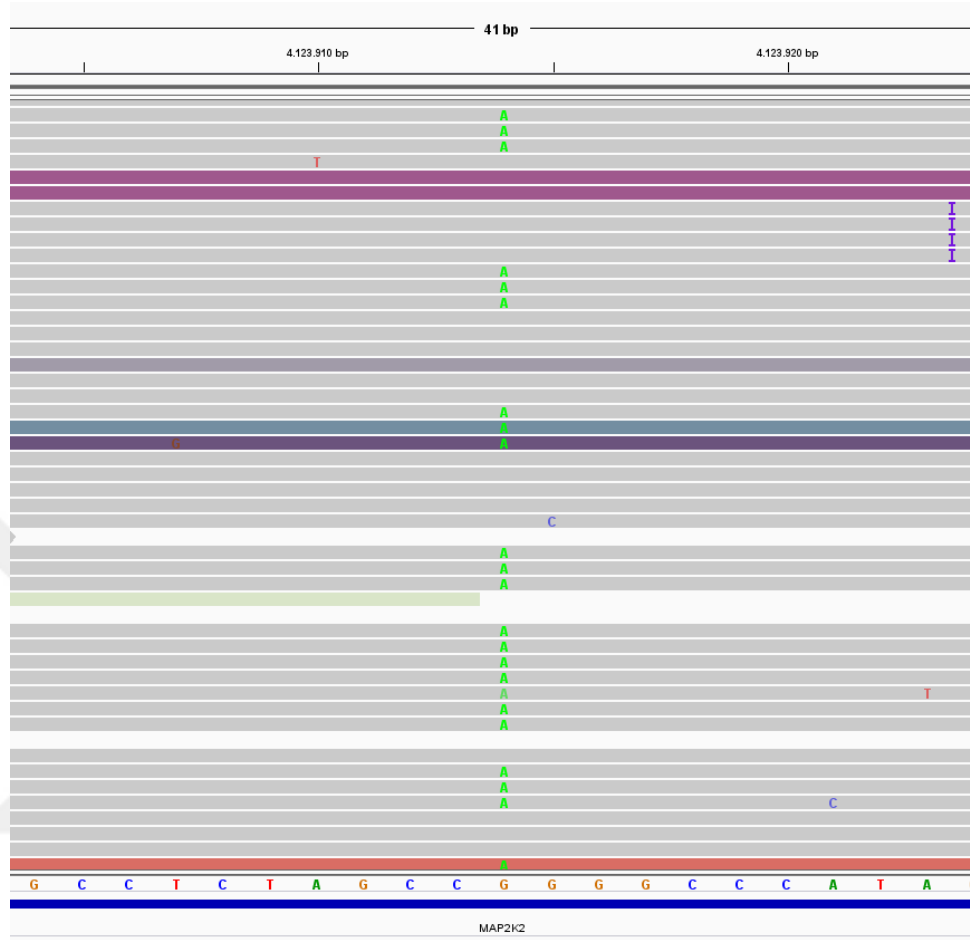
Olguda *RAF1* geninin intronik bölgesinde c.1804-27T>G heterozigot varyantı saptanmış olup, bu varyant genel toplum verilerinde bulunmamaktadır (248). Yirmi dört ayrı in silico aracın birinde bu varyantın benign nitelikte olduğu tahmin edilmekte olup, diğer in silico araçlarda hastalık yapıcı niteliği açısından tahmin verisi bulunmamaktadır (235). Literatürde ve varyant veri tabanlarında daha önce bildirilmemiştir (228, 230, 254). *RAF1* genindeki hastalık yapıcı değişiklikler heterozigot olarak “Noonan sendromu 5 (OMIM; #611553)”, “Dilate kardiyomyopati (OMIM; #615916)” ve “Noonan-multipl lentijinöz sendromu 2 (OMIM; #611553)” ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *RAF1* geninde saptanan c.1804-27T>G heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre kriterlendirilerek klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır (232, 233).

4.2.5. Olgu 10

Prenatal USG’de NF: 6,5 mm olması nedeniyle SAT’ne göre 22. gebelik haftasında amniyon sıvısı alınan olgu 10ailenin spontan gerçekleşen ikinci gebeliği olup, ilk gebelikten yaşayan sağ sağlıklı kız çocuğu (4 yaşında) mevcuttur. Mevcut

gebelik sırasında anne ve baba yaşı sırasıyla 35 ve 40'dır. Aralarında akrabalık bulunmayan ebeveynlerin özgeçmiş ve soygeçmişinde ek özellik yoktur. Herhangi bir prenatal tarama testi yapılmamıştır. Olgunun eşlik eden kardiyak anomalisi yoktur. Ailenin başvuru sonrası gebelik takibi sürecindeki özellikler bilinmemektedir.

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride toplam 13 gende 55 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 1 heterozigot varyant kriterlendirilerek olgunun klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. Rasopatilerle ilişkili olarak değerlendirilen genlerde homozigot varyant saptanmamıştır. *MAP2K2* geninde saptanan (NM_030662.4) c.-39C>T heterozigot varyantı (Şekil 8) klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyanta ait bilgiler Tablo 17'de bulunmaktadır.



Şekil 8. *MAP2K2* geninde saptanan c.-39C>T heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 17. Olgu 10'un rasopati panel analizinde saptanan varyant ve ilişkili hastalıklar.

<i>MAP2K2</i> NM_030662.4	-Kardiyofasiyokütanöz sendrom 4, (615280), OD	c.-39C>T	Heterozigot 137 (%50)	Klinik önemi belirsiz* (PM2, BP7)
------------------------------	---	----------	--------------------------	---

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre yapılmıştır (232, 233). OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif. (PM2:Pathogenic moderate 2, BP7: Benign Supporting 7).

Olguda *MAP2K2* geni c.-39C>T heterozigot varyantı genin 5' UTR bölgesinde yer almakta olup, genel toplum verilerinde bulunmamaktadır (248).

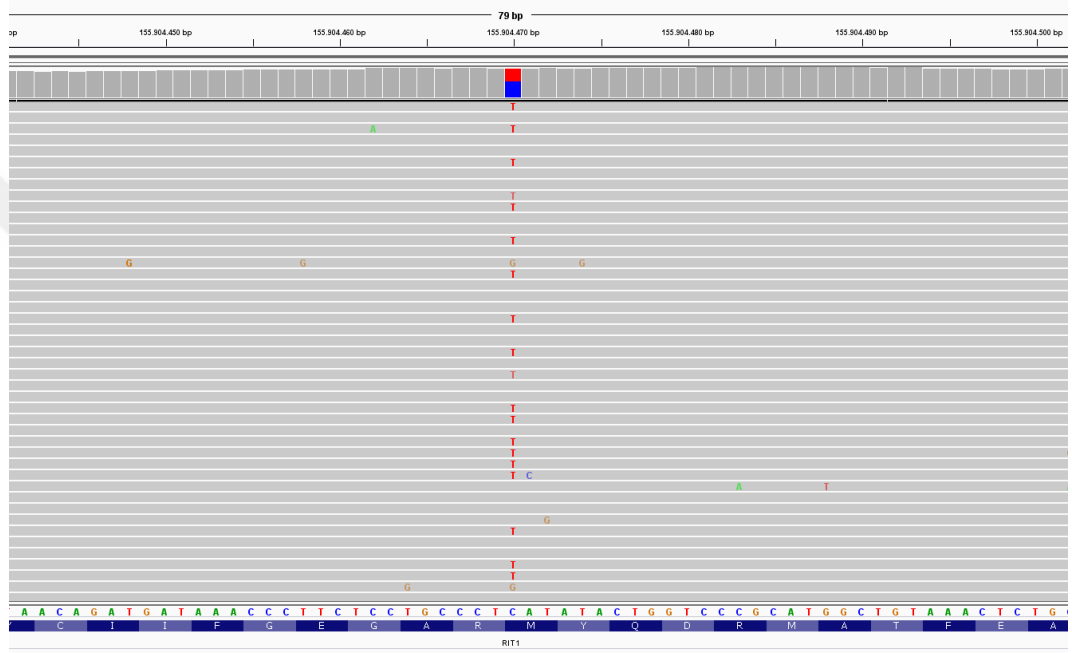
Yirmi dört ayrı in silico aracın birinde bu varyantın benign nitelikte olduğu tahmin edilmekte, diğeri in silico araçlarda varyantın hastalık yapıcı niteliğı açısından tahmin verisi bulunmamaktadır (235). *MAP2K2* genindeki hastalık yapıcı değışiklikler heterozigot olarak “Kardiyofasiyokütanöz sendrom 4 (OMIM; #615280)” ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *MAP2K2* geninde saptanan c.-39C>T heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre kriterlendirilerek klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır (232, 233).

4.2.6. Olgu 11

Prenatal USG’de NF: 17 mm, polihidramniyoz, plevral efüzyon, fetal EKO’da kardiyak anomaliler (fallot tetralojisi?, perimembranoz VSD, dekstropeze aort, pulmoner darlık) saptanması nedeniyle olguya SAT’ne göre 23 haftalık gebeliğı sırasında amniyosentez girişimi yapılmıştır. Ailenin spontan gerçekleşen ilk gebeliğı olup, gebelik sırasında anne 32 ve baba 38 yaşlarındadır. Aralarında 3. derece akrabalık bulunan ebeveynlerin özgeçmiş ve soygeçmişinde ek özellik yoktur. Herhangi bir prenatal tarama testi yapılmamıştır. Ailenin başvuru sonrası gebelik takibi sürecindeki özellikler bilinmemektedir.

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride toplam 13 gende 72 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 1 heterozigot varyant kriterlendirilerek olgunun klinik bulguları ile birlikte değıerlendirilmiştir. Rasopatilerle ilişkili olarak değıerlendirilen genlerde homozigot varyant

saptanmamıştır. *RIT1* geninde saptanan (NM_006912.6) c.270G>A p.(Met90Ile) heterozigot varyantı patojen olarak (Şekil 9) sınıflandırılmıştır. Bu varyanta ait bilgiler Tablo 18’de bulunmaktadır.



Şekil 9. *RIT1* geninde saptanan c.270G>A p.(Met90Ile) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 18. Olgu 11’in rasopati panel analizinde saptanan varyantlar ve ilişkili hastalıklar.

<i>RIT1</i> (NM_006912.6)	- Noonan sendromu 8, (615355), OD	c.270G>A p.(Met90Ile)	Heterozigot 479 (%44)	Patojen* (PM1, PM2, PS1, PM5, PP2, PP3, PP5)
------------------------------	--------------------------------------	--------------------------	-----------------------------	--

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre yapılmıştır (232, 233). OD: Otozomaml dominant, OR: Otozomal resesif. (PM2: Pathogenic moderate 2, PP2:Pathogenic supporting 2, PP3: Pathogenic supporting 3, PP5: Pathogenic supporting, PS1: Pathogenic strong, PM1: Pathogenic moderate, PM5:Pathogenic moderate).

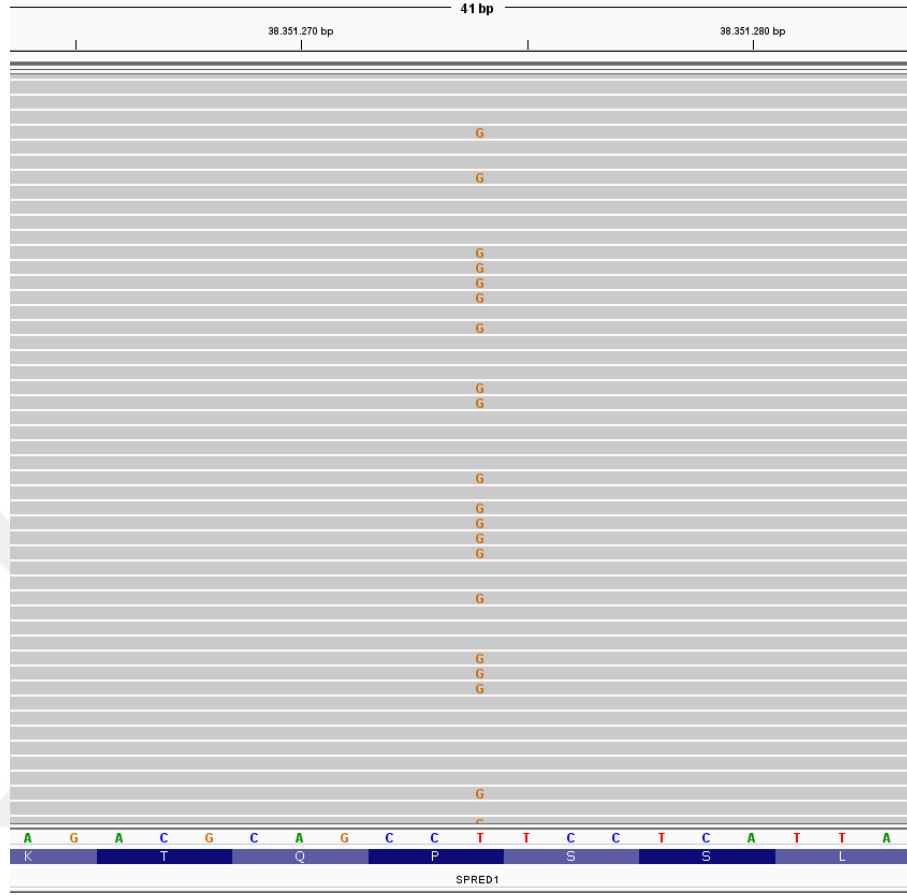
Olguda *RIT1* geninde saptanan c.270G>A p.(Met90Ile) heterozigot varyantı genel toplum verilerinde bulunmamaktadır (248). In silico araçlarda bu varyantın hastalık yapıcı nitelikte olduğu tahmin edilmektedir (235). Literatürde ve varyant veri tabanlarında Noonan sendromu ile ilişkili olarak çok sayıda hastada bildirilmiştir (228, 230, 265, 266). Ek olarak olguda saptanan bu varyant, yanlış anlamlı varyantların sıklıkla patojen/olası patojen olarak bildirildiği sıcak nokta (hot spot) bir bölgede yer almaktadır (234). Aynı kodonda başka aminoasit değişikliklerine neden olan (lösin ve valin değişiklikleri) iki farklı varyant ClinVar'da sırasıyla olası patojen/patojen olarak raporlanmıştır (230). Ayrıca, bu varyantın *RIT1* ekspresyon seviyesinde artışa neden olduğu ve büyüyen hücrelerde mitozaya ilerleme sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir (267). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *RIT1* geninde saptanan c.270G>A p.(Met90Ile) heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre kriterlendirilerek patojen olarak yorumlanmıştır (232, 233). Böylece olgudaki artmış NF, polihidramniyoz ve kardiyak defekt klinik bulgularının *RIT1* geni ile ilişkili “Noonan syndrome 8 (OMIM; #615355)” ile uyumlu olduğu düşünülmüştür.

4.2.7. Olgu 14

Prenatal USG’de NF: 6 mm, bilateral renal pelvis dilatasyonu saptanması nedeniyle olgudan SAT’ne göre 21 hafta 3 günlük gebelik sırasında amniyon sıvısı alınmıştır. Eşlik eden kardiyak anomali saptanmayan olgu, ailenin spontan gerçekleşen ikinci gebeliği olup, ilk gebelikten yaşayan sağlıklı kız çocuğu (7

yaşında) mevcuttur. Gebelik sırasında anne 30 ve baba 29 yaşlarında olup, aralarında 6. derece akrabalık bulunmaktadır. Ebeveynlerin özgeçmiş ve soygeçmişinde ek özellik yoktur. Olgu 14'ün gebeliği sırasında yapılan ikili tarama test sonucunda kombine trizomi 21 riskinin yüksek olduğu aileden sözel olarak öğrenilmiştir. Ailenin başvuru sonrası gebelik takibi sürecindeki özellikler bilinmemektedir.

Biyoinformatik analizler neticesinde anote edilmiş veride toplam 13 gende 96 varyant elde edilmiştir. Yapılan filtrelemelerden sonra belirlenen 2 heterozigot varyant kriterlendirilerek olgunun klinik bulguları ile birlikte değerlendirilmiştir. Rasopatilerle ilişkili olarak değerlendirilen genlerde homozigot varyant saptanmamıştır. *SPRED1* geninde saptanan (NM_152594.3) c.945T>G p.(Pro315=) heterozigot varyantı (Şekil 10) klinik önemi belirsiz olarak sınıflandırılmıştır. Bu varyanta ait bilgiler Tablo 19'da bulunmaktadır.



Şekil 10. *SPRED1* geninde saptanan c.945T>G p.(Pro315=) heterozigot varyantının BAM verisindeki görüntüsü.

Tablo 19. Olgu 14’ün rasopati panel analizinde saptanan varyant ve ilişkili hastalıklar.

<i>SPRED1</i> NM_152594.3	-Legius sendromu, (611431), OD	c.945T>G p.(Pro315=)	Heterozigot 227 (%40)	Klinik önemi belirsiz* (PM2, BP7)
------------------------------	-----------------------------------	-------------------------	--------------------------	---

*Belirlenen varyantların sınıflaması ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre yapılmıştır (232, 233). OD: Otozomal dominant, OR: Otozomal resesif. (PM2:Pathogenic moderate 2, , BP7: Benign Supporting 7).

Olguda *SPRED1* geninde saptanan c.945T>G p.(Pro315=) heterozigot varyantı genel toplum verilerinde bulunmamaktadır (248). Yirmi dört ayrı in silico

aracın birinde bu varyantın benign nitelikte olduğu tahmin edilmekte olup, diğeri in silico araçlarda varyantın hastalık yapıcı niteliğı açısından tahmin verisi bulunmamaktadır (235). Literatürde ve varyant veri tabanlarında daha önce bildirilmemiştir (228, 230, 254). Olguda saptanan c.945T>G p.(Pro315=) sinonim varyantı, genin kodlanan proteinin herhangi bir önemli domaininde ya da bölgesinde yer almamaktadır. *SPRED1* genindeki hastalık yapıcı değışiklikler heterozigot olarak “Legius sendromu (OMIM; #611431)” ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *SPRED1* geninde saptanan c.945T>G p.(Pro315=) heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre kriterlendirilerek klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır (232, 233).

5. TARTIŞMA

Prenatal dönemde kullanılan USG, fetal büyüme parametrelerinin yanı sıra fetal anomalilerin değerlendirilmesinde de en yaygın kullanılan taramalardan biridir (94). Lenfatik displazileri işaret eden kistik higroma ve/veya artmış NT ve/veya artmış NF ölçümlerinin saptanması, öncelikle kromozomal (sıklıkla anöploidiler) olmak üzere farklı genetik sendromlara eşlik eden önemli fetal USG bulgularındandır (11-14, 78). Anöploidiler içinde en sık trizomi 21 (Down sendromu), Turner sendromu (Monozomi X), trizomi 18 (Edwards sendromu) ve trizomi 13 (Patau sendromu)'te bu bulgular izlenmektedir. Ayrıca, kromozomal değişikliklerden triploidiler, delesyonlar ve/veya duplikasyonlar da lenfatik displaziler ile ilişkilendirilmektedir (11, 61, 80). 1990'ların başından beri NT ölçümü, fetal anöploidilerin saptanması amacıyla yapılan ilk trimester tarama programlarında yer almaktadır (11-17). İkinci trimesterde yapılan NF ölçümü de kromozomal kayıp ve/veya kazançlarla ilişkili en hassas ve spesifik izole USG belirteçlerinden biridir (78). İzole kistik higroma varlığında kromozomal anöploidilerin görülme oranları %29-60 arasında değişmekle beraber, kistik higromalı vakaların %50'sinde ek bir konjenital malformasyon saptanabilmektedir (12-14, 30). Bunlar kardiyak ve iskelet sistemi anomalileri başta olmak üzere ürogenital sistem, sinir sistemi ve karın duvarı anomalileridir (14, 64).

Lenfatik displazilerin etiyolojisinde kromozomal değişikliklerden sonra Ras-MAPK yolağında görev alan proteinleri kodlayan genlerde, yolağın aktivasyonuna ve/veya disregülasyonuna neden olan mutasyonlarla ilişkilendirilen rasopatiler, ayırıcı tanıda öncelikli olarak düşünülmelidir (12, 13, 30, 61, 80, 90).

Rasopatilerde prenatal USG’de artmış NT (≥ 3 mm, 95. persentil ve üzeri), artmış NF (≥ 6 mm, 95-99. persentil ve üzeri) ve kistik higromaya ek olarak fetal asit, fetal hidrops, plevral efüzyon, polihidramniyoz, konjenital kalp anomalileri ve/veya renal anomaliler saptanabilmektedir (93, 220). Rasopati hastalık grubunda en sık görülen sendrom olan NS, genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Şimdiye kadar 10'dan fazla sayıda gen NS ile ilişkilendirilmiş (231) olup, prenatal dönemde rasopatilerin tanısına yönelik yapılan moleküler analizlerde en sık *PTPN11* geni ilişkilendirilmiştir (182).

Çalışma grubumuzda bir olguda (olgu 5) *PTPN11* geninde heterozigot c.182A>G p.(Gln61Arg) varyantı saptanmış ve bu varyant, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre patojen olarak değerlendirilmiştir. Prenatal *PTPN11* mutasyonu saptanan vakaların retrospektif olarak değerlendirildiği bir çalışmada, kistik higroma (%48) ve artmış NT (%44)’nin en yaygın iki bulgu olduğu belirtilmektedir (221). Literatürde, prenatal USG’de artmış NT/NF ve kistik higroma bulgularından herhangi ikisinin veya bu bulgulardan birine ek olarak fetal asit, fetal hidrops, plevral efüzyon, polihidramniyoz, konjenital kalp hastalığı ve/veya renal anomaliler olması durumunda ayırıcı tanıda öncelikli olarak rasopatilerin düşünülmesi gerektiği bildirilmektedir (221, 268, 269). Houweling ve arkadaşları (2010), normal karyotipli fetüslerde NS’nun ve artmış NT’nin birlikte görülme sıklığı göz önüne alındığında, ek anomaliler olmasa dahi rasopatiler açısından genetik danışmanlık verilmesi ve NS genlerinin değerlendirilmesinin her zaman önerilmesi gerektiğini savunmaktadır (270). Geniş bir prenatal rasopati kohortunun değerlendirildiği yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise yalnızca

artmış NT'si olan fetüslerin eğer NT ölçüm değeri 5 mm ve üzerinde ise kromozomal anomaliler dışlandıktan sonra geniş rasopati gen paneli önerilmekte eğer geniş panel uygulanamayacaksa da prenatal dönemde en sık mutasyonu saptanan *PTPN11* gen analizinin araştırılmasını tavsiye edilmektedir (182). Aynı çalışmada, NT $\geq 3,5$ mm olduğunda rasopatinin diğer prenatal bulgularından olan geniş juguler lenfatik kese, fetal hidrops, polihidramniyoz, plevral efüzyon ve kardiyak defektlerden en az biri eşlik ettiğinde de yine rasopati genlerinin değerlendirilmesi önerilmekle beraber artmış NT ile birlikte, fetal asit veya renal anomaliler bulunmasının rasopati genlerinde patojen bir varyant bulmak için zayıf belirteçler olduğu öne sürülmektedir (182). Çalışmamızdaki fetüsler izole lenfatik displazisi olan ve/veya lenfatik displazilere ek olarak başka sistem tutulumu olan fetüsler arasından seçilmiştir. *PTPN11* geninde patojenik varyant saptanan olgu 5'de NT değeri 9 mm, fetal hidrops ve nazal kemik hipoplazisi, *HRAS* geninde patojen varyant saptanan olgu 1'de ise kistik higromaya ek olarak fetal hidrops, iskelet sistemi tutulumu (üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü) mevcuttur. *RIT1* geninde patojen varyant saptanan olgu 11'de ise NF değeri 17 mm, polihidramniyoz, plevral efüzyon, fetal EKO'da kardiyak anomaliler (fallot tetralojisi?, perimembranöz VSD, dekstropeze aort, pulmoner darlık) mevcuttur. Olgu 1, 5 ve 11'de saptadığımız patojen mutasyonlar, aynı zamanda malignitelerde de tanımlanmıştır. Klasik rasopatilerde saptanan germ hattı varyantları, sporadik kanserlerde bildirilen Ras-MAPK yolu varyantlarına göre genellikle daha az protein aktivasyonuna neden olmaktadır (271, 272). Kanserlerde somatik olarak bildirilmiş bir varyantın germ hattında heterozigot olarak bulunması durumunda,

uzun süreli sağkalımla uyumlu olması beklenmeyen ciddi fetal malformasyonlara neden olabileceği kabul görmüş bir teoridir (250, 271, 272). Olgularımızda mevcut prenatal bulgular ile saptanan patojen varyantlar da bu teoriyi desteklemektedir. Son yıllarda vaka örnekleri literatürde artarak bildirilmeye devam etmektedir.

Rasopatiler çoğunlukla OD kalıtım paterni (istisna olarak, OR kalıtlı *LZTR1* ve *SPRED2* genleri) göstermekte ve OD kalıtım çoğunlukla ileri baba yaşı ile ilişkilendirilmektedir. İleri baba yaşı tanımı üzerinde henüz bir fikir birliği bulunmamakla birlikte, ACMG tarafından 40 yaş ve üzeri ileri baba yaşı olarak kabul edilmektedir (273). Pekçok çalışmada rasopatilerde ortalama baba yaşı 38-43 yaş arası olarak bildirilmiştir (179). Çalışmamızda patojenik varyant saptanan üç olgudan sadece birinde (olgu 11) baba yaşı (38 yaş) literatür ile uyumlu iken, diğer iki olguda (olgu 1 ve 5) baba yaşı 29 ve 34'dür. Baba yaşı 40 yaş ve üzeri olan iki olgu çalışmamızda (olgu 9 ve 10) mevcut olmakla beraber, bu iki olguda da klinik bulgularla ilişkili olabilecek patojen/olası patojen varyant saptanmamıştır. Olgu 10'da saptanan *MAP2K2* geni c.-39C>T varyantının da klinik önemi bilinmemektedir.

Bilinen aile öyküsü olmayanlarda, rasopatilerle ilişkili *de novo* patojenik varyantların çoğunlukla baba kaynaklı olduğu gösterilmekte ve rasopati mutasyonları bulunanların sıklıkla erkek cinsiyette olduğu bildirilmektedir (165). Çalışmamızda ise patojen varyant saptanan üç olgunun ikisi kız cinsiyeti ile uyumlu karyotipe sahiptir, ancak kohortumuzdaki olgu sayısı cinsiyet özelliklerini yorumlayabilmek için yeterli değildir. Olgu 16'da gebelik, in vitro fertilizasyon ile elde edilmiştir, diğer olgularda gebelik spontan olarak gerçekleşmiştir. Ebeveynler

arasında akrabalık olduğuunda fetüste OR kalıtlımlı hastalık bulunma ihtimali ön plana çıkmakla beraber, olgularda *de novo* OD hastalık riski her zaman mevcuttur. Ebeveynlerinde akrabalık durumu gözden geçirildiğinde; olgu 7 ve 11’de 3. derece akrabalık, olgu 20’de 4. derece akrabalık, olgu 19’da 5. derece akrabalık, olgu 14’te ise 6. derece akrabalık mevcuttur. Diğer olguların ebeveynleri arasında ise akrabalık bulunmamaktadır. Ebeveynleri arasında 3. derece akrabalık bulunun olgu 11’de *RIT1* geninde patojen varyant saptanmış ve bu varyantın daha sonraki bir çalışma ile her iki ebeveynde değerlendirilmesi planlanmıştır.

Prenatal dönemde lenfatik displazilerin varlığında kromozomal değişiklikler dışlandıktan sonra etiyolojinin belirlenmesine yönelik tanı etkinliğinin artırılması için rasopatiler ile ilişkili genleri kapsayan panellerin kullanılması önerilmektedir. Panele dahil edilen genler ve her gen için kullanılan testin tanısal hassasiyeti laboratuvarlara göre değişiklik gösterebilmektedir. Maliyet ve etkinlik açısından avantajlı bir seçenek olan yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak panel analizi şeklinde gerçekleştirilen çalışmamızda, lenfatik displaziler ile ilişkisi bilinen çok fazla sayıda olmakla beraber, rasopatilerle daha sıklıkla ilişkilendirilen 13 gen hedeflenmiştir. Genel olarak prenatal tanıda geniş paneller ve klinik/tüm ekzom dizileme gibi yöntemler, prenatal dönemde klinik bulguların sınırlı olması, yüksek maliyet, hızlı sonuç verme gerekliliği ve tesadüfi varyant saptanma riski nedeniyle rutin uygulamalarda yer almadığından, çalışmamızda da rasopatilerde sıklıkla saptanan genlere yönelik panel analizi kullanılmıştır.

5.1. Genotip-fenotip korelasyonları

5.1.1. Olgu 1

Olgu 1’de *HRAS* geninde patojen olarak sınıflandırılan (NM_005343) c.182A>G p.(Gln61Arg) heterozigot varyantı saptanmıştır. *HRAS*, *NRAS* ve *KRAS* genleri Ras proteinini kodlayan üç temel gendir (274). Kromozom 11p15.5’te lokalize olan *HRAS* geni, yaklaşık 6.5 kb boyutunda olup, 6 ekzondan oluşmaktadır (275). *HRAS* geni ilk ekzonu UTR’dan oluşmakta, 2-5. ekzonlar ise mRNA’nın alternatif kesimi (splicing) ile gerçekleşen mRNA modifikasyonu sonrası moleküler ağırlığı yaklaşık 21 kDa olan 170 amino asitlik bir proteini (H-Ras proteini) kodlamaktadır (276). *HRAS* geninde heterozigot patojen varyantların “Costello sendromu (CS) (OMIM; #218040)”na neden olduğu bilinmektedir (171, 249). Literatürde şimdiye kadar bildirilen tüm CS olgularının otozomal dominant kalıtımla uyumlu heterozigot mutasyonlara sahip olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, *HRAS* genindeki patojen varyantların postzigotik gerçekleştiği somatik mozaizmler “Schimmelpenning-Feuerstein-Mims sendromu, somatik mozaik (OMIM; #163200)” ile ilişkilendirilmiştir (277-279).

Olguda saptanan *HRAS* geni c.182A>G p.(Gln61Arg) varyantı, Ras proteinin Switch II bölgesinde bulunan “katalitik aktivite” için gerekli olan 61. kodonda yer almaktadır. Türler arasında iyi korunmuş olduğu bilinen Gln61 rezidüsünün işlevinin bozulması durumunda, Ras proteininde intrinsik GTP hidrolizinin etkilendiği gösterilmiştir (255, 256). Üç Ras izoformunda (H-Ras, K-Ras, N-Ras proteinleri), “G” domaininin N-terminalini oluşturan 1-86. kodonlar

arasında %100 sekans benzerliği bulunmaktadır (129), olgumuzda saptanan varyant bu bölgede yer almaktadır. Gln61 kodonu tüm ras izoformlarında sporadik kanserler için hotspot bir bölge olup, bu rezidüdeki birçok aminoasit dönüşümü, başta melanom, akciğer kanseri ve tiroid tümörü olmak üzere birçok tümörde “sürücü mutasyon” olarak bildirilmiştir (179). Kanser dokusundan alınan fibroblast hücreleri üzerinde yapılan fonksiyonel çalışmalarla, *HRAS* geni c.182A>G Gln61Arg varyantının Ras-MAPK yolağında sinyalizasyonda anormal artışa neden olduğu, dolayısıyla kanser hücrelerinde Ras-MAPK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (252). Bu varyant ClinVar’da bir bireyde “Noonan sendromu ve Noonan-ilişkili sendrom” tanısı ile bildirilmiş olup, zigositesi, kalıtım paterni, klinik bulguları ve hasta yaşı gibi ayrıntılı ek bilgiler sunulmamıştır. Literatürde Gln61Arg varyantı prenatal olarak germ hattında iki fetüste bildirilmiştir. Birincisi, rasopatinin prenatal bulgularını kapsayan geniş bir kohortta yer alan kistik higroma ve hidrops fetalisi olan bir fetüstdür, bulguları şiddetli olan bu fetüs antenatal 17. haftada kaybedilmiştir (1). İkinci fetüste hidrops fetalisi, artmış NT, polihidramniyoz ve fetal akinezi bildirilmiştir (280). *HRAS* geninde olgumuzdaki varyant ile aynı kodonda yer alan ancak farklı bir aminoasit değişikliğine neden olan bir varyant ise artrogripozis, fetal hidrops ve polihidramniyoz bulguları olan bir fetüste heterozigot olarak bildirilmiştir (281).

Olgumuzdaki prenatal USG’de saptanan üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü, CS hastalarında prenatal dönemde bilinen bir bulgudur (281, 282). CS’da çocukluk çağında omuz ve/veya dirsek kontraktürleri, aşıl tendonu kontraktürü, ekin deformitesi, pes kavus, kamptodaktili, kalça displazisi, ulnar

deviasyon ve düztabanlık gibi ortopedik deformiteler sık olarak görülmektedir (283). Aşil tendonu kontraktürleri, girişimsel müdahale gerektirebilecek düzeyde olabilmektedir (284). Literatürde *HRAS* geninde heterozigot varyant bulunan bazı olgularda rasopati benzeri bulgular ile birlikte, kas biyopsisi ile tanı konulan ve “Kas içciklerinin fazlalığı ile giden konjenital miyopati (CMEMS; Congenital myopathy with excess of muscle spindles)” olarak bilinen erken başlangıçlı şiddetli bir fenotip tanımlanmıştır. Tanımlanan kas ve iskelet sistemi tutulumu bulgularının, CS’da beklenen bulgular olması nedeniyle CMEMS’in ayrı bir klinik olarak düşünülmemesi gerektiği ifade edilmektedir (281, 282). Kas ve iskelet sistemi tutulumunun CS’nun şiddetli bulgular ile giden neonatal letal formunun bir parçası olduğu öne sürülmektedir (281, 282). Literatürde, fetal akinezi ve kas biyopsisinde miyopati ile uyumlu değişiklikler (tip 2 fiber baskınlığı, kas içciklerinde artma) saptanan dört CMEMS hastası tanımlanmıştır (285). Bu hastalarda bildirilen heterozigot *HRAS* varyantlarının ikisi yeni tanımlanmış Glu63Lys ve Gln22Lys varyantları, diğer ikisi ise Gly12Val ve Gly12Ser’dir. Bu dört CMEMS hastasının, en uzun süre hayatta kalanı 14 ay yaşayabilmiş, ikisi kardiyorespiratuar yetmezlik nedeniyle erken dönemde kaybedilmiştir. Hastalarda ek olarak hipotoni, ciddi miyokardiyal tutulum, şiddetli kontraktürler, fetüste spontan hareketlerin yokluğu ve arefleksi bildirilmiştir. Bildirilen CMEMS olgularında rasopati benzeri bulgulara ek olarak, miyopatiyi işaret eden kas histolojisi bulguları temel özelliktir. Olgumuzda üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürleri mevcut olmakla beraber, dış merkezde termine edilmiş olması nedeniyle kas histolojisi değerlendirilememiştir. Ras-MAPK yolağının, özellikle miyoblast diferansiyasyonu ve proliferasyonunda

hayati rolü olduğu bilinmektedir. Ancak, CS'nda kas tutulumunun derecesi, yaygınlığı ve histolojik özelliklerinin aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Literatürde CMEMS olarak bildirilen az sayıda hasta olması nedeniyle CMEMS ve CS arasında *HRAS* geni özgün allel ayırımını düşündürecek genotip-fenotip korelasyonu mevcut değildir. CMEMS'de bildirilen Gly12Val ve Gly12Ser varyantları, CS hastalarında değişken yaşlarda sıklıkla bildirilmiştir. Güncel literatür verilerinde CMEMS'nin CS'nun iskelet kası tutulumu ile giden bir formu olduğu, CMEMS hastalarının esasen CS spektrumunun şiddetli ucunda yer aldığı ifade edilmektedir (203, 285-288). Kas içciklerinin fazlalığı ile giden konjenital miyopatinin CS'dan ayrı bir fenotip olması ihtimalini netleştirmek için literatürde daha fazla olgunun tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Kas içciklerinin fazlalığı ile giden konjenital miyopatiye özgün *HRAS* alellerinin olmaması, CS hastalarında iskelet kası morfolojisinin henüz netleştirilmemiş olması ve CMEMS'nin CS'dan ayrı bir fenotip olduğunu destekleyebilecek verilerin yetersiz olması nedeniyle olgumuzda saptanan bu varyant, CS spektrumunun şiddetli bulgularla giden neonatal formu ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir.

Konjenital sendromlarla ilişkilendirilen onkogenler ve bu onkogenlerdeki varyantların değerlendirilmesi ile "zayıf ve güçlü alleller" kavramı ortaya çıkmıştır (250). Zayıf ve güçlü allel ayırımı, bir onkoprotein veya belirli bir allelin normal gelişime müdahale ederek ölümcül veya ölümcül olmayan bir embriyonik fenotipe neden olma kabiliyetine dayanmaktadır. Ras-MAPK yolağında yüksek düzeyde aktive edici mutasyonlar germ hattında ve heterozigot olduğunda ciddi letalite ile giden fenotipe neden olabilmektedir (289). Costello sendromunda görülen tüm

HRAS mutasyonlarının (en sık Gly12Val, Gly12Cys, Gly12Ser, Gly12Ala, Gly12Asp, Gly13Cys) çoğu kanserlerde de bildirilmiştir (290). Gly12Ser, Gly12Ala, Gly13Cys varyantları Ras-MAPK yolağında düşük düzey aktivasyona; Gly12Asp, Gly12Cys varyantları orta düzey aktivasyona; Gly12Val varyantı ise yüksek düzey aktivasyona neden olmaktadır (291, 292). Costello sendromunda en sık görülen mutasyon olan Gly12Ser çoğunlukla "klasik" CS fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (289, 291, 293). Bununla birlikte, Gly12Ser mutasyonuna sahip şiddetli fenotipi olan hastalar da bildirilmiş olup, bu hastalar ciddi solunum ve beslenme güçlükleri nedeniyle erken çocukluk döneminde kaybedilmiştir (282, 285). En yüksek aktivasyon potansiyeli olan Gly12Val varyantı, kanserlerde en sık saptanan *HRAS* mutasyonudur, ancak CS'da nadiren rastlanmaktadır. Gly12Val varyantı ile bildirilen CS hastaları neonatal letal seyir göstermektedir; artmış NT, kistik higroma, fetal hidrops, şiddetli büyüme geriliği, polihidramniyoz, HKMP, kas güçsüzlüğü, eklem kontraktürleri, CS dismorfik bulguları mevcut olup, neonatal dönemde kardiyak, solunum ve kas sistemi komplikasyonları nedeniyle kaybedilmişlerdir (249, 286, 288, 294). Ras-MAPK yolağında yüksek düzeyde aktive edici mutasyonlar germ hattında olduğunda ciddi letalite ile giden fenotipe neden olabilmektedir (289). Neonatal letal CS olarak adlandırılan ve CS spekturumunun şiddetli formunu oluşturan bu durum nadirdir ve spesifik olmayan bulgularla seyretmektedir. Neonatal letal CS'da bulgular prenatal dönem başlangıçlı olup, etkilenmiş bireylerde intrauterin büyüme geriliği, polihidramniyoz, artmış NT, kistik higroma, fetal hidrops ve eklem kontraktürleri, görülebilmektedir (282). Ras-MAPK yolağında aşırı aktivasyona neden olan germ

hattı mutasyonlarının fetal büyüme üzerinde olumsuz etkilerinden dolayı, bu mutasyonlara sahip olan fetüslerin doğum öncesi veya erken yenidoğan dönemde tanı alamadan kaybedilmeleri söz konusu olabilmektedir.

Nörolojik, oküler, cilt ve iskelet tutulumu ile seyreden Schimmelpenning-Feuerstein-Mims sendromu, postzigotik dönemde *HRAS*, *KRAS* ve *NRAS* genlerinde gerçekleşen aktive edici mutasyonların somatik mozaizmi ile ilişkili bir hastalıktır (279, 295, 296). Olgumuzda saptanan Gln61Arg varyantı, literatürde “Schimmelpenning-Feuerstein-Mims sendromu (SFMS) (OMIM; #163200)” ile uyumlu klinik bulguları olan iki hastada postzigotik mozaizm ile bildirilmiştir (295, 296). Yaşlarının 13 ve 15 olduğu belirtilen bu iki hastada D vitaminine dirençli hipofosfatemik raşitizm, kısa boy ile yaygın keratinositik epidermal nevüsler, sebase kahverengi verrüköz papüller ve plakların olduğu cilt bulguları kaydedilmiştir. Literatürde prenatal dönemde tanı konulan SFMS hastasına rastlanılmamıştır. KVÖ materyalinde yapılan analizlerde plasentaya sınırlı mozaizm (confined plasental mozaizm) nedeniyle fetal örneklemin tam olarak değerlendirilememesi söz konusu olabilmektedir. Postnatal dönemde tanı alan bir SFMS hastasının prenatal öyküsünde hidrotoraks varlığı bildirilmiş olup diğer SFMS hastalarında prenatal öyküde özellik belirtilmemiştir (297). Olgu 1’de DNA eldesi KVÖ materyalinden yapılmış ve DNA profillemeye (Short Tandem Repeats, STR) analizi ile maternal kontaminasyon dışlanmıştır. Direkt KVÖ preparasyonunun fetal doku lehine olması olasılığı uzun döneme göre daha düşük olmakla birlikte, olgunun rasopati ile uyumlu USG bulgularının olması, prenatal dönemde özellikle iskelet sistemi tutulumu gibi şiddetli bulgular saptanması

moleküler çalışmada okuma yüzdesinin ve okuma sayısının heterozigotluk lehine olması nedeniyle hastada SFMS düşünülmemiştir.

Olguda saptanan diğer varyant olan *MAP2K1* geni c.*88A>C heterozigot varyantı genin 3' UTR bölgesinde yer almakta olup, literatürde ve varyant veri tabanlarında daha önce bildirilmemiştir (228, 230, 254). Sanger yöntemi ile yapılan ebeveyn analizinde asemptomatik annede de heterozigot olarak saptanmıştır. *MAP2K1* genindeki hastalık yapıcı değişiklikler heterozigot olarak “Kardiyofasiyokütanöz sendrom 3 (OMIM; #615279)” ile ilişkilendirilmektedir. Ancak, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre kriterlendirilen c.*88A>C heterozigot varyantı, klinik önemi belirsiz olarak yorumlanmıştır (232, 233). Ebeveyn çalışmasında annede de aynı varyantın belirlenmesi üzerine hafif klinik seyirli CFCS ihtimali ile varyantın klinik önemi belirsiz sınıflandırması değişmemiştir.

Olguda *HRAS* geninde saptanan c.182G>A p.Gln61Arg heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre patojen olarak yorumlanmıştır (232, 233). *HRAS* genindeki bu varyant annede saptanmamış olup, babaya da analiz planlanmıştır. Literatürde ebeveyn analizi yapılan CS hastalarında mutasyonların çoğunlukla *de novo* olduğu belirtilmektedir (249). Olguda mevcut olan kistik higroma, fetal hidrops ve üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü fenotipinin, Costello sendromunun neonatal letal formu ile uyumlu olduğu düşünülmüştür. Olguda saptanan varyant, rasopati ile ilişkili genlerde güçlü aktivasyona neden olan mutasyonların embriyonal/fetal gelişimi tamamen veya yüksek düzeyde etkileyebileceğini, bu tür varyantların somatik olarak kanser

vakaları ve çok şiddetli fetal fenotiplerle ilişkili olduğunu öne süren teoriyi desteklemektedir (298). Olgumuzda saptanan bu sonuç, CS’da fenotipin değişken olduğunun teyidi niteliğindedir ve bu değişkenliğin bir nedeninin *HRAS* mutasyonlarının Ras-MAPK yolağını aktive edici potansiyelindeki farklılıklar olabileceği fikrini desteklemektedir.

5.1.2. Olgu 5

Olguda prenatal rasopati vakalarında en sık bildirilen gen olan *PTPN11* geninde c.211T>C p.(Phe71Leu) heterozigot varyant saptanmıştır. *PTPN11* geninde heterozigot patojen varyantlar “Noonan sendromu 1 (OMIM; #163950)”, “LEOPARD Sendromu (OMIM; #151100)” ve “Metakondromatozis (OMIM; #156250)” ile ilişkilendirilmektedir. Noonan sendromlu bireylerin yaklaşık %50’si *PTPN11*’de patojenik bir yanlış anlamlı varyanta sahiptir (164). Artmış NT’si olan normal karyotipli fetüslerin %3-15’inde *PTPN11* patojen mutasyonunun olabileceği düşünülmektedir (182). *PTPN11* geni tarafından kodlanan Shp2 proteini bir “non-reseptör protein tirozin fosfataz” olarak görev yapar; iki src homoloji 2 (SH2; N-terminal SH2 ve C-terminal SH2) bölgesi ve bir protein tirozin fosfataz (PTP) bölgesinden oluşmaktadır (136). Hastada saptanan Phe71Leu varyantı, Shp2 proteinin 6-102. aminoasitleri tarafından kodlanan N-terminal SH2 (N-SH2) bölgesinde bulunmaktadır (236). Shp2 proteinin katalitik aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, 71. Fenilalanin rezidüsünün N-SH2 ve PTP alanlarının birbirleriyle etkileşiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (299).

PTPN11 genindeki patojen mutasyonların çoğu, Shp2 proteininin otoinhibitör bölgesinde yer alan aminoasitlerde kümelenme göstermektedir. Bu etkileşimde görev alan diğer rezidüler olan Glu69, Lys70 ve Ala72 rezidülerinde çok sayıda varyant patojenik olarak bildirilmiştir (136, 258, 300) ki bu Phe71 kodonunun önemini desteklemektedir. Olgu 5'te saptanan Phe71Leu varyantını hedefleyen fonksiyonel çalışma mevcut olmamakla birlikte, Phe71Leu varyantının Shp2 proteinin otoinhibitör etkileşimi bozarak, aktif formdan (katalitik etkili), inaktif (katalitik etkili olmayan) forma geçişi engellemesi beklenmektedir (299). Bu durumda Shp2 proteininde artmış fosfataz aktivitesinin, Ras-MAPK yolağında sinyalizasyon artışı ile sonuçlanması beklenen bir durumdur (136, 144).

PTPN11 geninde bildirilen patojen varyantlar sıklıkla ekzon 3'te yer almakta olup, çoğunlukla Phe71 rezidüsünden önceki ve sonraki aminoasitleri etkilemektedir. *PTPN11* geninde Phe71Leu ile aynı kodonda aynı yanlış anlamalı değişikliğe neden olan varyantlar (c.213T>A, c.213T>G) ve aynı kodonda farklı aminoasit değişikliklerine neden olan varyantlar (c.211T>A (p.Phe71Ile), c.211T>G (p.Phe71Val)) ClinVar'da patojen olarak bildirilmiştir (230) ki bu veriler, 71. kodonun protein işlevi üzerindeki önemini vurgulayan kanıtlardandır . Protein Shp2'de çok yüksek aktivasyona yol açan varyantlar malignitelerde daha sık görülürken, klasik NS hastalarında saptanan germ hattı varyantları genellikle proteinde düşük düzeyde aktivasyona neden olan varyantlardır (144). Noonan sendromu hastalarında gözlenen *PTPN11* germ hattı mutasyonlarının, sendromik olmayan lösemili bireylerde saptanan somatik mutasyonlarla karşılaştırıldığında, çoğunlukla benzerlik göstermediği görülmektedir (259). Olgumuzda saptanan

Phe71Leu varyantı ise hem somatik olarak JMML ve AML malignitelerinde (259, 261, 262), hem de NS ile ilişkili olarak germ hattında çok sayıda hastada raporlanmıştır (258, 259).

Fetal USG anomalileri olgumuz (fetal hidrops, nazal kemik hipoplazisi ve 9 mm NT) ile benzerlik gösteren, intrauterin veya erken neonatal dönemde kaybedilmiş üç ayrı fetüste (bu fetüslerde fetal hidrops ortak klinik bulgu olup, ek olarak kistik higroma, plevral efüzyon, polihidroamniyoz ve renal piyelektazi mevcuttur) Phe71Leu varyantı bildirilmiştir (221, 223, 301). Ayrıca, artmış NT'li bir fetüste de aynı kodonda aynı aminoasit değişikliğine yol açan başka bir varyant bildirilmiştir (182). Belirlenen Phe71Leu varyantı, ClinVar'da çok sayıda hastada patojen/olası patojen olarak bildirilmiştir (230). Aynı kodonda farklı bir aminoasit değişikliğine neden olan Phe71Ile varyantı, ASD ve hidroseli olan 9 aylık bir erkek hastada saptanmış, tek bulgusu pitozis olan bir babadan kalıtıldığı bildirilmiştir (300). Olgumuzda ise saptanan varyant, ebeveyn çalışması sonrası *de novo* olarak yorumlanmıştır. Olgudaki nazal kemik hipoplazisi, *PTPN11* geninin normal nazal kemik gelişimindeki rolü nedeniyle, bu gendeki mutasyon ile ilişkilendirilmiştir (269, 302). Nazal kemik hipoplazisi, nispeten nadir olmakla birlikte, literatürde NS hastalarında prenatal dönemde bildirilmiş bir bulgudur (269, 302).

On üçüncü gebelik haftasında ailenin isteği ile termine edilen olgunun postmortem dismorfik muayenesinde fetal hidrops, nukal ödem, bilateral aşağı eğimli palpebral fissürler, geniş burun tabanı, retrognati izlenmiştir. Bu dismorfik bulgular NS'da iyi bilinen fetal fenotipik özelliklerdendir (303-306). Literatürde *PTPN11* mutasyonu saptanan hastalarda en sık saptanan kardiyak bulgu pulmoner

stenoz olmakla beraber (307), olgumuzda kardiyak anomali bulunmamaktadır. Olgunun postmortem muayenesinde yapılan ölçümleri; baş çevresi 10.5 cm (95. Persentil), boy (Crown-heel length, baş-topuk mesafesi) 15 cm (95. Persentil) şeklindedir (308). Noonan sendromunda prenatal dönemde fetal aşırı büyüme ve makrosefali görülebilmektedir (309, 310). NS'lu yenidoğanlarda boy ve kilo genellikle normal olduğundan, fetal büyüme parametreleri tanı koymada her zaman yardımcı olmayabilmektedir. Hastada boy ve baş çevresi persentilleri üst sınıra yakın olarak saptanmakla beraber, bu parametreler hastadaki fetal hidrops bulgusuna bağlı olarak yüksek ölçülmüş olabilir.

“Metakondromatozis” *PTPN11* geninde heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonları ile ilişkilendirilmiş olup, metakondromatozis'teki özgün lezyonlar olan osteokondromlar, hücresel düzeyde karşı allelede ikinci vuruş mekanizmasıyla gelişmektedir (208). *PTPN11*'in allelik hastalıklarından olan metakondromatoziste gelişimsel fenotip görülmemektedir. Olgumuzdaki varyantın olası mekanizması ve klinik bulguları değerlendirildiğinde, metakondromatozis ile ilişkili olması beklenmemektedir. *PTPN11*'in diğer allelik hastalığı olan NMLS ve NS ile kısmen fenotipik benzerlik gösterebilmektedir. Ancak yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, NMLS'na neden olan varyantların moleküler temelde NS ile farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (193). *PTPN11*-ilişkili NMLS'na neden olan patojenik varyantların tümü NS'da olduğu gibi yanlış anlamlı varyantlardır. NMLS'nun dominant negatif mekanizma ile hastalığa neden olduğu düşünülmektedir (193). Ancak, NS ile ilişkili yanlış anlamlı varyantlar Shp2 proteininde fonksiyon kazanımına neden olurken, NMLS-ilişkili yanlış anlamlı varyantlar Shp2

proteininin fosfataz aktivitesinde azalma ile sonuçlanmakta, ancak proteinin aktivitesi tamamen yok olmamaktadır (194). Bunun yanında, NS ve NMLS'na neden olan *PTPN11* patojenik varyantlarının PI3k-AKT-mTOR sinyal yolları üzerinde farklı etkileri vardır (194, 311, 312) ki bu durumun da klinik farklılıklara katkıda bulunması beklenmektedir. *PTPN11* patojenik varyantlarının NMLS'na yol açma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Genotip-fenotip korelasyonu çalışmaları; NMLS'nun temel bulgularından olan HKMP'nin, *PTPN11* ile ilişkili NS hastalarının sadece %8'inde bulunduğunu, sağırılık ve lentijinöz lezyonların ise NMLS'na kıyasla NS'da çok nadir olarak görüldüğünü göstermektedir (313). Terminasyon sonrası muayene edilen olgunun fetal cilt dokusunda ödem nedeniyle yeterli değerlendirme yapılamadığından ve multipl lentijinöz lezyonların başlangıç yaşı değişken olabildiğinden, bu lezyonlar açısından olgunun değerlendirilebilmesi mümkün olamamıştır. NMLS'na neden olan patojenik varyantların çoğu proteinin PTP bölgesinde yer alan bir kısım aminoasitleri kodlayan ekzon 7, 12 ve 13'te tanımlanmıştır (192, 194). Bu olguda saptanan Phe71Leu varyantı, ekzon 3'te yer almaktadır, NS'da rekürren mutasyonlar çoğunlukla ekzon 3 ve ekzon 13'te kümelenme göstermektedir (314). Olguda saptanan varyant, kanser ile ilişkisi iyi bilinen, domaindeki konumu ve komşu aminoasitlerle ilişkisi itibarıyla Shp2 proteininde aktivite artışı sonucu Ras-MAPK yolağında sinyalizasyonda artışa neden olması beklenen bir mutasyon olup, literatürde çok sayıda NS hastasında bildirilmiştir. Tüm bu nedenlerle olgumuzdaki bulgular NMLS ile ilişkilendirilmemiş, NS ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Olguda *PTPN11* geninde saptanan c.211T>C p.(Phe71Leu) heterozigot varyantı, genel toplum verilerinde bulunmayıp (248), farklı türler arasında iyi korunmuş olan 71. kodonda yanlış anlamlı aminoasit değişikliğine neden olması beklenmektedir. In silico araçlarda bu varyantın hastalık yapıcı nitelikte olduğu tahmin edilmektedir (235). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *PTPN11* geninde saptanan c.211T>C p.(Phe71Leu) heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre patojen olarak yorumlanmıştır (232, 233). Böylece olgudaki hidrops fetalis, artmış NT ve nazal kemik hipoplazisi klinik bulgularının, *PTPN11* geni ile ilişkili “Noonan syndrome 1 (OMIM; #163950)” ile uyumlu olduğu düşünülmüştür. Olgumuzun USG bulguları ve saptanan *PTPN11* geni Phe71Leu varyantı mevcut literatür verileri ile birlikte değerlendirildiğinde, yüksek oranda artmış Ras-MAPK yolağı aktivitesinin daha şiddetli fenotiplere neden olduğu ve işlevsel olarak en şiddetli mutasyonların germ hattında meydana gelmesi halinde neonatal letaliteye neden olabileceği fikrini desteklemektedir.

5.1.3. Olgu 11

Olguda yapılan rasopati panel analizinde hastada *RIT1* geninde c.270G>A p.(Met90Ile) heterozigot varyantı saptanmıştır. *RIT1* genindeki heterozigot patojen varyantlar “Noonan sendromu 8 (OMIM; #615355)” ile ilişkilendirilmiştir. *RIT1* geni patojen mutasyonları, Ras-MAPK yolağının aşırı aktivasyonu ile NS’na neden olmaktadır (181). *RIT1* geni, küçük GTPazların Ras alt ailesine ait Rit1 proteinini kodlar (236). Rit1 proteini, küçük G proteinlerinde yüksek oranda korunmuş bir

olan 5'li G bölgesine sahip olup, tüm hücrelerde eksprese olmaktadır (315). Protein Rit1'de bulunan G bölgesi (19-185. amino asit rezidüleri tarafından kodlanır), Ras proteini ile yüksek oranda sekans özdeşliği (~%51) gösterir. Protein Rit1, Ras benzeri proteinlerde bulunan C-terminal CAAX prenilasyon motifinden yoksundur. Rit1-GDP'nin Rit1-GTP'ye dönüşümü, switch-I (48-58. amino asit rezidüleri) ve switch-II'den (78-93. amino asit rezidüleri) oluşan Rit1-efektör bağlanma bölgesinde konformasyonel değişikliğe neden olur ki bu da, Rit1 aktivasyonu ile sonuçlanır (316). *RIT1* genindeki patojen mutasyonların çoğu, Ras geni ile homoloji gösteren switch II bölgesinde yer almaktadır (317). Ras-MAPK yolağının diğer elemanları gibi, Rit1 proteini de hücre çoğalması ve hücrenin hayatta kalma fonksiyonlarının düzenlenmesinin yanı sıra nöronal farklılaşma ve morfogenezde rol oynamaktadır (318).

Noonan sendromlu bireylerin yaklaşık %5'inde *RIT1* geninde patojen varyant saptanabilmektedir ve bu gen prenatal başlangıçlı rasopatilerde önemli bir role sahiptir (137, 182). Herediter kardiyomiyopati, *RIT1*'li hasta popülasyonunda genel NS popülasyonundan daha sık görülür (319). Prenatal başlangıçlı HKMP, *RIT1*'de sıklıkla bildirilmiştir (319). Prenatal dönemde artmış NT, polihidramniyoz, plevral efüzyon, fetal asit ve fetal hidrops gibi prenatal bulgular *RIT1* mutasyonuna sahip fetüslerde yaygın olarak bildirilmiştir (317, 319, 320).

Olgumuzun fetal USG bulguları artmış NF (17 mm), polihidramniyoz, plevral efüzyon ve fetal EKO'da kardiyak anomalilerdir (fallot tetralojisi?, perimembranöz VSD, dekstropeze aort ve pulmoner darlık). Met90Ile varyantı, prenatal öyküsünde kistik higroma ve kardiyak defekt olan bir olgu ile prenatal

USG’de kistik higroma, artmış NF ($\geq 7,5$ mm), polihidramniyoz, plevral efüzyon ve makrozomisi olan bir başka fetüste de bildirilmiştir (182, 318). Prenatal öyküsünde polihidramniyozu olan, postnatal takiplerinde NS ile uyumlu dismorfik bulguları, kardiyak bulguları (hafif PS, HKMP), lenfödem ve gelişim geriliği olan bir hastada da *RIT1* geninde Met90Ile varyantı bildirilmiştir (321). Polihidramniyoz, artmış NT ve şilotoraks gibi prenatal anomaliler bulunan olgulardan birinde ciddi plevral efüzyon, HKMP ve hepatomegali bildirilmiş ve bu fetüslerden bir tanesi yaygın ödem ve dolaşım bozukluğu nedeniyle doğumdan 53 gün sonra kaybedilmiştir (181). Aynı kodonda farklı aminoasit değişikliğine (Met90Val) neden olan bir varyant, artmış NT ($\geq 3,6$ mm), kistik higroma, fetal hidropsu olan bir fetüste ve artmış NT, kistik higroma, genişlemiş juguler lenfatik keseler, üriner toplayıcı sistem duplikasyonu olan bir başka fetüste de patojen olarak bildirilmiştir (320, 322). Met90Ile, ClinVar’da çok sayıda hastada patojen olarak bildirilmiş bir varyanttır (230). Proteinin Switch II bölgesinde yer alan Met90 kodonuna komşu kodonlarda aminoasit değişiklikleri de hastalık yapıcı olarak çok sayıda hastada bildirilmiştir (316).

Olgu 11’de EKO ile kardiyak bulgular değerlendirildiğinde fallot tetralojisinin komponentleri ile uyumlu olarak yorumlanmıştır, bu komponentler tek başına olduğunda NS’nda sık olarak görülen bulgulardır (323). Özellikle kardiyak bulguların NS ile ilişkili diğer genetik nedenlere göre daha sık görüldüğü *RIT1*-ilişkili NS’nda kardiyak bulgular sıklıkla (farklı yayınlarda %90-100 sıklıkta) görülmektedir (137, 319, 323). Ancak fallot tetralojisi söz konusu olduğunda, bu kardiyak bulgular kompleksi NS’nda nadir görülen bir durumdur ve literatürde

RIT1-ilişkili NS’nda fallot tetralojisi varlığı daha önce bildirilmemiştir (323). Fallot tetralojisi diğer genetik etiyojilere sahip NS’larında bilinen bir bulgu olup, olguda saptanan *RIT1* geni patojen varyantının fetüsün kardiyak bulguları ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Somatik *RIT1* mutasyonları malign tümörlerde diğer rasopati genlerine kıyasla nadiren bildirilmiştir. Kanserlerde bildirilen *RIT1* varyantları, NS’ndaki germ hattı *RIT1* varyantları ile önemli ölçüde benzerlik göstermektedir (137). Malignitelerle ilişkilendirilen somatik *RIT1* mutasyonlarının tamamı, olgu 11’de saptanan varyantın da yer aldığı switch II bölgesinde yer almaktadır (317). Olgu 11’de saptanan Met90Ile varyantı, akciğer kanserinde ve miyeloid malignitelerde somatik olarak bildirilmiş bir varyanttır (290). Yapılan iki ayrı fonksiyon çalışmasıyla, Met90Ile’nin ERK1/2 fosforilasyonunu indükleyerek Ras-MAPK yolağında aktivasyon artışına neden olduğu gösterilmiştir (321, 324). *RIT1* geninin gelişimsel süreçlere ve NS’ndaki patojenez katkısının netleştirilmesi için daha fazla çalışma gerekmektedir. Ancak kanserlerde bildirilmiş olan Ras-MAPK yolağında yüksek düzeyde aktivasyona neden olan mutasyonların, germ hattında meydana geldiğinde prenatal başlangıçlı şiddetli fenotiple ortaya çıktığı teorisini desteklemektedir (271, 272).

Olguda *RIT1* geninde saptanan c.270G>A p.(Met90Ile) heterozigot varyantı genel toplum verilerinde bulunmayan ve farklı türler arasında iyi korunmuş 90. kodonda yer almaktadır (236). In silico araçlarda bu varyantın hastalık yapıcı nitelikte olduğu tahmin edilmektedir (235). Olgumuzda saptanan bu varyant yanlış anlamlı varyantların sıklıkla patojen/olası patojen olarak bildirildiği hotspot bir

bölgede yer almaktadır (234). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında; olguda *RIT1* geninde saptanan c.270G>A p.(Met90Ile) heterozigot varyantı, ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre patojen olarak yorumlanmıştır (232, 233). Böylece olgudaki artmış NF, polihidramniyoz ve kardiyak anomalilerin, *RIT1* geni ile ilişkili “Noonan syndrome 8 (OMIM; #615355)” ile uyumlu olduğu düşünülmüştür.

5.1.4. Klinik Önemi Belirsiz Varyant Saptanan Hastalar

Çalışmaya dahil edilen olgulardan olgu 2’de *RAF1* geninde c.171T>C p.(Thr57=), olgu 6’da *RAF1* geninde c.1804-27T>G, olgu 10’da *MAP2K2* geninde c.-39C>T ve olgu 14’te *SPRED1* geninde c.945T>G p.(Pro315=) varyantları saptanmıştır. Bu dört olguda saptanan varyantlar ACMG 2015 ve ACGS 2019 kılavuzlarına göre klinik önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırılmaktadır. Bu dört olguda klinik bulguları açıklayan patojen/olası patojen varyant saptanmamıştır. *RAF1* genindeki patojen/olası patojen heterozigot değişikliklerin “Noonan sendromu 5 (OMIM; #611553)”, “Dilate kardiyomiyopati, 1NN (OMIM; #615916)” ve “Noonan-multipl lentiginöz sendromu 2 (OMIM; #611553)” ile ilişkili olduğu bilinmektedir. *MAP2K2* genindeki patojen/olası patojen heterozigot değişikliklerin “Kardiyofasiyokütanöz sendrom 4 (OMIM; #615280)” ile ilişkisi rapor edilmiştir. *SPRED1* genindeki patojen/olası patojen heterozigot değişikliklerin ise “Legius sendromu (OMIM; #611431)” ile ilişkisi belirtilmiştir. Olgu 2, 6, 10 ve 14’te saptanan varyantlar, genel toplum veri tabanlarında bulunmamaktadır. Klinik önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırılan bu

varyantların sağlıklı kişilerde bulunmamasının, hastalık yapıcı olma ihtimallerini kuvvetlendirdiği söylenebilir. Rasopati genlerindeki varyantlar, genel toplum veri tabanlarında saptandığında dikkatli değerlendirilmelidir. Bu veri tabanları katılımcıların sağlıklı oldukları beyanına bağlı olarak oluşturulmaktadır. Rasopatiler açısından genetik heterojenite nedeniyle hafif klinik bulguları olan ve/veya kendilerinde mevcut bir genetik durumun farkında olmayan etkilenmiş bireyler, genel toplum veritabanlarına sağlıklı olarak dahil edilmiş olabilir.

Olgu 2’de saptanan varyant, Raf1 proteinin “Ras-bağlayıcı (RBD)” bölgesinde bulunmaktadır. Olgu 14’te saptanan *SPRED1* geni c.945T>G p.(Pro315=) sinonim varyant türleri arasında iyi korunmuş bir kodondadır ve kodlanan proteinin işlevsel olarak herhangi bir önemli bölgesinde yer almamaktadır (234, 236). Olgu 2 ve 14’te saptanan varyantlar sinonim varyantlar olup, splicing’i etkileme ihtimali bulunmaktadır. Olgu 6’da saptanan varyant intronik bir varyantır, olgu 10’daki varyant ise genin 5’ UTR bölgesinde yer almaktadır. Olgu 6 ve 10’da saptanan varyantların da splicing’i etkileme ihtimali bulunmaktadır. Genel olarak splicing’i etkileyen varyantların büyük olasılıkla proteinde fonksiyon kaybına neden olması beklenmekle beraber, *RAF1* ve *MAP2K2* genlerinde oluşan varyantların fonksiyon kazanımı yoluyla Ras-MAPK yolağında aktivasyonun artmasına neden olduğu ileri sürülmektedir (215, 325). Bununla birlikte yapılan bir fonksiyon çalışmasında, *MAP2K2* geninde haploetersizliğe neden olan CNV’nin, yolağın modulatorlerinden biri olan sprouty 1 proteinin ifadenme seviyesini etkileyerek Ras-MAPK yolunda düzensizliğe yol açtığı gösterilmiştir (215, 218). *SPRED1* geni ile ilişkilendirilen Legius sendromu, Spred-1 proteininde fonksiyon

kaybına neden olan heterozigot mutasyonlar ile ilişkilendirilmiştir (185, 186). Ras-MAPK yolağının pozitif modölatör proteinlerindeki fonksiyon kaybının rasopatilere veya rasopati benzeri bulgulara neden olup olmadığı ise halen tartışmalıdır. Ras-MAPK yolağında yer alan genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonlarının, yolakta görev alan bazı proteinlerin eksikliği veya yolağın modölatörlerindeki ifadenin seviyesi değişiklikleri ile yolağın çalışmasında düzensizliğe neden olduğu, bunun sonucunda da rasopati benzeri bulgularının gelişebileceği teorisi öne sürülmektedir (215). Bu teorisin aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Splicing'i etkileme ihtimali bulunan varyantların da mRNA dizi analizi ile gösterilmesi mümkün olabilir. Rasopatilerin etiolojisine yönelik daha doğru bir yorum yapabilmek için varyantların proteine etkisini gösteren fonksiyon çalışmaları önerilmektedir. Ras-MAPK sinyal yolağındaki aktivasyon/inaktivasyon mekanizmaları ve/veya katalitik işleyişler üzerindeki etkilerinden faydalanılarak yapılacak fonksiyon çalışmaları ile varyantların hücre düzeyindeki etkileri de değerlendirilebilecektir.

Prenatal USG'de olgu 2'de kistik higroma ve artmış NT (4,5 mm); olgu 6'da kistik higroma, artmış NT (6,9 mm); olgu 10'da artmış NF (6,5 mm); olgu 14'te artmış NF (6 mm) ve bilateral renal pelvis dilatasyonu saptanmıştır. Olgulardaki USG bulguları rasopatilerde iyi bilinen bulgular olmakla beraber, spesifik değildir (220). Olgu 14'te lenfatik displaziye ek olarak saptanan renal pelvis dilatasyonu, rasopatilerdeki en sık renal bulgudur (164, 326). Bu olgulardaki mevcut bulguların, panel çalışmamıza dahil olmayan diğer rasopati ilişkili genlerdeki varyantlarla

ilişkisi ve/veya lenfatik displazi görülen diğer sendromlarla ilişkili genlerde hastalık yapıcı mutasyonlarla ilişkisi dışlanamamıştır.

Olgu 10'da baba yaşı, ileri baba yaşı tanımı için sınır değerdedir (40 yaş). Rasopatilerde *de novo* varyantlar ileri baba yaşı ile ilişkilendirilmekle beraber (273), kural değildir. Olguda saptanan varyantın, planlanan ebeveyn çalışması sonrasında *de novo* olduğunun belirlenmesi durumunda patojen gruba dahil edilebilir ve baba yaşı ile ilişkilendirilmesi söz konusu olabilir (165). Olgu 2, 6 ve 14'te her üçünün de ebeveyn yaşları normal yaş aralığındadır ve ebeveynleri arasında akrabalık bulunmamaktadır. Olgu 14'ün ebeveynleri arasında 6. derece akrabalık mevcuttur, olgu 14'ün USG bulgularının, akrabalık göz önünde bulundurulduğunda resesif hastalıklara bağlı olma ihtimali akrabalık bulunmayan diğer hastalara göre daha olasıdır.

Klinik önemi bilinmeyen varyantların ebeveyn danışmanlığı sırasında belirsizliklere neden olması kaçınılmazdır, bu belirsiz koşullarda ebeveynler terminasyon seçeneklerini ertelemeyi ve gebeliğin doğal seyrini bir süre daha izlemeyi tercih etme eğilimi gösterebilirler. Prenatal dönemde fetüsün moleküler tanısının kesin olması, gebeliğin prognozu açısından ebeveyn kararlarında önemli bir etkidir. Klinik önemi bilinmeyen varyantın ebeveyn analizi ile değerlendirilmesi, ebeveyn danışmanlığına büyük oranda katkı sağlamaktadır. Bu çalışmalarda, bir varyantın etkilenmemiş bir ebeveynden kalıtıldığına görülmesi veya etkilenmiş aile bireylerinde segregasyon göstermesi veya *de novo* olarak ortaya çıktığının belirlenmesi varyant sınıflandırması için yol gösterici olmaktadır. Diğer yandan NS ve rasopatilerin, özellikle NS'nun değişken fenotipik

özelliklerinin olması ve yetişkinlerde silik bulgularla seyretme olasılığı nedeniyle, ebeveynlerin değerlendirmesinde bu durumlar göz ardı edilmemelidir. NS için moleküler test endikasyonu varlığında, fetal örnekle eş zamanlı olarak ebeveyn kanının alınması, fetüste bir mutasyonun belirlenmesi durumunda, ebeveyn DNA'sı ile varyantın *de novo* olup olmadığının hızlıca test edilmesi açısından önerilmektedir. Bu yaklaşım, prenatal tanıda zaman kazandırmakta ve mutasyonun patojenitesi hakkındaki belirsizliği sınırlayabilmektedir. Prenatal dönemde ayrıntılı USG'de saptanan bulguların etiyolojilerinin değerlendirilmesiyle bu bulguların altında yatan nedene dair ipuçları elde edilebilmekte, bazı olgularda şüpheli bir sendromun DNA analizi ile moleküler olarak doğrulanması mümkün olabilmektedir (270). Moleküler genetik tanının belirlenmiş olması etkin bir genetik danışmanlık imkanı sağlayarak ebeveynlere gebeliğe devam edip etmeme konusunda bilinçli bir karar verme fırsatı sunabilmektedir. Çalışmamızın bütçesinin sınırlı olması nedeniyle dört olguda da ebeveyn analizleri ve fonksiyon çalışması yapılamamıştır. Olgularda saptanan varyantlar, gelecekte fonksiyon çalışmalarının yapılması ile aydınlatılabilecektir. Klinik önemi bilinmeyen varyant saptanan tüm bu olgularda, saptanan varyantların hastalık yapıcı olup olmadığının netleştirilebilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.2. Prenatal/Postnatal Klinik Bulgular ve Genetik Danışmanlık

Gebelikte fetal USG bulgusu varlığında genetik etiyolojinin prenatal dönemde belirlenmesi, ilerleyen gebelik haftalarında karşılaşılabilecek ek bulgular

açısından tedbir alınmasını sağlayabilir. Bunun yanı sıra doğum anında ya da sonrasında karşılaşılabilecek sorunlar açısından doğumun yönetiminde uygun koşulların sağlanabilmesi, devam eden gebelik ve sonraki gebelikler açısından genetik danışmanlıkta oldukça büyük bir öneme sahiptir. Belirlenen genetik nedenin ailesel veya *de novo* olmasına göre ailenin sonraki gebeliklerinde tekrarlama olasılığının belirlenmesi ve aileye preimplantasyon genetik tanı ve/veya prenatal tanı seçeneklerinin önerilmesi genetik danışmanlık sürecinde önemlidir.

Rasopatilerle ilişkili prenatal USG bulgularının büyük oranda çeşitlilik göstermesi, nonspesifik olması ve spesifik olmaması rasopatilerin prenatal tanısını zorlaştırmaktadır. Başlıca prenatal bulgular polihidramniyoz, kistik higroma, artmış NT ve artmış NF, fetal hidrops, plevral efüzyon, kardiyak defektler, ve renal anomalilerdir (220). Bu prenatal bulguların kromozomal yeniden düzenlemeler, anöploidiler ve çeşitli genetik sendromlar gibi diğer patolojilere sahip fetüslerde de tespit edilebileceği göz önünde bulundurulmalı (223), ancak normal karyotipli fetüslerde ayırıcı tanıda rasopatiler de düşünülmelidir. Lenfatik displazilere sahip normal karyotipli fetüsler, çeşitli malformasyonlar ve genetik sendromlar açısından artmış risk taşımaktadırlar. Bu hastalarda normal bir karyotipin belirlenmesi genetik etiyoloji açısından ebeveynleri büyük bir belirsizlikle karşı karşıya bırakabilir. Bu nedenle, ebeveynlere tanı koymaya yönelik kapsamlı danışmanlık sunulması amaçlanmalıdır. Rasopatilerin ortak bulgularının tanınması, prenatal veya postnatal süreçte olası komplikasyonların zamanında değerlendirilmesine ve müdahale edilmesine katkıda bulunabilir (220). Rasopatilerde doğumdan sonra ortaya çıkabilen geç başlangıçlı malformasyonlar çok sık görüldüğü için genellikle

doğum öncesinde gözden kaçabilecek (327) bu durumlar ebeveynlere bilgi olarak verilmelidir. Doğum öncesi ultrasonografi değerlendirmesi rutin haline getirilmiş olduğundan, perinataloji uzmanı ve/veya yenidoğan uzmanı tarafından rasopati tanısını düşündürebilecek bulguların tespiti kritik önem taşımaktadır. Rasopatili fetüsler/bebekler kardiyak morbidite ve mortalite açısından önemli bir risk artışı taşıdığından, erken tanı çok önemlidir.

Noonan sendromunda prenatal bulgular, postnatal fenotipin ciddiyeti ile korelasyon göstermeyebilir, bu da genetik danışmanlığı zorlaştıran faktörlerdendir. Prenatal bulgular ve postnatal fenotip arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir derlemede, prenatal bulgular ile prognoz arasında net bir korelasyon bulunmadığı raporlanmıştır (5). Bazı raporlarda fetal hidrops ve kistik higromanın kendiliğinden gerilediği de bildirilmiştir (328, 329). Bununla birlikte prenatal USG anomalilerinin postnatal JMML veya kognitif etkilenim olasılığında artış ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (5). Noonan sendromlu bireylerde ölüm yaşı doğum sonrası ilk birkaç ay ile 61 yaş arasında değişmektedir (150). Birçok hasta ortalama bir yaşam süresine ve minimal morbiditeye sahiptir. Noonan sendromunda morbidite ve mortalite esas olarak kardiyak defektin ciddiyetine bağlıdır. Fetüste özellikle PS mevcut olduğunda *PTPN11*'de patojen varyant saptanma olasılığı yüksektir (136, 330). HKMP en sık *RAF1* ile ilişkili NS'da görülmektedir, bazı kohortlarda %85'e varan sıklıkla saptanmıştır (135, 331). Prenatal olarak rasopatilerden şüphelenilen fetüslerde yapılacak fetal EKO kardiyak defektin daha detaylı araştırılmasına olanak sağlayacaktır. Konjenital kalp hastalığı vakaların yaklaşık %20'sinde prenatal dönemde tespit edilebilmektedir (220).

NS'nun yüz görünümü yaşla birlikte önemli ölçüde değişiklik göstermekte, en çok genç ve orta çocukluk döneminde dikkat çekmekte ve yetişkinlikte en silik halini almaktadır. Yaşamın ilk aylarında rasopatilerin tanınması zordur çünkü fizik muayenedeki karakteristik bulgular yenidoğan döneminden sonraki birkaç aya kadar tam olarak belirgin olmayabilmektedir. Yaştan bağımsız olarak bulunan temel dismorfik bulgular; düşük yerleşimli ve arkaya dönük kulaklar, aşağı eğimli palpebral fissürler, epikantus, üst göz kapaklarında dolgunluk veya sarkıklık (pitozis) şeklindedir. Dismorfik bulguların çoğunluğunun embriyonik gelişim sırasındaki lenfatik obstrüksiyon veya disfonksiyonun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir (332). Rutin prenatal taramada yaygın olarak kullanılmayan bir teknik olan üç boyutlu (3-D) USG kullanılarak fetal yüz özelliklerinin araştırılmasıyla rasopatilerin prenatal tanısına katkı sağlanabilir (269). Ancak fetal dismorfik bulgular açısından rasopatilerde prenatal moleküler analiz endikasyonlarını netleştirmek için ayrıntılı dismorfik yüz özelliklerini değerlendiren büyük kohortlara ihtiyaç vardır.

Noonan sendromu büyük bir genetik heterojenite göstermekte ve *PTPN11* genindeki patojen varyantlar vakaların %50'sini oluşturmaktadır. Diğer NS ilişkili genler arasında vakaların %10-13'ünde *SOS1*, %8'inde *LZTR1*, %5'inde *RAF1* ve %5'inde *RIT1* etiyolojide rol almaktadır (148). Prenatal dönemde saptanan mutasyonların çoğu, çalışma grubumuzda olgu 5'de olduğu gibi *PTPN11* genindedir (182, 221). Noonan sendromu klinik tanı kriterlerini karşılayan bireylerin %20-30'luk kısmında bilinen genlerde herhangi bir hastalık yapıcı varyant bulunmayabilmektedir (333). Bu durum hastalık ilişkisi tanımlanması

gereken başka genlerin var olma olasılığını düşündürmektedir (132). Ras-MAPK yolağının aktivasyonunun rasopatilerin temel patofizyolojik özelliği olduğu kanıtlanmıştır, bu yolla görev alan genlerde mutasyon saptanmadığında, klinik bulguların oluşumunda Ras ile ilişkili diğer efektör/yan yolların rol oynaması da muhtemeldir (99, 334). Ras ile ilişkili yan yolların aktivasyonunun rasopatilerde fenotipik heterojenitenin ve bazı bulguların gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (188). Tüm ekzom/genom dizileme gibi güçlü moleküler analizlerin artan kullanılabilirliği ile Ras sinyalizasyonunun karmaşıklığını aydınlayabilecek yeni bilgilerin ortaya konması, rasopatilerin genetik etiolojisinin aydınlatılmasına daha çok katkı sağlayabilecektir.

PTPN11-ilişkili NS'nda boy kısalığı, temel bulgulardan biridir ve büyüme hormonu eksikliğine, nörosekretuar disfonksiyona veya büyüme hormon (GH) direncine bağlı olabileceği düşünülmektedir (335). Büyüme hormonu tedavisi Noonan sendromu için onaylanmış bir tedavidir ve erken dönemde başladığında hastalar fayda görebilmektedirler (335). Noonan sendromlu erkeklerde gonadal disfonksiyon bildirilmiş ve bu durumun inmemiş testisten ziyade primer sertoli hücre disfonksiyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (155). Noonan sendromu tanılı kadınlarda doğurganlık fonksiyonlarının etkilenmesi beklenmemektedir. NS'lu hastaların %10'unda böbrek anomalileri saptanabilmektedir (146). NS hastalarında özellikle infantil dönemde JMML veya JMML benzeri miyeloproliferatif hastalıklar gelişebilmektedir. Sporadik JMML agresif seyrederken, NS hastalarında ortaya çıkan JMML genellikle iyi prognoz göstermekte ve kendiliğinden düzelme eğilimindedir (259). NS ilişkili JMML'nin

doğal seyri ve *PTPN11* genotip-fenotip korelasyonu hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (259). Hastalarda JMML'nin ilerlemesine neden olabilecek diğer genlerde edinilmiş somatik mutasyonlar da gelişmesi hastalığın seyrini etkilemektedir (122). Etkilenen bireylerin çoğunda zeka normal sınırlarda olup, IQ düzeyi genellikle 70 ile 120 arasında değişir (159). Noonan sendromu hastalarını kapsayan kohortlarda, duygudurum bozuklukları, iletişim güçlükleri, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) bildirilmiştir (159, 160). *RIT1* geninde mutasyon olan tüm hastalar NS'nun tipik klinik semptomlarını taşımaktadırlar. Özellikle de hipertelorizm, düşük kulaklar ve düşük ense saç çizgisi ile kısa boyun gibi dismorfik kraniyofasiyal özelliklere sahiptirler (318). *RIT1* ilişkili NS'da kısa boy nispeten nadir bir bulgudur ve şiddetli entelektüel yetersizlik görülme olasılığı daha düşüktür (317, 336).

Costello sendromu ilk olarak ayırt edici yüz yapısı, kısa boy, göreceli makrosefali, cilt fazlalığı, hiperekstensibl eklemler, kıvrıkcık saç, ağız ve burun çevresinde papillomatalar ve gelişimsel gerilik/entelektüel yetersizlik gibi ana bulgularla rapor edilmiştir (204). Diğer rasopatilerle karşılaştırıldığında CS'nun en ayırt edici özelliklerinden biri, yaşamın erken dönemlerinde belirginleşen karakteristik kaba yüz, gevşek cilt, derin palmar ve plantar çizgiler ve eklem laksitesi ile belirgin bir yumuşak doku etkilenimidir. Costello sendromlu bireylerde büyüme yetersizliği genellikle diğer rasopatilerde görülenden daha şiddetlidir ve yetişkin boyunun 135-150 cm arasında değiştiği bildirilmiştir (171). Costello sendromunda yaygın hipotoni, eklem laksitesi, kardiyak defektler, kardiyak hipertrofi (genellikle HKMP), konjenital kalp defekti (genellikle PS) ve aritmi

(supraventriküler taşikardi, kaotik atriyal ritim/multifokal atriyal taşikardi veya ektopik atriyal taşikardi) görülebilmektedir (204). Rölatif veya mutlak makrosefali karakteristiktir ve doğum sonrası serebellar aşırı büyüme, hidrosefali veya Chiari I malformasyonuna sekonder de olabilmektedir (204). Prenatal olarak ise Costello sendromunda polihidramniyoz, kardiyak yapısal anomaliler, aritmi ve makrosefali sıklıkla bildirilen bulgulardır (220). Etkilenmiş fetüslerde erken doğum, yenidoğan döneminde hipotoni, yetersiz beslenme ve solunum sıkıntısı görülebilmektedir (220). Kardiyak aritmi ve yenidoğan hipoglisemisi tüm rasopatilerde önemli bir bulgu olmakla beraber, CS'da daha sık olarak beklenmektedir (220). Costello sendromunda görülen karakteristik el bileklerinin ulnar deviasyonu ve gergin aşıl tendonlarının gelişimi, genellikle diğer rasopatilerde görülmez (337). Bu çalışma serisinde olgu 1'de üst ekstremitelerde fleksiyon kontraktürü mevcuttu.

HRAS iyi bilinen bir onkogendir ve sporadik somatik tümörlerde, anormal aşırı aktivasyonu sıklıkla saptanmaktadır; bu nedenle germ hattı *HRAS* patojenik varyantı olan bireylerde kanser insidansı diğer rasopatilere göre önemli ölçüde yüksektir (%15) (337). Costello sendromlu bireylerde iyi huylu ve kötü huylu solid tümörler genel popülasyona kıyasla çok daha sık görülür (en sık rabdomyosarkom, nöroblastom, ganglionöroblastom ve mesane kanseri) (271). *HRAS* geni kodon 12, 13 ve 61'deki mutasyonlar, bu kanserlerde somatik olarak sıklıkla tanımlanan mutasyonlardır (179). Olgu 1'de saptanan Gln61Arg mutasyonu kanserlerde bilinen bir mutasyondur. Tanımlanmış bir *HRAS* patojenik varyantı olan bireylerin yaşamı boyunca genel tümör geliştirme insidansı yaklaşık olarak %15'tir (204). Erken çocukluk dönemi tümörleri olan rabdomyosarkom ve nöroblastom, CS'da

genel popülasyonla benzer yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Bunun tersine, genel popülasyonda daha yaşlı yetişkinlerde (%70'i 65 yaş sonrası) görülen mesane karsinomu, Costello sendromlu adolesanlarda bulunabilir (204). Costello sendromu ile adolosan mesane karsinom arasındaki ilişki, diğer genetik sendromlarda adolosan döneminde raporlanmamış bir özelliktir. Sekiz ila on yaşına kadar her üç ila altı ayda bir rabdomyosarkom ve nöroblastom taraması için abdominal ve pelvik ultrasonografi ile takip; on yaşından itibaren mesane kanseri taraması amacıyla hematüri bulgusu açısından yıllık idrar tahlili yapılması önerilmekle (204) beraber, bu güne kadar mesane kanseri açısından hiçbir tarama yaklaşımının faydası tam olarak gösterilmemiştir. Erken tümör tespiti için en önemli unsur, artan kanser riski konusunda ebeveynlerin ve doktorların bilinçli olmasıdır (338). Bugüne kadar CS'unun, probandların çoğunda *de novo* patojenik bir varyant neticesinde ortaya çıktığı bildirilmiştir (249). Bu durumun ileri ebeveyn yaşı ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (339). Çalışmalarda CS'nda ortalama baba yaşı (38-43 yaş arası) önemli ölçüde ileri olarak bildirilmiştir (179). Bu çalışmadaki CS'lu olgu 1'de baba yaşı 29'dur. *De novo* patojenik varyantların tamamı olmasa da çoğu paternal germ hattında ortaya çıkmaktadır (340). Hafif CS fenotipi olan iki ailede vertikal geçiş bildirilmiştir (341, 342). Olgu 1'de saptanan varyant için anne normal bulunmuş, babadan ise çalışma planlanmıştır. Parental muayene belirgin olarak probanddaki varyantın *de novo* olduğunu düşündürse de probandın ebeveynleri için moleküler genetik test yapılması önerilmektedir (204). Rasopatilerde eğer probandda bulunan patojenik varyant ebeveynlerin periferik kan DNA'sında tespit edilmezse, bu durum nadir olan somatik/gonadal mozaizizmleri dışlamamaktadır. Bu durumda

ebeveynler klinik olarak etkilenmese de gonadal mozaizizm olasılığı nedeniyle, probandın kardeşlerinde nüks riski genel popülasyondan biraz daha fazla olabilecektir (*PTPN11* c.922A>G patojenik varyantı için germ hattı mozaizizmi bildirilmiştir) (165). Germ hattı mozaizizmi riski göz önünde bulundurularak, ailede etkilenmiş NS'lu birey varlığında, sonraki gebeliklerde prenatal moleküler tanı mutlaka önerilmelidir.

Noonan sendromu tanısı konan bireylerin yaklaşık olarak %30 ila %75'i etkilenmiş bir ebeveyne sahiptir; NS'da penetrans %100'e yakındır ancak değişken ekspresyon ile ilişkili olduğundan ve hastalığın belirtileri sıklıkla silik/hafif olduğundan, etkilenen birçok yetişkine ancak daha belirgin şekilde etkilenen bir çocuk sahibi olmalarından sonra tanı konulabilmektedir (164). Rasopati grubundaki hastalıkların klinik olarak heterojen olması, fenotipik ifadenemesinin oldukça değişken olması ve yaşla birlikte bulguların değişmesi nedeniyle klinik tanısı oldukça zordur. Probandda NS'na neden olan patojenik varyant biliniyorsa her iki ebeveyn için moleküler genetik test önerilmektedir. Çalışmalarda, NS'nda hastalık yapıcı varyantın anneden aktarımının, babaya göre daha sık olduğu gösterilmiştir, bunun nedeninin de olasılıkla etkilenimi olan erkek bireylerde kriptorşidizme bağlı infertilite olabileceği öne sürülmüştür (343). Moleküler neden bilinmiyorsa; ebeveynlerde NS'nun klinik bulgularına yönelik kapsamlı bir fizik muayene önerilmektedir. Ebeveynlerden biri etkilenmişse kardeşler için risk %50'dir. Klinik bulgular aile içinde önemli derecede değişkenlik gösterebileceğinden, kardeşler etkilenmiş diğer kardeşler ile benzer bulgulara sahip olmayabilir (164). Noonan

sendromunun tanısının, yetişkinlerde zor olabileceği her zaman akılda tutulmalı, ebeveynler de genetik olarak incelenmelidir.

Rasopatilerle ilişkili yollarda yer alan proteinlerin işlevini değiştiren/düzenleyen klinik çalışma denemeleri, özellikle komplikasyonların ve ciddi bulguların kontrolünün sağlanabilmesi açısından umut vaat etmektedir. MAP2K1/2 inhibitörü trametinib, *RIT1*'de patojenik varyantları ve ilerleyici konjenital HKMP'si olan iki bebekte ruhsatlı kullanım kapsamında denenmiş, her iki vakada da, ilerleyici miyokardiyal hipertrofi ve valvüler obstrüksiyonda gerileme görülmüştür (344). Trametinib, MAP2K1/2 aktivitesinin geri dönüşümlü allosterik inhibitörüdür. Trametinib tedavisi ile retroperitoneal lenfanjiyektazi ve şilotoraksın azaldığı *SOS1*-ilişkili NS'lu 14 yaşında bir birey bildirmiştir (345). Akondroplazi için kullanıma giren vosoritide'in, NS için tedavi denemeleri devam etmektedir. Vosoritid, natriüretik peptid reseptörü-B adı verilen ve kemik büyümesini düzenleyen spesifik bir reseptöre bağlanarak etki etmektedir. İlerleyen zamanlarda yeni klinik çalışmalar ile birlikte rasopatilerin tedavisi açısından elde edilecek verilerin artması, rasopatilerde moleküler tanının önemini artıracak ve hasta yönetimini önemli derecede değiştirebilecektir.

Prenatal kohortumuzda patojen olarak saptanan varyantların Ras-MAPK yolağında yüksek aktivasyona neden olan varyantlar olması nedeniyle, rasopatilerde görülen güçlü aktivasyon ile ilişkili mutasyonların embriyonal/fetal gelişimle uyumlu olmadığı veya zayıf uyumlu olduğu ve neredeyse sadece somatik olarak kanserlerde gözlemlendiği veya ciddi fenotiplerle ilişkili olduğu değerlendirilmiştir (298). Rasopatilerde genel olarak tümör yatkınlığı bilinen bir

durumdur, ancak *RIT1* genindeki germ hattı mutasyonlarının NS’nda tümör oluşumuna neden olup olmadığının yorumlanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

- Bu çalışma prenatal ultrasonografide lenfatik displazi (kistik higroma ve/veya artmış NT ve/veya artmış NF) nedeniyle rasopati panel analizi yapılan 20 olguyu kapsamaktadır. Bu panel ile rasopati sendromlarıyla ilişkilendirilen *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1* ve *SPRED1* genleri yeni nesil dizileme yöntemi ile analiz edilmiştir. Üç olguda üç ayrı gende patojen varyant saptanmış olup, bunlar *HRAS* geninde c.182A>G p.(Gln61Arg), *PTPN11* geninde c.211T>C p.(Phe71Leu) ve *RIT1* geninde c.270G>A p.(Met90Ile) varyantlarıdır. Çalışma Ras-MAPK yolağında görev alan proteinleri kodlayan genlerdeki kanser ile ilişkilendirilmiş varyantların, germ hattında kalıtıldığında rasopati hastalık grubunda yer alan sendromların ciddi ve şiddetli prenatal fenotipine neden olduğu hipotezini desteklemektedir.
- Kısıtlı süre ve bütçe azlığı nedeniyle bu çalışma daha sınırlı olguda yapılabilmektedir. Olgularda saptanan klinik önemi bilinmeyen varyantların ebeveyn analizi ile değerlendirilmesi bu çalışmanın kapsamı dışında olduğu

için (bütçe ve zaman kısıtlılığı nedeniyle), bu varyantların *de novo* veya ailesel olup olmadığı değerlendirilememiştir.

- Prenatal lenfatik displazilerde rutin uygulamada algoritmik yaklaşım olarak, öncelikle konvansiyonel ve moleküler karyotiplemenin yapılması, bu analizler normal olarak değerlendirildiğinde ise rasopati sendromlarının moleküler olarak araştırılması önceliklidir. Çalışmanın başında değerlendirilen 35 olgunun on üçünde sitogenetik analiz ile anöploidi, ikisinde de array-CGH analizi ile patojen CNV saptandığından, rasopati panel analizi ile ilişkili çalışmaya 20 olgu ile devam edilmiştir. Literatürde array-CGH analizinde delesyonlar ve/veya duplikasyonlar saptanan nadir lenfatik displazili olgular bildirilmekle beraber, bu çalışmanın dışlanma kriter grubundaki olgularda rasopati ile ilişkili genlerde delesyon ve/veya duplikasyon mevcut değildir.
- Çalışmamız, prenatal dönemde rasopati genlerinin analizinin önemini ve prenatal başlangıçlı rasopati vakalarında genotip-fenotip ilişkisini vurgulamaktadır. Ayrıca bu çalışma, yeni nesil dizileme yöntemi ile yapılan tüm ekzom/genom dizilemenin rasopatilerde yaygın kullanımının daha fazla genin eş zamanlı olarak analizinin sağlanabilmesi, böylece NS'nun hafif-ağır formlarının prenatal fenotipinin daha iyi tanımlanmasına katkıda bulunulabileceğini göstermesi açısından değerlidir.

7. KAYNAKLAR

1. Scott A, Di Giosaffatte N, Pinna V, Daniele P, Corno S, D'Ambrosio V, et al. When to test fetuses for RASopathies? Proposition from a systematic analysis of 352 multicenter cases and a postnatal cohort. *Genetics in Medicine*. 2021;23(6):1116-24.
2. Bellini C, Rutigliani M, Boccardo FM, Bonioli E, Campisi C, Grillo F, et al. Nuchal translucency and lymphatic system maldevelopment. 2009.
3. Haak MC, Bartelings MM, Jackson DG, Webb S, Vugt JMv, Groot ACG-d. Increased nuchal translucency is associated with jugular lymphatic distension. *Human reproduction*. 2002;17(4):1086-92.
4. de Mooij YM, van den Akker NM, Bekker MN, Bartelings MM, van Vugt JM, Gittenberger-de Groot AC. Aberrant lymphatic development in euploid fetuses with increased nuchal translucency including Noonan syndrome. *Prenatal diagnosis*. 2011;31(2):159-66.
5. Baldassarre G, Mussa A, Dotta A, Banaudi E, Forzano S, Marinosci A, et al. Prenatal features of Noonan syndrome: prevalence and prognostic value. *Prenatal diagnosis*. 2011;31(10):949-54.
6. Bekker MN, van den Akker NM, Bartelings MM, Arkesteijn JB, Fischer SG, Polman JA, et al. Nuchal edema and venous-lymphatic phenotype disturbance in human fetuses and mouse embryos with aneuploidy. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2006;13(3):209-16.
7. Nicolaides K, Azar G, Snijders R, Gosden C. Fetal nuchal oedema: associated malformations and chromosomal defects. *Fetal diagnosis and therapy*. 1992;7(2):123-31.
8. Molina FS, Avgidou K, Kagan KO, Poggi S, Nicolaides KH. Cystic hygromas, nuchal edema, and nuchal translucency at 11–14 weeks of gestation. *Obstetrics & Gynecology*. 2006;107(3):678-83.
9. Michailidis G, Economides D. Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome in karyotypically normal fetuses. *Ultrasound in*

- Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 2001;17(2):102-5.
10. Wright D, Kagan K, Molina F, Gazzoni A, Nicolaides K. A mixture model of nuchal translucency thickness in screening for chromosomal defects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2008;31(4):376-83.
 11. Cho J, Kim K, Lee Y, Toi A. Measurement of nuchal skin fold thickness in the second trimester: influence of imaging angle and fetal presentation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2005;25(3):253-7.
 12. Malone FD, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade GR, Berkowitz RL, et al. First-trimester septated cystic hygroma: prevalence, natural history, and pediatric outcome. *Obstetrics & Gynecology*. 2005;106(2):288-94.
 13. Noia G, Maltese PE, Zampino G, D'Errico M, Cammalleri V, Convertini P, et al. Cystic hygroma: A preliminary genetic study and a short review from the literature. *Lymphatic Research and Biology*. 2019;17(1):30-9.
 14. Schreurs L, Lannoo L, De Catte L, Van Schoubroeck D, Devriendt K, Richter J. First trimester cystic hygroma colli: retrospective analysis in a tertiary center. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2018;231:60-4.
 15. Yoshida S, Miura K, Yamasaki K, Miura S, Shimada T, Tanigawa T, et al. Does increased nuchal translucency indicate a fetal abnormality? A retrospective study to clarify the clinical significance of nuchal translucency in Japan. *Journal of human genetics*. 2008;53:688-93.
 16. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *British medical journal*. 1992;304(6831):867-9.
 17. Bilardo C, Timmerman E, Pajkrt E, Van Maarle M. Increased nuchal translucency in euploid fetuses—what should we be telling the parents? *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2010;30(2):93-102.
 18. Cuckle H, Platt L, Thornburg L, Bromley B, Fuchs K, Abuhamad A, et al. Nuchal Translucency Quality Review (NTQR) program: first one and half million results. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015;45(2):199-204.
 19. Avgidou K, Papageorgiou A, Bindra R, Spencer K, Nicolaides KH. Prospective first-trimester screening for trisomy 21 in 30,564 pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2005;192(6):1761-7.
 20. Souka AP, Krampl E, Bakalis S, Heath V, Nicolaides KH. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2001;18(1):9-17.

21. Aagaard-Tillery KM, Malone FD, Nyberg DA, Porter TF, Cuckle HS, Fuchs K, et al. Role of second-trimester genetic sonography after Down syndrome screening. *Obstetrics and gynecology*. 2009;114(6):1189.
22. Salomon L, Bernard J, Taupin P, Benard C, Ville Y. Relationship between nuchal translucency at 11–14 weeks and nuchal fold at 20–24 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2001;18(6):636-7.
23. Benacerraf B. The significance of the nuchal fold in the second trimester fetus. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2002;22(9):798-801.
24. Chen H-Y, Zheng J-Q, Zhang H-P. A case report of Turner syndrome associated with fetal nuchal cystic hygroma and bilateral syndactyly of the hands and feet. *Italian Journal of Pediatrics*. 2019;45:1-3.
25. Benacerraf B, Frigoletto Jr F. Prenatal sonographic diagnosis of isolated congenital cystic hygroma, unassociated with lymphedema or other morphologic abnormality. *Journal of ultrasound in medicine*. 1987;6(2):63-6.
26. Noia G, Pellegrino M, Masini L, Visconti D, Manzoni C, Chiaradia G, et al. Fetal cystic hygroma: the importance of natural history. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2013;170(2):407-13.
27. Sherman BE, Kendall K. A unique case of the rapid onset of a large cystic hygroma in the adult. *American journal of otolaryngology*. 2001;22(3):206-10.
28. Alpman A, Cogulu O, Akgul M, Arıkan EA, Durmaz B, Karaca E, et al. Prenatally diagnosed Turner syndrome and cystic hygroma: incidence and reasons for referrals. *Fetal diagnosis and therapy*. 2009;25(1):58-61.
29. Özcan HÇ, Uğur MG, Balat Ö, Sucu S, Bayramoğlu Tepe N, Öztürk E, et al. Analysis of cystic hygroma diagnosed in the prenatal period: 5-years' experience at a tertiary hospital in Southeastern Turkey. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2019;32(11):1800-5.
30. Graesslin O, Derniaux E, Alanio E, Gaillard D, Vitry F, Quéreux C, et al. Characteristics and outcome of fetal cystic hygroma diagnosed in the first trimester. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2007;86(12):1442-6.
31. Kharrat R, Yamamoto M, Roume J, Couderc S, Vialard F, Hillion Y, et al. Karyotype and outcome of fetuses diagnosed with cystic hygroma in the first trimester in relation to nuchal translucency thickness. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2006;26(4):369-72.
32. Scholl J, Chasen ST. First trimester cystic hygroma: does early detection matter? *Prenatal Diagnosis*. 2016;36(5):432-6.
33. Gallagher PG, Mahoney MJ, Gosche JR, editors. *Cystic hygroma in the fetus and newborn*. Seminars in Perinatology; 1999: Elsevier.
34. Bakker M, Pajkrt E, Bilardo CM. Increased nuchal translucency with normal karyotype and anomaly scan: what next? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2014;28(3):355-66.

35. Haak MC, van Vugt JM. Pathophysiology of increased nuchal translucency: a review of the literature. *Human reproduction update*. 2003;9(2):175-84.
36. Haak M, Twisk J, Bartelings M, Gittenberger-de Groot A, Van Vugt J. First-trimester fetuses with increased nuchal translucency do not show altered intracardiac flow velocities. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2005;25(3):246-52.
37. Carvalho J. The fetal heart or the lymphatic system or...? The quest for the etiology of increased nuchal translucency. *Wiley Online Library*; 2005. p. 215-20.
38. Von Kaisenberg C, Brand-Saberi B, Christ B, Vallian S, Farzaneh F, Nicolaides K. Collagen type VI gene expression in the skin of trisomy 21 fetuses. *Obstetrics & Gynecology*. 1998;91(3):319-23.
39. Von Kaisenberg C, Prols F, Nicolaides K, Maass N, Meinhold-Heerlein I, Brand-Saberi B. Glycosaminoglycans and proteoglycans in the skin of aneuploid fetuses with increased nuchal translucency. *Human Reproduction*. 2003;18(12):2544-61.
40. Sebire N, Snijders R, Davenport M, Greenough A, Nicolaides K. Fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks' gestation and congenital diaphragmatic hernia. *Obstetrics & Gynecology*. 1997;90(6):943-6.
41. Hyett J, Moscoso G, Papapanagiotou G, Perdu M, Nicolaides K. Abnormalities of the heart and great arteries in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 1996;7(4):245-50.
42. Rudolph AM, Heymann MA. Cardiac output in the fetal lamb: the effects of spontaneous and induced changes of heart rate on right and left ventricular output. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1976;124(2):183-92.
43. Bekker MN, van den Akker NM, de Mooij YM, Bartelings MM, van Vugt JM, Gittenberger-de Groot AC. Jugular lymphatic maldevelopment in Turner syndrome and trisomy 21: different anomalies leading to nuchal edema. *Reproductive Sciences*. 2008;15(3):295-304.
44. Bekker M, Haak M, Rekoert-Hollander M, Twisk J, Van Vugt J. Increased nuchal translucency and distended jugular lymphatic sacs on first-trimester ultrasound. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2005;25(3):239-45.
45. Celentano C, Di Donato NG, Prefumo F, Rotmensch S. Early resolution of increased nuchal translucency in a fetus with trisomy 18. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2003;189(3):880-1.
46. Clark EB. Neck web and congenital heart defects: A pathogenic association in 45 X-O Turner syndrome? *Teratology*. 1984;29(3):355-61.
47. de Mooij YM, van den Akker NM, Bekker MN, Bartelings MM, Wisse LJ, van Vugt JM, et al. Abnormal Shh and FOXC2 expression correlates with aberrant lymphatic development in human fetuses with increased nuchal

- translucency. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2009;29(9):840-6.
48. Hyett J, Moscoso G, Nicolaides K. Increased nuchal translucency in trisomy 21 fetuses: relationship to narrowing of the aortic isthmus. *Human Reproduction*. 1995;10(11):3049-51.
 49. Hyett J, Moscoso G, Nicolaides K. Abnormalities of the heart and great arteries in first trimester chromosomally abnormal fetuses. *American journal of medical genetics*. 1997;69(2):207-16.
 50. Hyett J, Perdu M, Sharland G, Snijders R, Nicolaides K. Increased nuchal translucency at 10—14 weeks of gestation as a marker for major cardiac defects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 1997;10(4):242-6.
 51. Perlitz Y, Haddad S, Matilsky M. Increased nuchal translucency is associated with asphyxiating thoracic dysplasia. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: the Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 1997;10(4):297-8.
 52. Brand-Saberi B, Epperlein H, Romanos G, Christ B. Distribution of extracellular matrix components in nuchal skin from fetuses carrying trisomy 18 and trisomy 21. *Cell and tissue research*. 1994;277:465-75.
 53. Brand-Saberi B, Flöel H, Christ B, Schulte-Vallentin M, Schindler H. Alterations of the fetal extracellular matrix in the nuchal oedema of Down's syndrome. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 1994;176(6):539-47.
 54. Böhländt S, Von Kaisenberg C, Wewetzer K, Christ B, Nicolaides K, Brand-Saberi B. Hyaluronan in the nuchal skin of chromosomally abnormal fetuses. *Human Reproduction*. 2000;15(5):1155-8.
 55. Von Kaisenberg C, Krenn V, Ludwig M, Nicolaides K, Brand-Saberi B. Morphological classification of nuchal skin in human fetuses with trisomy 21, 18, and 13 at 12—18 weeks and in a trisomy 16 mouse. *Anatomy and embryology*. 1998;197:105-24.
 56. Nicolaides KH, Heath V, Cicero S. Increased fetal nuchal translucency at 11—14 weeks. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2002;22(4):308-15.
 57. Brown R, Nicolaides K. Increased fetal nuchal translucency: possible association with esophageal atresia. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2000;15(6):531-2.
 58. Souka A, Snijders R, Novakov A, Soares W, Nicolaides K. Defects and syndromes in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 1998;11(6):391-400.
 59. Maymon R, Zimerman A, Weinraub Z, Herman A, Cuckle H. Correlation between nuchal translucency and nuchal skin-fold measurements in Down syndrome and unaffected fetuses. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology:*

The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 2008;32(4):501-5.

60. Pandya P, Snijders R, Johnson S, Nicolaides K. Natural history of trisomy 21 fetuses with increased nuchal translucency thickness. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 1995;5(6):381-3.
61. Sinajon P, Chitayat D, Roifman M, Wasim S, Carmona S, Ryan G, et al. Microarray and RASopathy-disorder testing in fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2020;55(3):383-90.
62. Baer RJ, Norton ME, Shaw GM, Flessel MC, Goldman S, Currier RJ, et al. Risk of selected structural abnormalities in infants after increased nuchal translucency measurement. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2014;211(6):675. e1-. e19.
63. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004;191(1):45-67.
64. Scholl J, Durfee SM, Russell MA, Heard AJ, Iyer C, Alammari R, et al. First-trimester cystic hygroma: relationship of nuchal translucency thickness and outcomes. *Obstetrics & Gynecology*. 2012;120(3):551-9.
65. Hyett J, Perdu M, Sharland G, Snijders R, Nicolaides KH. Using fetal nuchal translucency to screen for major congenital cardiac defects at 10-14 weeks of gestation: population based cohort study. *Bmj*. 1999;318(7176):81-5.
66. Goldstein I, Weizman B, Nizar K, Weiner Z. The nuchal translucency examination leading to early diagnosis of structural fetal anomalies. *Early human development*. 2014;90(2):87-91.
67. Weiner Z, Goldstein I, Bombard A, Applewhite L, Itzkovits-Eldor J. Screening for structural fetal anomalies during the nuchal translucency ultrasound examination. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2007;197(2):181. e1-. e5.
68. Le Lous M, Bouhanna P, Colmant C, Rozenberg P, Quibel T. The performance of an intermediate 16th-week ultrasound scan for the follow-up of euploid fetuses with increased nuchal translucency. *Prenatal Diagnosis*. 2016;36(2):148-53.
69. Lund I, Christensen R, Petersen O, Vogel I, Vestergaard E. Chromosomal microarray in fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015;45(1):95-100.
70. Hillman S, McMullan D, Hall G, Togneri F, James N, Maher E, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2013;41(6):610-20.
71. Grande M, Jansen F, Blumenfeld Y, Fisher A, Odibo A, Haak M, et al. Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015;46(6):650-8.
72. Maya I, Yacobson S, Kahana S, Yeshaya J, Tenne T, Agmon-Fishman I, et al. Cut-off value of nuchal translucency as indication for chromosomal

- microarray analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2017;50(3):332-5.
73. Snijders R, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides K. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *The Lancet*. 1998;352(9125):343-6.
 74. Souka AP, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2005;192(4):1005-21.
 75. Mastromoro G, Guadagnolo D, Khaleghi Hashemian N, Bernardini L, Giancotti A, Piacentini G, et al. A Pain in the Neck: Lessons Learnt from Genetic Testing in Fetuses Detected with Nuchal Fluid Collections, Increased Nuchal Translucency versus Cystic Hygroma—Systematic Review of the Literature, Meta-Analysis and Case Series. *Diagnostics*. 2022;13(1):48.
 76. Pajkrt E, Mol BW, Bleker OP, Bilardo CM. Pregnancy outcome and nuchal translucency measurements in fetuses with a normal karyotype. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 1999;19(12):1104-8.
 77. Gedikbasi A, Oztarhan K, Aslan G, Demirali O, Akyol A, Sargin A, et al. Multidisciplinary approach in cystic hygroma: prenatal diagnosis, outcome, and postnatal follow up. *Pediatrics International*. 2009;51(5):670-7.
 78. Li L, Fu F, Li R, Liu Z, Liao C. Prenatal diagnosis and pregnancy outcome analysis of thickened nuchal fold in the second trimester. *Medicine*. 2018;97(46).
 79. Bethune M. Literature review and suggested protocol for managing ultrasound soft markers for Down syndrome: thickened nuchal fold, echogenic bowel, shortened femur, shortened humerus, pyelectasis and absent or hypoplastic nasal bone. *Australasian radiology*. 2007;51(3):218-25.
 80. Lee BH, Yoo H-W. Noonan syndrome and RASopathies: clinical features, diagnosis and management. *Journal of Genetic Medicine*. 2019;16(1):1-9.
 81. Odibo AO, Sehdev HM, Gerkowicz S, Stamilio DM, Macones GA. Comparison of the efficiency of second-trimester nasal bone hypoplasia and increased nuchal fold in Down syndrome screening. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2008;199(3):281. e1-. e5.
 82. Kazemi K, Adibi A, Hovsepian S. Reference values of nuchal fold thickness in an Iranian population sample. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2018;23.
 83. Locatelli A, Piccoli MG, Vergani P, Mariani E, Ghidini A, Mariani S, et al. Critical appraisal of the use of nuchal fold thickness measurements for the prediction of Down syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2000;182(1):192-7.
 84. Bromley B, Benacerraf BR. The resolving nuchal fold in second trimester fetuses: not necessarily reassuring. *Journal of ultrasound in medicine*. 1995;14(3):253-5.
 85. Goumy C, Bonnet-Dupeyron MN, Cherasse Y, Laurichesse H, Jaffray JY, Lacroute G, et al. Chorionic villus sampling (CVS) and fluorescence in situ

- hybridization (FISH) for a rapid first-trimester prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2004;24(4):249-56.
86. Öztürk FH, Öcal FD, Erol SA, Yakut K, Öztürk M, Oguz Y, et al. Fetal genetic diagnosis by chorionic villus sampling: evaluation of the five-year experience from a single center. *Fetal and Pediatric Pathology*. 2021;40(4):281-9.
 87. Morgan T, Tan CD, Della-Torre M, Jackson-Bey T, DiGiovanni L, Enakpene CA. Determinant of prenatal diagnostic testing among women with increased risk of fetal aneuploidy and genetic disorders. *American journal of perinatology*. 2021.
 88. De Wit M, Srebniak M, Govaerts L, Van Opstal D, Galjaard R, Go A. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2014;43(2):139-46.
 89. Howarth ES, Draper ES, Budd JL, Konje JC, Clarke M, Kurinczuk JJ. Population-based study of the outcome following the prenatal diagnosis of cystic hygroma. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2005;25(4):286-91.
 90. Sanhal C, Mendilcioglu I, Ozekinci M, Yakut S, Merdun Z, Simsek M, et al. Prenatal management, pregnancy and pediatric outcomes in fetuses with septated cystic hygroma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2014;47:799-803.
 91. Vičić A, Hafner T, Vlatković IB, Korać P, Habek D, Stipoljev F. Prenatal diagnosis of Down syndrome: A 13-year retrospective study. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2017;56(6):731-5.
 92. Kim YE, Baek ST. Neurodevelopmental aspects of RASopathies. *Molecules and Cells*. 2019;42(6):441.
 93. Rauen KA. The rasopathies. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013;14:355-69.
 94. De Vigan C, Baena N, Cariatì E, Clementi M, Stoll C, Group EW, editors. Contribution of ultrasonographic examination to the prenatal detection of chromosomal abnormalities in 19 centres across Europe. *Annales de genetique*; 2001: Elsevier.
 95. Aoki Y, Niihori T, Inoue S-i, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. *Journal of human genetics*. 2016;61(1):33-9.
 96. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*. 2005;118(5):843-6.
 97. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 2007;129(5):865-77.
 98. Ségalliny AI, Tellez-Gabriel M, Heymann M-F, Heymann D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *Journal of bone oncology*. 2015;4(1):1-12.
 99. Tidyman WE, Rauen KA. Expansion of the RASopathies. *Current genetic medicine reports*. 2016;4:57-64.

100. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small gtpases by gefs, gaps, and gdis. *Physiological reviews*. 2013;93(1):269-309.
101. Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982;79(16):4848-52.
102. Shimizu K, Goldfarb M, Perucho M, Wigler M. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1983;80(2):383-7.
103. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001;294(5545):1299-304.
104. Wittinghofer A, Vetter IR. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annual review of biochemistry*. 2011;80:943-71.
105. Parker MI, Meyer JE, Golemis EA, Dunbrack Jr RL. Delineating the RAS conformational landscape. *Cancer research*. 2022;82(13):2485.
106. Enjalbert A, Le Pechon-Vallee C. Protein kinases. 2003.
107. Lowes VL, Ip NY, Wong YH. Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals*. 2002;11(1):5-19.
108. Robinson DR, Wu Y-M, Lin S-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 2000;19(49):5548-57.
109. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-related cancer*. 2001;8(3):161-73.
110. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-34.
111. Hubbard SR. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in biophysics and molecular biology*. 1999;71(3-4):343-58.
112. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Kaiser C, Krieger M, Scott MP, et al. *Molecular cell biology*: Macmillan; 2008.
113. Choudhary C, Mann M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(6):427-39.
114. Roskoski Jr R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*. 2012;66(2):105-43.
115. Dikic I, Giordano S. Negative receptor signalling. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(2):128-35.
116. Uhlitz F, Sieber A, Wyler E, Fritsche-Guenther R, Meisig J, Landthaler M, et al. An immediate-late gene expression module decodes ERK signal duration. *Molecular systems biology*. 2017;13(5):928.
117. Marmor MD, Yarden Y. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene*. 2004;23(11):2057-70.
118. Ney G, Gross A, Livinski A, Kratz CP, Stewart DR, editors. *Cancer incidence and surveillance strategies in individuals with RASopathies*. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2022: Wiley Online Library.

119. Villani A, Greer M-LC, Kalish JM, Nakagawara A, Nathanson KL, Pajtler KW, et al. Recommendations for cancer surveillance in individuals with RASopathies and other rare genetic conditions with increased cancer risk. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(12):e83-e90.
120. Zenker M. Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors. *Current opinion in pediatrics*. 2011;23(4):443-51.
121. Kratz CP, Rapisuwon S, Reed H, Hasle H, Rosenberg PS, editors. *Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes*. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics; 2011: Wiley Online Library.
122. Niemeyer CM. RAS diseases in children. *Haematologica*. 2014;99(11):1653.
123. Riller Q, Rieux-Laucat F. RASopathies: from germline mutations to somatic and multigenic diseases. *biomedical journal*. 2021;44(4):422-32.
124. Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL, Chang S, et al. Endogenous oncogenic K-rasG12D stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer cell*. 2004;5(4):375-87.
125. Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, et al. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer cell*. 2003;4(2):111-20.
126. Lasho T, Patnaik MM. Juvenile myelomonocytic leukemia—A bona fide RASopathy syndrome. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2020;33(2):101171.
127. Locatelli F, Niemeyer CM. How I treat juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(7):1083-90.
128. Prior IA, Hancock JF. Compartmentalization of Ras proteins. *Journal of cell science*. 2001;114(9):1603-8.
129. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science*. 2016;129(7):1287-92.
130. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research*. 2012;72(10):2457-67.
131. Noonan JA. Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease. *Midwest Soc Pediat Res*. 1963;63:468-70.
132. Tidyman WE, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current opinion in genetics & development*. 2009;19(3):230-6.
133. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2006;38(3):331-6.
134. Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, et al. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2007;39(1):70-4.
135. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics*. 2007;39(8):1007-12.

136. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2001;29(4):465-8.
137. Kouz K, Lissewski C, Spranger S, Mitter D, Riess A, Lopez-Gonzalez V, et al. Genotype and phenotype in patients with Noonan syndrome and a RIT1 mutation. *Genetics in Medicine*. 2016;18(12):1226-34.
138. Gripp KW, Aldinger KA, Bennett JT, Baker L, Tusi J, Powell-Hamilton N, et al. A novel rasopathy caused by recurrent de novo missense mutations in PPP1CB closely resembles Noonan syndrome with loose anagen hair. *American journal of medical genetics Part A*. 2016;170(9):2237-47.
139. Motta M, Sagi-Dain L, Krumbach OH, Hahn A, Peleg A, German A, et al. Activating MRAS mutations cause Noonan syndrome associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*. 2020;29(11):1772-83.
140. Takenouchi T, Sakamoto Y, Miwa T, Torii C, Kosaki R, Kishi K, et al. Severe craniosynostosis with Noonan syndrome phenotype associated with SHOC2 mutation: clinical evidence of crosslink between FGFR and RAS signaling pathways. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2014;164(11):2869-72.
141. Capri Y, Flex E, Krumbach OH, Carpentieri G, Cecchetti S, Lißewski C, et al. Activating mutations of RRAS2 are a rare cause of Noonan syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2019;104(6):1223-32.
142. Yamamoto GL, Agüena M, Gos M, Hung C, Pilch J, Fahiminiya S, et al. Rare variants in SOS2 and LZTR1 are associated with Noonan syndrome. *Journal of medical genetics*. 2015;52(6):413-21.
143. Motta M, Pannone L, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Radio FC, Cecchetti S, et al. Enhanced MAPK1 function causes a neurodevelopmental disorder within the RASopathy clinical spectrum. *The American Journal of Human Genetics*. 2020;107(3):499-513.
144. Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, et al. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *The American Journal of Human Genetics*. 2006;78(2):279-90.
145. Sznajder Y, Keren B, Baumann C, Pereira S, Alberti C, Elion J, et al. The spectrum of cardiac anomalies in Noonan syndrome as a result of mutations in the PTPN11 gene. *Pediatrics*. 2007;119(6):e1325-e31.
146. Sharland M, Burch M, McKenna W, Paton M. A clinical study of Noonan syndrome. *Archives of disease in childhood*. 1992;67(2):178-83.
147. Allanson J, Hall J, Hughes H, Preus M, Witt R, Opitz JM, et al. Noonan syndrome: the changing phenotype. *American journal of medical genetics*. 1985;21(3):507-14.
148. Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD. Noonan syndrome. *The Lancet*. 2013;381(9863):333-42.
149. Marino B, Digilio MC, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B. Congenital heart diseases in children with Noonan syndrome: an expanded cardiac

- spectrum with high prevalence of atrioventricular canal. *The Journal of pediatrics*. 1999;135(6):703-6.
150. Shaw AC, Kalidas K, Crosby AH, Jeffery S, Patton MA. The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study. *Archives of disease in childhood*. 2007;92(2):128-32.
 151. Qiu WW, Yin SS, Stucker FJ. Audiologic manifestations of Noonan syndrome. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 1998;118(3):319-23.
 152. Binder G, Neuer K, Ranke M, Wittekindt N. PTPN11 mutations are associated with mild growth hormone resistance in individuals with Noonan syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(9):5377-81.
 153. Serra-Nédélec ADR, Edouard T, Tréguer K, Tajan M, Araki T, Dance M, et al. Noonan syndrome-causing SHP2 mutants inhibit insulin-like growth factor 1 release via growth hormone-induced ERK hyperactivation, which contributes to short stature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(11):4257-62.
 154. Romano AA, Dana K, Bakker B, Davis DA, Hunold JJ, Jacobs J, et al. Growth response, near-adult height, and patterns of growth and puberty in patients with Noonan syndrome treated with growth hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(7):2338-44.
 155. Marcus K, Sweep C, van der Bürgt I, Noordam C. Impaired Sertoli cell function in males diagnosed with Noonan syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2008;21(11):1079-84.
 156. Tartaglia M, Gelb BD. Germ-line and somatic PTPN11 mutations in human disease. *European journal of medical genetics*. 2005;48(2):81-96.
 157. Sharland M, Patton M, Talbot S, Chitolie A, Bevan D. Coagulation-factor deficiencies and abnormal bleeding in Noonan's syndrome. *The Lancet*. 1992;339(8784):19-21.
 158. Miller M, Motulsky AC. Noonan syndrome in an adult family presenting with chronic lymphedema. *The American journal of medicine*. 1978;65(2):379-83.
 159. Cesarini L, Alfieri P, Pantaleoni F, Vasta I, Cerutti M, Petrangeli V, et al. Cognitive profile of disorders associated with dysregulation of the RAS/MAPK signaling cascade. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009;149(2):140-6.
 160. Verhoeven W, Wingbermühle E, Egger J, Van der Burgt I, Tuinier S. Noonan syndrome: psychological and psychiatric aspects. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2008;146(2):191-6.
 161. Cotton JL, Williams RG. Noonan syndrome and neuroblastoma. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 1995;149(11):1280-1.
 162. Sherman CB, Ali-Nazir A, Gonzales-Gomez I, Finlay JL, Dhall G. Primary mixed glioneuronal tumor of the central nervous system in a patient with noonan syndrome: a case report and review of the literature. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2009;31(1):61-4.
 163. Fryssira H, Leventopoulos G, Psoni S, Kitsiou-Tzeli S, Stavrianeas N, Kanavakis E. Tumor development in three patients with Noonan syndrome. *European journal of pediatrics*. 2008;167:1025-31.

164. Roberts AE. Noonan syndrome. 2022.
165. Yoon S-R, Choi S-K, Eboreime J, Gelb BD, Calabrese P, Arnheim N. Age-dependent germline mosaicism of the most common noonan syndrome mutation shows the signature of germline selection. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;92(6):917-26.
166. GeneReviews Ev. 2023 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>].
167. Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2011;25(1):161-79.
168. Lepri F, De Luca A, Stella L, Rossi C, Baldassarre G, Pantaleoni F, et al. SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype–phenotype correlations. *Human mutation*. 2011;32(7):760-72.
169. Zenker M, Lehmann K, Schulz AL, Barth H, Hansmann D, Koenig R, et al. Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations. *Journal of medical genetics*. 2007;44(2):131-5.
170. Schubbert S, Bollag G, Lyubynska N, Nguyen H, Kratz CP, Zenker M, et al. Biochemical and functional characterization of germ line KRAS mutations. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(22):7765-70.
171. Hennekam RC, editor *Costello syndrome: an overview*. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2003: Wiley Online Library.
172. Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, et al. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *The American Journal of Human Genetics*. 2006;79(1):129-35.
173. Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, Horn D, et al. A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2010;42(1):27-9.
174. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, et al. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science*. 2006;311(5765):1287-90.
175. Altmüller F, Lissewski C, Bertola D, Flex E, Stark Z, Spranger S, et al. Genotype and phenotype spectrum of NRAS germline variants. *European Journal of Human Genetics*. 2017;25(7):823-31.
176. Aggarwal S, Vineeth VS, Das Bhowmik A, Tandon A, Kulkarni A, Narayanan DL, et al. Exome sequencing for perinatal phenotypes: the significance of deep phenotyping. *Prenatal Diagnosis*. 2020;40(2):260-73.
177. Tartaglia M, Zampino G, Gelb B. Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. *Molecular syndromology*. 2010;1(1):2-26.
178. Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, et al. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Human mutation*. 2009;30(4):695-702.

179. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Human mutation*. 2008;29(8):992-1006.
180. Gentile M, Fanelli T, Lepri FR, Gentile A, Orsini P, Volpe P, et al. First prenatal case of Noonan syndrome with SOS2 mutation: Implications of early diagnosis for genetic counseling. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2021;185(6):1897-902.
181. Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, et al. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2013;93(1):173-80.
182. Stuurman KE, Joosten M, van der Burgt I, Elting M, Yntema HG, Meijers-Heijboer H, et al. Prenatal ultrasound findings of rasopathies in a cohort of 424 fetuses: update on genetic testing in the NGS era. *Journal of Medical Genetics*. 2019;56(10):654-61.
183. Piotrowski A, Xie J, Liu YF, Poplawski AB, Gomes AR, Madanecki P, et al. Germline loss-of-function mutations in LZTR1 predispose to an inherited disorder of multiple schwannomas. *Nature genetics*. 2014;46(2):182-7.
184. Lorenzo C, McCormick F. SPRED proteins and their roles in signal transduction, development, and malignancy. *Genes & development*. 2020;34(21-22):1410-21.
185. Motta M, Fasano G, Gredy S, Brinkmann J, Bonnard AA, Simsek-Kiper PO, et al. SPRED2 loss-of-function causes a recessive Noonan syndrome-like phenotype. *The American Journal of Human Genetics*. 2021;108(11):2112-29.
186. Brems H, Legius E. Legius syndrome, an update. *Molecular pathology of mutations in SPRED1*. *The Keio Journal of Medicine*. 2013;62(4):107-12.
187. Brems H, Pasmant E, Van Minkelen R, Wimmer K, Upadhyaya M, Legius E, et al. Review and update of SPRED1 mutations causing Legius syndrome. *Human mutation*. 2012;33(11):1538-46.
188. Higgins EM, Bos JM, Mason-Suares H, Tester DJ, Ackerman JP, MacRae CA, et al. Elucidation of MRAS-mediated Noonan syndrome with cardiac hypertrophy. *Jci Insight*. 2017;2(5).
189. Suzuki H, Takenouchi T, Uehara T, Takasago S, Ihara S, Yoshihashi H, et al. Severe Noonan syndrome phenotype associated with a germline Q71R MRAS variant: a recurrent substitution in RAS homologs in various cancers. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2019;179(8):1628-30.
190. Yu C, Lyn N, Li D, Mei S, Liu L, Shang Q. Clinical analysis of Noonan syndrome caused by RRAS2 mutations and literature review. *European Journal of Medical Genetics*. 2022;104675.
191. Niihori T, Nagai K, Fujita A, Ohashi H, Okamoto N, Okada S, et al. Germline-activating RRAS2 mutations cause Noonan syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2019;104(6):1233-40.
192. Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B, et al. Grouping of multiple-lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the

- PTPN11 gene. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;71(2):389-94.
193. Kontaridis MI, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG. PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(10):6785-92.
 194. Gelb BD, Tartaglia M. Noonan Syndrome with Multiple Lentigines Synonyms: LEOPARD Syndrome, Multiple Lentigines Syndrome. *Gene*. 1:2.
 195. Rodríguez F, Ponce D, Berward FJ, Lopetegui B, Cassorla F, Aracena M. RAF1 variant in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines and craniosynostosis. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2019;179(8):1598-602.
 196. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nature genetics*. 2009;41(9):1022-6.
 197. Mazzanti L, Cacciari E, Cicognani A, Bergamaschi R, Scarano E, Forabosco A. Noonan-like syndrome with loose anagen hair: A new syndrome? *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2003;118(3):279-86.
 198. Zambrano RM, Marble M, Chalew SA, Lilje C, Vargas A, Lacassie Y. Further evidence that variants in PPP1CB cause a rasopathy similar to Noonan syndrome with loose anagen hair. *American journal of medical genetics Part A*. 2016;173(2):565-7.
 199. Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, et al. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;87(2):250-7.
 200. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Verloes A, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nature genetics*. 2006;38(3):294-6.
 201. Rauen KA. Cardiofaciocutaneous Syndrome Synonym: CFC Syndrome.
 202. Bentires-Alj M, Kontaridis MI, Neel BG. Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nature medicine*. 2006;12(3):283-5.
 203. Sol-Church K, Gripp K. The molecular basis of Costello syndrome. *Noonan Syndrome and Related Disorders-A Matter of Deregulated Ras Signaling*. 17: Karger Publishers; 2009. p. 94-103.
 204. Gripp KW, Rauen KA. Costello syndrome. 2019.
 205. Shchelochkov OA, Patel A, Weissenberger GM, Chinault AC, Wiszniewska J, Fernandes PH, et al. Duplication of chromosome band 12q24. 11q24. 23 results in apparent Noonan syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2008;146(8):1042-8.
 206. Graham Jr JM, Kramer N, Bejjani BA, Thiel CT, Carta C, Neri G, et al. Genomic duplication of PTPN11 is an uncommon cause of Noonan syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009;149(10):2122-8.

207. Geckinli B, Aydin H, Karaman A, Delil K, Simsek H, Gokmeydan E, et al. Clinical report of a patient with de novo trisomy 12q23. 1q24. 33. *Genet Couns*. 2015;26(4):393-400.
208. Lissewski C, Kant SG, Stark Z, Schanze I, Zenker M. Copy number variants including RAS pathway genes—How much RASopathy is in the phenotype? *American journal of medical genetics Part A*. 2015;167(11):2685-90.
209. Luo C, Yang YF, Yin BL, Chen JL, Huang C, Zhang WZ, et al. Microduplication of 3p25. 2 encompassing RAF1 associated with congenital heart disease suggestive of Noonan syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012;158(8):1918-23.
210. Chen J-L, Zhu X, Zhao T-L, Wang J, Yang Y-F, Tan Z-P. Rare copy number variations containing genes involved in RASopathies: deletion of SHOC2 and duplication of PTPN11. *Molecular cytogenetics*. 2014;7:1-6.
211. Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nature genetics*. 2007;39(9):1120-6.
212. Pasmant E, Sabbagh A, Hanna N, Masliah-Planchon J, Jolly E, Goussard P, et al. SPRED1 germline mutations caused a neurofibromatosis type 1 overlapping phenotype. *Journal of medical genetics*. 2009;46(7):425-30.
213. Kiuru M, Busam KJ. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory investigation*. 2017;97(2):146-57.
214. Stowe IB, Mercado EL, Stowe TR, Bell EL, Oses-Prieto JA, Hernández H, et al. A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes & development*. 2012;26(13):1421-6.
215. Nowaczyk MJ, Thompson BA, Zeeman S, Moog U, Sanchez-Lara PA, Magoulas PL, et al. Deletion of MAP2K2/MEK2: a novel mechanism for a RASopathy? *Clinical genetics*. 2014;85(2):138-46.
216. Yu S, Graf WD. BRAF gene deletion broadens the clinical spectrum neuro-cardio-facial-cutaneous syndromes. *Journal of Child Neurology*. 2011;26(12):1593-6.
217. Risheg H, Pasion R, Sacharow S, Proud V, Immken L, Schwartz S, et al. Clinical comparison of overlapping deletions of 19p13. 3. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013;161(5):1110-6.
218. Cabrita MA, Christofori G. Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis*. 2008;11:53-62.
219. Bekker MN, Go AT, van Vugt JM. Persistence of nuchal edema and distended jugular lymphatic sacs in Noonan syndrome. *Fetal diagnosis and therapy*. 2007;22(4):245-8.
220. Myers A, Bernstein JA, Brennan ML, Curry C, Esplin ED, Fisher J, et al. Perinatal features of the RASopathies: Noonan syndrome, cardiofaciocutaneous syndrome and Costello syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164(11):2814-21.
221. Lee K, Williams B, Roza K, Ferguson H, David K, Eddleman K, et al. PTPN11 analysis for the prenatal diagnosis of Noonan syndrome in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Clinical genetics*. 2009;75(2):190-4.

222. Leach N, Wilson Mathews D, Rosenblum L, Zhou Z, Zhu H, Heim R. Comparative assessment of gene-specific variant distribution in prenatal and postnatal cohorts tested for Noonan syndrome and related conditions. *Genetics in Medicine*. 2019;21(2):417-25.
223. Hakami F, Dillon MW, Lebo M, Mason-Suares H. Retrospective study of prenatal ultrasound findings in newborns with a Noonan spectrum disorder. *Prenatal Diagnosis*. 2016;36(5):418-23.
224. Pasińska M, Adamczak R, Repczyńska A, Łazarczyk E, Iskra B, Runge AK, et al. Prenatal identification of partial 3q duplication syndrome. *BMC Medical Genomics*. 2019;12:1-8.
225. Pires A, Ramos L, Venâncio M, Rei AI, Castedo S, Saraiva J. Prenatal foetal diagnosis of partial trisomy 3q and monosomy 13p due to a maternal balanced rearrangement. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2005;25(4):292-5.
226. Bird LM, Mascarello JT. Chromosome 2q duplications: case report of a de novo interstitial duplication and review of the literature. *American journal of medical genetics*. 2001;100(1):13-24.
227. HPO Ev. 2023 [Available from: Elektronik veritabanı HPO.
228. LOVD Evt. 2023 [Available from: <https://www.lovd.nl>.
229. AC EvH. 2023 [Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac>.
230. ClinVar Ev. 2023 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>.
231. OMIM Ev. 2023 [Available from: <https://www.omim.org>.
232. Ellard S, Baple EL, Berry I, Forrester N, Turnbull C, Owens M, et al. ACGS best practice guidelines for variant classification 2019. *Assoc Clin Genet Sci*. 2019;1-32.
233. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*. 2015;17(5):405-23.
234. Varsome Evt. 2023 [Available from: <https://varsome.com/>.
235. Genoox EvFb. 2023 [Available from: <https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>.
236. Uniprot Ev. 2023 [Available from: <https://www.uniprot.org/>.
237. Ensembl Evt. 2023 [Available from: <https://www.ensembl.org/index.html>.
238. HPRD Ev. 2023 [Available from: <http://hprd.org/index.html>.
239. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24-6.
240. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Human mutation*. 2016;37(6):564-9.
241. Blast EvtP. 2023 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
242. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American

- College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). Elsevier; 2020.
243. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genetics in Medicine*. 2011;13(7):680-5.
 244. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020;581(7809):434-43.
 245. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic acids research*. 2014;42(D1):D986-D92.
 246. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensembl resources. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;84(4):524-33.
 247. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome research*. 2002;12(6):996-1006.
 248. GnomAD. GnomAD 2022 [Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
 249. Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, et al. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nature genetics*. 2005;37(10):1038-40.
 250. Castel P, Rauen KA, McCormick F. The duality of human oncoproteins: drivers of cancer and congenital disorders. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(7):383-97.
 251. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. 2005.
 252. Rosenberger G, Meien S, Kutsche K. Oncogenic HRAS mutations cause prolonged PI3K signaling in response to epidermal growth factor in fibroblasts of patients with Costello syndrome. *Human Mutation*. 2009;30(3):352-62.
 253. Chakravarty D, Gao J, Phillips S, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: a precision oncology knowledge base. *JCO precision oncology*. 2017;1:1-16.
 254. NCBI EvH-. 2023 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/human>.
 255. Gasper R, Wittinghofer F. The Ras switch in structural and historical perspective. *Biological chemistry*. 2019;401(1):143-63.
 256. Buhman G, Casey O, Zerbe B, Kearney BM, Napoleon R, Kovrigina EA, et al. Analysis of binding site hot spots on the surface of Ras GTPase. *Journal of molecular biology*. 2011;413(4):773-89.
 257. Geyer M, Herrmann C, Wohlgemuth S, Wittinghofer A, Kalbitzer HR. Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling. *Nature structural biology*. 1997;4(9):694-9.
 258. Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillesen-Kaesbach G, et al. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype–

- phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *European journal of human genetics*. 2003;11(2):201-6.
259. Strullu M, Caye A, Lachenaud J, Cassinat B, Gazal S, Fenneteau O, et al. Juvenile myelomonocytic leukaemia and Noonan syndrome. *Journal of medical genetics*. 2014;51(10):689-97.
 260. Loh ML, Vattikuti S, Schubbert S, Reynolds MG, Carlson E, Lieuw KH, et al. Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis. *Blood*. 2004;103(6):2325-31.
 261. Loh M, Reynolds M, Vattikuti S, Gerbing R, Alonzo T, Carlson E, et al. PTPN11 mutations in pediatric patients with acute myeloid leukemia: results from the Children's Cancer Group. *Leukemia*. 2004;18(11):1831-4.
 262. Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nature genetics*. 2003;34(2):148-50.
 263. Bard-Chapeau EA, Li S, Ding J, Zhang SS, Zhu HH, Princen F, et al. Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer cell*. 2011;19(5):629-39.
 264. Chan RJ, Feng G-S. PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. *Blood*. 2007;109(3):862-7.
 265. Lallar M, Bijarnia-Mahay S, Verma I, Mandal K, Puri RD. Mutation and Phenotypic Spectrum of Patients With RASopathies. *Indian pediatrics*. 2021;58:30-3.
 266. Aoi H, Mizuguchi T, Suzuki T, Makino S, Yamamoto Y, Takeda J, et al. Whole exome sequencing of fetal structural anomalies detected by ultrasonography. *Journal of Human Genetics*. 2021;66(5):499-507.
 267. Cuevas-Navarro A, Van R, Cheng A, Urisman A, Castel P, McCormick F. The RAS GTPase RIT1 compromises mitotic fidelity through spindle assembly checkpoint suppression. *Current Biology*. 2021;31(17):3915-24. e9.
 268. Gaudineau A, Doray B, Schaefer E, Sananès N, Fritz G, Kohler M, et al. Postnatal phenotype according to prenatal ultrasound features of Noonan syndrome: a retrospective study of 28 cases. *Prenatal diagnosis*. 2013;33(3):238-41.
 269. Bakker M, Pajkrt E, Mathijssen I, Bilardo C. Targeted ultrasound examination and DNA testing for Noonan syndrome, in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenatal diagnosis*. 2011;31(9):833-40.
 270. Houweling A, De Mooij Y, Van der Burgt I, Yntema H, Lachmeijer A, Go A. Prenatal detection of Noonan syndrome by mutation analysis of the PTPN11 and the KRAS genes. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2010;30(3):284-6.
 271. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(4):295-308.

272. Bellacosa A. Developmental disease and cancer: biological and clinical overlaps. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013;161(11):2788-96.
273. Toriello HV, Meck JM, Practice P, Committee G. Statement on guidance for genetic counseling in advanced paternal age. *Genetics in Medicine*. 2008;10(6):457-60.
274. Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Current Biology*. 2005;15(14):R563-R74.
275. Barbacid M. Ras genes. *Annual review of biochemistry*. 1987;56(1):779-827.
276. Gripp KW, Lin AE. Costello syndrome: a Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. *Genetics in Medicine*. 2012;14(3):285-92.
277. Heike CL, Cunningham ML, Steiner RD, Wenkert D, Hornung RL, Gruss JS, et al. Skeletal changes in epidermal nevus syndrome: does focal bone disease harbor clues concerning pathogenesis? *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2005;139(2):67-77.
278. Ernst LM, Quinn PD, Alawi F. Novel oral findings in Schimmelpenning syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2007;143(8):881-3.
279. Hoffman WH, Jueppner HW, DeYoung BR, O'dorisio MS, Given KS. Elevated fibroblast growth factor-23 in hypophosphatemic linear nevus sebaceous syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2005;134(3):233-6.
280. Westenius E, Sahlin E, Conner P, Lindstrand A, Iwarsson E. Diagnostic yield using whole-genome sequencing and in-silico panel of 281 genes associated with non-immune hydrops fetalis in clinical setting. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2022;60(4):487-93.
281. Reischer T, Liebmann-Reindl S, Bettelheim D, Balendran-Braun S, Streubel B. Genetic diagnosis and clinical evaluation of severe fetal akinesia syndrome. *Prenatal Diagnosis*. 2020;40(12):1532-9.
282. Lo IF, Brewer C, Shannon N, Shorto J, Tang B, Black G, et al. Severe neonatal manifestations of Costello syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 2008;45(3):167-71.
283. Gripp KW, Stabley DL, Nicholson L, Hoffman JD, Sol-Church K. Somatic mosaicism for an HRAS mutation causes Costello syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006;140(20):2163-9.
284. Detweiler S, Thacker MM, Hopkins E, Conway L, Gripp KW. Orthopedic manifestations and implications for individuals with Costello syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013;161(8):1940-9.
285. Van der Burgt I, Kupsky W, Stassou S, Nadroo A, Barroso C, Diem A, et al. Myopathy caused by HRAS germline mutations: implications for disturbed myogenic differentiation in the presence of constitutive HRas activation. *Journal of medical genetics*. 2007;44(7):459-62.
286. Quélin C, Loget P, Rozel C, D'Hervé D, Fradin M, Demurger F, et al. Fetal costello syndrome with neuromuscular spindles excess and p. Gly12Val HRAS mutation. *European Journal of Medical Genetics*. 2017;60(7):395-8.

287. Henry JM, Chahin N, Shiloh-Malawsky Y, Fan Z, Selcen D. A rare case of congenital myopathy with excess muscle spindles: expanding the clinical spectrum of HRAS-associated neuromuscular disease. *Journal of neurology*. 2015;262:1587-9.
288. Burkitt-Wright EM, Bradley L, Shorto J, McConnell VP, Gannon C, Firth HV, et al. Neonatal lethal Costello syndrome and unusual dinucleotide deletion/insertion mutations in HRAS predicting p. Gly12Val. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012;158(5):1102-10.
289. Zampino G, Pantaleoni F, Carta C, Cobellis G, Vasta I, Neri C, et al. Diversity, parental germline origin, and phenotypic spectrum of de novo HRAS missense changes in Costello syndrome. *Human mutation*. 2007;28(3):265-72.
290. COSMIC Evt. 2023 [Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
291. Lorenz S, Petersen C, Kordaß U, Seidel H, Zenker M, Kutsche K. Two cases with severe lethal course of Costello syndrome associated with HRAS p. G12C and p. G12D. *European journal of medical genetics*. 2012;55(11):615-9.
292. Morice-Picard F, Ezzedine K, Delrue MA, Arveiler B, Fergelot P, Taïeb A, et al. Cutaneous manifestations in Costello and cardiofaciocutaneous syndrome: report of 18 cases and literature review. *Pediatric dermatology*. 2013;30(6):665-73.
293. Kerr B, Delrue M-A, Sigaudy S, Perveen R, Marche M, Burgelin I, et al. Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases. *Journal of medical genetics*. 2006;43(5):401-5.
294. Burkitt Wright E, Bradley L, Shorto J, McConnell V, Gannon C, Firth L, et al. HRAS p. Gly12Val mutations in four patients with neonatal lethal Costello syndrome. *Journal of Medical Genetics supplement 1* 2011. 2011:s47-s.
295. Park PG, Park E, Hyun H-S, Kang HG, Ha I-S, Cho T-J, et al. Cutaneous skeletal hypophosphatemia syndrome in association with a mosaic HRAS mutation. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2018;48(5):665-9.
296. Lim YH, Ovejero D, Sugarman JS, DeKlotz CM, Maruri A, Eichenfield LF, et al. Multilineage somatic activating mutations in HRAS and NRAS cause mosaic cutaneous and skeletal lesions, elevated FGF23 and hypophosphatemia. *Human molecular genetics*. 2014;23(2):397-407.
297. Rijntjes-Jacobs EG, Lopriore E, Steggerda SJ, Kant SG, Walther FJ. Discordance for Schimmelpenning–Feuerstein–Mims syndrome in monozygotic twins supports the concept of a postzygotic mutation. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152(11):2816-9.
298. Tartaglia M, Gelb BD. Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: Phenotypic spectrum and molecular mechanisms. *Annals of the new York Academy of Sciences*. 2010;1214(1):99-121.
299. Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE. Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*. 1998;92(4):441-50.
300. Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriyama S, et al. Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan

- syndrome and childhood leukemia. *Journal of human genetics*. 2005;50(4):192-202.
301. Malniece I, Grasmann A, Inashkina I, Stavusis J, Kreile M, Miklasevics E, et al. The fetal phenotype of Noonan syndrome caused by severe, cancer-related PTPN11 variants. *The American Journal of Case Reports*. 2020;21:e922468-1.
 302. Nakamura T, Gulick J, Pratt R, Robbins J. Noonan syndrome is associated with enhanced pERK activity, the repression of which can prevent craniofacial malformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(36):15436-41.
 303. Lamouroux A, Dauge C, Perez M, Faure J, Fuchs F, Mousty E, et al. OP02. 06: Noonan syndrome fetal phenotype with PTPN11, RIT1, RAF1 and NRAS pathogenic variant: ultrasound data, fetopathology study and literature review. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2019;54:89-.
 304. Levailant JM, Gérard-Blanluet M, Holder-Espinasse M, Valat-Rigot AS, Devisme L, Cavé H, et al. Prenatal phenotypic overlap of Costello syndrome and severe Noonan syndrome by tri-dimensional ultrasonography. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2006;26(4):340-4.
 305. van Nierop JW, van Trier DC, van der Burgt I, Draaisma JM, Mylanus EA, Snik AF, et al. Cochlear implantation and clinical features in patients with Noonan syndrome and Noonan syndrome with multiple lentigines caused by a mutation in PTPN11. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2017;97:228-34.
 306. Jaouadi H, Chehida AB, Kraoua L, Etchevers HC, Argiro L, Kasdallah N, et al. A severe clinical phenotype of Noonan syndrome with neonatal hypertrophic cardiomyopathy in the second case worldwide with RAF1 S259Y neomutation. *Genetics Research*. 2019;101:e6.
 307. Athota JP, Bhat M, Nampoothiri S, Gowrishankar K, Narayanachar SG, Puttamalles V, et al. Molecular and clinical studies in 107 Noonan syndrome affected individuals with PTPN11 mutations. *BMC Medical Genetics*. 2020;21:1-10.
 308. Maroun LL, Graem N. Autopsy standards of body parameters and fresh organ weights in nonmacerated and macerated human fetuses. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2005;8(2):204-17.
 309. Beltrami B, Cerasani J, Consales A, Villa R, Resta N, Loconte DC, et al. Prenatal overgrowth and polydramnios: Would you think about Noonan syndrome? *Clinical Case Reports*. 2022;10(8):e6256.
 310. Croonen EA, Nillesen WM, Stuurman KE, Oudesluijs G, Van De Laar IM, Martens L, et al. Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses with abnormal ultrasound findings. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21(9):936-42.
 311. Marin TM, Keith K, Davies B, Conner DA, Guha P, Kalaitzidis D, et al. Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(3):1026-43.

312. Edouard T, Combier J-P, Nédélec A, Bel-Vialar S, Métrich M, Conte-Auriol F, et al. Functional effects of PTPN11 (SHP2) mutations causing LEOPARD syndrome on epidermal growth factor-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase 3 β signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 2010;30(10):2498-507.
313. Lauriol J, Kontaridis MI. PTPN11-associated mutations in the heart: has LEOPARD changed Its RASpots? *Trends in cardiovascular medicine*. 2011;21(4):97-104.
314. Maheshwari M, Belmont J, Fernbach S, Ho T, Molinari L, Yakub I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome type I: detection of recurrent mutations in exons 3 and 13. *Human mutation*. 2002;20(4):298-304.
315. Consortium G. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science*. 2020;369(6509):1318-30.
316. Van R, Cuevas-Navarro A, Castel P, McCormick F. The molecular functions of RIT1 and its contribution to human disease. *Biochemical Journal*. 2020;477(15):2755-70.
317. Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, et al. Spectrum of mutations and genotype–phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. *Human genetics*. 2016;135:209-22.
318. Gos M, Fahiminiya S, Poznański J, Kłapecki J, Obersztyn E, Piotrowicz M, et al. Contribution of RIT1 mutations to the pathogenesis of Noonan syndrome: four new cases and further evidence of heterogeneity. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164(9):2310-6.
319. Calcagni G, Baban A, Lepri FR, Marino B, Tartaglia M, Digilio MC. Congenital heart defects in Noonan syndrome and RIT1 mutation. *Genetics in Medicine*. 2016;18(12):1320-.
320. Milosavljević D, Overwater E, Tamminga S, de Boer K, Elting MW, van Hoorn ME, et al. Two cases of RIT1 associated Noonan syndrome: Further delineation of the clinical phenotype and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2016;170(7):1874-80.
321. Koenigshofer M, Hung CY, McCauley JL, Dallman J, Back EJ, Mihalek I, et al. Mutations in RIT1 cause Noonan syndrome—additional functional evidence and expanding the clinical phenotype. *Clinical genetics*. 2016;89(3):359-66.
322. Qiu Z, Chang W-T, Chou Y-C, Wen K-C, Ziyang Y, Yuen K, et al. Prenatal case of RIT1 mutation associated Noonan syndrome by whole exome sequencing (WES) and review of the literature. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022;61(3):535-8.
323. Pierpont ME, Digilio MC. Cardiovascular disease in Noonan syndrome. *Current opinion in pediatrics*. 2018;30(5):601-8.
324. Berger A, Imielinski M, Duke F, Wala J, Kaplan N, Shi G, et al. Oncogenic RIT1 mutations in lung adenocarcinoma. *Oncogene*. 2014;33(35):4418-23.
325. Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nature genetics*. 2007;39(8):1013-7.

326. Turner AM. Noonan syndrome. *Journal of paediatrics and child health*. 2014;50(10):E14-E20.
327. Menashe M, Arbel R, Raveh D, Achiron R, Yagel S. Poor prenatal detection rate of cardiac anomalies in Noonan syndrome. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2002;19(1):51-5.
328. Kiyota A, Tsukimori K, Yumoto Y, Hojo S, Morokuma S, Fukushima K, et al. Spontaneous resolution of cystic hygroma and hydrops in a fetus with Noonan's syndrome. *Fetal diagnosis and therapy*. 2009;24(4):499-502.
329. Izquierdo L, Kushnir O, Sanchez D, Curet L, Olney P, Sarto G, et al. Prenatal diagnosis of Noonan's syndrome in a female infant with spontaneous resolution of cystic hygroma and hydrops. *Western Journal of Medicine*. 1990;152(4):418.
330. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, Van der Burgt I, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;70(6):1555-63.
331. Gelb BD, Roberts AE, Tartaglia M. Cardiomyopathies in Noonan syndrome and the other RASopathies. *Progress in pediatric cardiology*. 2015;39(1):13-9.
332. Allanson JE, editor Noonan syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2007: Wiley Online Library.
333. Chen P-C, Yin J, Yu H-W, Yuan T, Fernandez M, Yung CK, et al. Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(31):11473-8.
334. Chen P-C, Wakimoto H, Conner D, Araki T, Yuan T, Roberts A, et al. Activation of multiple signaling pathways causes developmental defects in mice with a Noonan syndrome-associated *Sos1* mutation. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(12):4353-65.
335. Seo GH, Yoo H-W. Growth hormone therapy in patients with Noonan syndrome. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism*. 2018;23(4):176.
336. Bertola DR, Yamamoto GL, Almeida TF, Buscarilli M, Jorge AA, Malaquias AC, et al. Further evidence of the importance of *RIT1* in Noonan syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2014;164(11):2952-7.
337. Zenker M, editor Clinical overview on RASopathies. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2022: Wiley Online Library.
338. Gripp KW, Scott Jr CI, Nicholson L, McDonald-McGinn DM, Ozeran JD, Jones MC, et al. Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: proposal for a tumor screening protocol. *American journal of medical genetics*. 2002;108(1):80-7.
339. Giannoulatou E, McVean G, Taylor IB, McGowan SJ, Maher GJ, Iqbal Z, et al. Contributions of intrinsic mutation rate and selfish selection to levels of de novo *HRAS* mutations in the paternal germline. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(50):20152-7.

340. Sol-Church K, Stabley DL, Nicholson L, Gonzalez IL, Gripp KW. Paternal bias in parental origin of HRAS mutations in Costello syndrome. *Human mutation*. 2006;27(8):736-41.
341. Gripp KW, Hopkins E, Serrano A, Leonard NJ, Stabley DL, Sol-Church K. Transmission of the rare HRAS mutation (c. 173C> T; p. T58I) further illustrates its attenuated phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012;158(5):1095-101.
342. Gripp KW, Sol-Church K, Smpokou P, Graham GE, Stevenson DA, Hanson H, et al. An attenuated phenotype of Costello syndrome in three unrelated individuals with a HRAS c. 179G> A (p. Gly60Asp) mutation correlates with uncommon functional consequences. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015;167(9):2085-97.
343. Nisbet DL, Griffin DR, Chitty LS. Prenatal features of Noonan syndrome. *Prenatal diagnosis*. 1999;19(7):642-7.
344. Andelfinger G, Marquis C, Raboisson M-J, Théoret Y, Waldmüller S, Wiegand G, et al. Hypertrophic cardiomyopathy in Noonan syndrome treated by MEK-inhibition. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;73(17):2237-9.
345. Dori Y, Smith C, Pinto E, Snyder K, March ME, Hakonarson H, et al. Severe lymphatic disorder resolved with MEK inhibition in a patient with Noonan syndrome and SOS1 mutation. *Pediatrics*. 2020;146(6).

8. ÖZET

“Fetal lenfatik displazilere algoritmik yaklaşım; konvansiyonel ve moleküler karyotip normal saptandığında yeni nesil dizi analizi ile rasopati genlerinin araştırılması”

Sıklıkla anöploidiler ve kromozomlarda kayıp/kazançlar ile ilişkilendirilen fetal lenfatik displazilerde, prenatal dönemde rasopati gen analizleri önceliklidir. Rasopatiler, Ras-MAPK sinyal yolağında görev alan proteinleri kodlayan genlerin germ hattı mutasyonlarının neden olduğu bir gelişimsel hastalık sınıfıdır. Bu çalışmaya 2022 ve 2023 yıllarında prenatal ultrasonografide lenfatik displazi lehine değerlendirilen kistik higroma ve/veya artmış NT ($\geq 3,5$ mm) ve/veya artmış NF (≥ 6 mm) saptanan, konvansiyonel ve moleküler karyotipleme ile normal karyotip saptanan 20 fetüs dahil edilmiştir. Bu fetüslere ait 10 koryonik villüs örnekleme materyali, 9 amniyon sıvısı ve bir eksitus sonrası postmortem cilt materyalinin direkt ve/veya kültürlerinden elde edilen DNA’larından rasopati ile ilişkili *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1* ve *SPRED1* genleri yeni nesil dizi analizi yöntemi ile çalışılmıştır. Üç fetüste *HRAS* geninde c.182A>G p.(Gln61Arg), *PTPN11* geninde c.211T>C p.(Phe71Leu) ve *RIT1* geninde c.270G>A p.(Met90Ile) olmak üzere heterozigot patojen varyant, dört fetüste ise farklı genlerde klinik önemi belirsiz heterozigot varyantlar belirlenmiştir. Noonan sendromu 1 ile ilişkilendirilen *PTPN11* geni, prenatal rasopatilerde en sık bildirilen genidir. Olgularımızın prenatal bulguları ile uyumlu olarak literatürde, *RIT1* geni mutasyonları kardiyak etkilenim ile *HRAS* geni mutasyonları ise kas tutulumu ile ön plandadır. Sonuçlarımız, rasopati genlerinde

güçlü aktivasyona neden olan mutasyonların somatik olduğunda kanserlere, germ hattında ve heterozigot olduğunda ise ciddi fetal fenotiplere neden olabileceği teorisini desteklemektedir. Özetle bu çalışma, fetüslerinde lenfatik displazi saptanan ailelerin gebeliğin prognozuna karar verebilmesi açısından, fetal kromozom analizi normal olduğunda öncelikli olarak rasopati panel analizinin yapılmasını göstermesi açısından değerlidir.

Anahtar kelimeler: Fetal lenfatik displazi, rasopati, yeni nesil dizileme

9. SUMMARY

"Algorithmic approach to fetal lymphatic dysplasia; investigating rasopathy genes by next generation sequence analysis when both conventional and molecular karyotypes are detected normally"

In fetal lymphatic dysplasia which are frequently related with aneuploidies and chromosomal losses/gains, the prenatal analysis of rasopathy genes are of first priority. Rasopathies are a class of developmental disorders caused by germline mutations of genes encoding proteins of Ras-MAPK signaling pathway. This study consisted 20 normal karyotyped fetuses (via conventional and molecular karyotyping) with cystic hygroma / increased NT (≥ 3.5 mm) / increased NF (≥ 6 mm) detected on prenatal ultrasonography in 2022 and 2023. After obtaining fetal direct/postcultured DNA from ten chorionic villus, nine amniotic fluid, and one postmortem skin samples, rasopathy related genes *BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *RIT1*, *SHOC2*, *SOS1* and *SPRED1* were analyzed via next-generation sequencing. The analysis ended with three heterozygous pathogenic variants consisting c.182A>G p.(Gln61Arg) in *HRAS* gene, c.211T>C p.(Phe71Leu) in *PTPN11* gene and c.270G>A p.(Met90Ile) in *RIT1* gene, and also four fetuses analysis ended with heterozygous variants of uncertain clinical significance. The *PTPN11* gene associated with Noonan syndrome 1 is the most frequently reported one in prenatal period. Concordant with our findings the mutation of *RIT1* gene is related with cardiac involvement, while *HRAS* gene is associated with muscle involvement on the reports. Our results verified the relationship between the heterozygote germline mutations of the rasopathy genes with severe fetal abnormalities, while the somatic mutations are related with cancers. In sum for parent decision of the prognosis of pregnancies, this study has value to point out the necessity of prenatal rasopathy gene analysis to the fetuses with normal karyotypes.

Keywords: Fetal lymphatic dysplasia, rasopathy, next generation sequencing

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Lale

Soyadı: Yılmaz Çelik

Doğum Yeri ve Tarihi:

Eğitimi:

- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik (2019-2023)
- Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi (2009-2016)
- 75. Yıl Anadolu Lisesi (2005-2009)
- Şehitlik İlköğretim Okulu (1998-2005)
- Hasangazi İlköğretim Okulu (1997-1998)

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

- Tıbbi Genetik Derneği

Bilimsel Etkinlikleri:

- Yılmaz Çelik L., Kazancıoğlu E., Kayhan G. *PCDH19* Geninde Mutasyon Saptanan İki Olgu. 15. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Dalaman, Türkiye. Kasım 2022 [Sözlü Bildiri]
- Yılmaz Çelik L., Kayhan G., Ergün M.A. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Adenokarsinomunda Gazi Üniversitesi Tıbbi Genetik AD Likit Biyopsi Verilerinin Değerlendirilmesi. 1. Ulusal HematoOnkoGenetik Kongresi, Belek, Türkiye. Kasım 2021 [Sözlü Bildiri]

- Yılmaz L., Savaş A., Tuğ E., Yirmibeş Karaoğuz M. İdic (Y) ve XX mozaik karyotipe sahip bir hastada SRY geninin varlığına bağlı olarak gelişen erkek fenotip. V. Uluslararası Katılımlı Erciyes Tıp Genetik Günleri Kongresi, Nevşehir, Türkiye. Şubat 2020 [Poster Bildiri]

E-mail:



11. EKLER

11.1. Ek-1: Bilgilendirilmiş Onam Formu-1



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU-1

Tarih:

Aşağıdaki bilgileri okudum,

1- Biyolojik örnek vermeyi ve bu örnekten konvansiyonel kromozom analizi ve/veya FISH/QF-PCR yapılmasını,

☐ Kabul ediyorum

☐ Kabul etmiyorum

Örnek:

☐ Amniyon sıvısı

☐ Koryon villus doku örneği

☐ Kord kanı

☐ Diğer

2- Verdiğim örnekten doğrulama ve/veya daha ileri tanı için moleküler karyotipleme (mikroarray vs.) yapılmasını,

☐ Kabul ediyorum

☐ Kabul etmiyorum

3- Verdiğim örnekten daha ileri tanı için moleküler analizlerin (DNA dizi analizi, WES vs.) yapılmasını,

☐ Kabul ediyorum

☐ Kabul etmiyorum

4- Elde edilen sonuçların kimlik bilgilerim açık olarak kullanılmadan eğitim / araştırma amaçlı bilimsel olarak kullanılmasını,

☐ Kabul ediyorum

☐ Kabul etmiyorum

***Hastanın
İsim ve imzası***

***Ebeveynin
İsim ve imzası***

***Aile adına sorumlu
kişinin isim ve imzası***

- Verdiğiniz örnekten direkt çalışma ve/veya uzun dönem doku kültürü yapılacak ve sitogenetik (ortalama 3 hafta)/ moleküler sitogenetik (ortalama 24 saat veya hücre kültürü sonrası çalışmalarda 4- 6 hafta) moleküler genetik çalışma (6-8 hafta) sonucu, seçilen yönteme bağlı olarak değişen sürelerde raporlandırılacaktır.
- Kültürde üreme olmazsa, yeniden örnek alınması istenebilir.
- Sitogenetik analizde mozaik veya patolojik durum ortaya çıktığında, aynı ve/veya ikinci bir prenatal Kültürde üreme olmazsa, yeniden örnek alınması istenebilir. Tanı tekniği ile alınmış örnekten tekrar çalışma istenebilir.
- Bazı durumlarda ebeveyn ve/veya ailede çalışma istenebilir.
- Prenatal tanıda seçilen tekniğe bağlı olarak % 0,5- 4 arasında gebeliğin düşükle sonlanması olasılığı vardır.
- Biyolojik örnek alımında, girişime bağlı olarak düşük oranda da olsa enfeksiyon, kanama gibi komplikasyonlar gelişebilir.
- Sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik analiz sonuçlarını yorumlamak bazen güç olabilir veya alınan sonuçlar örnekteki gerçek durumu yansıtmayabilir. Ayrıca kromozom analizinde küçük yapısal değişimler ve düşük orandaki mozaizmler değerlendirilemeyebilir.

11.2. Ek-2: Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF)



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ÇALIŞMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: *Fetal lenfatik displazilere algoritmik yaklaşım; konvansiyonel ve moleküler karyotip normal saptandığında yeni nesil dizi analizi ile rasopati genlerinin araştırılması*

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Esra Tuğ

Diğer Araştırmacıların Adı: Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoguz, Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Kayhan, Arş. Gör. Dr. Lale Yılmaz Çelik

Destekleyici (varsa): Gazi Üniversitesi BAP destek birimine başvuru yapılacaktır.

“Fetal lenfatik displazilere algoritmik yaklaşım; konvansiyonel ve moleküler karyotip normal saptandığında yeni nesil dizi analizi ile rasopati genlerinin araştırılması” isimli çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni gebeliğinizin takibi sırasında fetal ultrasonografide kistik higroma, artmış ense saydamlığı ve artmış ense kalınlığı belirlenmesi nedeniyle yapılan koryon villus örnekleme (KVÖ) veya amniyosentez materyallerinizde karyotip ve mikroarray analizlerinizin normal olarak saptanmış olmasıdır. Literatüre göre normal karyotip saptanan artmış ense saydamlığı ve/veya kistik higromalı ve/veya artmış ense kalınlığı olan olgularda “rasopatiler” olarak isimlendirilen bir grup hastalık görülebilmektedir ki Noonan sendromu bu hastalık grubu içinde en sık görülenidir. Bu durumda kistik higroma, artmış ense saydamlığı ve artmış ense kalınlığı ile ilişkili rasopatilerin tespiti için karyotip ve mikroarray analizi yeterli değildir. Yapılacak bu çalışmada yeni nesil dizi analizi yöntemi ile rasopatiler ile ilişkili olduğu bilinen 13 genin araştırılması hedeflenmektedir. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz

sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Esra Tuğ'un sorumluluğu altındadır.

Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni gebelik sürecinizde prenatal dönemde fetal ultrasonografide (USG) kistik higroma, artmış ense saydamlığı ve artmış ense kalınlığı belirlenmesi nedeniyle yapılan KVÖ veya amniyosentez materyallerinde karyotip ve mikroarray analizlerinin normal olarak saptanmış olmasıdır. Kistik higroma, artmış ense saydamlığı ve artmış ense kalınlığı ile ilişkili olduğu bilinen diğer sendromların tespiti için karyotip ve mikroarray analizi yeterli değildir. Yapılacak çalışma ile rutin prenatal tanı testleri ile gösterilemeyen, rasopatiler denilen hastalık grubu ile ilişkili genlerdeki olası bir varyantın yeni nesil dizi analizi yöntemi ile araştırılması hedeflenmektedir. Bu çalışma ile fetüsünüzdeki artmış ense saydamlığı ve/veya kistik higroma ve/veya artmış ense kalınlığının genetik nedeninin belirlenmesi durumunda, sizlere daha geniş genetik danışma sunulabilecek ve sizi takip eden hekiminizin gebelik izlemine ve doğum sonrası dönemde tedavi seçenekleri konusunda hazır olmasına yardımcı olacaktır. Bu çalışmaya sizin de dahil olduğunuz toplam 20 hastanın alınması planlanmaktadır.

Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

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

Genetik araştırma nasıl yapılacaktır?

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

Bu çalışmada fetal USG anomalisinin genetik nedenlerinin belirlenmesi amacıyla gebelik haftasına uygun olarak tercih edilen rutin invaziv prenatal tanı testlerinden KVÖ veya amniyosentez materyallerinden elde edilen DNA kullanılmaktadır.

b. Örnekte neler araştırılacaktır ?

Fetal USG'de belirlenen artmış ense saydamlığı, artmış ense kalınlığı ve/veya kistik higroma ile ilişkili olabilecek genlerdeki değişiklikler (varyantlar) yeni nesil dizi analizi yöntemi ile araştırılacaktır.

c. Örnekler nerede çalışılacaktır ?

Örnekler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi (GHDM) bünyesinde bulunan Moleküler Laboratuvarında çalışılacaktır.

d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor ?

Örnek uygun saklama koşulları altında laboratuvarımızda muhafaza edilecektir. Sağlık Bakanlığı ve ilgili birimlerin yayınladığı kılavuzlarda yer alan öneriler ve yönergeler doğrultusunda örnekler saklanmaktadır. Örneklerin imhası bu kılavuzlarda yer alan bilgiler doğrultusunda yapılmaktadır.

Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilir mi?

(Bu bölümde katılımcıdan “Tabakalandırılmış olur” olarak isimlendirilen bir onay alınmalıdır. Aşağıda yazılı olan bölüm aynen korunarak katılımcının aşağıdaki 4 seçenekten birini işaretlemesi istenmelidir.)

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

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum, ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

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

Çalışmanın riskleri nelerdir?

Koryon villus örnekleme veya amniyosentez işlemi, az da olsa düşük riski taşır. Tecrübeli bir hekim tarafından yapılan koryon villus örnekleme veya amniyosentez işleminde düşük riski oldukça azdır. Girişimsel işlemler yumuşak doku enfeksiyonları için risk oluşturabilir. Ayrıca düşük oranda amniyon mayii kaçağı ve/veya kanama riski olabilir. İlk girişimde yeterli miktarda alınamaz ise girişimin tekrarlanması gerekebilir.

Çalışmanın yararları nelerdir?

Koryon villus örnekleme veya amniyosentez örneğinizden yapılacak rutin sitogenetik ve kromozomal mikroarray analiz sonuçlarınız normal olarak raporlandığında, dahil olacağınız bu çalışma ile fetüste var olan artmış ense saydamlığı, artmış ense kalınlığı ve/veya kistik higromanın genetik nedeni belirlenebilir. Bu durumda doğru genetik tanı konulmuş olacak, böylece mevcut şartlar altında tedavi seçenekleri, eşlik edebilecek diğer klinik durumlar ve sonraki kuşaklarda tekrar etme riski hakkında daha net bilgiler edinebileceksiniz. Aynı zamanda bu çalışma sizin ile benzer tıbbi durumlara sahip diğer bireyler için de bunun gibi genetik araştırmaların yapılabilmesinde faydalı/öncü olabilme potansiyeli taşımaktadır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Çalışmadan sorumlu doktorunuz kişisel bilgileriniz gizli tutmak koşuluyla, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

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

Çalışma tamamlandığında elde edilen sonuçlar tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Sağlık Bakanlığı ve diğer ilgili sağlık otoriteleri orijinal tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişebilir. Bu yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayarak yalnızca adı geçen kişi ve kurumlara erişim izni vermiş olacaksınız. Ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

(Çalışma için eğer gerekiyorsa aşağıdaki standart durumlar açıklanmalıdır)

- *Elde ettiğimiz genetik materyaliniz (DNA) genetik faktörler açısından test edilecek ve elde edilen bilgi sizin hakkınızda bize genetik bilgi verecektir. Genetik testler, bu araştırma ile ilgisi olmayan size ait çok özel başka bilgiler de verebilir. Böyle bir durumda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacak ve bilgiler üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacaktır.)*

Bu çalışmaya katılmaman maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak?

Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim ?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Esra Tuğ
GÖREVİ : Araştırma Yöneticisi
TELEFON : [REDACTED]

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Prof. Dr. Esra Tuğ / Arş. Gör. Dr. Lale Yılmaz Çelik tarafından “*Fetal lenfatik displazilere algoritmik yaklaşım; konvansiyonel ve moleküler karyotip normal saptandığında yeni nesil dizi analizi ile rasopati genlerinin araştırılması*” isimli tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

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. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden 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.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Esra Tuğ / Arş. Gör. Dr. Lale Yılmaz Çelik 'i bulabileceğimi ve / [REDACTED] numaralı telefonlardan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN DEVAMI ŞEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER ALMAYACAKTIR.