

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

**Prenatal Dönemde Holoprozensefali Saptanan
Olgularda Genetik Etiyopatogenezin Yeni Nesil
Dizileme Yöntemi ile Araştırılması**

Dr. Özge HACER DEMİRBİLEK
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gözde Yeşil Sayın

İSTANBUL
2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım tüm hocalarıma,
Tez yazım aşamalarında desteğini aldığım tez danışmanım Prof. Dr. Gözde Yeşil Sayın
hocama,

Birlikte çalışmış olmaktan mutluluk duyduğum, beraber eğlenip öğrendiğim dert
ortağım olan canım asistan arkadaşlarıma,

Asistanlığım boyunca poliklinikte birlikte çalışmaktan çok büyük mutluluk duyduğum
ve her konuda yardımlarını esirgemeyen çok değerli İTF Tıbbi Genetik Poliklinik çalışanlarına,

Asistanlığım boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim ve birlikte çalışmaktan
mutluluk duyduğum İTF Tıbbi Genetik Laboratuvarındaki tüm değerli çalışma arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren, fedakarlıklarını asla unutmayacağım her daim yanımda olan
aileme,

Her koşulda yanımda olup desteğini ve sevgisi esirgemeyen biricik eşim Tuncay'a,
Tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir. Proje No: 38810

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Santral Sinir Sistemi (SSS) Embriyolojisi.....	7
2.2. Prozenşefalonun Gelişim Anomalileri	10
2.2.1. Prozenşefalik Oluşum Bozuklukları.....	11
2.2.1.1. Aprozensefali ve Atelensefali.....	11
2.2.2. Prozenşefalik Bölünme Bozuklukları.....	12
2.2.2.1. Holoprozenşefali.....	12
2.2.3. Orta Hat Prozenşefalik Gelişim Bozuklukları.....	12
2.2.3.1. Korpus Kallozum Agenezisi.....	12
2.2.3.2. Septum Pellusidum Agenezisi.....	13
2.2.3.3. Septo-Optik Displazi.....	14
2.3. Tarihçe.....	15
2.4. Epidemiyoloji.....	17
2.5. Holoprozenşefali Varyantları.....	18
2.5.1. Alobar HPE.....	19
2.5.2. Semilobar HPE.....	20
2.5.3. Lobar HPE.....	20
2.5.4. Orta İnterhemisferik Füzyon Varyant HPE (MIHF/ MIHV/ Sintelensefali).....	21

2.5.5.Septopreoptik HPE.....	21
2.5.6.HPE'nin Mikroformları (Mikroform HPE).....	21
2.6.Holoprozensefalinin Prenatal Dönemde Tanısı.....	22
2.7.Holoprozensefalinin Klinik Özellikleri.....	27
2.7.1.Sağkalım.....	28
2.7.2.Kraniyofasiyal Anomaliler.....	29
2.7.3.Gelişimsel Kusurlar.....	30
2.7.4.Hidrosefali.....	31
2.7.5.Nöbetler ve Epilepsi.....	31
2.7.6.Motor Bozukluklar.....	31
2.7.7.Oromotor Disfonksiyon ve Beslenme.....	31
2.7.8.Akciğer Sorunları.....	32
2.7.9. Gastrointestinal Problemler.....	32
2.7.10. Hipotalamik Disfonksiyon.....	32
2.7.11. Endokrin Disfonksiyon.....	32
2.8.HPE Etiyolojisi.....	33
2.8.1. Genetik Dışı İlişkili Durumlar.....	33
2.8.1.1.Maternal Hastalıklar.....	34
2.8.1.1.1. Diyabetes Mellitus.....	34
2.8.1.1.2. Enfeksiyonlar.....	35
2.8.1.1.3. Yüksek Kan Basıncı.....	35
2.8.1.1.4. Anemi.....	35
2.8.1.1.5. Diğer Maternal Hastalıklar.....	35
2.8.1.2. Hamilelik Özellikleri ve Üreme Hikayesi.....	36
2.8.1.2.1. Cinsiyet oranı.....	36
2.8.1.2.2. Hamilelikte Vajinal Kanama.....	36

2.8.1.2.3. Adet Döngüleri.....	36
2.8.1.2.4. Parite.....	36
2.8.1.2.5.Fertilite Tedavileri.....	37
2.8.1.3. Sosyodemografik Faktörler.....	37
2.8.1.3.1.Yaş	37
2.8.1.3.2. Irk / Etnisite.....	37
2.8.1.3.3. Sosyo-Ekonomik Durum.....	37
2.8.1.4. Maternal Terapötik Kullanımı.....	37
2.8.1.4.1. Salisilat.....	37
2.8.1.4.2. Diğer Analjezikler.....	38
2.8.1.4.3. Antiepileptik İlaçlar.....	38
2.8.1.4.4. Retinoik asit.....	38
2.8.1.4.5. Hormonlar.....	39
2.8.1.4.6. Tiroid Hormonu.....	39
2.8.1.4.7. Statinler.....	39
2.8.1.5. Maternal Non-Terapötik Kullanımı.....	40
2.8.1.5.1. Alkol.....	40
2.8.1.5.2. Sigara.....	40
2.8.1.6. Nutrisyonel Faktörler.....	41
2.8.1.6.1. Folik Asit ve Multivitamin Kullanımı.....	40
2.8.1.6.2. Diyet.....	40
2.8.1.6.3. Vücut Kitle İndeksi (BMI).....	41
2.8.1.7. Diğer Tıbbi Riskler.....	41
2.8.2. Genetik Nedenler.....	41
2.8.2.1. Kromozom Anomalileri.....	41
2.8.2.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri.....	42
2.8.2.1.2.Yapısal Kromozom Anomalileri.....	43
2.8.2.1.3. Kopya Sayısı Değişiklikleri (CNV).....	44
2.8.2.2.Holoprozensefalinin Eşlik Ettiği Monogenik Sendromlar.....	45
2.8.2.3.Non-Sendromik, Non-kromozomal (İzole) HPE’de Tek Gen Bozuklukları.....	46
2.9.HPE İlişkili Sinyal Yolları.....	47
2.9.1.Nodal Sinyal Yolu.....	48

2.9.2.Hedgehog Sinyal Yolu.....	49
2.9.3.Retinoid Sinyal Yolu.....	52
2.9.4.Fibroblast Büyüme Faktörü Sinyali (<i>Fibroblast Growth Factor Signaling</i>).....	53
2.9.5.Kemik Morfogenetik Protein Sinyali (<i>Bone Morphogenetic Protein, BMP</i>).....	53
2.10.Holoprozensefalinin Moleküler Genetiği.....	55
2.11.Holoprozensefalide Çoklu Vuruş ve Digenik Kalıtım.....	58
3.MATERYAL-METOD.....	60
3.1.Olgu Grubu ve Klinik Değerlendirme.....	60
3.2.Moleküler Yöntemler.....	61
3.2.1.DNA izolasyonu ve DNA kalitesinin değerlendirilmesi.....	61
3.2.2. Tüm ekzom dizileme.....	61
3.2.2.1.Islak laboratuvar çalışmaları.....	62
3.2.2.2.Ekzom verilerinin biyoinformatik analizi.....	68
3.2.2.2.1.Varyantların sınıflandırılması.....	69
3.3.Saptanan Varyantların Sanger Dizileme ile Doğrulanması.....	71
3.3.1. Sanger Dizileme İçin Primerlerin Tasarlanması.....	71
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	72
3.3.2.1.PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	73
3.3.3.Dizi PZR Çalışması.....	73
3.3.3.1.Dizi PZR reaksiyonu ürünlerinin saflaştırılması.....	74
3.3.3.2. Elektrophorez Cihazına Yükleme.....	74
3.3.3.3. Elektrophorez Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	74
4.BULGULAR.....	75
4.1. Antenatal US Bulguları.....	75
4.2. İnvazif İşlemler.....	75
4.3.Postmortem Fetal Değerlendirme ve Fetal Otopsi.....	76
4.4.Moleküler Bulgular.....	76
4.5.Olgular.....	78
4.5.1.Olgu 1.....	78
4.5.1.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	78
4.5.1.2.Moleküler Bulgular.....	79

4.5.2. Olgu 2.....	81
4.5.2.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	81
4.5.2.2.Moleküler Bulgular.....	82
4.5.3. Olgu 3.....	83
4.5.3.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	84
4.5.3.2.Moleküler Bulgular.....	84
4.5.4.Olgu 4.....	87
4.5.4.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	87
4.5.4.2.Moleküler Bulgular.....	88
4.5.5. Olgu 5.....	90
4.5.5.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	90
4.5.5.2.Moleküler Bulgular.....	90
4.5.6. Olgu 6.....	92
4.5.6.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	92
4.5.6.2.Moleküler Bulgular.....	93
4.5.7. Olgu 7	95
4.5.7.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	95
4.5.8. Olgu 8.....	96
4.5.8.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	97
4.5.9. Olgu 9.....	97
4.5.9.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	98
4.5.10. Olgu 10.....	99
4.5.10.1.Postmortem değerlendirme bulguları.....	99
5.TARTIşMA.....	100
6.KAYNAKLAR.....	123
GEN LİSTESİ.....	151
ETİK KURUL KARARI.....	153

FORMLAR.....	154
ÖZGEÇMİŞ.....	157



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Prozensefalik Gelişim Bozuklukları.

Tablo 2: Holoprozensefalinin DeMyer ve Zeman (1963) ve Probst (1979) karşılaştırmalı sınıflandırmaları.

Tablo 3: HPE varyantlarının anatomik sınıflandırması.

Tablo 4: HPE türlerinin nörogörüntüleme özellikleri.

Tablo 5: "Yüz genellikle beyni tahmin eder". Yüz ve beyin fenotiplerinin paralelliği.

Tablo 6: Holoprosensefalinin kromozomal olmayan sendromik nedenlerinde genetik ve klinik.

Tablo 7: Yerleşik ve önerilen HPE lokusları.

Tablo 8: HPE lokuslarının ve bunlarla ilişkili genlerin özeti.

Tablo 9: Parçalanma, son-onarım ve A-ekleme termal döngü koşulları.

Tablo 10: Numune başına FX reaksiyon karışımı.

Tablo 11: Örnek başına ligasyon miksi.

Tablo 12: Kütüphane zenginleştirme reaksiyon miksi.

Tablo 13: Kütüphane amplifikasyon döngü koşulları.

Tablo 14: Hibridizasyon yakalama için havuz oluşturma.

Tablo 15: Kütüphane havuzunun problemler ve bloklama reaktifleri ile oluşturulması.

Tablo 16: Hibridizasyon yakalama termal döngüsü.

Tablo 17: Yakalama sonrası amplifikasyon için reaksiyon karışımı.

Tablo 18: Yakalama sonrası amplifikasyon termal döngü koşulları.

Tablo 19: Nihai yükleme konsantrasyonuna bağlı olarak gerekli havuzlanmış kitaplık konsantrasyonları.

Tablo 20: ACMG varyant puanlama tablosu.

Tablo 21: Patojenik varyantları sınıflandırma kriterleri.

Tablo 22: Zararsız varyantları sınıflandırma kriterleri.

Tablo 23: Primer dizileri.

Tablo 24: PZR döngü koşulları.

Tablo 25: Dizi PZR termal döngü koşulları.

Tablo 26: Çalışma grubumuzda saptanan patolojik US bulguları.

Tablo 27: TED analizi ile saptanan varyantlar ve ilişkili fenotipler.

Tablo 28: Olgu 1’de saptanan *ZIC2* ve *PTCH1* varyantlarına ait bilgiler.

Tablo 29: Olgu 2’de saptanan *SHH* varyantına ait bilgiler.

Tablo 30: Olgu 3’te saptanan *SIX3* ve *GLI2* varyantlarına ait bilgiler.

Tablo 31: Olgu 4’te saptanan *KATNIP* (*KIAA0556*) varyantlarına ait bilgiler.

Tablo 32: Olgu 5’te saptanan *HESX1* varyantlarına ait bilgiler.

Tablo 33: Olgu 6’da saptanan *DHCR7* varyantlarına ait bilgiler.



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Nöral tüpün gelişimi, transvers kesit.

Şekil 2: Nöral tüpün kapanışının dorsal görünümü.

Şekil 3: Beyin veziküllerinin gelişimi.

Şekil 4: Prozensefalik gelişim bozuklukları spektrumunun şematik tasviri.

Şekil 5: HPE ve siklopi tarihinde sanatsal kaynaklar.

Şekil 6: HPE varyant tiplerinin MRG görüntüleri.

Şekil 7: Normal fetal beyinde 'kelebek işareti' ve HPE'de kelebek işaretinin yokluğu.

Şekil 8: "Kafatasının altında bir yılan" işaretinin ultrosonografik gösterimi.

Şekil 9: HPE hastalarında klinik ve moleküler tanı için önerilen bir protokol.

Şekil 10: HPE etiyolojisi.

Şekil 11: HPE delesyonlarının ve genlerinin G bantlı kromozomlar üzerindeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi.

Şekil 12: Telensefalonu düzenleyen sinyal merkezleri.

Şekil 13: Nodal sinyal yolunun şematik gösterimi.

Şekil 14: SHH üretimi ve salgılanması.

Şekil 15: Sonic hedgehog sinyal yolunun şematik gösterimi.

Şekil 16: Ön beyin gelişimi ve HPE ile ilgili temel sinyal yolların şematik gösterimi.

Şekil 17: Prenatal invazif girişimlerin dağılımı. (n=10)

Şekil 18: Olgu 1'e ait aile ağacı.

Şekil 19: Olgu 1'in klinik muayene bulguları.

Şekil 20: Olgu 1'e ait moleküler analiz sonuçları.

Şekil 21: Olgu 2'ye ait aile ağacı.

Şekil 22: Olgu 2'nin fizik muayene bulguları.

Şekil 23: Olgu 2'ye ait moleküler analiz sonuçları ve amino asit dizisinin evrimsel korunumu.

Şekil 24: Olgu 3'e ait aile ağacı.

Şekil 25: Olgu 3'ün klinik muayene bulguları.

Şekil 26: Olgu 3'e ait moleküler analiz sonuçları.

Şekil 27: Olgu 4'e ait aile ağacı.

Şekil 28: Olgu 4'ün klinik muayene bulguları.

Şekil 29: Olgu 4'e ait moleküler analiz sonuçları.

Şekil 30: Olgu 5'e ait aile ağacı.

Şekil 31: Olgu 5'e ait moleküler analiz sonuçları.

Şekil 32: Olgu 6'ya ait aile ağacı.

Şekil 33: Olgu 6'nın klinik muayene bulguları.

Şekil 34: Olgu 6'ya ait moleküler analiz sonuçları.

Şekil 35: Olgu 7'ye ait aile ağacı.

Şekil 36: Olgu 7'nin klinik muayene bulguları.

Şekil 37: Olgu 8'e ait aile ağacı.

Şekil 38: Olgu 8'in klinik muayene bulguları.

Şekil 39: Olgu 9'a ait aile ağacı.

Şekil 40: Olgu 9'un klinik muayene bulguları.

Şekil 41: Olgu 10'a ait aile ağacı.

Şekil 42: Olgu 10'un klinik muayene bulguları.

Şekil 43: Zic proteinin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi.

Şekil 44: Ptch1 proteinin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi.

Şekil 45: SHH sinyal yolu ile PTCH1 ilişkisi.

Şekil 46: SHH proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi.

Şekil 47: Six3 proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi.

Şekil 48: Gli2 proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi.

Şekil 49: Katnip proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi.

Şekil 50: Hesx1 proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi.

Şekil 51: Dhcr7 proteininin öngörülen yapısı ve membran topolojisi ile olgumuzdaki varyantların protein üzerindeki konumu.



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACA: Anterior serebral arter

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

AS: Amniyosentez

ASP: Septum pellucidum agenezisi

BA: *Benign stand-alone*

BMI: Vücut Kitle İndeksi

BS: *Benign strong*

BP: *Benign supporting*

BMP: Kemik morfogenetik proteini (*bone morphogenetic protein*)

CC: Korpus kallozum

CCA: Korpus kallozum agenezisi

CSP: Cavum septi pellucidum

CBDMP: Kaliforniya Doğum Kusurları İzleme Programı (*California Birth Defects Monitoring Program*)

CMV: Sitomegalovirüs

SSS: Santral sinir sistemi

CNV: Kopya sayısı değişiklikleri

CVS: Koryon villus biyopsisi

DISP1: Dispatched1

ECLAMC: Latin Amerika Konjenital Malformasyon Çalışması (*Latin American Study of Congenital Malformations*)

EUROCAT: European Surveillance of Congenital Anomalies

FDA: Gıda ve İlaç İdaresi (*Food and Drug Administration*)

FGF: Fibroblast büyüme faktörü (*fibroblast growth factor*)

HPE: Holoprozensefali

IUMF: İntrauterin Mort Fetus

İKK: İntrakraniyal kanama

KS: Kordosentez

MIHF: Orta İnterhemisferik Füzyon Varyant (*Middle Interhemispheric Fusion Variant*)

MIHF: Orta İnterhemisferik Varyant (*Middle Interhemispheric Variant*)

MÖ: Milattan önce

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

MT: *MutationTaster*

NBDPS: Ulusal Doğum Kusurlarını Önleme Çalışması (*National Birth Defects Prevention Study*)

NGS: *Next Generation Sequencing*

NTD: Nöral tüp defekti

OD: Otozomal dominant

OR: Otozomal resesif

PA: Perikallosal arter

PEV: Pes ekinovarus

PM: *Pathogenic moderate*

PP: *Pathogenic supporting*

PS: *Pathogenic strong*

PTCH: Patched

PVS: *Pathogenic very strong*

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RDS: Respiratur distress sendromu

SHH: Sonic hedgehog

SLOS: Smith-Lemli-Opitz sendromu

SMO: Smoothened

SOD: Septooptik displazi

TED: Tüm ekzom dizileme

TGD: Tüm genom dizileme

US: Ultrasonografi

VSD: Ventiküloseptal defekt

WES: Whole exome sequencing

WNT: *Wingless/integrated*

YDD: Yarı damak dudak

YND: Yeni nesil dizileme

ZFD: Çinko parmak domain (*zing finger domain*)

7-DHC: 7-dehidrokolesterol

ÖZET

Giriş: Holoprozensefali (HPE), sıklığı yaklaşık olarak 16.000 canlı doğumda ve 250 gebelikte bir olarak bildirilen, üçüncü ve dördüncü gestasyon haftalarında ön beynin başarısız veya tam olmayan bölünmesi ile meydana gelen, insanlarda ön beynin en yaygın malformasyonudur. HPE heterojen bir etiyolojiye sahip olup genetik ve çevresel faktörler etiyolojide yer alır. Genetik etiyolojide HPE'li bireylerin yaklaşık %25-50'sinde kromozom anormallileri, %10'unda patojenik kopya sayısı değişiklikleri, %18-25'inde tek bir gende patojenik bir varyant ile ilişkili en az 25 farklı antite ile ilişkilendirilmiş sendromik HPE yer alır. Genetik etiyolojide yer alan diğer grup, nonsendromik-izole HPE'lerdir. Bu grup genellikle eksik penetrans ve değişken ekspresivite gösterir ve çoğunlukla otozomal dominant kalıtım paternine sahiptir. Nonsendromik HPE ile ilişkilendirilmiş en iyi bilinen 4 gen *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* ve *TGIF* olmakla beraber literatürde çok sayıda HPE ile ilişkisi tanımlanmış gen mevcuttur, bu genler genellikle erken embriyonik dönemde ön beyin gelişiminde etkili olan SHH, Nodal, TGF- β , BMP, FGF ve Retinoid sinyal yollarındadırlar. Bu yollarındaki genler başta olmak üzere etiyolojiyi açıklamak için araştırılan aday genler de mevcuttur. Son veriler aynı zamanda bu grubun multigenik ve multi-hit (ilave ya da ek genetik mutasyonlar) bir kökeni olduğuna da işaret etmektedir. Teknolojik gelişmeler ve yeni nesil dizileme yöntemleri ile moleküler çalışmalar HPE olgularında yoğunlaşmış olup, aday genler ve bu genlerin klinik korelasyonu araştırılmaktadır ancak halen ailevi HPE olguları da dahil moleküler tanı konulamayan olgular mevcuttur. Moleküler teşhis etiyopatogenezin netleştirilmesi, özgün genetik danışmanın verilebilmesi ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Yöntemler: Bu çalışmada, 2011-2021 yılları arasında prenatal dönemde HPE saptanarak intrauterin mort fetus (IUMF) veya tıbbi tahliye ile kalp atımı kaybolan ve İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde postmortem değerlendirilen; daha önce Tıbbi Genetik AD polikliniğinde hazırlanmış klinik dosyalarının değerlendirilmesi ve saklanmış DNA örnekleri ile yürütüldü. Tez kapsamında 10 olgu çalışmaya dahil edilerek tüm ekzom dizileme (TED) yöntemi ile solo analiz gerçekleştirilmiş; beklenen kalıtım modeline ve yolak genlerine uygun biyoinformatik yaklaşımlarla genetik etiyoloji araştırılmıştır.

Sonuçlar: TED analizi ACMG kriterleri baz alınarak değerlendirilen olgularımızda 6 farklı olguda 8 farklı gende hastalık ilişkili veya ilişkili olduğu düşünülen 10 adet varyant saptandı. Bu varyantlardan 6'sı yanlış anlamlı, 2'si anlamsız, 2'si ise çerçeve kayması tipinde idi. Bu varyantlar Sanger dizi analizi ile doğrulandı ve mümkün olan ailelerde segregasyon analizleri yapıldı.

Tartışma: Bu çalışmada; prenatal dönemde HPE saptanan olgularda mevcut kliniğe neden olabilecek genlerin ve genlerdeki varyantların TED yöntemi ile araştırılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen verilerin etiyopatogenezin netleştirilmesi ile prenatal/preimplantasyon genetik tanı olanaklarına, genotip-fenotip korelasyonunun detaylandırılmasına ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: holoprozensefali, prenatal holoprozensefali, tüm ekzom dizileme, TED



ABSTRACT

Introduction: HPE is the most common malformation of the forebrain in humans, occurring with failed or incomplete division of the forebrain during the third and fourth weeks of gestation, with a frequency of approximately 1 in 16,000 live births and 250 pregnancies. HPE has a heterogeneous etiology, and genetic and environmental factors are involved. Approximately 25-50% of individuals with HPE have chromosomal abnormalities, 10% have pathogenic copy number variation and 18-25% have syndromic HPE associated with at least 25 different entities associated with a pathogenic variant in a single gene. The other group with genetic etiology was non-syndromic-isolated HPEs. This group usually shows incomplete penetrance and variable expressivity, and mostly has an autosomal dominant inheritance pattern. Although the four best-known genes associated with non-syndromic HPE are SHH, ZIC2, SIX3, and TGIF, there are many genes in the literature that have been associated with HPE. These genes are usually involved in the SHH, Nodal, TGF- β , BMP, FGF and Retinoid signalling pathways that are effective in forebrain development during the early embryonic period. Many candidate genes have been investigated to explain the etiology, especially those involved in these pathways. Recent data have also indicated that this group has a multigenic and multihit origin. Technological developments, next-generation sequencing methods, and molecular studies have focused on HPE cases, and candidate genes and clinical correlations of these genes are being investigated, but there are still cases where no molecular diagnosis can be made, including familial HPE cases. Molecular diagnosis is of great importance in terms of clarifying etiopathogenesis, providing specific genetic counselling, and determining treatment options.

Methods: In this study, we evaluated the clinical files of patients with HPE detected during the prenatal period between 2011 and 2021, whose heartbeat was lost by IUMF or medical evacuation, and who were evaluated postmortem in the outpatient clinic of the Department of Medical Genetics, Istanbul Medical Faculty, and evaluated their clinical files previously prepared in the outpatient clinic of the Department of Medical Genetics and preserved DNA samples. Within the scope of this thesis, 10 cases were included in the study and a solo analysis was performed with the whole exome sequencing (WES) method; genetic etiology was investigated using bioinformatic approaches appropriate to the expected inheritance model and pathway genes.

Results: In our cases evaluated on the basis of WES analysis ACMG criteria, 10 variants were detected in eight different genes in six different cases, which were associated or thought to be associated with the disease. Of these variants, 6 were missense, 2 were nonsense, and 2 were

frameshift types. These variants were confirmed by Sanger sequencing, and segregation analyses were performed on possible families.

Discussion: In this study, it was aimed to determine the genes and variants in the genes that may cause the current clinic in cases with holoprosencephaly detected in the prenatal period by investigating them by WES method. It is expected that the data obtained from our study will contribute to the clarification of the etiopathogenesis, possibilities of prenatal/preimplantation genetic diagnosis, elaboration of the genotype-phenotype correlation, and development of treatment options.

Keywords: holoprosencephaly, prenatal holoprosencephaly, whole exome sequencing, WES



GİRİŞ VE AMAÇ

HPE, üçüncü ve dördüncü gestasyon haftalarında ön beynin başarısız ve tam olmayan bölünmesi ile meydana gelen, insanlarda ön beynin en yaygın malformasyonudur. Sıklığı 250 gebelikte 1 veya 16.000 canlı doğumda 1 olarak bildirilmiştir. İntrauterin insidans ile canlı doğumlarda insidans farkı olmasının nedeni fetal dönemde yüksek gebelik kayıpları ile açıklanır. Bu anomalide ön beyin sağ ve sol hemisferlere, derin beyin yapılarına, olfaktör ve optik bulbus ve yollara tam olarak bölünmez. HPE, serebral hemisferlerin ayrışmasındaki yetersizliğin derecesine göre klasik olarak şiddeti çoktan aza doğru; alobar, semilobar ve lobar olarak sınıflandırılır (1, 2). Ayrıca ek olarak orta interhemisferik füzyon varyant (MIHV) HPE, septopreoptik HPE ve mikroform HPE varyantları da ilerleyen süreçlerde tanımlanmıştır (3).

HPE oldukça heterojen bir etiyolojiye sahip olup genetik ve çevresel faktörler etiyolojide yer alır. Genetik olmayan nedenler arasında maternal hastalıklar, maternal terapötik madde kullanımı, maternal non-terapötik madde kullanımı, nutrisyonel nedenler, gebelik özellikleri, üreme hikayesi ve sosyodemografik faktörler literatürde tartışılmış ve HPE'nin çok sayıda çevresel ve teratojenik nedeni öne sürülmüştür. Ancak maternal diyabet kesin bir nedensel bağlantıya sahip olduğu yaygın olarak kabul edilen ve iyi bilinen bir risk faktörüdür (2, 4, 5). Genetik etiyolojide, kromozom anomalileri yaklaşık %25-50 kadar olguda, patojenik kopya sayısı değişiklikleri %10 kadarında yer alır. Olguların %18-25 kadarında ise tek bir gende patojenik bir varyant ile ilişkili farklı antiteler ile ilişkilendirilmiş sendromik HPE grubu yer alır (6, 7). Genetik etiyolojide yer alan diğer grubu non-sendromik izole HPE oluşturur. Bu son grup eksik penetrans ve değişken ekspresivite gösterir ve otozomal dominant kalıtım paternine sahiptir. Non-sendromik HPE etiyolojisinde başta *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* ve *TGIF1* genleri olmak üzere pek çok gende patojenik varyant tanımlanmıştır. Bu genler, beyin gelişiminde etkili olan SHH, BMP, FGF, WNT, Nodal ve Retinoid sinyal yollarında yer almaktadır ve bu yollar aday genler açısından güncel bilgiler ışığında değerlendirilmektedir. Son veriler ayrıca bu grubun digenik / multigenik ve çoklu vuruş kökeni olduğuna işaret etmektedir (7, 8, 9).

İnsan genom projesinin tamamlanması ile birlikte yeni nesil dizileme (YND) olarak adlandırılan masif paralel dizileme yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. YND yönteminde kullanılan ilk *Next Generation Sequencing* (NGS) cihazı 2005'te kullanıma sunulmuş ve 2009 yılında tüm dünyada kullanılmaya başlanan ve ilerleyen yıllarda kullanımı artan YND teknolojisi yüksek kapasitesi ve hızı ile birçok hasta ve genin eş zamanlı olarak dizilenmesinin yanı sıra insan genomundaki yaklaşık 20.000 genin, klinik bulgularla ilişkili gen/genlerin bilinmediği ya da birçok genin ilişkili olabildiği durumlarda tüm ekzomun ya da genomun tek

bir test ile incelebilmesine olanak sağlayarak moleküler genetik analizlere çok önemli katkılar sağlamıştır. Moleküler etiyopatogenezin aydınlatılmasında TED analizlerinin özellikle ekzonik mutasyonların saptanmasındaki önemli etkinliği artık bilinmektedir. HPE olgularında, teknolojik gelişmeler ve YND yöntemleri ile moleküler çalışmalar yoğunlaşmıştır (9, 10). YND teknolojisinin gelişmesi ve daha erişilebilir hale gelmesi ile TED artık HPE hastalarını araştırmak için rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Dizileme teknolojisindeki gelişmelere ve HPE ile ilişkili genlerin sayısının artmasına rağmen, pozitif moleküler tanı yüzdesinde artış HPE vakalarında beklenen oranda olmamıştır. Çoğu olguda eksik penetrans ve fenotipik değişkenliğin gözlenmesi digenik/oligogenik kalıtım ve *multihit* mekanizmalarının bu grupta ön planda olduğunu düşündürmüştür. Bu karmaşık genetik mimari, çözülmemiş HPE vakalarında yüzlerce genin YND teknikleri ile analizi ile daha iyi anlaşılmaktadır (11).

Bu çalışma kapsamında prenatal dönemde HPE saptanan ve postmortem fizik muayenesi yapılan fetal olgularda mevcut kliniğe neden olabilecek genlerin ve genlerdeki varyantların TED yöntemi ile araştırılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonuçlarının, patogeneizde rol oynayan genlerin ve varyantların belirlenmesi ile bilimsel literatüre katkı sağlaması beklenmektedir. Moleküler genetik tanı ile etiyopatogenezin aydınlatılması ve özgün genetik danışmanın verilebilmesi amaçlanmıştır.

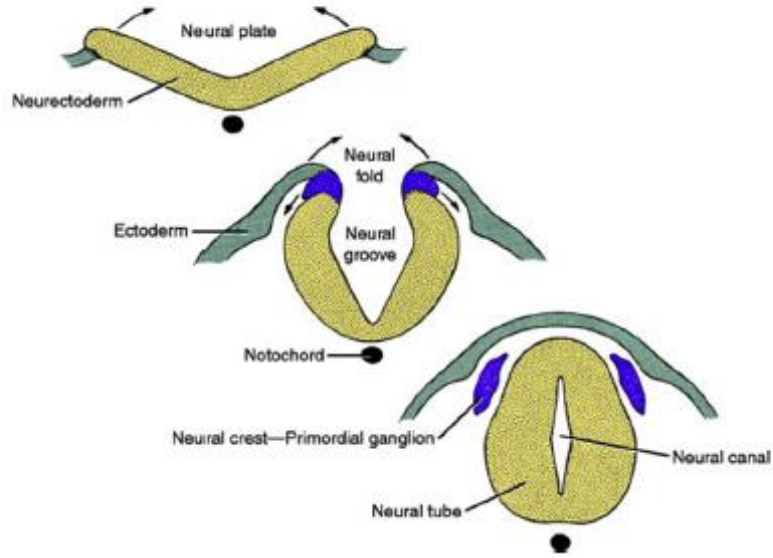
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Santral Sinir Sistemi (SSS) Embriyolojisi

Sinir sisteminin normal gelişiminin karmaşık düzenlemesi, yalnızca normal pluripotent dokuların varlığına değil, aynı zamanda bu dokuların belirli zamanlarda belirli bir farklılaşmış durumlarda bulunmasını gerektirir. Ayrıca, hassas bir şekilde zamanlanmış bu süreç, belirli yerlerde ve zamanlarda bulunması gereken çok sayıda morfogeni içerir. Nihayetinde, belirli bir malformasyonun neden ve nasıl geliştiğinin anlaşılması ancak normal embriyolojik gelişimin anlaşılmasıyla mümkündür.

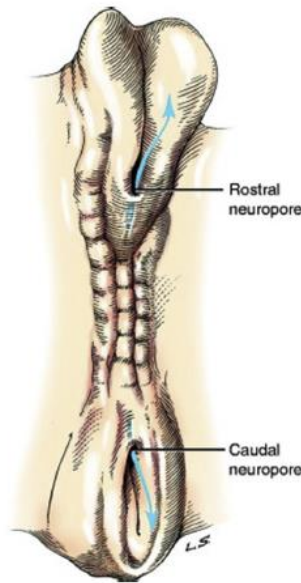
Gelişimin erken aşamalarında, tüm omurgalı embriyolarında, fetustaki tüm doku ve organlar üç hücre tabakasından oluşur. En dıştaki veya dorsaldeki katman olan ektoderm, epidermisi, nöral dokuları ve başın bazı iskelet ve bağ dokularını oluşturur. En derin ve en içteki katman olan endoderm, gastrointestinal ve solunum sistemi ile ilgili organların zarını ve karaciğer, pankreas ve mesane gibi karın içi organları oluşturur. Bu iki tabaka arasında kalan mezoderm, kasların, iskelet dokularının, ürogenital sistemin, kalp ve kan damarlarının çoğunu oluşturur (12).

Merkezi sinir sistemi, ilk olarak ektodermin kalınlaşması ile gelişen nöral plaka adını alan tübüler bir yapıdan gelişir. Bu nöral plak, notokord adı verilen mezodermal hücrelerin dorsalinde yer alan sütundan gelişir. Notokord, embriyonik ilkel çizgiden kaynaklanan ve embriyonun uzun eksenini oluşturan longitudinal bir mezodermal hücre kolonudur. Bu nöral plak, uzun eksen boyunca invajine olur, başlangıçta bir nöral oluk oluşturur, ardından bu orijinal nöral plağın lateral uçlarında bir yükselme olur ve böylece nöral kıvrımlar meydana gelir. Bu kıvrımlar, nöral oluk üzerinde bir nöral tüp ve nöral kanal oluşturmak için merkezde birleşirler. Nöral tüp oluşukça, orta hat boyunca kaynaşmak için tüpün dorsumu üzerinde büyüyen ve nöral olmayan ektodermden ayrılır. Ektodermal katmanların bu füzyonu ve ayrılması meydana geldiğinde, nöral olmayan ve nöral ektodermin birleşiminden ektodermal epitel hücrelerinin longitudinal bir kolonu ortaya çıkar ve nöral tüp oluştuğunda bu iki yapıdan ayrılır. Nöral tüpün tüm uzunluğu boyunca dorsolateralinde yer alan iki taraflı kolonlar, nöral krest hücrelerinin kolonlarıdır (12). Şekil 1'de nöral tüpün gelişiminin transvers kesiti görülmektedir.



1.Şekil 1: Nöral tüpün gelişimi, transvers kesit (12).

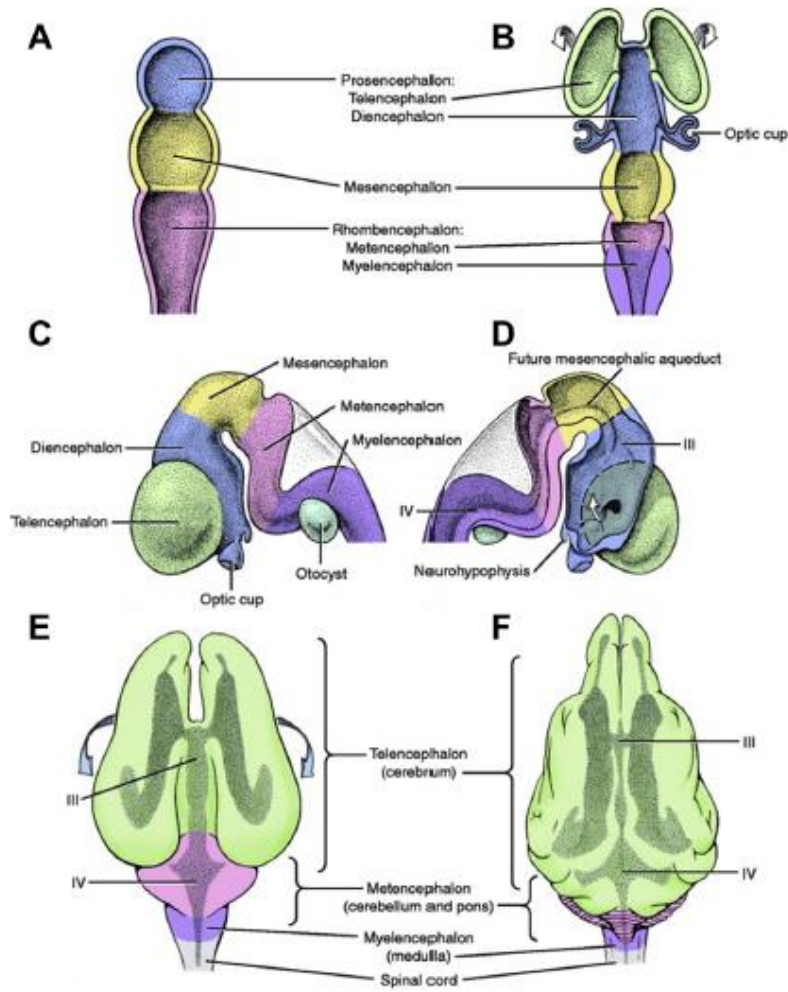
Nöral tüpün kapanması, beynin en kaudal bölümü olan rombensefalonun (arka beyin) gelişim bölgesi seviyesinden rostral ve kaudal olarak ilerler. Kaudal kapanma, omuriliğin çoğunu oluşturur. Nöral tüpün beyin kısmının kapanması, başlangıçta birden fazla bölgede meydana gelebilir ve rostral ve kaudal olarak ilerleyebilir. Bu bölgelerin yerleri türler arasında değişir. Tam kapanmadan önce, en rostral açıklık rostral nöropordur. Benzer şekilde, nöral tüpün kaudal açıklığına kaudal nöropor denir. Şekil 2’de nöral tüpün kapanışı dorsal kesitten görülmektedir.



1.Şekil 2: Nöral tüpün kapanışının dorsal görünümü (12).

Omuriliğin kaudal kısmı, kapalı nöral tüpün kaudal ucundan, notokord ve deri ektodermi arasındaki orta hat üzerinde kaudal olarak büyüyen bir nöroepitelyal hücre kolonunun bir uzantısı olarak gelişir. Bu hücre sütunu içindeki bir kavitasyon, nöral kanalın bir uzantısını oluşturur. Nöral tüpün bu kısmı sonunda kaudal, sakral ve değişken sayıda lomber omurilik segmentlerini oluşturur (12).

Nöral tüpün rostral ucu hızla gelişir ve rostralden kaudala doğru veziküller üretir; bu veziküller, prozensefalon (ön beyin), mezensefalon (orta beyin), ve rombensefalon (arka beyin)'dur. Şekil 3'te nöral tüpten gelişen beyin vezikülleri ve bu veziküllerin gelişimi gösterilmektedir.



Şekil 3: Beyin veziküllerinin gelişimi (12). (A) Üç vezikül aşaması. (B – F) Beş vezikül aşaması. III, IV: ventriküller.

Prozensefalon, sağ ve sol ön beyin yapılarını oluşturmak için sıvı dolu nöral tüpün rostral uzantısının çatallanmasını indükleyen süreçler yoluyla ön nöroporun kapanmasından sonra gelişir. Gelişimin 5. ve 6. haftalarında, ön beyin, üç ana düzlem boyunca bölünerek

gelişimini tamamlar. Embriyo yaklaşık 5 mm uzunluğa ulaştığında, her iki nöropor da kapanarak gelişmekte olan ventriküler sistemi amniyotik sıvıdan izole eder. Retina ve lens plak kodları da bu dönemde gelişir (12).

Prozensefalon; telensefalon ve diensefalonu içeren gelecekteki ön beyin anlamına gelir; bu yapılar serebral hemisferleri ve talamus/hipotalamusu oluşturur. Prozensefalonun nöral tüpün rostral ucunda kalan kısmı diensefalondur. Optik veziküller diensefalon ile ilişkili kalır. Diensefalon içindeki nöral kanal üçüncü ventriküldür. Lateral ventriküller (birinci ve ikinci ventriküller) her telensefalonun (serebral yarım küre) nöral kanalı ile rostrolateral olarak iletişim kurar. Talamus ve hipotalamusun çekirdekleri diensefalondan gelişir. Nörohipofiz, diensefalonun ventral büyümesi ile oluşur. Serebral korteks ve bazal çekirdeklerin çoğu ise telensefalondan gelişir (13).

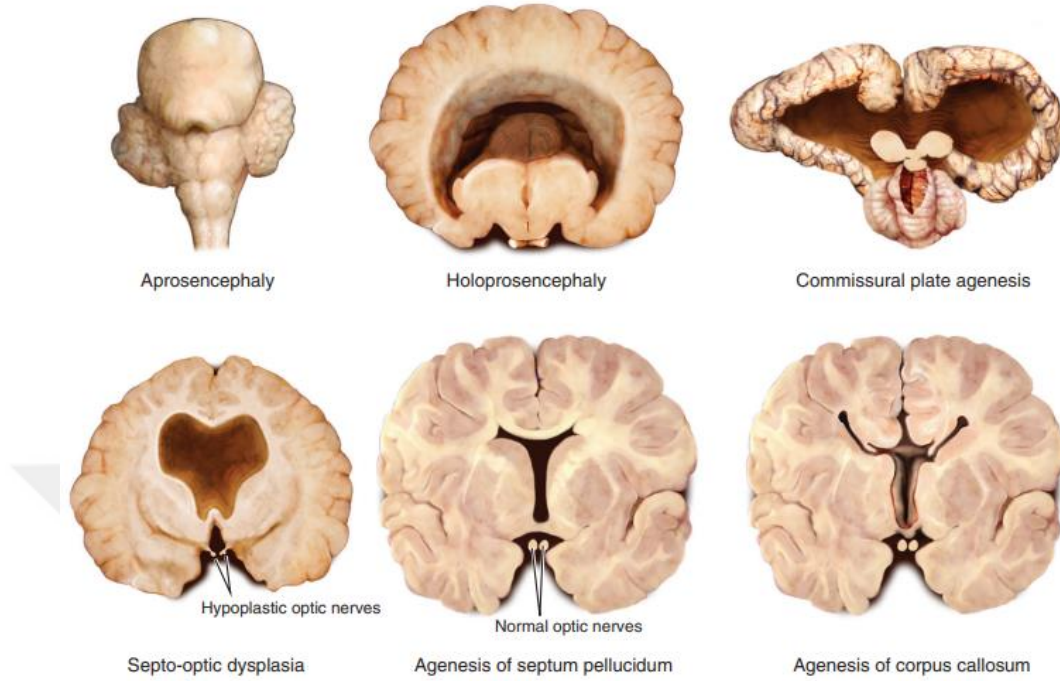
Gebeliğin yaklaşık 32. gününde, embriyo 5 ila 7 mm uzunluğundayken, ön beyin sagittal düzlemde eşleştirilmiş yapıları meydana getirmek üzere bölünür. Hipotalamik bölge, amigdala, hipokampal bölge ve olfaktör bölgeler dahil olmak üzere belirli alanlar bu aşamada tanımlanabilir. Ön beyin gelişimindeki üçüncü büyük olay bundan kısa bir süre sonra ön beyin koronal düzlemde bölündüğünde meydana gelir. Bu olay telensefalonu diensefalondan ayırarak epitalamus, subtalamus ve hipotalamusu meydana getirir. Gebeliğin ikinci ve üçüncü aylarının geri kalanında, korpus kallozum, anterior ve hipokampal komissürler, optik sinirler, optik kiazma ve hipotalamus dahil olmak üzere çoklu orta hat yapıları oluşur (13).

Rombensefalon, metensefalon ve miyelensefalonu oluşturur. Rostral rombensefalondan, serebellum gelişir. Kalan ventral metensefalondansa pons oluşur. Kaudal rombensefalon, miyelensefalon veya medulla oblongatayı oluşturur (12).

2.2. Prozensefalonun Gelişim Anomalileri

Prozensefalonun gelişimine yol açan ventral indüksiyon süreci birbiriyle yakından bağlantılı üç ardışık olaydan oluşur: bunlar prozensefalik oluşum, prozensefalik bölünme ve prozensefalik orta hat gelişimidir. Prozensefalik oluşum bozuklukları, aprozensefali ve atelensefali ile temsil edilir ve oldukça nadirdir. HPE ise, iyi bilinen bir prozensefalik bölünme bozukluğudur. Geçmişte HPE, "arinensefali" ile karıştırılıyordu, dolayısıyla koku alma yapılarının yokluğu vurgulanıyordu. Daha sonra DeMyer ve Zeman 1963'te, HPE'de ana nedensel faktör olarak prozensefalonun bölünme ve farklılaşma eksikliğini daha açık bir şekilde tanımladı (14, 15). Prozensefalik orta hat gelişim bozuklukları arasında ise korpus kallozum agenezisi (CCA), septum pellucidum agenezisi (ASP) ve septooptik displazi (SOD) yer alır

(16). Şekil 4'te prozensefalik gelişim bozuklukları spektrumu şematik olarak gösterilmiştir. Tablo 1'de ise prozensefalonun gelişim anomalileri listelenmiştir.



Şekil 4: Prozensefalik gelişim bozuklukları spektrumunun şematik tasviri (17).

Tablo 1: Prozensefalik Gelişim Bozuklukları (14). (Volpe ve ark., 2000 çalışmasından uyarlanmıştır.)

Prozensefalik Oluşum
1. Aprozensefali
2. Atelensefali
Prozensefalik Bölünme
1. Holoprozensefali
Orta Hat Prozensefalik Gelişim
1. Korpus kallozum agenezisi
2. Septum pellucidum agenezisi (serebral yarık +/-)
3. Septo-optik displazi

2.2.1. Prozensefalik Oluşum Bozuklukları

2.2.1.1. Aprozensefali ve Atelensefali

Aprozensefali ve atelensefali, prozensefalik gelişim bozukluklarının en şiddetlisidir. Aprozensefalide, tüm süreç meydana gelmez ve sonuç, gelişmemiş bir beyin sapının rostral

ucunda yer alan bir prozensefalik kalıntı ile hem telensefalon hem de diensefalon oluşumunun olmamasıdır. Atelensefalide, diensefalon nispeten korunduğu için anomali daha az şiddetlidir. Bu bozuklukların kökeni muhtemelen gebeliğin ikinci ayının başlangıcındaki prozensefalik gelişimin başlangıcıdır (18).

Aprozensefali-atelensefali, supraorbital bölgenin üzerinde çok az hacme sahip çarpıcı derecede küçük bir kafatası ile karakterizedir. Anensefaliden ayırım, dermal yapılar ile kaplı sağlam kafatasına dayanmaktadır. HPE'lili olgularda karşımıza çıkan siklopi (gözün üst kısmında bir hortum içeren tek göz veya kısmen bölünmüş göz) gibi yüz anomalileri, atelensefaliden çok aprozensefali olguları ile ilişkilidir. Aprozensefali letal bir durumdur; çoğu örnek, fetal örnekler veya yenidoğan döneminde ölen hastaları içermektedir. Atelensefali olgularında solunum dışında çok az nörolojik fonksiyonla yaklaşık bir yıl hayatta kalma gözlenmiştir (18).

2.2.2. Prozensefalik Bölünme Bozuklukları

2.2.2.1. Holoprozensefali

Holoprozensefalik bozukluklar spektrumu, prozensefalik gelişimin özellikle gebeliğin 18. ila 28. günleri arasında meydana gelen prozensefalik bölünmenin bozulduğu şiddetli bir bozukluktur. Bu spektrumda, ön beyin malformasyonu o kadar şiddetli olabilir ki, hem telensefalon hem de diensefalonun oluşumunda belirgin bir bozukluk olabilir. Bununla birlikte, genel olarak, holoprozensefali terimi, bölünme bozukluklarının tüm spektrumu için kullanılır ve temelde bozukluk, prozensefalonun yatay, enine ve sagittal bölünmesinin başarısızlığıdır (18).

2.2.3. Orta Hat Prozensefalik Gelişim Bozuklukları

Orta hat prozensefalik gelişim bozuklukları, komissural, kiazmatik ve hipotalamik plakalar etrafında gerçekleşir. Orta hat prozensefalik gelişim anormallikleri, prozensefalik gelişim anormallikleri spektrumunun en hafifi olarak kabul edilebilir. Orta hat bozuklukları en iyi iki geniş bozukluk olan korpus kallozum ve septum pellucidum anormallikleri açısından tartışılır.

2.2.3.1. Korpus Kallozum Agenezisi

Komissural agenezi, üç komissürün herhangi birini veya tümünü içerebilir ve klinik açıdan bakıldığında, korpus kallozumun agenezisi en önemlisidir. Kallozal agenezi gerçek bir agenezi değil, bir heterotopizm biçimidir, çünkü orta hattı geçemeyen aksonlar, Probst demetleri gibi heterotopik yollar oluşturmak üzere yeniden yönlendirilirler. Ancak, korpus

kallozum kendi başına oluşmaz; bu nedenle korpus kallozum agenezisi makul bir tanımdır. Kallozal agenezi, kısmi veya tam; izole veya karmaşık (diğer merkezi sinir sistemi anomalileri, dismorfik sendromlar, kromozomal veya genetik anomaliler, edinilmiş enfeksiyöz veya vasküler lezyonlarla ilişkili) olarak sınıflandırılabilir. Kallozal hipoplazi terimi, muhtemelen kesişen akson sayısının azalması nedeniyle, rostrokaudal ölçüde dolu ancak enine kesitte dar veya ince bir korpus kallozumu tanımlamak için kullanılır. Kallozal agenezin karmaşık formları, ilişkili beyin bulguları ve/veya sendromik, kromozomal veya genetik durumlara sahip olanlardır. Bu ilişkili durumların tanımlanması önemlidir, çünkü bunlar genellikle daha kötü bir prognoz ile ilişkilidirler (18).

Kapsamlı bir literatür taramasında, CCA olan olgularda eşlik eden anomalilerin vakaların %46'sında ve kromozomal anomalilerin vakaların %18'inde varolduğu bildirilmiştir (19). Birçok izole kallozal agenezi vakası gözden kaçabileceği için bu rakamlar abartılmış olabilir ve izole kallozal agenezi vakalarında kromozomal anomaliler daha nadiren görülür.

Korpus kallozumun tam agenezisi, en geç 12 haftalık gebelikte ortaya çıkar. Kısmi formlar, gebeliğin 20. haftasında ortaya çıkabilir. Kısmi veya tam korpus kallozum agenezisi veya hipoplazisi ile ilişkili yaklaşık 190 farklı sendrom bildirilmiştir (20). Korpus kallozumun agenezisi manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile tanımlanan seçili serilerde, çoğu vaka eşlik eden diğer beyin anomalileriyle ilişkilendirilmiştir; en sık ilişkili anomaliler arasında, Chiari II malformasyonu, miyelomeningosel, serebellar vermian hipoplazisi ve nöronal migrasyon bozuklukları (şizensefali, lizensefali, pakigiri, polimikrogri, belirgin nöronal heterotopyalar) yer alır.

2.2.3.2. Septum Pellusidum Agenezisi

Kavum septum pellusidumun gelişimsel anomalileri, tam veya kısmi yokluğu ve kalıcı genişlemeyi içerir. Septum pellusidum, her ikisi de komissural plakadan türetilmiş olan anterior korpus kallozuma benzer embriyonik kökenlere sahiptir. Septal yaprakçıklar arasındaki boşluk, foramen monronun önündeki kavum septi pellusidi ve arkasındaki kavum vergaye bölünmüş bir boşluktur. Çoğu durumda, septal yaprakçıklar tek bir septumda birleşir ve doğumdan 6 ay sonra kavumu kapatırlar. Bu zamandan önce, septal yaprakçıkların kısmen veya tamamen yokluğu, kavum septi pellusidumun yokluğu terimine yol açar. Daha sonraki postnatal aşamalarda, septum pellusidumun yokluğu terimi daha uygundur. Septum pellusidum, limbik sistem içinde kritik bir geçiş yapısı olduğundan, bu yapıdaki anormallikler nöropsikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (18).

Korpus kallozumun agenezisi gibi, kavum septi pellusidumun (veya doğumdan sonra septum pellusidumun) yokluğu, klinik olarak daha ciddi prozensefalik gelişim anormalliklerinin veya eşlik eden gelişimsel olayların varlığına dair önemli bir ipucudur. Kavum septi pellusidinin yokluğu, şizensefali hastalarının yaklaşık üçte ikisinde mevcuttur. Korpus kallozumun agenezisinde olduğu gibi, septum pellusidum yokluğunun klinik özellikleri ve uzun vadeli nörogelişimsel sonucu, esas olarak ilişkili bozukluklara bağlıdır.

Kavum septi pellusidinin yokluğu, o kadar geniş bir ön beyin anomalileri yelpazesi ile ilişkilidir ki, prenatal görüntülemeye tanımlama için kardinal bir anatomik yapı haline gelmiştir. Yokluğu, temel bir malformasyondan ziyade anormal ön beyin gelişiminin bir belirtisi olarak kabul edilir. Fetal MRG, septal yaprakçıklardaki anormallikleri güvenilir şekilde saptar ve vakaların %52'sinde fetal ultrasonografide belirgin olmayan ek beyin anomalilerini saptamaya yardımcı olur (21).

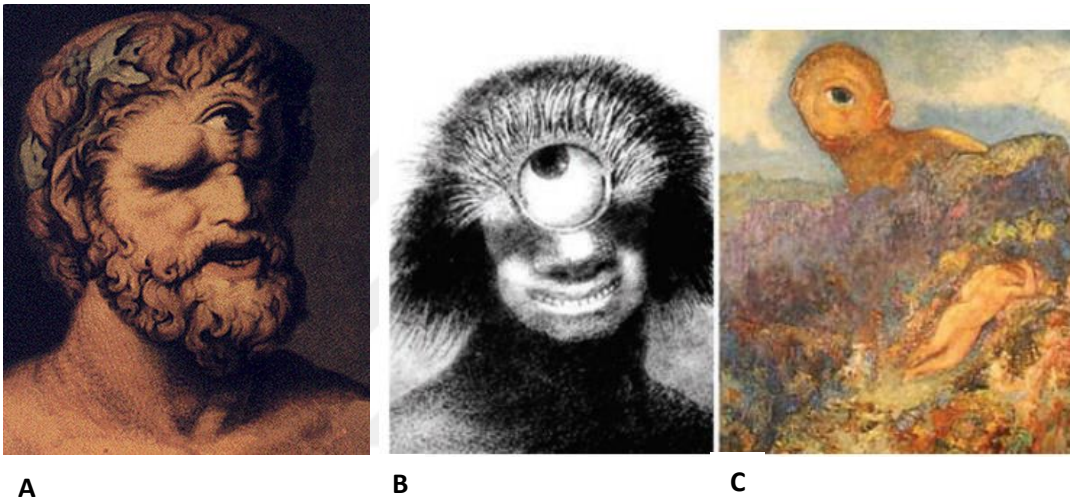
2.2.3.3. Septo-Optik Displazi

Septo-optik displazi sendromu ilk olarak 1953'te De Morsier tarafından kavum septi pellusidi yokluğu ile optik sinir hipoplazisi arasındaki ilişki olarak tanımlanmıştır. Daha sonra hipotalamus-hipofiz fonksiyonu bozuklukları da bir tanı kriteri haline gelmiştir. Septo-optik displazi tanısı klinikte ve optik sinir hipoplazisi, hipofiz hormonu anormallikleri ve orta hat beyin kusurlarından (septum pellusidum ve/veya korpus kallozum agenezisi) oluşan klasik üç anomalinin iki veya daha fazlasının var olması ile tanı konulur (22). Nadir bir konjenital anomali olup insidansı 10.000 canlı doğumda 1'dir. Erkeklerde ve kadınlarda eşit sıklıkta görülür ve daha genç annelerden doğan bebeklerde daha sık izlenmektedir (23, 24).

Fetusta septal yaprakçıkların olmaması (ve muhtemelen optik sinir hipoplazisinin saptanması) temelinde bu tanıdan şüphelenilebilir, ancak hipotalamus-hipofiz fonksiyon bozukluğunun doğrulanması ancak postnatal dönemde mümkündür (18). Bir pediatrik oftalmoloji kliniğinden bildirilen, optik sinir hipoplazisi olan geniş bir seçilmiş pediatrik olgu serisinde, olguların yalnızca küçük bir bölümünde septum pellusidum yokluğu olmasına rağmen, tam %72'sinde endokrinopati, özellikle büyüme hormonu ile ilişkili bozukluklar bildirilmiştir (25). Optik sinir hipoplazisi ve septo-optik displazi, heterojen bir orta hat gelişim bozuklukları grubunda akılda tutulması gereken bir antitedir.

2.3. Tarihçe

Holoprozensefali mitolojisinin çoğu siklopiye odaklanır. Ancak bu mitlerin çoğu oldukça hayalidir ve siklopik infant ve hayvanların gözlemlenmesi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. İngiliz müzesinde yer alan Babil Tabletleri'nde ülkeye felaket getirecek tek gözlü bir canavar olduğundan; Yunan mitolojisinde ise Arimaspi'nin Kuzeydoğu İskit'in Altay dağlarında yaşayan tek gözlü insan olduğundan bahsedilir (26). Yunan mitolojinde holoprozensefali, siklopların yaşamı ve davranışlarını konu alan Homeros'un Odyssey destanındaki siklop çoban Polyphemos figürü aracılığıyla yaklaşık MÖ 800 yıllarında antik çağlardan beri bilinmektedir (27).



Şekil 5: HPE ve siklopi tarihinde sanatsal kaynaklar (26).

A: Johann Heinrich Wilhelm Tischbein, Polyphemus adlı eseri (1802). Landesmuseum Oldenburg, Oldenburg. B: Smiling Cyclops, 1883. Museum of Fine Arts, Boston. C: The Cyclops, 1914. Tuval üzerine yağlı boya, Museum Kroller-Mueller, Otterlo, Hollanda.

17. yüzyıla kadar bir siklopik yenidoğan insan veya hayvanlar mistik ve efsanevi anlatılarla ilişkiliydi. 18. yüzyılda HPE ve diğer anomaliler, tanınabilir konjenital durumlar olarak kabul edildi ve HPE vakaları toplanarak bilimsel yöntemlerle açıklanmaya başlandı (27). 19. yüzyılda Etienne Geoffroy Saint-Hilaire ve oğlu Isidore Geoffroy Saint-Hilaire (1832), Vrolik (1834), Hannover (1884), Taruffi (1891) ve diğerlerinin katkıları ile birçok teratolojik çalışma HPE ile ilgili önemli bilgiler sağlamıştır. 19.yüzyılda Hannover (1884) tarafından 368 ve Taruffi (1891) tarafından 184 siklopi olgusu raporlanmıştır. Dareste (1891) ise vernikli yumurta, soğutma, elektrik, manyetizma ve çeşitli kimyasallar ile siklopi ile beraber diğer malformasyonları deneysel olarak üretmeyi başarmıştır. Kundrat 1882'de olfaktör yolların ve

bulbun olmaması durumunu tariflemek için “arinensefali” terimini ortaya atmıştır. 20. yüzyılın başında 1904’te Ballantyne'nin anomaliler üzerine üç ciltlik Antenatal Patoloji ve Hijyen El Kitabında (*Ballantyne's Manual of Antenatal Pathology and Hygiene- Volume 2, The Embryo*) Isidore Geoffroy Saint-Hilaire (1832) siklopiyi etnosefali (birbirinden probosis ile ayrılmış şiddetli derecede yakın yerleşimli gözler) ve sebosefali (tek burun deliği bulunan burun ile ayrılmış yakın yerleşimli gözler) kelimelerini icat ederek siklosefaliler adı altında gruplamıştır. Ayrıca siklopi ile beraber probosisi (genellikle yüzün orta hattında veya orta hattın sadece bir tarafında bulunan burun kemiği içermeyen etli, tüp/hortum benzeri bir yapı) tanımlamak için rinosefalus kelimesini, siklopi ile birlikte küçük mandibula ve anormal ağız yapısını tanımlamak için stomasefali kelimesini bulmuştur (26).

1959 yılında Yakovlev Serebral Malformasyonların Patoarkitektonik Çalışmaları (*Pathoarchitectonic Studies of Cerebral Malformations*) eserinde "holotelensefali" kavramını prozensefalunun lateral ventriküller ile serebral hemisferlerin ayrışmasındaki başarısızlığı tanımlamak için kullanmıştır (26).

Daha sonra 1963 yılında DeMyer ve Zeman bu malformasyon sekansını daha doğru bir şekilde tanımlayan “holoprozensefali” terimini önermiştir. DeMyer ve Zeman (1963) bu anomaliyi alobar, semilobar ve lobar olmak üzere sınıflandırmıştır. Probst (1979) en şiddetli malformasyonu tanımlamak için dorsal keseyi kullanarak holoprozensefalik spektrumu farklı bir şekilde gruplamıştır. Dorsal sakın alobar ve semilobar HPE tiplerinde bulunması ile birlikte Probst sınıflandırması ile DeMyer ve Zeman sınıflamasının örtüştüğü sonrasında anlaşılmıştır. Tablo 2’de bu iki sınıflandırmanın karşılaştırılması görülmektedir (26).

Tablo 2: Holoprozensefalinin DeMyer ve Zeman (1963) ve Probst (1979) karşılaştırmalı sınıflandırmaları (26).

DeMyer and Zeman (1963)	Probst (1979)
Alobar, kese ile birlikte	1. Dorsal kese A
Alobar, kese içermeyen	2. Orta şiddet A
Semilobar, kese ile birlikte	3. Dorsal kese B
	4. Dorsal kese C
Semilobar, kese içermeyen	5. Orta şiddet B
	6. Orta şiddet C
Lobar	7. Psödohemisferik

1963'te DeMyer ve Zeman tarafından bu malformasyon sekansının tanımlanmasından sonra etiyolojiyi açıklamaya yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Günümüzde de bu konudaki çalışmalar devam etmektedir.

2.4.Epidemiyoloji

HPE açısından yapılan epidemiyolojik çalışmalar çeşitli zorluklar içermektedir. Serebral anomali ve yüz fenotiplerindeki geniş çeşitlilik ve holoprozensefalinin etiyolojik heterojenliği, gözlemlenen çalışmalar arası heterojenliğe katkıda bulunmaktadır. Embriyonik ve fetal gelişimin erken aşamalarındaki yüksek letalite, HPE tespitini yaşa bağımlı hale getirir. Ayrıca HPE hakkında yayınlanmış epidemiyolojik çalışmaları değerlendirmedeki ana zorluklar arasında, farklı tanımların uygulanması ve vaka seçiminde farklı stratejiler kullanılarak vakaların tespitinde farklılara neden olması sayılabilir (28).

Matsunaga ve arkadaşlarının 1962'den 1974'e kadar olan dönemde 36.380 gebelik ürününü incelediği çalışmada 250 gebelikte 1 sıklık gözlemlenmiştir; bu çalışma HPE açısından maksimum prevalansı veren çalışmadır (29). Bununla birlikte, daha ileri gebelik yaşlarında HPE hakkında nispeten az sayıda epidemiyolojik çalışma yapılmıştır (28).

2004 yılında, Japonya'da yapılan HPE ile ilgili geniş bir embriyonik çalışmada; embriyolara, karakteristik kraniyofasiyal özelliklerine göre klinik olarak HPE teşhisi konulmuştur. Carnegie evre 13 ila 23 arasında değişen ki bu da yaklaşık olarak son adet dönemine göre 6 ila 10 gestasyon haftasına denk gelmektedir; 44.000 insan embriyosu arasında 201 HPE vakası saptanmıştır. Böylece bu embriyonik popülasyonda şiddetli HPE prevalansı 50:10.000 olarak bulunmuştur (30). Gerçek sıklık muhtemelen daha yüksektir, çünkü HPE'nin hafif formları, özellikle kraniyofasiyal gelişimin erken evrelerinde saptanamamış olabilir. Bu çalışmada HPE tipi belirlenmemiş ve olguların karyotip anomalisi taşıyıp taşımadığı belirtilmemiştir.

Kagan ve arkadaşlarının 2010'daki çalışmasında, 11-13. gestasyon haftasında 57.119 gebelikte 44 adet alobar HPE saptanmış olup sıklığını 7,7:10,000 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada saptanan yüksek prevalansın nedenleri arasında HPE'li fetuslarda, özellikle olası ölümcül kromozom anomalileri ile ilişkili fetuslarda erken gebelik kayıplarının doğumda tespit edilen serilerde görülmemesi ve bu nedenle bu popülasyonun seçilmiş bir popülasyon olması sayılabilir (31).

Blaas ve arkadaşları, gebeliğin 16. haftasından büyük veya eşit olan, tetkik için sevk edilmiş bir popülasyonda 17 HPE olgusu ve 119.411 doğumluk seçilmemiş bir popülasyonunda

ise 13 HPE'li fetus bildirmiştir. Bu popülasyonda lobar HPE vakaları tespit edilmemiş olup; seçilmemiş fetal popülasyonda HPE prevalansı 10.000 1,26 olarak bulunmuştur (32). Tayvan'dan yapılan bir araştırmada, antenatal ultrasonografi (USG) ile anomali tespit edilen ve fetal karyotipleme için sevk edilen vakalar arasında sıklık 10.000'de 6 gibi yüksek saptanmıştır (33). Bunun nedeni risk altındaki gebeliklerin seçim yanlılığının bir sonucu olduğu düşünülebilir.

Kaliforniya'dan bir perinatal çalışmada 20 haftalık gebelik yaşından büyük veya ona eşit 1.035.386 canlı veya ölüm doğum olgusunda 121 HPE tanısı konmuş ve prevalans 10.000'de 1,2 olarak saptanmıştır. Bu olguların 56'sı alobar (%46), 24'ü semilobar (%20), 11'i lobar (%9) olup 30 olguda (%25) ise tip belirlenmemiştir. Bu çalışmada seçilen popülasyonda doğum sonrası bir yaşına kadar olan tanılar dahil edilmesi yüksek prevalans ve hafif HPE türlerinin nispeten yüksek sıklıkta saptanmış olmasını açıklamaktadır (34).

Gebeliklerin sonlandırılması, ölü ve canlı doğumlar dahil olmak üzere geniş uluslararası çalışmalarda, nispeten yüksek prevalanslar bulmuştur (35, 36). 2000-2003 yılları arasında Güney Amerika'da hastane ilişkili popülasyonda 179 vaka saptanarak prevalans 10,000'de 2,16 bulunmuştur (28). Uluslararası *Clearinghouse Birth Defects Surveillance Registry* kayıtlarında 2000-2004 yılları arasında 963 HPE vakası tanımlanarak sıklık 10.000'de 1,31 bulunmuştur. Benzer prevalans 2000-2008 yılları arasında 6.218.000 doğumda 827 HPE veya arinensefalili olgunun saptandığı *European Surveillance of Congenital Anomalies* (EUROCAT) kayıtlarında da bildirilmiştir (35).

HPE çalışma popülasyonları, örneklerin yaşına, HPE'nin saptanma zamanına, örnek sayısına, belirli alt gruplara (örneğin, kromozomal, kromozomal olmayan, karyotipi bilinmeyen) ve popülasyon türüne (seçilmiş veya seçilmemiş) bağlı olarak farklılık gösterir. Embriyonik ve erken fetal popülasyonlar ile perinatal popülasyonlar arasındaki tutarsızlık, ilk trimesterin başlarında HPE'li fetuslarda yüksek bir gebelik kayıp oranına işaret eder. Ek olarak, bazı HPE vakalarının perinatal olarak tanınmaması ve/veya kaydedilmemiş olması da olasıdır. Özellikle normal yüzleri olan HPE'li yenidoğanlar ve hafif serebral HPE türleri gözden kaçırılmaya müsaittir. Sonuç olarak, farklı epidemiyolojik çalışmalarda HPE sıklığı değişmekle beraber 250 gebelikte bir veya 8.000 ila 16.000 canlı doğumda bir görüldüğü söylenebilir (37, 38).

2.5.Holoprozensefali Varyantları

HPE ilk olarak 1987 yılında DeMyer tarafından alobar, semilobar ve lobar olmak üzere klinik şiddete göre üç klasik sınıfa ayrılmıştır. Bu klasik formlara ek olarak, daha hafif bir HPE

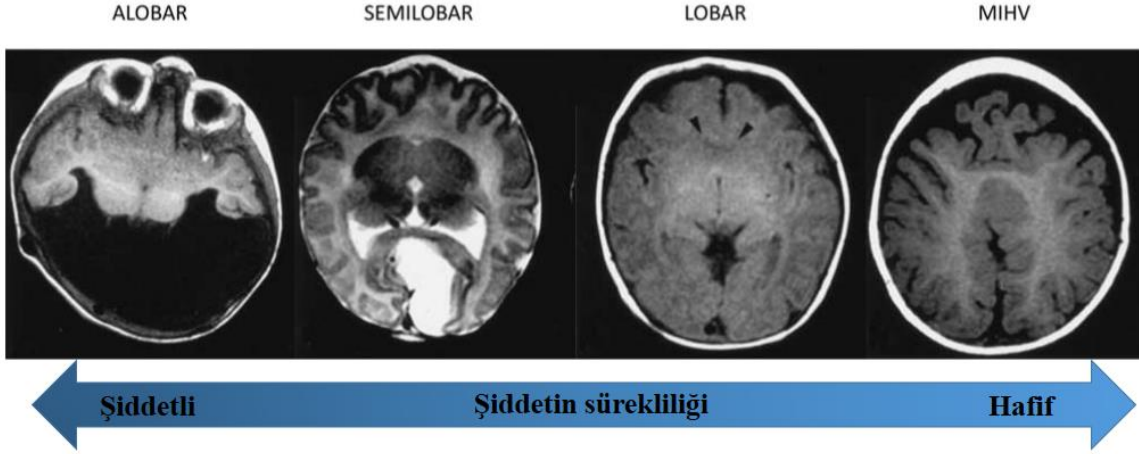
alt tipi olan orta interhemisferik (MIH) varyant veya sentelensefali, septopreoptik HPE ve mikroform HPE daha sonra tanımlanmıştır (39,40).

HPE, prozensefalonun ayrılmama derecesine göre günümüzde klasik olarak dört alt tipe ayrılır (15, 41). Bu tipler, artan kortikal ayrılma sırasına göre; diffüz kortikal ayrılmama ile karakterize edilen alobar form; ön lobların ayrılmaması ile karakterize edilen semilobar form; frontal lobların bazal yönünün ayrılmaması ile karakterize edilen lobar form ve posterior frontal ve parietal lobların ayrılmaması ile karakterize edilen orta interhemisferik varyanttır (42). HPE'li olguların yaklaşık üçte ikisinde en şiddetli form olan alobar formu mevcuttur (43).

2.5.1.Alobar HPE

Tek bir "monoventrikül"ün olduğu ve serebral hemisferlerin ayrılmadığı; en şiddetli HPE formudur. Alobar HPE, serebral hemisferlerin çok erken ayrılma hatalarından kaynaklanır. Karakteristik radyografik bulguları arasında, ilkel bir monoventrikül ile tek bir orta hatta ön beyindir. Daha da önemlisi, monoventrikülün iletişim kurduğu bir dorsal kist olguların neredeyse hepsinde mevcuttur (16). Korpus kallozum, interhemisferik fissür ve falks, septum pellucidum ve olfaktör bulbuslar ve yollar olgularda mevcut değildir (44). Bazal ganglionlar, talamus ve hipotalamus dahil olmak üzere derin gri çekirdeklerin ayrılmaması üçüncü ventrikülün gelişmemesine neden olur (2, 45). Talamik ayrılma olmamasının bir sonucu olarak, üçüncü ventrikül gelişmez, bu da serebral omurilik sıvısının "çıkışını" etkiler ve böylece dorsal kistin oluşumuna katkıda bulunur (46). Bazı olgularda, diensefalik displazi daha posteriora uzanabilir ve mezensefalonu da içine alabilir (47). Bu tipte silvian fissür genellikle yoktur. Serebral giruslar birkaç sulkus içeren alışılmadık derecede geniş giruslarla hipoplastiktir.

Beyin omurilik sıvısı çıkış obstrüksiyonu varsa makrosefali veya olmaması durumunda mikrosefali dahil olmak üzere ciddi kraniyofasiyal malformasyonlar en sık alobar tipte görülür. Ek olarak, siklopi, sinoftalmi, hipotelorizm veya hipertelorizm dahil olmak üzere bir dizi oküler bulgu; probosis, orta hat orofasiyal yarık ve tek bir üst orta kesici diş bulguları eşlik edebilir (48). Şekil 6'da HPE ana varyantlarının MRG görüntüleri ve şiddet spektrumu görülmektedir.



Şekil 6: HPE varyant tiplerinin MRG görüntüleri (43).

2.5.2.Semilobar HPE

Semilobar HPE, serebral hemisferlerin ön yüzünün ayrılmamasından kaynaklanırken, arka hemisferlerin bazı bölümleri ayrılma gösterir. Sağ ve sol frontal ve parietal loblar kaynaşmıştır ve interhemisferik fissür sadece posteriorda mevcuttur. Ventriküllerin ön boynuzları ve septum pellucidum yoktur (44, 49). Üçüncü ventrikül normalden küçüktür ve bazı olgularda dorsal kist bulunur. Derin çekirdekler ve talamus arasında değişen derecelerde ayrılma vardır; hipotalamus ayrılmaz veya kaynaşmış görünür, alobar tipte olduğu gibi, diensefalik displazi daha arkaya doğru uzanabilir ve mezensefalonu birleştirebilir (50). Splenium ve korpus kallozumun arka gövdesinin çeşitli kısımları mevcuttur, ancak rostrum, genu ve ön gövde dahil olmak üzere diğer ana kısımları yoktur. İnterhemisferik fissür ve falks anteriorda yoktur, ancak posteriorda mevcuttur. (16, 45, 50). Silviyan fissürler öne, mediyale doğru yer değiştirir ve frontal loblarla kaynaşır. Bölünmemiş ön loblar genellikle küçüktür. Serebral giruslar, alobar varyanttaki kadar geniş değildir. Ayrıca, eşlik eden kraniyofasiyal anomaliler semilobar HPE’de mevcut olabilir, ancak genellikle alobar varyanttan daha az şiddetlidir (42).

2.5.3.Lobar HPE

Alobar ve semilobar formlardan daha az ciddi anatomik beyin kusurları ile karakterize edilir. Sağ ve sol serebral hemisferlerin ve lateral ventriküllerin çoğu ayrılır, ancak telensefalunun en rostral yönü olan frontal loblar, özellikle ventralde kaynaşmıştır. Pratik bir kural olarak, frontal lobların toplam hacminin yarısından fazlasının lobar HPE olarak sınıflandırılması için ayrılması gerekir; frontal lobların yarısından azı ayrılmışsa semilobar HPE tanısı daha uygundur (51). İnterhemisferik fissür ve falks orta hat boyunca bulunur, ancak

genellikle anterior hipoplazi ile birlikte (3). Korpus kallozumun rostrum ve genu parçaları olgularda yokken, gövde parçası değişken derecelerde ve splenium kısmının tamamı mevcuttur (16, 42,44). Lateral ventriküllerin ön boynuzları genellikle küçüktür veya yoktur; septum pellucidum ise displastiktir veya yoktur. Bazal gangliyonlar ve talamus genellikle ayrılmıştır ve bir dorsal kist yoktur. Hipotalamus sıklıkla kaynaşmış görünür. Silvian fissürler semilobar HPE vakalarına göre öne doğru daha az yer değiştirmiştir. Nadiren lobar HPE, orta hat subkortikal heterotopiler ile de ilişkilendirilebilir (40, 42, 44, 45, 49, 50).

2.5.4.Orta İnterhemisferik Füzyon Varyant HPE (MIHF / MIHV / Sintelensefali)

Orta interhemisferik varyantta, frontal ve oksipital loblar normal olarak birbirinden ayrılmıştır. Ancak, frontal ve pariyetal lobların daha arka bölümlerinin farklı kısımlarını içeren prozensefalik bir bölünme eksikliği mevcuttur (51). Bu formda korpus kallozum gövdesi yok iken korpus kallozumun genu ve spleniumu genellikle mevcuttur. Lateral ventriküllerin ön boynuzları normal olabilir ancak septum pellucidum yoktur (42, 49). Üçüncü ventrikül oluşur ancak bireylerin %25-40'ında dorsal kist bulunabilir (39). Diğer HPE varyantları gibi, talamus ve kaudat çekirdekler tam olarak ayrılmamış olabilir, ancak hipotalamus ve lentiform çekirdekler ayrılmıştır. Silvian fissürleri mevcuttur ancak vertikal olarak oryante olabilir ve anormal şekilde orta hatta bağlanabilir (40, 42). İnterhemisferik fissür ve falks posterior frontal ve parietal bölgelerde genellikle yoktur. Bu varyantta olgularda kraniyofasiyal defektler tanımlanmamıştır (39).

2.5.5.Septopreoptik HPE

Çok hafif bir HPE formu olarak kabul edilen septopreoptik HPE, 2010 yılında Hahn ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Tam ayrılmamış septal ve preoptik bölgeler telensefalik yapılar olduğundan, yazarlar septopreoptik HPE'nin HPE spektrumuna ait olduğunu düşünmektedirler (52). Ayrılmama septal ve/veya preoptik bölgelerle sınırlıdır, frontal neokorteks hiç veya çok az füzyone haldedir (3). Korpus kallozumun ön kısmı anormal bir şekilde gelişmiştir, rostrum yoktur veya hipoplastiktir ve genu hipoplastiktir, fakat gövde ve splenium normaldir. Bazal gangliyonlar tamamen ayrılmıştır ancak talamusta kısmi kaynaşma mevcuttur (52). Bu hafif HPE formuna sahip olgularda hafif orta hat yüz malformasyonları izlenebilir (42).

2.5.6.HPE'nin Mikroformları (Mikroform HPE)

Görüntülemeye yapısal beyin anomalileri olmaksızın HPE ile ilişkili kraniyofasiyal anomalilerin varlığı ile tanımlanan HPE'nin klinik alt tipleridir. Bu olgular bir ailede tek bir

HPE'li olguda olabileceği gibi klasik HPE formlarına sahip indekslerin akrabalarında ortaya çıkabilir (53). Tablo 3'te bahsedilen HPE varyantlarının anatomik olarak sınıflandırılması görülmektedir.

Tablo 3: HPE varyantlarının anatomik sınıflandırması (2).

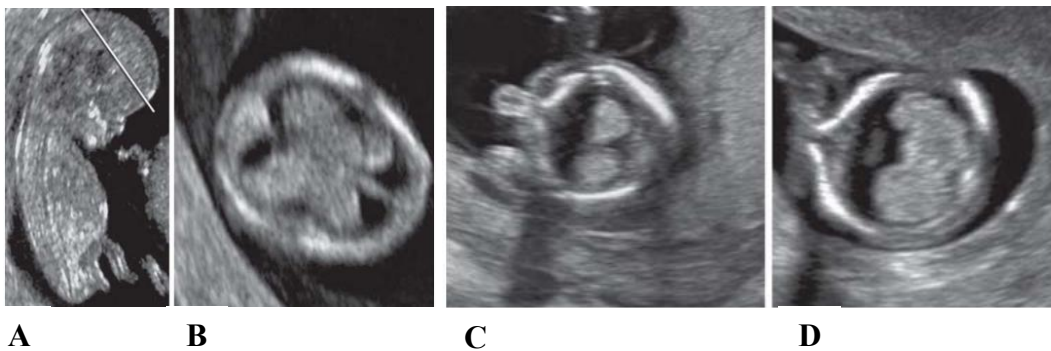
ALOBAR	Küçük tek ön beyin ventrikülü Hemisferler arası bölünme yok Olfaktör ampul ve yollarının yokluğu Korpus kallozum yokluğu Derin gri çekirdeklerin ayrılmaması
SEMİLOBAR	İlkel serebral loblar Eksik interhemisferik bölünme Olfaktör ampul ve yollarının yokluğu veya hipoplazisi Korpus kallozum yokluğu Derin gri çekirdeklerin değişken ayrılmaması
LOBAR	Tam gelişmiş serebral loblar Belirgin interhemisferik bölünme Korpus kallozum yokluğu/hipoplazisi/normal gelişimi Derin gri çekirdeklerin ayrılması
MIHF	Posterior frontal ve parietal lobların ayrılmasında başarısızlık Kallozal genu ve splenium normal olarak oluşur Korpus kallozumun yokluğu Normal ayrılmış hipotalamus ve lentiform çekirdekler Heterotopik gri madde

2.6. Holoprozensefalinin Prenatal Dönemde Tanısı

Normal nöroembriyoloji hakkında iyi bilgi sahibi olunarak, anomalinin erken belirteçleri gebeliğin erken döneminde görülebilir ve bazı önemli anormallikler bu dönemde teşhis edilebilir veya en azından ilk trimesterde anomaliden şüphelenilebilir. Fetal beyini değerlendirmek için hem transabdominal hem de transvajinal yaklaşımlar tanımlanmıştır. Transabdominal yaklaşım rutin taramada en sık kullanılan yöntem olsa da bunu transvajinal tarama ile tamamlamak genellikle erken gebelikte yararlıdır (54, 55). Santral sinir sisteminin konjenital malformasyonları için prenatal ultrason duyarlılığı %68 ile %92 arasında değişir, ancak standart muayenede kusurun kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi ve teşhisi genellikle zordur (56, 57). Ultrason teknolojisindeki gelişmeler ve sonografi uzmanlarının erken gebelikte taramaya aşina olması ile çoğu fetal malformasyon artık ilk trimesterde tespit edilebilir. Fetal

merkezi sinir sisteminin ilk trimester değerlendirmesi zordur, çünkü bu sistem gebelik boyunca önemli ölçüde gelişmeye devam eder (58, 59, 60).

Santral sinir sisteminin fetal defektlerinden genellikle erken tarama ultrasonu değerlendirmesinde şüphelenilir, ancak her bir beyin anomalisinin doğru teşhisi ve sınıflandırılması için uzman tarafından ayrıntılı bir muayene gereklidir. Hamilelik sırasında, SSS malformasyonları için ultrason taraması esas olarak orta trimester anomali taraması sırasında gerçekleştirilir ve üç eksenel düzlemin, yani transventriküler, transtalamik ve transserebellar düzlemlerin değerlendirilmesine dayanmakla beraber fetal omurganın temel değerlendirmesi de bu tarama prosedürünün bir parçasıdır (61, 62) Erken anatomik değerlendirmenin potansiyeli önemli ölçüde artmış olsa da, çoğu SSS anormalliği için, 20. gebelik haftasından sonra nörosonografik muayene önerilir. Doğrudan teşhis konulan ve takip taramasına ihtiyaç duyulmayan önemli istisnalar, ekzensefali-anensefali, büyük sefalosel ve HPE gibi ölümcül veya ölüme yakın anomalilerdir (63). Beyin anormalliklerinin çoğu aslında 1. trimesterde de mevcuttur, ancak bunlardan sadece birkaçı bu kadar erken bir aşamada tespit edilir. Histolojik olarak holoprozensefaliye son adet tarihinden itibaren 6 hafta veya Carnegie evre 13'ten sonra tanı konulabilir (64). Alobar HPE, gelişmekte olan embriyoda ultrasonografi yardımıyla en kolay teşhis edilebilen HPE tipidir. 10 haftalık menstrüel yaştan önce US ile tanı alan en az iki vaka raporu ve anormal yüz morfolojisi ve "kelebek" işaretinin yokluğu temelinde 10 ila 14 hafta arasında tespit edilen sayısız vaka raporu mevcuttur. İlk trimesterde, her iki koroid pleksusun aksiyel düzlemde görüntülenmesi "kelebek" işareti olarak tanımlanmıştır ve bu işaretin olmaması alobar holoprozensefali için çok yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (65). Şekil 7'de normal fetal beyinde 'kelebek işareti' ve HPE'de kelebek işaretinin yokluğunun prenatal ultrasonografik görüntüsü görülmektedir.



Şekil 7: Normal fetal beyinde 'kelebek işareti' ve HPE'de kelebek işaretinin yokluğu (66).

A: Fetal beyin aksiyel görünümü. B: Normal bir birinci trimester fetusunda ventriküllerle dolduran belirgin koroid pleksuslar ("kelebek" işareti). C-D: Birinci trimesterdeki iki farklı fetusta

holoprosensefali. 'Kelebek' işaretinin olmaması, orta hattın bulunmadığı ve ön beyinde monoventriküler boşluk.

Farklı HPE türleri arasında alobar tip, ultrasonografik tanıya en uygun olanıdır. Ancak tüm HPE formlarının ayırt edici özelliği kavum septum pellusidumun olmamasıdır ve bu yapıya dikkat edilmesi, daha hafif formların saptanmasını sağlamak için hayati önem taşır. Yüz normal ise, normal bir kavum septum pellusidumun gösterilememesi ciddi beyin malformasyonunun tek ipucu olabilir. Normal bir kavum septum pellusidum rutin obstetrik US görüntülerinde gösterilemiyorsa, mevcut uzmanlığa bağlı olarak endovajinal US, üç boyutlu hacim elde etme ve fetal MRG ile dikkatli takip esastır. Gebeliğin ikinci trimesterında alobar HPE'nin ultrasonografik bulguları, tek bir ventriküler boşluk ve interhemisferik fissür, falks serebri, korpus kallozum ve CSP gibi orta hat yapılarının olmamasını içerir. Ek olarak, talamus kaynaşmış görünür ve genellikle bir dorsal kist bulunur. Yüz profilinde, gözler, burun ve dudaklar da anomali saptanabilir; bunlar arasında probosis ile beraber olan veya olmayan, hipotelorizm ve orta hatta kaynaşık tek orbita (siklopi) veya orta hatta dudak ve/veya damak yarıkları gibi özellikler dahil olmak üzere normal yüz görünümüne kadar değişken derecelerde olabilir. Semilobar HPE'nin ultrasonografik görünümü, alobar tip ile karşılaştırılabilir. Lateral ventriküllerin ön boynuzları ve septum pellusidum yoktur, ancak lateral ventriküllerin arka boynuzları iyi gelişmiştir (67). Lobar HPE'de ise, lateral ventriküllerin ön boynuzları septi pellusidi ile kaynaşmıştır. Koronal bölümde frontal boynuzların çatısı düzdür, forniksler kaynaşmıştır. Orta hatta interhemisferik fissür ve falks serebri bulunur. Korpus kallozum mevcuttur ancak tam olarak gelişmemiştir. Arka boynuzlar iyi gelişmiştir. Kaynaşmış ön boynuzların bir sonucu olarak, ön serebral arter dışı doğru itilir ve interhemisferik fissür yerine beynin yüzeyinde ilerler (67, 68).

MIHV hem alobar hem de lobar HPE özelliklerine sahip bir ara durumdur. Ön boynuzlar, alobar HPE'ye göre daha gelişmiştir, ancak arka boynuzlar zayıf bir şekilde gelişmiştir ve tek bir ventriküler boşluk olarak görünür (67). Septi pellusidi yoktur. Talamus tam olarak ayrılmamıştır ve posteriyorda interhemisferik fissür ve falks yoktur. Tablo 4'te farklı HPE varyantlarının nörogörüntüleme özellikleri gösterilmektedir.

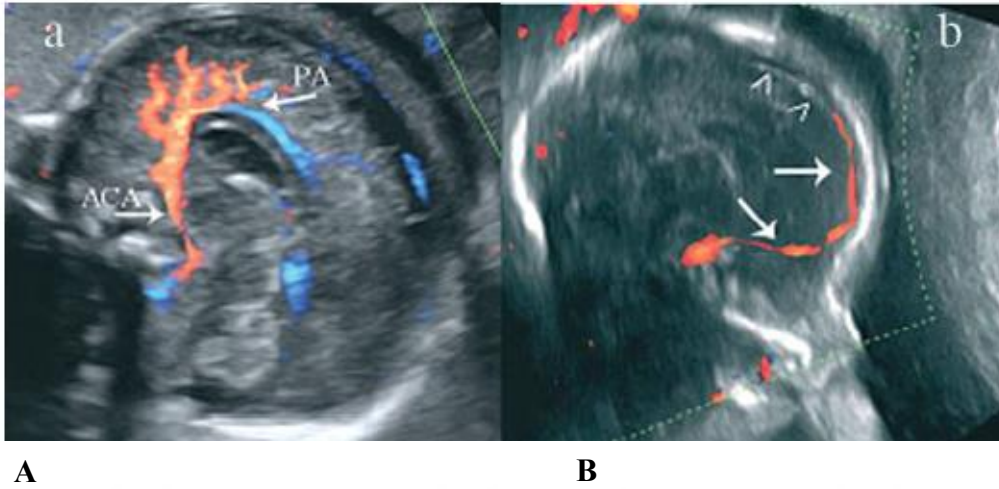
Tablo 4: HPE türlerinin nörogörüntüleme özellikleri (42).

HPE varyantı Nörogörüntüleme özellikleri	Alobar	Semilobar	Lobar	MIH
Kortikal ayrılmama	Yaygın (holosfer)	Frontal	Bazal frontal	Posteriyor frontal ve pariyetal
Korpus kallozum	Yok	Rostrum, genu ve gövde yok, splenium var	Rostrum ve genu anterior gövde değişken var; splenium var	Gövde yok, genu değişken var, splenium var
IHF and falks	Önde ve arkada tamamen yok	Sadece posteriorda mevcut	Önde hipoplastik ve arkada mevcut	Posteriyor frontal ve pariyetal bölgede yok
Ventriküller	Dorsal kist ile geniş bir şekilde iletişim kuran monoventrikül	Ön boynuzlar yok; arka boynuzlar mevcut, küçük üçüncü ventrikül	İlkel ön boynuzlar; üçüncü ventrikül oluşur	Normal veya hipoplastik ön boynuzlar, üçüncü ventrikül oluşur
Dorsal kist	Genellikle mevcut	Değişken olarak mevcut	Yok	¼'ünde var
Septum pellucidum	Yok	Yok	Yok veya displastik	Yok
Talamus	Genellikle kaynaşmış	Kısmi füzyon	Genellikle tamamen ayrılmış	⅓- ½'sinde kaynaşmış
Bazal ganglion	Genellikle kaynaşmış (talami ile tek kütle oluşturabilir)	Kısmi füzyon (özellikle kaudatın başı)	Değişken füzyon derecesi	Ayrılmış
Hipotalamus	Her zaman bir dereceye kadar kaynaşmış (%100)	Çok sık olarak bir dereceye kadar kaynaşmış (%98)	Genellikle bir dereceye kadar kaynaşmış (%83)	Ayrılmış
Sylvian fissür	Genellikle yok	Kaynaşmış frontal lob ile anterior ve mediyal olarak yer değiştirmiş (geniş sylvian fissür) ve küçük frontal loblar	Anterior ve mediyal olarak yer değiştirmiş (geniş sylvian fissür) ve küçük frontal loblar	Genellikle tepe noktası üzerinden orta hat boyunca anormal şekilde bağlanır
Kortikal displazi ve heterotopik gri madde	Çok az sulkus içeren yaygın geniş girusların sık varlığı	Nadiren çok az sulkus içeren geniş giruslar	Ön bölgelerde nadir orta hat subkortikal heterotopyalar	Çok yaygın
Serebral damar sistemi	İç serebral arterlerden dallanan damarların ağı	Azigos ön serebral arter	Azigos ön serebral arter	Azigos ön serebral arter

IHF, Interhemisferik fissür; MIH, holoprozensefalinin orta interhemisferik varyantı.

Son zamanlarda lobar HPE ve SOD'u ayırt etmek için ek bir sonografik işaret kullanılmaktadır. Lobar HPE'de, anterior serebral arter, iki frontal girus arasındaki anormal bir kortikal doku köprüsü tarafından genellikle frontal kemiğin yanında öne doğru itilir. Bu 'kafatasının altındaki yılan' (*snake under the skull*) işareti olarak adlandırılır ve fetal beynin

midsagittal görünümünde görülebilmektedir (68). Şekil 8’de bu işaret ultrasonografik olarak görülmektedir.



Şekil 8: "Kafatasının altında bir yılan" işaretinin ultrasonografik gösterimi (16).

A: 24. GH’da normal bir fetusta dallanan ve perikallozal artere (PA) yol açan anterior serebral arterin (ACA) renkli Doppler gösterimi. B: 25 haftalık bir fetusta lobar holoprozensefali. Anterior serebral arter dallanması (oklar), iki frontal girus (ok başları) arasındaki anormal kortikal doku köprüsü tarafından frontal kemiğin yanında ("kafatasının altında bir yılan" işareti) dıştan itilir.

MRG’nin fetal nörogörüntülemeye yüksek yumuşak doku kontrastı, beynin her iki tarafının görüntülenmesi ve geniş görüş alanı gibi pek çok avantajı vardır (69). US özellikleri kafa karıştırıcı olduğunda ileri değerlendirme için veya kavum septum pellucidum olmadığında nöroanatomiye daha iyi tanımlamak için fetal kraniyal MRG faydalı bir araçtır. Bununla birlikte, MRG, eğitimli operatör tarafından ilgili bir tanısal veya klinik sorguyu ele almak için endike olduğundan, yalnızca bir nörosonografik incelemeden sonra ve onu tamamlamak için yapılmalıdır. Yayınlanmış kanıtlar, deneyimli bir operatör tarafından, Uluslararası Obstetrik ve Jinekolojik Ultrasonografi Derneğinin (*International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, ISUOG) fetal merkezi sinir sisteminin ultrasonografik değerlendirilmesi güncel kılavuzunda belirtilen kriterlere göre yeterli bir nörosonografik inceleme yapıldığında, vakaların yalnızca %7-15’inde bir MRG incelemesinin gerekli olduğunu göstermiştir (70, 71, 72).

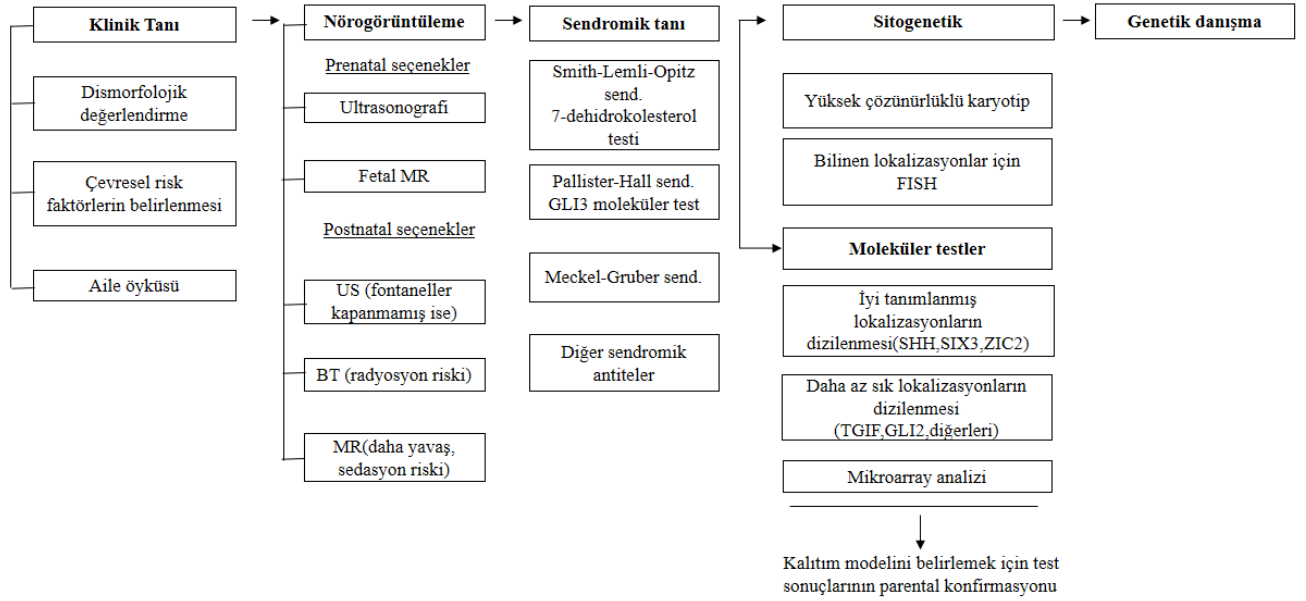
Hedefli nörosonografide, özellikle iyi bir iki boyutlu görüntünün elde edilmesinin zor olduğu durumlarda, hem geliştirilmiş çözünürlükten hem de çok düzlemli görüntüleme korelasyonu gerçekleştirme olasılığından yararlanmak için üç boyutlu ultrason yaklaşımının kullanılması önerilir (63). Üç boyutlu USG’nin ortaya çıkmasıyla, ventriküler sistemi doğrudan değerlendirmek için üç boyutlu hacimlerin kullanılması gibi ek teknikler tanıya yarar sağlayabilir. Bu teknik, yüksek riskli hastalarda erken teşhis için yardımcı olabilir (73).

Stashinko ve arkadaşlarının HPE'li yaşayan 104 çocukla yaptığı çalışmada, sadece %22'sine doğum öncesi tanı konulmuştur (74). Farklı bir çalışma da doğum öncesi USG'nin şiddetli HPE'nin yüz ve merkezi sinir sistemi anormalliklerini ilk trimester kadar erken dönemde gösterebileceğini, ancak spektrumun daha az şiddetli ucuna doğru çok daha az duyarlı olduğunu belirtmektedir (75). Ultrason temelli tanı ile postmortem otopsi bulgularını karşılaştıran yakın tarihli bir çalışmada, otopsi 21 vakadan 17'sinde doğum öncesi HPE tanısını doğrularken; iki olguda ağır malformasyonlar nedeniyle kesin bir patolojik tanı alınamamış ve iki olguda HPE dışında ciddi karmaşık beyin ve yüz malformasyonları saptanmıştır. Ultrason aynı zamanda HPE tipini belirlemede tam olarak doğru sonuç vermeyebilmektedir; başka bir çalışmada 17 vakanın yedisinde, prenatal tanı ile belirlenen HPE tipi, postmortem otopsi ile belirlenenden farklı saptanmıştır (76).

2.7. Holoporozenfalede Klinik Özellikler

HPE açısından teşhis süreci tipik olarak anormal doğum öncesi beyin görüntüleme, pozitif fizik muayene bulguları ve/veya pozitif aile öyküsü ile başlatılır. Mümkün olduğunda, kapsamlı bir dismorfolojik değerlendirme, risk faktörlerinin belirlenmesi ve aile öyküsünün detaylandırılması önemlidir. Her olguda özgül nörolojik bulguların ve HPE tipinin beyin görüntüleme yoluyla belirlenmesi, prognoz üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, hasta ve ailesine uygun danışmanlık verilebilmesi için esastır. MRG, bu amaç için en yüksek kalitede verileri sağlar ve kortikal beyaz cevherin ve derin gri çekirdeklerin yapısal anormalliklerinin ayrıntılı analizine izin verir (42). MRG yapılamıyorsa, fontaneller açıkken yapılabilen US ve radyasyon maruziyeti ile ilişkili riskler taşıyan bilgisayarlı tomografi görüntüleme diğer seçenekler arasındadır. Prenatal olarak, erken tanı sağlamak hem bilimsel hem de psikolojik açıdan önemlidir, çünkü malformasyonların ciddiyeti aile üyeleri arasında duygusal etkilere yol açar ve gebeliğin sonlandırılmasına neden olabilir (76, 77).

Klinik yaklaşım ve nörogörüntüleme sonrasında olguda eşlik eden sendromik özelliklerin varlığında ön tanıda düşünülen hastalığa özgü testlerin planlanması; sendromik HPE düşünülmeyen olgularda sitogenetik ve moleküler testlerin planlanması ve sonuçlara göre genetik danışmanın planlanması önerilmektedir. Şekil 9'de Raam ve arkadaşlarının 2011'deki çalışmalarındaki HPE hastalarında klinik ve moleküler tanı yaklaşımı gösterilmiştir.



Şekil 9: HPE hastalarında klinik ve moleküler tanı için önerilen bir protokol (37). Raam & Solomon, 2011 çalışmasından uyarlanmıştır. Hastalarda holoprozensefalinin nedenlerini teşhis etmek ve aydınlatmak için önerilen klinik protokol.

2.7.1. Sağkalım

Genel olarak, HPE'li yenidoğanlar için ölüm oranı yüksektir, ancak bazı hastalar yenidoğan döneminin ötesinde hayatta kalır ve daha az sayıda hasta ise uzun yıllar boyunca hayatta kalır (78). 1985 ile 1998 yılları arasında Kuzey İngiltere'de HPE'li 24 canlı doğan bebeğin; %33'ü ilk 24 saat içinde, %58'i ilk ay içinde ölürken, %29'u ilk bir yıl hayatta kalmıştır (79). Mortalite, beyin malformasyonunun ciddiyeti, yüz malformasyonunun ciddiyeti, kromozomal anormalliklerin varlığı ve çoklu konjenital anomali sendromunun veya diğer organ tutulumunun varlığı dahil olmak üzere çeşitli faktörlerle ilişkilidir (79, 80, 81). İzole HPE'li (kromozomal anomalili ve sendromik olmayan) çocuklar en uzun süre hayatta kalma eğiliminde olan grubu oluşturur. Alobar HPE'li çocuklar en yüksek ölüm oranına sahipken, HPE'nin daha hafif formlarına, yani lobar HPE ve MIH tip HPE'ye sahip çocukların uzun yıllar yaşaması beklenmektedir. Hayatta kalma, beyin malformasyonunun ciddiyeti ile ilişkili olsa da, her bir HPE tipinde hayatta kalma konusunda hala önemli farklılıklar mevcuttur. İzole alobar HPE'ye sahip bazı çocuklar ergenliğe ve hatta yetişkinliğe kadar hayatta kalmaktadır (78).

2.7.2.Kraniyofasiyal Anomaliler

HPE'li olguların %80 kadarına kraniyofasiyal anomaliler eşlik eder. Yüz ve oküler malformasyonlar, HPE'nin fenotipik spektrumunun ayrılmaz bir parçasıdır. Beyin malformasyonlarına tipik olarak bir kraniyofasiyal fenotipik spektrum eşlik eder. Kafatası gelişiminin erken aşamalarında beynin büyümesi, yüzün morfogenezi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Beyin malformasyonları gibi, fasiyal anomaliler de farklı şiddet dereceleri gösterir ve hem üst hem de alt yüz yarımını etkileyebilir.

Birkaç sinyal yolu, yani *Sonic HedgeHog* (SHH), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) ve Nodal sinyali, beyin ve yüz gelişimini kontrol ve koordine eder. Beyindeki SHH sinyali, aynı zamanda yüz gelişimini de düzenleyen bir sinyalleşme merkezi olan Frontonasal Ektodermal Zonun indüksiyonunu ve mekansal organizasyonunu kontrol ederek yüz gelişimini doğrudan etkiler (82, 83).

HPE'deki ana yüz fenotipleri arasında siklopi, anoftalmi veya mikroftalmi, probosis, tek burun deliği, etmosefali, sebosefali, hipotelorizm, median yarık damak-dudak yer alır. HPE'lili olgularda kraniyofasiyal bulgular şiddetli uçta siklopi, sinoftalmi veya probosis iken hafif olgularda normal yüz özelliklerine kadar değişen bir fenotip gösterir.

Yüz özellikleri genellikle beyin malformasyonunun ciddiyeti ile ilişkilidir. DeMyers ve arkadaşlarının 1964 yılındaki çalışmasında "Yüz beyni tahmin eder" cümlesi vakaların %80'inde doğrulanmıştır (52, 84, 85, 86). Siklopi ve etmosefali gibi ağır bulgular her zaman alobar HPE ile ilişkilidir (85). Bununla birlikte, vakaların %19'unda yüzün tanısal olmadığı bulunmuştur (88). Bu vakalarda, orta yüz hipoplazisinin derecesi, prozensefalon tutulumunun ciddiyetiyle orantılı değildir. Tablo 5'te yüz ve beyin fenotiplerinin paralelliği gösterilmektedir.

Tablo 5: "Yüz genellikle beyni tahmin eder". Yüz ve beyin fenotiplerinin paralelliği (2).

Grup	Morfoloji	HPE derecesi
(I) Siklopi	Tek veya çift göz Probosis	Alobar
(II) Etmosefali	Ayrı orbitalar Aşırı oküler hipotelorizm Probosis	Alobar
(III) Sebosefali	Oküler hipotelorizm Probosis, tek burun deliği ile	Alobar
(IVA)	Oküler hipotelorizm Orta hat yarık dudak Düz burun	Alobar veya Semilobar
(IVB)	Oküler hipotelorizm Orta hat yarık dudak (tam veya kısmi) Düz burun	Semilobar veya Lobar

Burnun anomalileri arasında burnun tam yokluğu, nazal kıkırdağın agenezisi ve probosis bulunur. Damak anomalileri arasında çeşitli median veya lateral yarıklar, bifid uvula, yüksek damak ve üst labiyal frenulumun olmaması yer alır (89).

Hafif derecede etkilenmiş aile üyelerindeki minimal yüz anomalileri kolayca gözden kaçabilir Belirgin kraniyofasiyal bulguları olmayan bireylerde yaygın kraniyofasiyal özellikler arasında mikrosefali (hidrosefali makrosefali ile sonuçlanabilmesine rağmen), hipotelorizm, basık burun sırtı ve yarık dudak ve/veya damak yer alır. Tek bir üst orta kesici diş mevcut olabilir; bu bulgu spesifik olmayan bir bulgu olmasına rağmen, otozomal dominant mikroform HPE'de ayırt edici bir özellik olabilir (90, 91, 92).

2.7.3. Gelişimsel Kusurlar

Gelişimsel yetersizlikler, HPE'li hemen hemen tüm çocuklarda mevcuttur. Gelişimsel yetersizliğin derecesi genellikle nörogörüntüleme beyin malformasyonunun ciddiyeti ile ilişkilidir (78).

Alobar HPE'li çocuklar minimal gelişimsel ilerleme gösterir ve genellikle ağır global gelişimsel bozukluklara sahiptirler (78). Alobar HPE'li çocuklarda yapılan bir çalışmada olguların hiçbirinin bağımsız oturamadığı, nesnelere uzanıp ulaşamadığı ya da sözcük söyleyemediği gözlenmiştir (86).

Semilobar HPE'li çocuklar için gelişimsel sonuçların aralığı ise çok geniştir. Semilobar HPE'li bazı çocuklar çok az gelişimsel ilerleme kaydederken, diğerleri özellikle alıcı dil olmak üzere bilişsel beceriler ve dil becerilerinde önemli gelişme gösterir (78).

Lobar HPE'li çocukların motor becerileri çok daha iyi gelişir. Yaklaşık yarısında normal el işlevinde hafif bozulma vardır, bağımsız olarak veya yardımla yürüyebilir ve tek kelimelerle veya birden fazla kelimedenden oluşan cümlelerle konuşabilir (86). Lobar HPE ile karşılaştırıldığında, MIH tip HPE'ye sahip çocuklar biraz daha iyi el/kol işlevine ve konuşma ve benzer hareketliliğe sahiptirler (39).

2.7.4.Hidrosefali

Bir dorsal kistin varlığı ve/veya talamusun ayrılmaması hidrosefali gelişimi ile yakından ilişkilidir. Talamik ayrılmamanın üçüncü ventrikülden BOS çıkışını bloke ettiği ve bu nedenle hidrosefaliye yol açtığı varsayılmaktadır (46). Ventriküloperitoneal şant bu olgularda artmış intrakranial basınç semptomlarını hafifletebilir. Hidrosefali olmayan HPE'li olguların hemen hepsinde mikrosefali beklenir. Alobar HPE'li çocukların şant ihtiyacı olma olasılığı, diğer HPE türlerine sahip çocuklara göre daha fazladır (78).

2.7.5.Nöbetler ve Epilepsi

HPE'li çocukların yaklaşık yarısı en az bir kez nöbet geçirmiştir ve *Carter Center* veri tabanına kayıtlı HPE'li çocukların yalnızca yaklaşık %40'ında (182 olgunun 73'ünde) antiepileptik ilaçlarla tedavi gerektiren epilepsi görülmüştür (78, 86). Bu olgularda nöbetler ayrıca hipernatremi veya hipoglisemi gibi endokrinolojik anormallikler tarafından da tetiklenebilir. Nöbetlerin başlangıcı genellikle bebeklik dönemindeydir. Bu çocukları çeşitli nöbet tipleri etkilerken, en sık görülen tip %43 oran ile karmaşık parsiyel nöbetler olarak bildirilmiştir. İnatçı nöbetler, epilepsisi olan HPE hastalarının yaklaşık üçte birinde görülür ve daha belirgin kortikal malformasyonu olan olgularda daha sık izlenir (78).

2.7.6.Motor Bozukluklar

Anormal kas tonusu ve bozulmuş koordinasyon, HPE'li hemen hemen tüm çocuklarda bir dereceye kadar görülür, ancak MIH ve lobar HPE'si olan bazı çocukların minimal motor bozukluğu ile seyrettiği görülmüştür. Çoğu çocukta trunkal hipotoni, üst ekstremitelerde distoni ve alt ekstremitelerde daha fazla spastisite görülen karışık paternler yaygındır. Bebeklik dönemindeki hipotoni, çocuk büyüyüp geliştikçe spastisite ve/veya distoniye ilerleyebilir (78).

2.7.7.Oromotor Disfonksiyon ve Beslenme

Ağır motor bozukluğu olan çocuklarda daha çok yutma bozukluğu görülür. Bu nedenle, alobar ve semilobar HPE'si olan hemen hemen tüm çocuklarda bazı yutma sorunları görülür. Bu çocukların yaklaşık üçte ikisi, aspirasyon riski veya yetersiz oral alım nedeniyle gastrotomi

tüpü ile beslenmektedir. Yutma bozukluğu olan çocuklar akut aspirasyon pnömonisi ve kronik akciğer hastalığı gelişimi için risk altındadırlar. Tekrarlayan mikroaspirasyon, akut aspirasyon öyküsü olmadan kronik akciğer hastalığına yol açabilir. Oromotor disfonksiyonun yanı sıra yarık dudak/damak gibi yüz anomalileri ve konjenital nazal piriform açıklık darlığı da beslenme sorunlarına katkıda bulunur. HPE'li çocuklar, beslenme ve hormonal nedenler dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle yaşitlarından boy ve kilo olarak geri olma eğilimindedirler. (78).

2.7.8.Akciğer Sorunları

HPE ve oromotor disfonksiyonu olan çocuklar aspirasyon ve tekrarlayan solunum problemleri ve/veya kronik akciğer hastalığı geliştirme riski altındadır. HPE'li çocuklarda ayrıca yüz anomalileri nedeniyle üst solunum yolu tıkanıklığı da olabilir. Santral apne, daha ağır etkilenen olgularda mevcut olabilir ve alobar HPE'li çocuklarda, yaşamın ilk birkaç ayındaki yüksek mortalite oranına muhtemelen önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (78).

2.7.9.Gastrointestinal Problemler

Serebral palsili ve diğer nörogelişimsel engelli çocuklarda olduğu gibi, mide-bağırsak sorunları bu çocuklarda da yaygındır. Genel olarak, gastrointestinal sistem normaldir, ancak hastalarda, muhtemelen sinir sistemi tarafından anormal regülasyona bağlı olarak zayıf gastrik boşalma, gastroözofageal reflü ve kabızlık gibi fonksiyonel bozukluklar vardır (78).

2.7.10.Hipotalamik Disfonksiyon

Hipotalamik çekirdekler, homeostaz, uyku, sıcaklık, iştah ve susama gibi önemli vücut fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Görüntüleme yoluyla tespit edilmiş hipotalamik ayrılmama, HPE'li çocuklarda hipotalamik işlev bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir (86). HPE'li çocuklarda anormal uyku-uyanıklık döngüleri, sıcaklık istikrarsızlığı ve bozulmuş susama mekanizmaları yaygındır. HPE'li çocuklarda değişen ve düzensiz uyku-uyanıklık döngüleri yaygındır; gündüz-gece tersine dönmesi, çocukların her seferinde yalnızca birkaç saat uyuduğu parçalanmış uyku düzenleri, azalan uyku ihtiyacı ve artan uyku ihtiyacı dahil olmak üzere çeşitli paternler gözlenir. HPE'li bazı çocukların vücut sıcaklıkları başlangıçta normalden daha düşükken, bazıları enfeksiyonun eşlik etmediği durumlarda da normalden daha yüksek vücut sıcaklıklarına sahiptir ve bazıları her iki uç noktaya da gidebilmektedir (78).

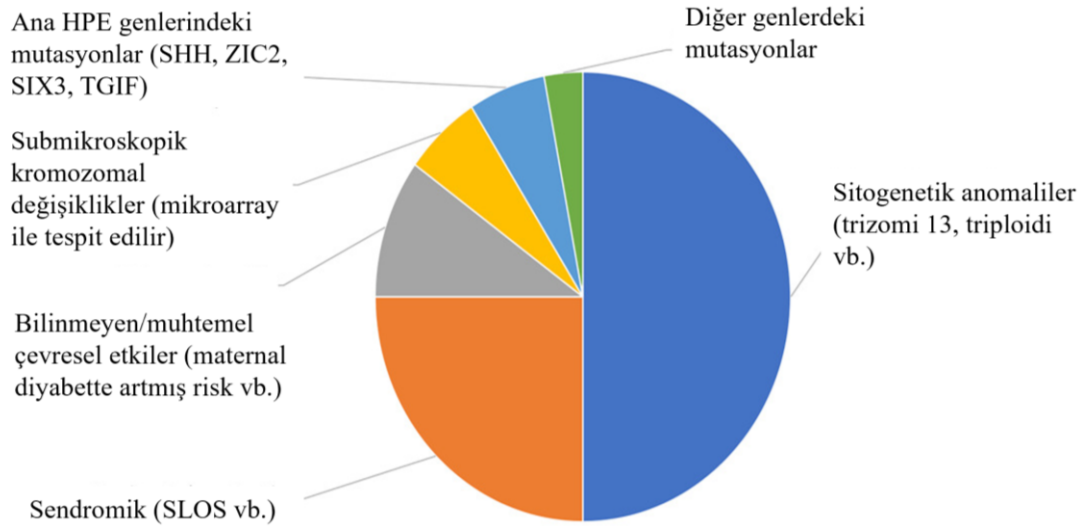
2.7.11.Endokrin Disfonksiyon

Diğer orta hat beyin anomalilerinde olduğu gibi, endokrinolojik anormallikler HPE'li olgularda da oldukça yaygındır. HPE'li 117 hastayı içeren bir çalışmada, klasik HPE'li hastaların yaklaşık %70'inde merkezi diyabetes insipidus, %11'inde hipotiroidizm, %7'sinde hipoadrenokortisizm ve %5'inde büyüme hormonu eksikliği gibi ön hipofiz hormonu

eksiklikleri saptanmıştır (93). Bu endokrin anormallikler yenidoğan döneminde olmayıp zaman içinde gelişebilir ve bu nedenle bu açıdan bu olguların periyodik izlemine gerektirir.

2.8. HPE Etiyolojisi

HPE etiyolojik olarak oldukça heterojendir ve bir dizi hem çevresel hem de genetik neden tanımlanmıştır. Şekil 10'da HPE etiyolojisinin dağılımı şekilsel olarak gösterilmiştir.



Şekil 10: HPE etiyolojisi (94).

2.8.1. Genetik Dışı İlişkili Durumlar

Genetik olmayan nedenler arasında maternal hastalıklar, maternal terapötik madde kullanımı, maternal non-terapötik madde kullanımı, nutrisyonel nedenler, gebelik özellikleri, üreme hikayesi ve sosyodemografik faktörler sayılabilir. HPE için genetik olmayan risk faktörlerinin değerlendirilmesi için dört ana vaka-kontrol çalışması mevcuttur. Bu dört çalışma; Teratolojik Çalışmalar için İnsan Embriyo Merkezi- Kyoto Embriyo Çalışması (*Human Embryo Center for Teratological Studie, Kyoto Embryo Study*), Kaliforniya Doğum Kusurları İzleme Programı (*California Birth Defects Monitoring Program, CBDMP*), Latin Amerika Konjenital Malformasyon Çalışması (*Latin American Study of Congenital Malformations, ECLAMC*) ve Ulusal Doğum Kusurlarını Önleme Çalışması (*National Birth Defects Prevention Study (NBDPS)*)'dır. Bu çalışmalara ek olarak, diyabet ve obezite gibi belirli risk faktörlerine ilişkin birkaç farklı epidemiyolojik çalışma da mevcuttur. Aşağıda genetik olmayan ilişkili durumlar bu çalışmalar ve ek çalışmalar kapsamında tek tek değerlendirilmiştir.

Bugüne kadar HPE için çok az sayıda genetik olmayan risk faktörü kesin olarak tanımlanmıştır; diyabet bunlar arasında en yaygın olarak çalışılan ve çalışmalar arasında

oldukça tutarlı sonuçlarla en güçlü ilişkilerle sonuçlanan risk faktörüdür. Daha fazla çalışma gerektirebilecek diğer potansiyel risk faktörleri arasında salisilat kullanımı, solunum yolu ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar ve epidemiyolojik çalışmalarda muhtemelen ilişkili olarak tanımlanan yardımcı üreme teknolojilerinin kullanımı yer almaktadır. Diyet kalitesi ve multivitamin takviyelerinin kullanımı ise riskin azalmasıyla ilişkili olabilir.

Genetik etiyolojiye sahip HPE olgularının çalışmalarda dışlanması, HPE için genetik olmayan risk faktörlerini incelemek açısından önemlidir. Etiyolojik olarak heterojen vaka gruplarını kullanan çalışmalar, potansiyel genetik olmayan risk faktörlerinin tanımlanmasını engelleyebilir. Örneğin, kromozomal anomalileri olan farklı oranlarda vakaların dahil edilmesi, anne yaşı ile HPE arasındaki ilişkiyle ilgili çalışmalarda görülen değişkenlikten sorumlu olabilir. Bu çalışmalardaki bir diğer önemli faktör, tüm olguların gerçekten HPE'ye sahip olmasını sağlamaktır. Bazı çalışmalarda HPE tanısı yüz fenotipine dayandırılmaktadır ve bu durum HPE'liye sahip ancak anormal yüz özelliklerine sahip olmayan olguların kaçırılmasına neden olmaktadır. Gelecekteki çalışmalar, HPE için genetik olmayan risk faktörlerini belirlemeye yetecek kadar büyük bir örneklem boyutuna ulaşmak için muhtemelen birden çok araştırmacı arasında iş birliği gerektirecektir. Bu çalışmalar HPE'nin genetik olmayan nedenlerini aydınlatma açısından oldukça kıymetli olacaktır.

2.8.1.1. Maternal Hastalıklar

2.8.1.1.1. Diyabetes Mellitus

Genetik olmayan nedenler arasında diyabet en yaygın olarak çalışılan ve çalışmalar arasında oldukça tutarlı sonuçlarla en güçlü ilişkinin tanımlandığı risk faktörüdür. Maternal diyabet, HPE de dahil olmak üzere çok sayıda doğum kusuru için bir risk faktörüdür (95). Hem gestasyonel hem de pregestasyonel diyabette HPE için artmış bir risk mevcut olmakla birlikte; insülin gerektiren pregestasyonel diyabet yaklaşık 10 kat artmış risk ile en yüksek non-genetik HPE risk faktörüdür (96, 97). Artmış oksidatif stres, hipoksi, apoptoz ve epigenetik değişiklikler de dahil olmak üzere maternal hipergliseminin doğum kusurlarının bir nedeni olarak etkilerini açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir (98). Multivitamin takviyeleri, diyabetle ilişkili bazı doğum kusurları riskini azaltabilir; ancak diyabet, folik asit içeren takviyeler alan kadınlar arasında bile HPE için güçlü bir risk faktörüdür (99, 100). Fare modelinden elde edilen sonuçlar, vaka serilerinden elde edilen gözlemlerle tutarlıdır. Bir fare çalışmasında, diyabeti indüklemek için hamile farelere gebeliğin 2. gününde intraperitoneal olarak streptozotosin verilmiş ve yavrular arasında HPE dahil çeşitli konjenital anomalilerin oranı gözlenmiştir. Diyabetik farelerin HPE yavru verme riski daha yüksek iken; bu risk, insülin ile tedavi edilen fareler arasında azalmıştır. Önceden var olan diyabetle ilgili dört

epidemiyolojik çalışma ve gestasyonel diyabet ile ilgili dört çalışmadan üçü HPE'li bebeklerin anneleri arasında diyabet prevalansının kontrol annelerine göre en az iki kat daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir (4, 34, 101, 102, 103 104).

2.8.1.1.2. Enfeksiyonlar

HPE'li bebeklerin anneleri arasında çeşitli enfeksiyonlar bildirilmiştir (105). Konjenital sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu, çeşitli vaka raporları ve vaka serilerinde HPE'nin olası bir nedeni olarak tanımlanmıştır (106, 107, 108, 109). Ancak, bu vakaların birçoğunda konjenital CMV dokümantasyonu eksikti. HPE'li çocuğu olan annelerde bildirilen diğer enfeksiyonlar arasında, fetal gelişimin ilk haftalarında döküntü ve yüksek ateş ile prezente olan bir annede kızamıkçık şüphesi ile herpes simpleks ve konjenital sifiliz kanıtı gösteren trizomi 13 olan HPE'li iki olgudur (108, 110). CMV'de olduğu gibi, bu konjenital enfeksiyonların dokümantasyonu eksiktir. Farklı epidemiyolojik çalışmalar, hamilelik sırasında solunum yolu hastalıkları, solunum yolu enfeksiyonları veya grip geçiren anneler arasında HPE riskini araştırmıştır. Bu çalışmalardan ECLAMC çalışmasında, influenzalı anneler ve solunum yolu hastalığı olan annelerde risk artışı rapor edilmişken NBDPS çalışmasında gebelik sırasında solunum yolu enfeksiyonu veya ateş ile HPE arasında bir ilişki bulunamamıştır (4, 102, 111).

2.8.1.1.3. Yüksek Kan Basıncı

HPE ile maternal yüksek kan basıncı arasındaki ilişkiler, epidemiyolojik çalışmalarda araştırılmıştır, bunlarda HPE ile yüksek kan basıncı arasında ilişki tanımlanmamıştır (4, 111)

2.8.1.1.4. Anemi

2000'de Croen ve arkadaşlarının çalışmasında, anemisi olan annelerde HPE riskinin arttığı rapor edilmiştir, ancak sonraki bir çalışmada böyle bir ilişki bulunmamıştır. Aynı çalışmada HPE ve hamilelik sırasında demir takviyesi kullanımı da incelenmiş ve bir ilişki görülmemiştir (4, 102).

2.8.1.1.5. Diğer Maternal Hastalıklar

Araştırmacılar, HPE ile cilt sorunları, alerjiler, idrar yolu enfeksiyonu ve yaralanma arasındaki ilişkileri araştırmak için CBMDP çalışmasının verilerini kullanmış ve hiçbir ilişki tespit edilmemiştir (4).

Gebeliğin ilk 8-10 haftası boyunca fenilalanin seviyeleri yüksek olan fenilketonürlü bir anneden doğan tek bir lobar HPE vakası bildirilmiştir ancak maternal yüksek fenilalanin seviyeleri ile HPE ilişkisini kanıtlayacak başka veri mevcut değildir (112).

2.8.1.2. Hamilelik Özellikleri ve Üreme Hikayesi

İkiz gebelikler, HPE de dahil olmak üzere birkaç farklı doğum kusuru türüyle ilişkilendirilmiştir (113). Monozigotik ikizlerdeki HPE gibi erken yapısal kusurların orta hat alanındaki bölünme bozukluklarını temsil edebileceği varsayılmıştır (114, 115). Çalışmalar tutarlı bir şekilde HPE vakalarının yaklaşık %6'sının ikizlerin veya çoğul doğumların bir üyesi olduğunu bulmuştur; bu yüzde beklenenden daha yüksek bir yüzdendir. Bu nedenle çoğul gebelikler HPE açısından bir risk olarak tanımlanabilir (79, 111, 116).

2.8.1.2.1. Cinsiyet oranı

Cinsiyet oranı, HPE için potansiyel bir risk faktörü olabilir, çünkü literatürde HPE'li dışı olguların fazlalığı sürekli olarak rapor edilmiştir (108, 111, 117) HPE vakaları arasında dışıların baskın olmasının nedeni belirsizdir. Dışi embriyolar, HPE'ye neden olan bozulmalara karşı daha duyarlı olabilir veya erkek embriyoların spontan düşük yoluyla kaybolma olasılığı daha yüksek olabilir. HPE'li embriyoların büyük bir kısmı doğum öncesi kaybedilir; ancak, doğum öncesi olarak 16-36. gebelik haftalarında tanımlanan fetuslar arasında eşit bir cinsiyet oranı, gebeliğin bu sonraki aşamasındaki kayıpların erkeklerde daha sık görülmediğini göstermektedir (29,118). Cinsiyet oranı diğer doğum kusurlarının varlığına veya yokluğuna ve HPE'nin alt tiplerine göre değişir (80, 102,116,119) HPE vakaları arasında ve alt türler içinde değişen cinsiyet oranının nedenlerini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.8.1.2.2. Hamilelikte Vajinal Kanama

Hamilelikte vajinal kanama ile HPE ilişkisi ECLAMC ve Kyoto Embriyo Çalışmasındaki verilerde ilişkili olarak tanımlanmıştır. Kyoto çalışmasında, HPE'li çocuğu olan annelerin %70'inde vajinal kanama bildirilmişken, bu oran kontrol grubu için %26'dır. Bu çalışmalar vajinal kanama ile HPE'nin ilişkili olabileceğini destekler niteliktedir (29, 102).

2.8.1.2.3. Adet Döngüleri

Kyoto embriyo çalışmasında vaka ve kontrol anneleri arasında adet döngüsü düzensizliği açısından fark gözlenmemiştir (29). Ancak CBMDP tarafından yapılan çalışmada, 11 yaşın altında menarş olan annelerin, 12-14 yaş arasında menarş olan annelerle karşılaştırıldığında HPE için artmış 2 kat riske sahip olduğu saptanmıştır (4).

2.8.1.2.4. Parite

CBMDP ve Kyoto embriyo çalışmasındaki verilerle yapılan çalışmalarda HPE ile önceki canlı doğumların sayısı arasında bir ilişki gözlenmemiş, ancak Kyoto embriyo çalışmasında parite sürekli bir değişken yerine kategorik olarak ele alındığında daha düşük parite ile artan risk saptanmıştır (4, 29).

2.8.1.2.5. Fertilite Tedavileri

Annenin hamilelik sırasında salisilat ve diğer ilaçların kullanımı gibi başka potansiyel risk faktörleri olmasına rağmen, bir HPE vakasında inseminasyon işlemi kullanımı bildirilmiştir. NBDPS'den elde edilen veriler, yardımcı üreme teknolojilerinden geçen anneler arasında HPE riskinin arttığını, ancak genel olarak bu durumun doğurganlık tedavileri için geçerli olmadığını göstermektedir (111).

2.8.1.3. Sosyodemografik Faktörler

2.8.1.3.1. Yaş

Anne yaşı tutarsız bir şekilde HPE ile ilişkilendirilmiştir, bazı araştırmalar genç anneler arasında daha düşük riskler ve daha yaşlı anneler arasında daha yüksek riskler bulurken, diğerleri hem genç hem de daha yaşlı anneler arasında artmış risk bulurken farklı araştırmalar yaşla hiçbir ilişki bulmaz (102, 108, 111, 117, 120). Bu varyasyonun bir kısmı, bazı HPE araştırmalarına kromozom anormallikleri (trizomiler dahil) olan bebeklerin dahil edilmesinden kaynaklanıyor olabilir. HPE ile baba yaşı arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda ise hiçbir ilişki gözlenmemiştir (29, 34, 102).

2.8.1.3.2. Irk / Etnisite

Amerika Birleşik Devletleri ve Birleşik Krallık'ta yürütülen dört çalışmada, beyaz olmayan anneler arasında beyaz olan annelere göre daha yüksek HPE riskleri gözlemlenirken, Hawaii'de yapılan bir çalışmada Pasifik Adalılarla kıyasla Uzak Doğu Asyalılar arasında daha büyük bir risk görülmüştür (108, 120, 121). Baba ırkı/etnisite ile HPE arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmadaysa hiçbir ilişki tespit edilmemiştir (4).

2.8.1.3.3. Sosyo-Ekonomik Durum

Liseden daha az eğitime sahip annelerin HPE riski, lise eğitimi olan annelere kıyasla daha yüksek saptanmıştır (4,111). Düşük gelirli anneler için riskin biraz arttığını gösteren çalışmalara ek olarak başka çalışmalarda, HPE ile sosyoekonomik durum arasında bir ilişki bulamamıştır (102, 111).

2.8.1.4. Maternal Terapötik Kullanımı

2.8.1.4.1. Salisilat

Hamileliğin erken döneminde yüksek dozda aspirin alan anneler arasında HPE'li çocuklara ilişkin üç vaka raporu tanımlanmıştır ve sodyum salisilat ve sülfasalazin alan annelerden doğan iki ek vaka tanımlanmıştır. Bu vakalarda, ebeveynler arasında akrabalık, annelerin sigara içme ve diğer ilaçları kullanma gibi ek potansiyel risk faktörleri bildirilmiştir (110, 112, 123, 124, 125). Salisilat kullanımı, tutarsız sonuçlar veren üç epidemiyolojik

çalışmada araştırılmıştır. CBMDP ve NBDPS çalışmalarındaki verilerden elde edilen bulgular, HPE'li çocuğu olan annelerin hamileliğin erken döneminde aspirin veya salisilat alma ihtimalinin iki kattan fazla olduğunu gösterirken, ECLAMC çalışmasındaki verilerde hiçbir ilişki gösterilememiştir (102). İlaç kullanımı ile doğum kusurları arasındaki ilişkiyi gösteren tüm çalışmalarda olduğu gibi, bazı araştırmalarda gözlemlenen salisilatlar ile HPE arasında gözlenen ilişkinin ilacın kendisiyle mi yoksa ilacın hangi amaçla kullanıldığıyla mı ilgili olduğunu dikkate almak önemlidir.

2.8.1.4.2. Diğer Analjezikler

Bir vaka raporu, hamileliğin ikinci üç aylık döneminde asetaminofen alan bir anneden doğan bir bebekte HPE tanımlamıştır, ancak anne aynı zamanda ilk üç aylık dönemde aspirin almış ve gebelik boyunca sigara içmiştir (122).

NBDPS'den elde edilen sonuçlar, hamilelik sırasında asetaminofen kullanımı ile HPE arasında zayıf bir ilişki bulmuştur, ancak ibuprofen kullanımı ile ilişki saptamamıştır (111).

2.8.1.4.3. Antiepileptik İlaçlar

Kotzot ve arkadaşlarının 1993'teki çalışmasında, annesi fenitoin ve primidon ile tedavi edilen HPE'li bir bebek bildirmiştir. HPE'ye ek olarak, bebekte hipertelorizm, orta yüz hipoplazisi ve hipoplastik distal falanks ve el ve ayak parmaklarının tırnaklarında hipoplazi dahil olmak üzere fetal hidantoin sendromu özellikleri bildirilmiştir (126).

Bu olası ilişkiyi ele almak için, Boston bölge hastanelerinde doğan ve antiepileptik ilaçlara maruz kalan bebeklerin bir incelemesi yapılmış ve antiepileptiklere maruz kalan 112 gebelik arasında bir HPE vakası kaydedilmiştir. Bununla birlikte, antiepileptiklere maruz kalan 453 gebeliğin analizinde, HPE'li hiçbir vaka tespit edilmemiştir (127).

1995'teki Rosa'nın çalışmasında ABD Gıda ve İlaç İdaresi'ne (FDA) gönderilen yan etki raporlarını gözden geçirilmiştir. Hamilelik sırasında karbamazepin, valproat, fenitoin ve primidon olmak üzere (tek başına veya kombinasyon halinde) antiepileptik kullanan annelerde Kotzot ve arkadaşları tarafından bildirilen vaka da dahil olmak üzere yedi şüpheli HPE vakası belirlendi (126, 128). Sonuç olarak farklı çalışmalarda HPE'li bebeklerin oranı, antiepileptik kullananlar arasında, antikonvülsan dışındaki ilaçlara maruz kalan annelere göre daha yüksek saptanmıştır.

2.8.1.4.4. Retinoik asit

Şiddetli akne tedavisinde kullanılan bir retinoik asit türevi olan izotretinoine doğum öncesi maruz kalan 154 anneden oluşan bir seride, 21'inde doğumsal anomaliler ve bu olgulardan birinde de HPE saptanmıştır (129). 1969 ve 1993 yılları arasında akne tedavisinde kullanılan all-trans-retinoik asit içeren kremlerin gebeliğin ilk 3 aylık döneminde kullanımı

sonrası FDA'ya 25 konjenital anomali bildirilmiştir, bunların da 5'inde HPE mevcuttur. Bu rakam farklı bir çalışmada retinoik asit kullanımı olan 8700 vakanın 19'unda HPE vakası saptanmasına kıyasla yüksektir (129). Ayrıca hayvan modelleri doğum öncesi retinoik asit maruziyeti ile HPE arasında olası bir ilişkiyi destekler niteliktedir. All-trans-retinoik asitin gebeliğin erken dönemlerinde farelere oral olarak verilmesi sonucu HPE ve fenotip ile uyumlu kraniyofasiyal anomalili fareler bildirilmiştir (130, 131).

2.8.1.4.5. Hormonlar

HPE'li çocuğu olan anneler arasında hamileliğin erken döneminde alilloestrenol ve dihidrogesteron, oral kontraseptifler ve kortizon dahil olmak üzere birkaç farklı hormonun kullanıldığı bildirilmiştir, ancak bu hormonları alan annelerin çoğu başka ilaçlar da kullanmaktaydı (132, 133). ECLAMC verilerinin kullanıldığı çalışmada seks hormonlarının kullanımı artmış HPE riski ile ilişkilendirilmiştir (102). NBDPS çalışmasında gebeliğin ilk üç ayında progesteron kullanan anneler arasında yüksek bir risk de görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (111). Kyoto embriyo çalışmasında, vaka annelerinin %23'ü erken dönemde progestajen almışken; kontrol annelerinin %15'i kullanmıştır. CBDMP'den araştırmacılar HPE ve doğum kontrol haplarının kullanımı arasında hiçbir ilişki bulamamıştır (4, 29). Sonuç olarak hormon kullanımı ile HPE arasındaki ilişki için farklı çalışmalar da farklı sonuçlar bulunmuyor ve daha çok çalışmaya gerek vardır.

2.8.1.4.6. Tiroid Hormonu

NBDPS çalışmasından elde edilen verilerde gözlemlenen tiroid hormonu kullanımı ile HPE arasında ilişki saptanmıştır. Bu ilişkinin başka çalışmalarda tekrarlanması gerekmektedir. Gözlenen ilişkinin tiroid hormonu kullanımıyla mı, yoksa tiroid hormonu tedavisinin kullanıldığı altta yatan durumla mı, yoksa şansa mı bağlı olduğu bilinmemektedir. Bununla birlikte, fetal sinir sisteminin gelişimi için tiroid hormonu gereklidir, bu nedenle ilişki biyolojik olarak makul olabilir (134).

2.8.1.4.7. Statinler

Birkaç kanıt, annenin kolesterol düzeylerini düşürmek için kullanılan statinlere maruz kalmasının HPE riskini artırabileceğine dair endişelere yol açmıştır. HPE'ye sebep olabilecek faktörler arasında, kolesterol metabolizması bozuklukları olan bazı genetik antiteler mevcuttur. Kolesterol biyosentezinin inhibisyonunun daha önce hayvan çalışmalarında HPE ile sonuçlandığı ve kolesterolün embriyonik gelişimde kritik olan Hedgehog sinyal yolunun işlevi için gerekli olduğu ve HPE ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (135, 136, 137, 138, 139, 140).

FDA'ya rapor edilen statine maruz kalan 52 gebeliği içeren bir rapor, 1'i HPE'li olmak üzere majör malformasyonlu çocuğu olan 20 anne tanımlamıştır (140, 141, 142). Hamilelik

sırasında statinlere maruz kalma sıklığı düşük olduğundan, vaka kontrol tasarımı kullanan analizler bu durumda mümkün olmamıştır ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.8.1.5. Maternal Non-Terapötik Kullanımı

2.8.1.5.1. Alkol

Rapor edilen annelerin çoğunun sigara ve ilaç kullanımı gibi başka potansiyel risk faktörleri olmasına rağmen, birkaç vaka raporu, HPE'nin bir nedeni olarak gebeliğin ilk üç ayında aşırı alkol tüketimini göstermiştir (108, 133, 143, 144). Hayvan çalışmaları HPE etiyojisinde annenin alkol maruziyetinin rolünü desteklemektedir. Farelerde embriyonik gelişimin erken bir aşamasında (gastrulasyon) akut maternal etanole maruz kalmanın, HPE ve fenotip ile uyumlu kraniyofasiyal anormallikler spektrumunu indüklediği gösterilmiştir (145, 146). Hayvan modelleri, alkolün hayvanlarda bu anormallikleri üretme mekanizması hakkında bilgi sağlamak için kullanılmıştır. Bu çalışmalar, etanole maruz kalmanın, gelişimin kritik bir döneminde belirli gelişimsel genlerin ekspresyonunun bozulmasına yol açtığını göstermektedir (147, 148). Bununla birlikte, hamilelik sırasında maternal alkol kullanımının epidemiyolojik çalışmalarının sonuçlarında tutarsızlıklar mevcuttur. CBDMP verileri kullanılan çalışmada yüksek bir risk görülmüştür ancak NBDPS ve Kyoto Embriyo çalışmasından elde edilen verileri kullanan araştırmacılar, alkol kullanımı ve HPE arasında bir ilişki bulamamıştır (29, 111).

2.8.1.5.2. Sigara

Çoğu annenin alkol alımı ve ilaç kullanımı gibi diğer potansiyel risk faktörlerine sahip olmasına rağmen, çeşitli vaka raporları, HPE'li çocukları olan anneler arasında hamilelik sırasında yoğun sigara kullanımı tanımlamıştır (122, 133, 149). Üç epidemiyolojik çalışma, çelişkili sonuçlar vermekle beraber sigara içmenin HPE için potansiyel bir risk faktörü olarak rolünü araştırmıştır. CBDMP araştırmacıları riskin dört kat arttığını tespit ederken, NBDPS ve Kyoto embriyo çalışmasından araştırmacılar HPE ile sigara kullanımı arasında hiçbir ilişki tespit etmemiştir (4, 29, 111).

2.8.1.6. Nutrisyonel Faktörler

2.8.1.6.1. Folik Asit ve Multivitamin Kullanımı

NBDPS elde edilen verilere göre, hamilelik sırasında folik asit veya multivitamin kullanan kadınların HPE'li bebek sahibi olma riski daha düşüktü; ancak, bu ilişki CBDMP çalışmasından alınan verilerin analizinde gözlenmemiştir (4, 111).

2.8.1.6.2. Diyet

Erken gebelik sırasında düşük kalorili bir diyetle bağlı olan bir annede meydana gelen bir HPE olgusu bildirilmiştir, ancak bu çalışmada annenin hamilelik sırasında antibiyotik kullanımı gibi başka potansiyel risk faktörleri de vardır (150). NBDPS araştırmacıları, diyet

kalitesinin HPE ile ilişkili olabileceğini, yüksek yağsız veya az yağlı süt, yoğurt, tereyağı, fasulye, brokoli, tavuk ve balık tüketimi olan anneler için daha düşük riskler gözlemlenebileceğini belirtmiştir (111).

2.8.1.6.3.Vücut Kitle İndeksi (BMI)

Vücut kitle indeksi ile HPE arasındaki ilişkiyi araştıran üç çalışmada; CBDMP ve Texas Doğum defektleri kayıt sistemi (*Texas Birth Defects Registry*) verileri kullanılarak yapılan çalışmalarda BMI>29 kg/m² için artmış risk gösterirken; NBDPS çalışması bu ilişkiyi desteklememiştir. Ayrıca Texas çalışmasında gebe kadınlarda obezite ve gestasyonel diyabet arasındaki etkileşim incelenmiştir ve obezite yalnız başına HPE riskini arttırmazken, gestasyonel diyabeti olan obez kadınların HPE riskinin altı kat arttığı görülmüştür (4, 101, 111).

2.8.1.7. Diğer Tıbbi Riskler

NBDPS veya CBDMP araştırmacıları tarafından hamilelik sırasında HPE ile X-ışınları arasında ilişki gözlemlenmemiştir. CBDMP çalışmasından elde edilen veriler, HPE'nin hamilelik sırasında ameliyatla ilişkili olup olmadığını araştırmak için de kullanılmış ve herhangi bir ilişki saptanmamıştır (4, 111).

2.8.2.Genetik Nedenler

HPE'nin genetik etiyolojisinde sayısal ve yapısal kromozom anomalileri, kopya sayısı değişiklikleri (CNV), monogenik sendromik bozukluklar, non-sendromik (izole) monogenik bozukluklar yer alır. 127 fetusu içeren HPE etiyolojisinde rol oynayan faktörleri araştıran bir çalışmada olguların 64 (%50,39)'ünde bir kromozom anomalisi saptanmıştır. Bu çalışmada en sık görülen kromozom anomalisi trizomi 13 (n=38) olup bunu sırasıyla trizomi 18 (n=8) ve triploidi (n=5) izlenmiştir. Yapısal kromozom anomalilerinden terminal 7q delesyonu en sık görülen anomali iken bir olguda 18. Kromozomun p kolunda delesyon saptanmıştır (151).

2.8.2.1.Kromozom Anomalileri

Kromozom analizi, özellikle SSS malformasyonları olmak üzere genetik sendromların nedenini belirlemek için mükemmel bir yaklaşım oluşturur (152). HPE'de bildirilen ilk sitogenetik anomaliler, trizomi 13, trizomi 18 ve triploidlerdir (153, 154, 155). Daha sonra, sitogenetik tekniklerdeki gelişmeler, HPE'li hastalardan oluşan serilerde farklı kromozomal anomalilerin tanımlanmasını sağlamıştır. HPE'li bireylerin yaklaşık %25-50'sinde kromozom anormalliği saptanmaktadır. HPE'li olgularda kromozom anomalileri spesifik değildir ve sayısal veya yapısaldır ve herhangi bir kromozomu içerebilir (156, 157). Bu heterojenliğe rağmen, beyin malformasyonları olan hastalarda kapsamlı çalışmalar ve dört ana bölgede otozomal delesyonların HPE ile ilişkili olduğunu göstermiştir (158, 159). Bu dört tekrarlayan kromozomal bölgelerin moleküler çalışmaları, kritik bölgelerin tanımlanmasına ve nihai olarak

HPE'ye özgü genlerin tanımlanmasına yol açmıştır. Tekrar eden bu sitogenetik bölgeler, *SHH* (7q36), *ZIC2* (13q32), *SIX3* (2p21) ve *TGIF* (18p11.3) genlerinde spesifik nokta mutasyonlarının veya delesyonlarının HPE ile ilişkisinin saptanmasını sağlamıştır (160, 161, 162, 163, 164, 165). Bu çalışmalardan elde edilen veriler ile karyotip analizlerinde tespit edilen tekrarlayan kromozomal delesyonların analizi, 12 aday HPE lokusunun tanımlanmasına yol açmıştır (153, 154).

Kromozomal anormallikler üzerine daha ileri çalışmalar daha fazla aday HPE lokusunun ortaya çıkmasına yardımcı oldu ve HPE patojenitesinde ayırt edici olarak *SHH* sinyal yolunun öneminin fark edilmesine yol açtı ve bu yoldaki *PTCH1* (9q22), *GLI2* (2q14) ve *DISP1* (1q41) genleriyle HPE ilişkisinin kurulmasını sağlamıştır (157, 166, 167, 168). Bu keşiflerle aynı zamana denk gelen, NODAL/TGF- β yolunda katkıda bulunan *TDGF1* (3p21.31) ve *FOXH1* (8q24.3) olmak üzere iki yeni gen tanımlanmıştır (169).

Kraniyofasiyal anormallikler veya HPE alt tipi kromozom anomalisi olan ve olmayan olgularda ayırt edilemez; bununla birlikte, bir kromozom anormalliğinin neden olduğu HPE'li bireylerin başka organ sistemi tutulumuna sahip olma olasılığı daha yüksektir ve bu da olguların çoğunda daha şiddetli bir klinik seyirle sonuçlanır (11).

2.8.2.1.1.Sayısal Kromozom Anomalileri

HPE'nin en yaygın nedeni olan trizomi 13, tüm nedenlerin %40-60'ında ve kromozom anormalliklerinin neden olduğu HPE'nin yaklaşık %75'inde görülür. Trizomi 13'ün doğum prevalansı 1:5000'dir. Trizomi 13'lü bireylerin yaklaşık %70'inde arinensefali görülür.

HPE ile ilişkili diğer yaygın anöploidiler arasında trizomi 18 ve triploidi bulunur. HPE vakalarında diğer çeşitli anöploidiler de bildirilmiştir (31, 155, 170, 171, 172).

Trizomi 13

Trizomi 13, HPE'nin en yaygın nedenidir. trizomi 13'te çoklu organ sistemleri etkilenebilir ve yaygın fizik muayene bulguları arasında mikroftalmi/anoftalmi, yarı damak ve dudak, postaksiyel polidaktili ve fırlak topuk yer alır. Trizomi 13'lü bireylerin %8 ila 39'unda HPE bildirilmiştir (173, 174, 175, 176). HPE ile ilişkilendirilen trizomi 13 olgularının çoğu doğum öncesi testlerden elde edilmiştir. 50.000'den fazla gebeliği içeren Kagan ve arkadaşlarının çalışmasında HPE'si olan fetusların %65,9'unun anormal karyotiplere sahip olduğu ve bu anormal karyotip saptananların %86'sının trizomi 13 olduğu bulunmuştur (31). Trizomi 13'ün HPE ile ilişkisinin mekanizması net olarak anlaşılamamıştır. Yaygın olarak HPE ile ilişkili bir gen olan *ZIC2*, 13q32.3 bölgesinde bulunur, ancak *ZIC2* varyantları fonksiyon kaybı ile gitmektedir.

Diğer anöploidiler

Trizomi 13'ten sonra HPE ile ilişkili en yaygın anöploidiler trizomi 18, trizomi 21 ve trizomi 22'dir. Trizomi 18'de görülen merkezi sinir sistemi anomalileri arasında korpus kallozum agenezisi, spina bifida ve serebellar hipoplazi yer alırken HPE daha nadir görülen SSS anomalisidir (177). Petracchi ve arkadaşlarının 13.883 prenatal HPE tanısı alan 28 fetusta 2 trizomi 18 vakası saptamıştır (170).

HPE ile ilişkilendirilen genlerden biri olan *TGIF*, 18p11.31'de yer almaktadır ve monozomi 18p'ye sahip olguların %10-15'inde HPE saptanmıştır (178, 179).

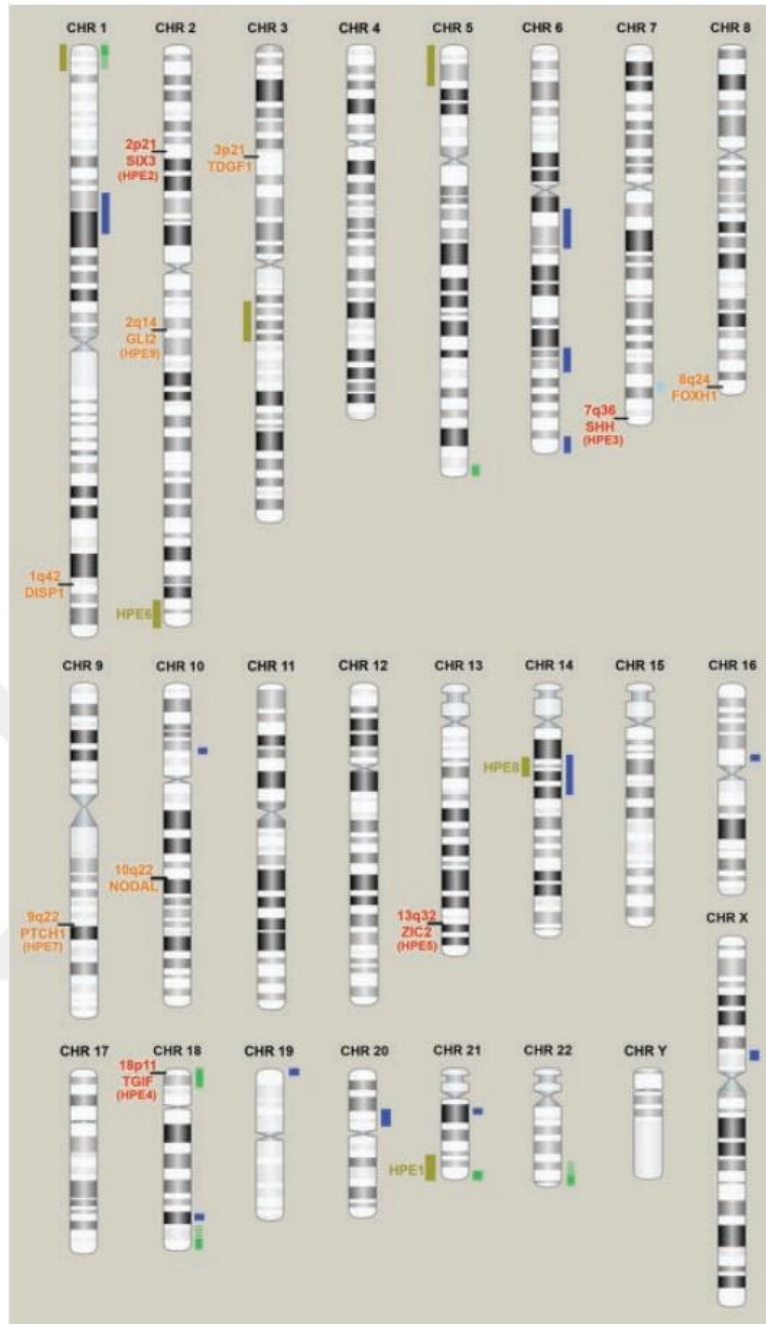
HPE'si olan en az 5 trizomi 21 vakası bildirilmiştir (6, 180, 181, 182). Aynı şekilde üç trizomi 22 olgusunda HPE vakası, bir trizomi 16 olguda da HPE bildirilmiştir (183, 184, 185).

Triploidi

Triploidide yaygın bulgular arasında letalite, mikrosefali, ekstremité anomalileri ve nadiren de HPE yer alır. Boston'daki *Brigham and Women's Hospital (Brigham and Women's Hospital/Boston)*'da 54 triploidi fetus üzerinde yapılan bir çalışmada, 3 fetusta HPE saptanırken; Kagan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada anormal karyotipli 29 HPE'li vakadan 3'ünün triploidi olduğu saptanmıştır (31, 171).

2.8.2.1.2.Yapısal Kromozom Anomalileri

HPE ile ilişkili yapısal kromozom anormallikleri neredeyse tüm kromozomlarda rapor edilmiştir. En sık görülen delesyon veya duplikasyonlar, 13q ve del(18p), del(7)(q36), dup(3)(p24-pter), del(2)(p21) ve del(21)(q22.3) bölgelerinde saptanmıştır (186). Bu bölgelerin çoğu, otozomal dominant sendromik olmayan HPE ile ilişkili olduğu bilinen genleri içermektedir. HPE için potansiyel aday genler içerebilecek diğer anomaliler arasında 1pter, 3q ve 5pter'de anomaliler tanımlanmıştır (187, 188, 189). Ayrıca, belirli genlerin bulunmadığı ama en olası HPE lokusları olarak kabul edilen üç tekrarlayan HPE bölgesi de tanımlanmıştır. Bu bölgeler OMIM'de HPE1 (MIM# 236100) (*21q22*), HPE6 (MIM# 605934) (*2q37*) ve HPE8 (MIM# 609408) (*14q13*) olarak listelenmiştir (165). Şekil 11'de Bendavid ve arkadaşlarının 2010'daki çalışmalarından alınmış HPE delesyonlarının ve genlerinin G bantlı kromozomlar üzerindeki lokalizasyonlarının gösterimi mevcuttur.



Şekil 11: HPE delesyonlarının ve genlerinin G bantlı kromozomlar üzerindeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi (165).

2.8.2.1.3. Kopya Sayısı Değişiklikleri (CNV)

Array-CGH gibi yeni genomik teknolojiler, genomik kopya sayısı değişikliklerinin mikroskop altı seviyelerde haritalanmasına izin verdi. 2018’de Hu ve arkadaşlarının çalışmasında, kromozomal mikroyarray ile değerlendirilen HPE’li 222 olguda 6 HPE lokusunda CNV bulunmuştur. Bunlar *SIX3*, *SHH*, *TGIF1*, *ZIC2*, *GLI2* ve *DISP1* genlerinin bulunduğu lokuslardır (186). Roessler ve arkadaşlarının 2018 yılındaki çalışmasında saptadığı gibi *TGIF1*’in yanı sıra *SHH*, *ZIC2* ve *SIX3*’teki fonksiyon kaybı varyantları HPE’nin yaygın görülen

nedenleridir ve 2018’de Hu ve arkadaşlarının çalışması da bunu destekler niteliktedir (186, 190). HPE ile *GLI2* ve *DISP1*'deki delesyonlar arasındaki ilişkiyi destekleyecek daha az veri mevcuttur. *GLI2*'deki varyantların, HPE'den ayrı olarak, hipofiz anomalileri, polidaktili ve ince yüz özelliklerinin baskın olduğu bir dizi fenotipe yol açtığına dair artan veriler mevcuttur (6,191). *GLI2* ile *DISP1* genleri ile HPE arasındaki ilişkiyi destekler nitelikte yayınlarla artmaktadır (186).

HPE’li tüm bireylerin yaklaşık %10’unda patojenik CNV’leri (HPE ile ilişkili olduğu bilinen lokuslar dahil) tanımlanmıştır. CNV saptama oranlarının test laboratuvarına ve metodolojiye göre değişebileceği akılda tutulmalıdır (11, 186).

2.8.2.2.Holoprozensefalinin Eşlik Ettiği Monogenik Sendromlar

HPE’si olan bireylerin %18-25’inde Smith-Lemli-Opitz sendromu (SLOS) gibi tanınabilir bir monogenik sendrom vardır (6). HPE’nin nadiren de olsa eşlik ettiği en az 25 sendrom tanımlanmıştır; bu antitelerin çoğu oldukça nadirdir. Son otuz yılda genomik teknolojiye gelişmeler, HPE bulgusunu içeren sendromların çoğuna moleküler tanı konulmasını sağlamıştır. Sendromik HPE’li olgularda HPE’ye diğer organ ve sistemlerde eşlik eden majör malformasyonların olması tanının konulmasını kolaylaştırır (6). Prenatal ultrasonografik değerlendirmede HPE’ye eşlik edebilecek anomaliler saptanamayabilir bu nedenle HPE’nin çoğu sendromik nedeninin tek başına doğum öncesi ultrasonografide teşhis edilmesi çok zordur ve doğum sonrası bir dismorfolojik inceleme gerektirir (192). Tablo 6’da HPE’nin eşlik ettiği monogenik sendromların genetik ve klinik özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 6: Holoprozensefalinin kromozomal olmayan sendromik nedenlerinde genetik ve klinik (192).

Etiyoloji	Gen/Kalıtım modeli	Ana klinik özellikler
Pallister-Hall sendromu	<i>GLI3</i> / OD	Hipotalamik hamartom, bifid epiglottis, mezoaksiyel polidaktili.
Kallmann sendromu 2	<i>FGFR1</i> / OD	Konjenital hipogonadotropik hipogonadizm, anosmi/ or hiposmi.
Steinfeld sendromu	<i>CDON</i> / OD	Radiyal ray anomalisi, kardiyak anomaliler, renal anomaliler, safra kesesi agenezisi.
Hartsfield sendromu	<i>FGFR1</i> / OD	Ektrodaktili.
Psödotrizomi13 sendromu	Bilinmiyor	Normal karyotip ile HPE ve polidaktili.
Smith-Lemli-Opitz sendromu	<i>DHCR7</i> / OR	Fasiyal dismorfizm, mikrocefali, boy kısalığı, polidaktili, 2-3 ayakparmaklarında sindaktili,yarık damak, kardiyak anomaliler, bilişsel gerilik.
Genoa sendromu	Bilinmiyor	Kraniyosinostoz.
Lambotte sendromu	Bilinmiyor	Serebral malformasyonlar, mikrosefali, intrauterin büyüme geriliği (IUGR), letal.

Hidrolethalus sendromu	<i>HYLS1, KIF7</i> /OR	Kraniyofasiyal dismorfizm, hidrosefali, SSS/kardiyak/ akciğer anomalileri.
Brakiyal ameli, dudak yarığı ve HPE	Bilinmiyor	Brakiyal ameli, dudak yarığı.
Agnati-Otosefali Kompleksi	<i>PRRX1</i> / OD, OR	Mandibular hipoplazi/agnati, ventromediyal auriküler malpozisyon (meloti), auriküler füzyon (sinoti), hipoglossi / aglossi, mikrostomi.
Kaudal disgenezis sendromu	<i>VANGL1</i> / OD	Bel ve ekstremiteler dahil kaudal kutbun değişken anomalileri, genitoüriner / gastrointestinal anomaliler.
Stromme sendromu	<i>CENPF</i> / OR	Mikrosefali, intestinal atrezi, göz anomalileri.

OD, otozomal dominant kalıtım; OR, otozomal resesif kalıtım.

2.8.2.3.Non-Sendromik, Non-kromozomal (İzole) HPE’de Tek Gen Bozuklukları

Tekrarlayan kromozomal anomalilerin karyotip ile saptanması, sonunda 12 HPE aday lokusunun tanımlanmasına yol açtı (154). Bu bölgelerin moleküler çalışmaları, 7q36’da *SHH* (OMIM 600725), 13q32’de *ZIC2* (OMIM 603073), 18p11.3’te *TGIF1* (OMIM 602630) ve 2p21’de *SIX3* (OMIM 603714) dahil olmak üzere HPE’de dört ana nedensel genin tanımlanmasına yardımcı oldu (160, 161, 164, 178, 193). Kromozomal anomaliler hariç tutulduktan sonra genetik HPE vakalarının yaklaşık %25’inden bu dört ana gendeki varyantlar sorumludur (2). Tablo 7’de HPE açısından yerleşik ve önerilen lokuslar listelenmiştir. Yeni genler değerlendirildikçe HPE lokuslarının sayısının artması muhtemeldir.

Tablo 7: HPE lokusları ve genleri (194).

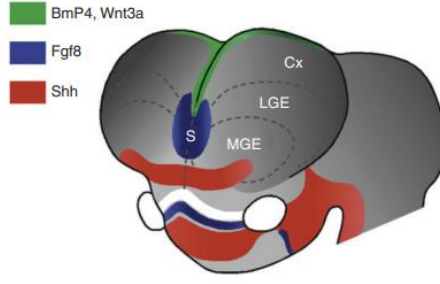
Adlandırılmış hastalık lokusları	Kromozomal lokasyon	Gen
HPE1	21q22.3	-
HPE2	2p21	<i>SIX3</i>
HPE3	7q36	<i>SHH</i>
HPE4	18p11.3	<i>TGIF</i>
HPE5	13q32	<i>ZIC2</i>
HPE6	2q37.1-q37.3	-
HPE7	9q22.3	<i>PTCH1</i>

HPE8	14q13	-
HPE9	2q14	<i>GLI2</i>
HPE10	1q41-q42	-
-	1q42	<i>DISP</i>
-	10q	<i>NODAL</i>
-	8q24.2	<i>FOXH1</i>

Moleküler genetik düzeyde iyi anlaşılan sendromik olmayan HPE formları, otozomal dominant bir şekilde kalıtılır. Sendromik olmayan HPE ile ilişkili genlerde patojenik varyantlara sahip bireylerin fenotipi, siklopinin eşlik ettiği alobar HPE'den klinik olarak normale kadar değişir ve aynı aile içinde bile son derece değişkendir. HPE'li bireylerin çoğunda, yüz anomalileri ile etiolojide rol oynayan gen ve/veya patojenik varyantın tipi arasında bir korelasyon mevcuttur. Ancak, birçok durumda bu korelasyon net olarak kurulamaz (11, 195,196). Bahsedildiği gibi tekrarlayan kromozomal anomalilerin analizi, Sonic hedgehog (SHH), kemik morfogenetik proteini (*bone morphogenetic protein*, BMP), fibroblast büyüme faktörü (*fibroblast growth factor*, FGF), *wingless/integrated* (WNT), Nodal ve retinoid gibi temel gelişimsel sinyal yollarına katılan HPE'ye neden olan ilk genlerin tanımlanmasını sağlamıştır.

2.9. HPE İlişkili Sinyal Yolları

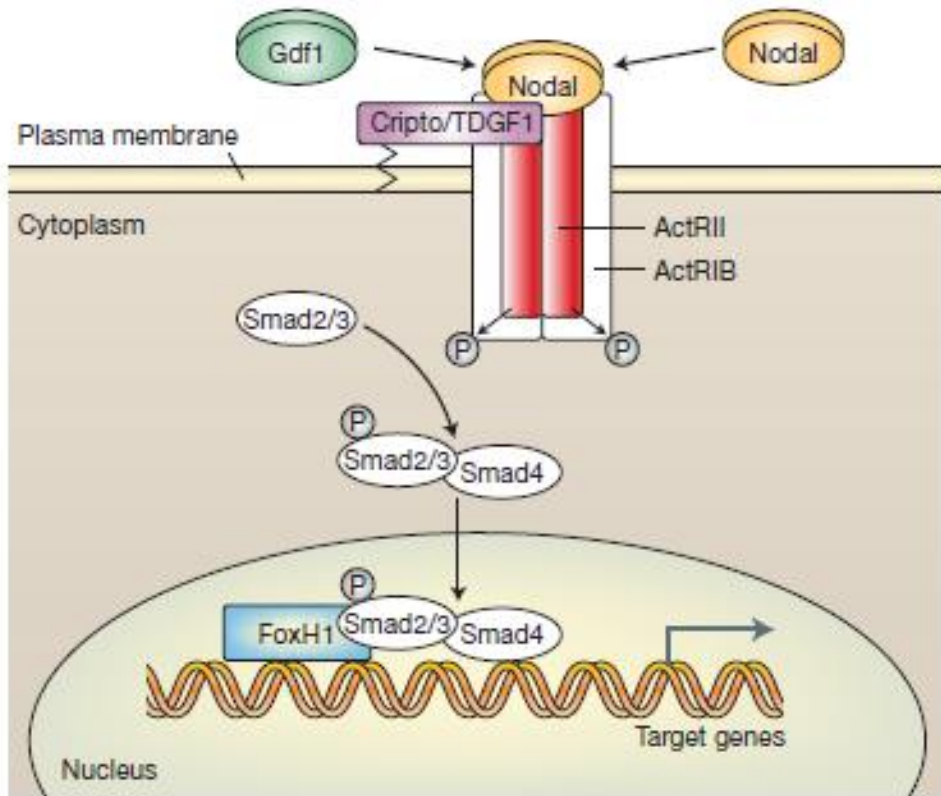
Beyin ve yüz gelişimi sırasındaki morfogenetik olaylar, SHH, BMP, FGF, WNT, Nodal ve retinoid sinyali gibi yalnızca bir avuç hücre dışı sinyal ağı tarafından koordine edilir. Tüm bu sinyal yolları, sadece beyin ve yüz gelişimi sırasında değil, aynı zamanda bir bütün olarak embriyonik gelişim sırasında tekrar tekrar kullanılır. Sinyal verme faaliyetinin yeri, zamanı ve süresi önemlidir. Sinyal gücünün ince ayarı genellikle yardımcı moleküller (koreseptörler, agonistler ve antagonistler) tarafından yapılır. Telensefalonun doğru spesifikasyonu için SHH, FGF ve BMP sinyalleri arasındaki denge kritiktir. SHH ventral sinyal merkezinde, BMP/WNT dorsal sinyal merkezinde ve FGF8 ise septumda ifade edilir. Şekil 12'de telensefalonun gelişimini etkileyen sinyal merkezleri ve telensefalondaki konumlanışları gösterilmiştir.



Şekil 12: Telensefalonu düzenleyen sinyal merkezleri (83). Diğer gelişmekte olan baş yapılarına göre bölgesel farklılaşma için önemli olan farklı sinyal merkezlerini gösteren telensefalonun ön-yandan görünümü: SHH (kırmızı) salgılayan ventral merkez, FGF8 (mavi) salgılayan rostral merkez; BMP'ler ve Wnt (yeşil) salgılayan dorsal merkez. Rostral, dorsal ve ventral sinyal merkezleri arasındaki çapraz düzenleme, erken telensefalonun modellenmesinde önemli bir rol oynar.

2.9.1. Nodal Sinyal Yolu

Zebra balığı ve fare üzerinde yapılan çalışmalar, dönüştürücü büyüme faktörü- β (*Transforming growth factor beta*, TGF- β) üst aile üyesi olan Nodal sinyali tarafından yapılan sinyalin, prekordal plakanın ilk spesifikasyonu için kritik olduğunu göstermiştir (197, 198). Nodal sinyaller tip I serin-treonin kinaz [aktivin reseptörü benzeri kinaz (Alk)4/ActrIb/Acvr1b veya Alk7] ve tip II reseptörlerinden (ActRIIA ve ActRIIB) oluşan bir reseptör kompleksi aracılığıyla işlev görür (83). Bu reseptörlerin aktivasyonları Smad2 ve Smad3'ün fosforilasyonuna yol açar, daha sonra Smad4'e bağlanarak nükleusa taşınır. Bu kompleks FoxH1/FAST196 gibi transkripsiyon regülatörleriyle özel genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Nodal sinyali, membran bağlı ekstraselüler kofaktörler olan Tdgfl (Cripto) ve Cfc1 (Cryptic) tarafından düzenlenir. Nodal sinyal yolağı, gastrulasyonun başlangıcında mezoderm oluşumu için kritiktir ve mutant farelerde, beyin gelişiminin başlangıcında ölüm gözlenmiştir. ActRIIA, Smad2 veya FoxH1 eksikliğinde fareler, prekordal mezendodermi düzgün şekilde oluşturamamaları nedeniyle oldukça şiddetli HPE formları gösterirler. İnsan HPE vakalarında, Nodal sinyal yolu veya aşağı akış hedefleri olan *TDGF1*, *TGIF* ve *FAST1*'de mutasyonlar tanımlanmıştır. Tüm bu mutasyonlarda ortak olan özellik, Shh ifadesinin azalması veya eksik olmasıdır (199). *Nodal* genindeki patojenik varyantlar HPE ile sonuçlanabilir, ancak daha yaygın olarak kardiyak defekt ve lateralite kusurları ile ilişkilendirilmiştir (200). Benzer şekilde NODAL sinyal yolunun bir parçası olan *FOXH1* genindeki patojenik varyantlar kardiyak kusurlara veya belirgin HPE'ye neden olabilir (169). Bu yolaktaki TDGF1'de (CRIPTO) mutasyonlara sahip biri orta hat beyin anomalisine diğeri HPE'ye sahip iki hasta bildirilmiştir (201).

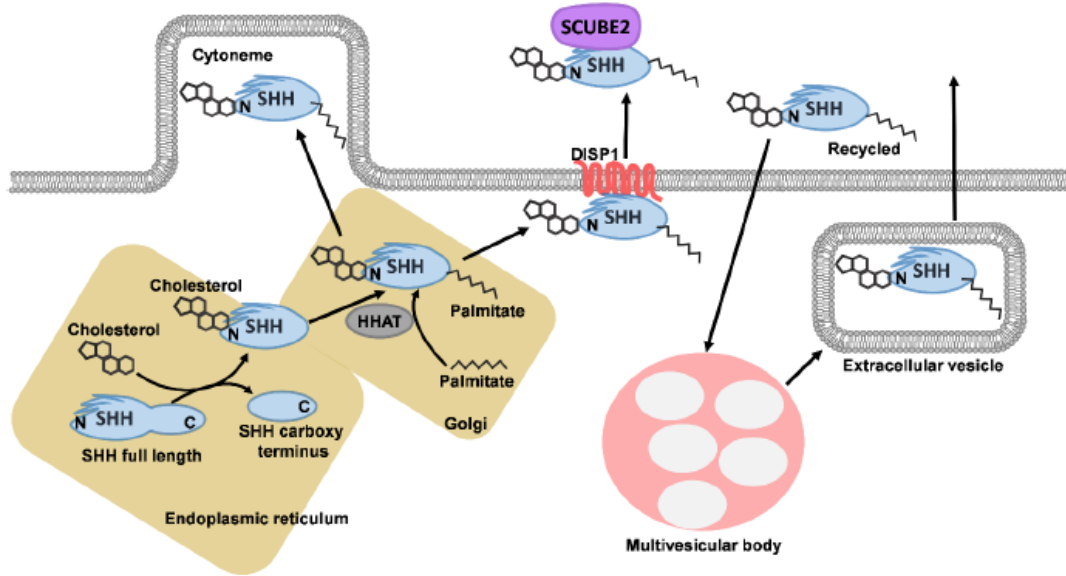


Şekil 13: Nodal sinyal yolunun şematik gösterimi (7). Gdf1 dahil homodimerik Nodal ailesi ligandlar, TGFb reseptör ailesinin dimerize üyeleri olan ActRIB ve ActRIIA/B ile birlikte Cripto/TDGF1 koreseptörüne bağlanır. Bu bağlantı, Smad2 ve Smad3'ü (Smad2/3) fosforile eder. Fosforlanmış Smad2/3, Smad4 ile nükleusa girer. Nükleusta FoxH1 gibi ek transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek hedef gen ekspresyonunu uyarır.

2.9.2. Hedgehog Sinyal Yolu

Hedgehog (HH) sinyal yolu, insan gelişimi sırasında hücre modellemesini, farklılaşmasını ve çoğalmasını kontrol eden ana yollardan biridir. Hedgehog (HH) sinyali, ventral ön beyin gelişimi için esastır (202). Bu yoldaki sinyalleşme normalde aktive edici ligandlar olarak hareket eden HH proteinleri tarafından başlatılır (203). HH ailesinin proteinleri, aktif sinyal moleküllerine dönüşmeden önce kapsamlı posttranslasyonel modifikasyona uğrarlar. Çözünmeyen ve inaktif öncü molekül, otokatalitik olarak bölünür ve iki kovalent lipid modifikasyonuna uğrar. İlk olarak, N-terminaline bir kolesterol, ardından C-terminaline bir palmitat eklenir, bu da lipidlerin birleşmesine ve hücre yüzeyine taşınmasına izin verir (204, 205). Her iki lipid modifikasyonundaki bozukluklar, insanlarda (DHCR7'daki mutasyonlar) veya farelerde (palmitoilasyon için gerekli Hedgehog asiltransferazda (Hhat) fonksiyon kaybı) HPE ile ilişkilendirilmiştir (206, 207) Ayrıca SHH'deki kolesterol parçasının eksikliği, ektopik

SHH sinyaline yol açarak doğru ön beyin gelişimini bozar (208). Şekil 14'te SHH üretimi, modifikasyonları ve salgılanması gösterilmiştir.



Şekil 14: SHH üretimi ve salgılanması (203). SHH polipeptitleri, endoplazmik retikuluma ve golgi'ye taşınır ve buralarda sinyal verme işlevine sahip amino-terminal alanı ve otomatik işlem düzenlemesi işlevine sahip karboksil-terminal alanı olarak bölünürler. Amino-terminal uç HHAT tarafından palmitat ile modifiye edilirken, karboksil-terminal uç ise kolesterol ile modifiye edilir. SHH'nin aktif kısmı, bir sitoneme taşınır veya DISP1'e bağlanır. Halihazırda salgılanmış olan SHH, hücreye geri dönebilir ve salgılanmak üzere hücre dışı veziküller halinde paketlenilecekleri mikroveziküler cisimlere taşınabilir.

Bu modifikasyonlardan sonra aktif olan multimerik HH proteini, hücre zarında lipit ile sabitlenir ve hücre dışına salınması için gönderilen transmembran proteinine *Dispatched1*'e (*DISP1*) ihtiyaç duyar. HH reseptörü *Patched* (*PTCH*), *Smoothened* (*SMO*) inhibitörü olarak işlev görür. HH'nin *PTCH*'ye bağlanması *SMO*'yu serbest bırakır ve *SMO* sinyal hücre içinde iletilebilir. SHH'deki kolesterol parçasının eksikliği, ektopik SHH sinyaline yol açar ve bu da doğru ön beyin gelişimini bozar (209).

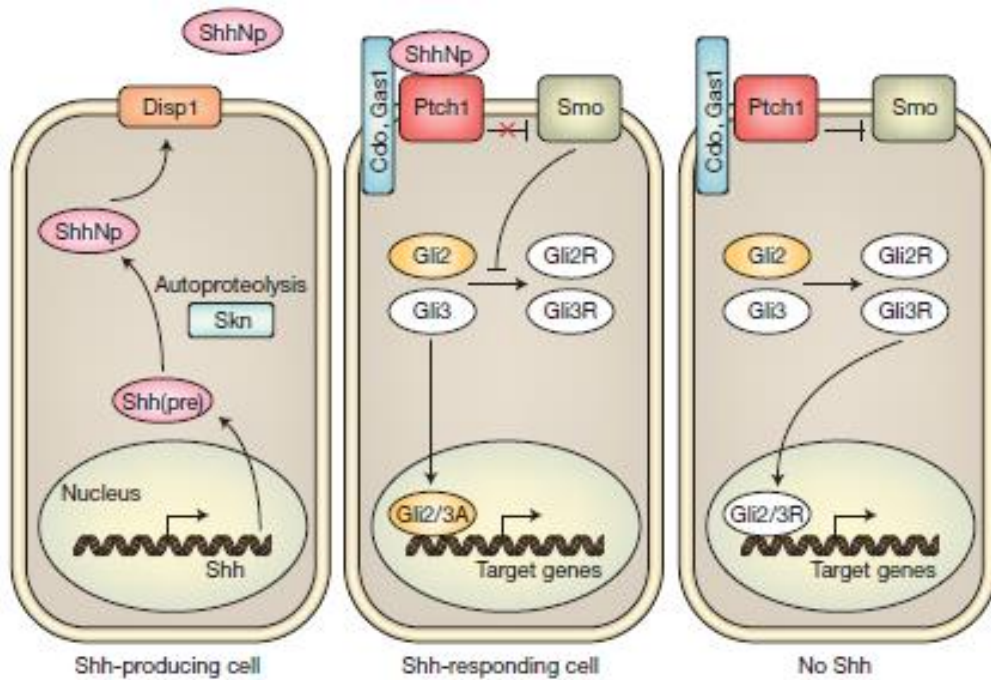
Farelerde *Disp1* kaybının, siklopi dahil olmak üzere HPE'ye yol açtığı gösterilmiştir. Benzer bir fenotip, *Smo* eksikliği olan farelerde de görülür. Oysa *Ptch* eksikliği olan farelerde, yapısal bir HH yolunun sürekli aktivasyonu ve *Shh* ifade alanının dorsal genişlemesi görülür (210, 211).

HH sinyal yolağı oldukça karmaşıktır ve işlevsel primer siliya gerektiren kanonik bir yolak ve modifiye ediciler ve ortak reseptörler içeren kanonik olmayan yolları mevcuttur. Kanonik HH sinyal yolu, glioblastoma gen ürünleri (*glioblastoma gene products*, *GLI*) ailesi transkripsiyon faktörleri (*GLI1*, *GLI2* ve *GLI3*) aracılığıyla gerçekleşir. Bu faktörler

Drosophila cubitus interruptus'un ortologlarıdır ve transkripsiyonel aktivatör veya baskılayıcı olarak hareket ederler. Kanonik olmayan GLI'den bağımsız sinyal yolları da mevcuttur (212). Gli2 kaybı, HH'ye bağımlı transkripsiyon yanıtın çoğundan sorumlu gibi düşünülmektedir. Erken beyin ve omurilik gelişim kusurları olan fare ve HPE vakalarında GLI2'de çeşitli mutasyonlar bildirilmiştir (167, 213, 214).

Gli3 eksikliği, HH'nin yokluğunda transkripsiyonu bir baskılayıcısı olarak proteolitik süreçle işlenir, böylece HH yolu antagonisti olarak hareket eder. Bu ventralize bir ön beyin ve ekzensefaliye yol açar. Tgif1 ve Tgif2 homologue eksikliği olan farelerde Gli3'te bir artış gözlenir ve bu da Shh kaybına benzer özelliklere sahip HPE ile sonuçlanır (215).

PTCH1 ile birlikte çalışan ve koreseptör olarak işlev görebilen CDO, BOC ve GAS1, HH bağlanma proteinleri olarak bu yolda işlev görür. Bu proteinlerin kaybı, genetik arka plana bağlı olarak HH sinyalinin azalmasına ve değişken şiddette HPE'ye yol açar (216, 217, 218). Shh haployetersiz farelere (Gas1^{-/-}; Shh^{+/-} ve Cdo^{-/-}; Shh^{+/-}) yapılan çaprazlamalar, bu moleküller arasında genetik bir etkileşim olduğunu ve SHH ligandının miktarının ve konumunun ventral ön beyin modellemesi için önemli olduğu göstermektedir (219, 220).



Şekil 15: Sonic hedgehog sinyal yolunun şematik gösterimi (7). Sonic hedgehog, öncül (pre) olarak üretilir ve Skinny hedgehog (Skn) tarafından katalizlenen otokatalitik proteoliz, kolesterol ekleme ve palmitasyon ile olgunlaşan sinyal molekülü ShhNp'ye dönüşür. ShhNp, Disp1 aracılığıyla üretilen hücrelerden salınır. ShhNp'ye maruz kalmayan hücrelerde (sağ hücre), Ptch1, Smo aktivitesini inhibe eder ve sinyalizasyonu bloke eder. Transkripsiyon faktörleri Gli2 ve Gli3, reseptör formlarına

(Gli2R ve Gli3R) proteolitik olarak işlenir ve nukleusa taşınır. Yol hedef genlerini baskılar. ShhNp'nin Ptch1'e bağlanması muhtemelen Gas1 veya Cdo ile birlikte, Smo'nun inhibisyonunu azaltır; Smo aracılı sinyalleme, doğrudan veya aktivatör formları (Gli2A ve Gli3A) üretmek için ek adımlar yoluyla çekirdeğe yer değiştirebilen ve yol hedef genlerini aktive edebilen Gli faktörlerinin işlenmesini önler.

2.9.3. Retinoid Sinyal Yolu

TGIF, üç amino asitli döngü uzantısı (*three-amino-acid loop extension*, TALE) homeodomain proteinlerinin üst ailesinin bir üyesidir. TGIF, fare hücresel retinol bağlayıcı protein II (*cellular retinol binding protein*, CrbpII) geninden bir retinoid tepki elemanına (*retinoid response element*, RXRE) bitişik bağlanma kabiliyeti sayesinde izole edilmiştir. Fonsiyonel analizler TGIF'in CtBP, mSin3 ve histon deasetilazlar dahil olmak üzere genel koruyucu proteinlerle etkileşime giren bir transkripsiyonel baskılayıcı olduğunu göstermiştir. TGIF, hem transforme edici büyüme faktörü beta (*transforming growth factor beta*, TGF-beta) yolunun koruyucu baskılayıcısı hem de retinoik asit yolunun bir rakibi olarak işlev görmektedir. TG-etkileşimli faktör (*TG-interacting factor*, TGIF) genindeki haployetersizlikler, daha önce HPE olgularında tanımlanmıştır (83).

Retinoik asit, retinoid X reseptörleri (*retinoid X receptors*, RXRs) adlı reseptör ailesi üyelerine bağlanır. RXR'leri sadece 9-cis retinoik aside bağlanırken, retinoik asit reseptörleri (*retinoic acid receptors*, RARs) çeşitli retinoik asit formlarına bağlanır. Retinoik asidin RAR veya RXR'ye bağlanması, reseptörlerde bir konformasyonel değişikliğe neden olur ve bu da yardımcı aktivatör ve yardımcı baskılayıcı etkileşimleri arasındaki dengeyi değiştirerek hedef gen ekspresyonunun baskılanmasından aktivasyonuna geçiş yapılmasını sağlar.

TGIF'in bu spesifik RXRE'ye bağlanması, gen ekspresyonunun aktivasyonunu azaltmaktadır. TGF- β , hücre yüzeyindeki bir reseptör kompleksi ile bağlanır ve TGF- β sinyalleşmesinin hücre içi araçlarını Smad proteinlerini fosforile ederek aktive eder. Smad4 ile reseptör tarafından aktive edilen Smad'lar kompleksi, çekirdeğe girer ve doğrudan veya diğer faktörlerle etkileşim yoluyla DNA'ya bağlanır. TGIF, TGF- β ile aktive olan Smad'lar için bir transkripsiyonel çekirdek baskılayıcıdır (221).

Retinoik asit, yalnızca diyet yoluyla sağlanan A vitamininin aktif türevidir ve merkezi sinir sisteminin ön-arka modellenmesinde kritik bir rol oynar. Retinoik asit, A vitaminini biyolojik olarak aktif ana metabolit olan all-trans retinoik aside dönüştüren retinal dehidrojenazlar tarafından üretilir. All-trans retinoik asit, çekirdeğe hareket eder ve transkripsiyon faktörleri olarak hareket eden nükleer retinoik asit reseptörlerine bağlanır. Retinoik asit seviyeleri sıkı bir düzenleme altındadır. A vitamini her yerde bulunan alkol dehidrojenazlar tarafından hidrolize edilse de retinaldehit dehidrojenazlar tarafından katalize

edilen geri dönüşümsüz all-trans retinoik aside dönüşüm hız sınırlayıcı basamaktır. Aynı zamanda, sitokrom gibi retinoik asidi parçalayan enzimler P450 ailesi üyesi CYP26A1, retinoik asit seviyelerini sıkı bir şekilde kontrol eder. *TGIF* hem retinoik asit sentezini hem de yıkımını kontrol eden genlerin ifadesini düzenler (222).

2.9.4. Fibroblast Büyüme Faktörü Sinyali (*Fibroblast Growth Factor Signaling*)

Memelilerdeki Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ailesinin sinyal bileşeni 18 sekrete edilen protein ve dört sinyal tirozin kiraz FGF reseptörü (FGFR) ile etkileşir. Aktive olan FGFR'ler özgül tirozin kalıntıları fosforile ederek sitozolik adaptör proteinleri ve RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ ve STAT intraselüler sinyal yolları ile etkileşimini sağlar. FGF ailesinin üyeleri, embriyonik gelişimin erken aşamalarında ve organogenez sırasında; progenitör hücrelerin korunması, büyümesi, farklılaşması, hayatta kalması ve modellenmesini düzenlemede görev alır.

FGF8, FGF ailesinin bir üyesidir. FGF reseptörleri, çeşitli sinyal kaskadlarını, özellikle de anahtar transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açabilen Ras/Raf/Erk yoluyla MAP kinaz yolunu aktive edebilen reseptör tirozin kinazlardır (223). Farede *Fgf8*'deki azalma, azalan hücre proliferasyonu, artan hücre ölümü ve orta hat anomalileri nedeniyle gelişmekte olan ön beyin hipoplazisi ile sonuçlanır (224). *Fgf8*, dorsal sinyal merkezinde *Zic2* ekspresyonunu indükleyebilir. *ZIC2* ve *FGF8*'deki mutasyonlar insanlarda HPE'ye neden olabilir (225, 226, 227).

2.9.5. Kemik Morfogenetik Protein Sinyali (*Bone Morphogenetic Protein, BMP*)

BMP, TGF- β üst ailesinin üyeleridir ve gelişmekte olan telensefalonun mediyal-lateral ekseninin organizasyonunda yer alır ve morfolojik olarak tanımlanmış bir dorsal orta hattın oluşumu için gereklidir. BMP'ler, tip I serin-treonin kinaz reseptörleri [*Alk1*, *Alk2*, *Alk3* (*Bmpr1a*) veya *Alk6* (*Bmpr1b*)] ve tip II reseptörlerinden (*Bmpr2* veya *Bmpr2* veya *ActRII*) oluşan bir kompleks ile Nodal sinyale benzer bir sinyal oluşturur (228). Sinyalin iletimi, ya BMP'ye özgü SMAD1, 5 ve 8 efektör proteinler yoluyla ya da MAPK/PI3K/Akt.1 gibi BMP'ye özgü olmayan sinyal iletim yolları ile yapılır.

İn vivo BMP sinyal aktivitesi, yolun çeşitli seviyelerinde yüksek oranda düzenlenir. Hücre içi alanda SMAD1, BMP, WNT ve FGF sinyallerini entegre eden bir sinyal merkezi olarak hizmet ederken; hücre dışı alanda NOGGIN, CHORDIN, TWISTED GASTRULATION (TWSG1) veya GREMLIN gibi BMP bağlayıcı proteinler BMP aktivitesini kontrol eder (229, 230). BMP sinyalinin dozajı ve zamanlaması önemlidir. *Bmpr1a*: *Bmpr1b* çift mutant farelerde görülen BMP sinyalindeki azalma ya da *Chordin*/*Noggin* mutant farelerde veya *Noggin* mutant farelerde görüldüğü gibi sinyaldeki artış, ön beyin ve kraniofasial gelişimi etkileyebilir.

gösterilmiş kemik morfogenetik protein (BMP) yolu, genellikle dorsal orta hatta sinyal gösterilir ve interhemisferik (MIH) HPE'de etkilidir.

2.10. Holoprosensefalinin Moleküler Genetiği

Çoğu araştırma, HPE'nin en az 13 farklı otozomal dominant lokustan herhangi birinin genetik kaybından veya mutasyonel işlev bozukluğundan kaynaklandığını düşünmektedir. Bu lokusların varlığına ve konumuna ilişkin ilk ipucu, kritik kromozomal bölgelerin kaybı veya kazanımıyla sonuçlanan sitogenetik değişikliklere sahip HPE hastalarının sistematik olarak toplanmasından elde edildi (237). Bu sitogenetik yeniden düzenlemeler tarafından tanımlanan kritik bölgelerin, 7q36'da *SHH*, 2p21'de *SIX3*, 13q32'de *ZIC2* ve 18p11.3'te *TGIF* yeni mutasyonlar için anahtar bölgeler olarak gösterildi. Bu dört gen şimdiye kadar, tespit edilen yüzlerce ailede HPE duyarlılığına neden olan yeni mutasyonların hedefi olmuştur (2, 237).

İncelenen tüm etnik popülasyonlardan olası HPE vakalarının en az %25'inde bir genetik sürücü mutasyon (veya delesyon) tanımlanabilir. En yaygın mutasyonlar, az sayıda anahtar rol oynayan *ZIC2*, *SHH*, *SIX3*, *FGFR1* ve/veya *FGF8* genleri arasındadır. Daha az yaygın olarak dahil edilen genler, HPE ile ilişki düzeyi genellikle sorgulanan *PTCH1*, *TGIF1*, *DLL1* ve *STIL* genleridir. Bu liste daha da uzatılabilir ve önemli sayıda vaka ile iyi tanımlanmış sendromik formlar; belirli *FGFR1* varyantları veya fonksiyon kaybı *GLI2* mutasyonları bu listede yer alabilir (162, 190).

2022'de Drissi ve arkadaşları akraba olmayan iki farklı ailde homozigot *PLCH1* geninde varyant tanımlamıştır. Bu çalışmada birinci ailede iki kardeşle konjenital hidrosefali, belirgin gelişimsel gecikme, monoventrikül ve kaynaşmış talamus; ikinci ailede iki kardeşle alobar HPE ve siklopi tanımlanmıştır. İnsan embriyo immünohistokimyası, *PLCH1*'in notokordda, gelişen omurilikte, dorsal kök gangliyonlarında, serebellumda ve dermatomiyozomda, *SHH* üreten veya buna yanıt veren tüm dokularda eksprese edildiğini göstermiştir. Bu çalışma verileri, *PLCH1*'in doğum öncesi memeli nörogelişiminde bir rolü olduğu ve patojenik varyantların klinik olarak değişken otozomal resesif kalıtım modeline sahip bir HPE spektrum fenotipine neden olduğunu göstermiştir. Bu gen ile ilişkili fenotipler HPE 14 (MIM#619895) olarak tanımlanarak literatüre girmiştir (238).

De Franco ve arkadaşları akraba olmayan 3 farklı ailde pankreas agenezi ve HPE anormal ön beyin gelişimi olan 3 olguda *CNOT1* heterozigot de novo varyant tanımlamıştır. *CNOT1*, embriyonik kök hücrelerin pluripotent bir durumda tutulması için kritik olduğu öne sürülen bir transkripsiyonel baskılayıcıdır. Bu bulgular, *CNOT1*'in pankreas ve nörolojik gelişimde kritik bir rol oynadığını ve pankreatik agenezi ve holoprosensefalinin yeni bir genetik

sendromunu tanımladığını göstermiştir (239). Kruszka ve arkadaşları akraba olmayan semilobar HPE saptanan 2 farklı olguda *CNOT1* geninde heterozigot de novo varyant tanımlamıştır. Aynı çalışmada fare embriyolarının in situ hibridizasyon analizlerinde, Cnotl'in ön beyin bölünmesi için kritik dönem boyunca prosensefalik nöral kıvrımlarda eksprese edildiğini göstermiş ve böylece insan ve fare verileri birleştirilerek, CNOT1'in eksik ön beyin bölünmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (240). Bu veriler ışığında *CNOT1* genindeki mono-allelilik patojenik varyantlar Pankreatik agenezinin eşlik ettiği veya eşlik etmediği, Holoprosensefali 12 (#MIM 618500) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir.

Kruszka ve arkadaşları X'e bağlı kohezin kompleksi geni STAG2 varyantlarla ilişkili HPE fenotipini, 6 olguda bildirmiştir. Bu olgulardan dördünün fenotipleri, HPE'nin en şiddetli formları olan siklopili alobar HPE, siklopolisiz alobar ve semilobar HPE olarak tariflenmiştir. Diğer iki olgudaysa daha hafif HPE formları; orta hat yarıklanması, hipotelorizm ve beyin anomalileri olmaksızın çökük burun köprüsü ile karakterize edilen mikroform HPE ve optik sinir hipoplazisi ve hafif derecede nörohipofizin anormal MRG bulgularıyla septo-optik displazi tipi HPE şeklinde sınıflandırılmıştır. Tüm mount in situ hibridizasyonu (*Whole-mount in situ hybridization*) kullanarak, STAG2 ve SMC1A'nın, farede birincil nörolasyon sırasında prosensefalik nöral kıvrımlarda eksprese edildiğini, ön beyin morfogenez ve holoprosensefali patogenezi ile tutarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca STAG2 ve SMC1A'nın shRNA yıkımının, insan nöral kök hücrelerinde HPE ile ilişkili genler ZIC2, GLI2, SMAD3 ve FGFR1'in anormal ifadesine neden olduğu ve bu bulgular ışığında kohesin kompleksinin holoprosensefalide medyan ön beyin gelişiminin ve X'e bağlı kalıtım modellerinin önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (241). Bu bilgiler ışığında STAG2 genindeki heterozigot patojenik varyantlar X'e bağlı HPE 13 (#MIM 301043) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir.

HPE'de değişken ekspresyon, klasik HPE'nin göze çarpan bir özelliği olmasına rağmen, sendromik formlardaki bulguların paterni tipik olarak çok daha tutarlıdır ve doğrudan spesifik gen testine yol açabilir. Değişken ekspresyonun temeli büyük ölçüde bilinmemektedir, ancak genetik veya çevresel değiştiriciler tarafından değiştirilen genetik duyarlılıklarla ilgili olduğundan şüphelenilmektedir. HPE ayrıca eksik penetrasyon ve geniş aile içi değişkenlik gösterir. Bu değişken ifade en iyi şekilde, ortak bir modifiye edici genetik veya çevresel faktörle birleştirilmiş bir otozomal dominant sürücü mutasyon tarafından modellenir. Çoklu vuruş (*multiple hit*) hipotezinin (iki veya daha fazla sürücü mutasyon) örnekleri son derece nadirdir (157, 242). Gerçek digenik kalıtım (genellikle her bir ebeveynden gelen iki eşik altı mutasyon arasındaki sinerji) nadiren tespit edilir. Yeni nesil dizileme, artık daha iyi anlaşılan HPE sürücü genleri kümesi arasındaki potansiyel genetik değiştiricilerin envanterini çıkarmaya başlamayı

ve bu modellerin her birini ampirik bir teste tabi tutmayı mümkün kılıyor (190). Tablo 8’de HPE lokusları ve bunlarla ilişkili genlerin özeti görülmektedir.

Tablo 8: HPE lokuslarının ve bunlarla ilişkili genlerin özeti (194, 239, 240, 241).

MIM #	Kromozomal bölge	Gen	Şu anki durum	Yorum
236100	Chr21q22.3 (HPE1)	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
157170	Chr2p21 (HPE2)	SIX3	Aktif (Major gen)	De novo ya da tercihli olarak kalıtılır
142945	Chr7q36.3 (HPE3)	SHH	Aktif (Major gen)	De novo ya da tercihli olarak kalıtılır
142946	Chr18p11.31 (HPE4)	TGIF1	Aktif (Minor gen)	De novo ya da tercihli olarak kalıtılır
609637	Chr13q32.3 (HPE5)	ZIC2	Aktif (Major gen)	De novo ya da tercihli olarak kalıtılır
605934	Chr2q37.1-q37.3 delesyon sendromu	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
610828	Chr9q22.3 (HPE7)	PTCH1	Muhtemel modifiye edici	Aynı şekilde kalıtılır veya kalıtılmaz
610829	Chr2q14.2 (HPE9)	GLI2	Sendromik HPE	Culler–Jones sendromu
615465	Chr8p11.23	FGFR1 (FGF8)	Sendromik HPE	Hartsfield sendromu
612702	Chr10q24.32	FGF8	Sendromik IHH; HPE	Kallmann sendromu
612530	Chr1q42 delesyon sendromu (HPE10)	DISP1	Muhtemel modifiye edici	Aynı şekilde kalıtılır veya kalıtılmaz
608707	Chr11q24.2(HPE11)	CDON	Aktif (Minor gen)	Nadir, tercihli olarak kalıtılır
618500	Chr16q21(HPE12)	CNOT1	Aktif (Minor gen)	De novo
301043	ChrXq25(X'e bağlı HPE 13)	STAG2	Aktif (Minor gen)	De novo
619895	Chr3q25.31(HPE14)	PLCH1	Aktif (Minor gen)	OR kalıtım

608708	Chr3	BOC	Muhtemel modifiye edici	Aynı şekilde kalıtılır veya kalıtılmaz
606582	Chr6q27	DLL1	Nadir potansiyel sürücü	Nadir. Aynı şekilde kalıtılır veya kalıtılmaz
181590	Chr1p33	STIL	Nadir OR primer mikrosefali 7	Çok nadir. Akrabalık olan ailelerde görülür

Kromozomal ve sendromik olmayan HPE, klasik olarak eksik penetrasyon ve oldukça değişken ekspresyona sahip otozomal dominant bir durum olarak kabul edilir. Tek bir mutasyonun etkilerinin tek bir akraba içinde bile geniş spektrumunu açıklamaya çalışan çalışmalar hala beklemededir, ancak hayvan modellerinden yapılan tahminler de dahil olmak üzere birçok analiz hattı, etkileşim halindeki çoklu genetik ve çevresel faktörleri birleştiren karmaşık bir kalıtım modeline işaret etmektedir (194, 195). Bir mutasyonun tanımlanması henüz klinik sonucun tahminini yapmaya izin vermez. HPE spektrumu bozukluklarının moleküler temellerine ilişkin bilgi birikimimiz, fonksiyonel analizlerin de dahil edildiği çalışmalar ile HPE ilişkili genlerdeki değişikliklerin biyolojik etkilerinin aydınlatılması ile mümkün olacaktır. Bu spektrumu daha iyi anlamak indeks ve aile üyelerini içeren detaylı tanısal yaklaşımlarla sağlanabilir. Burada ayrıntılı aile öyküsü, HPE spektrumunun bir parçası olabilecek özelliklerin ailede dikkatli muayenesi hem ebeveynleri hem de diğer aile üyelerini içeren moleküler analizler, nörogörüntüleme ve nöropsikiyatrik değerlendirme verilerin doğru değerlendirilmesi ile doğru yaklaşımlar tanımlanacaktır.

2.11. Holoprozensefalide Çoklu Vuruş ve Digenik Kalıtım

İnsan kalıtsal hastalıklarının moleküler genetik temellerinin belirlenmesinde son yirmi yılda muazzam ilerlemeler kaydedilmiştir. Çok sayıda gendeki varyantlar, spesifik klinik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmaların çoğu, Mendel kalıtımını gösteren bozukluklarla ilişkili genlerin aydınlatılmasına odaklanmıştır. Mendel kalıtımı olan bozukluklar, tanımları gereği "tek gen" bozukluklarıdır. Bununla birlikte, bu Mendel koşullarının çoğu için, genotip-fenotip korelasyonlarının belirsiz olduğu kanıtlanmıştır (243, 244).

Digenik kalıtım (DI) genetik olarak karmaşık hastalıklar için önerilmiş bir kalıtım şeklidir. Tek genlerdeki mutasyonların insan hastalıklarına neden olduğuna dair binlerce raporun aksine, bazı soyağaçlarında digenik kalıtıma dair kanıt bulunan düzinelerce insan hastalığı fenotipi vardır. Son on yılda yeni nesil dizileme teknolojilerinin ortaya çıkışı, kaçınılmaz olarak daha önce bulamayacağımız, fenotip için önemi veya etkisi olabilecek veya

olmayabilecek varyantların bulunmasına yol açtı. Semptomları tanımlamak ve tanıyı doğrulamak için bir değil iki veya daha fazla DNA varyantını dahil ettiğimizde işler daha karmaşık hale gelir; digenik kalıtım ve genomik düzenleyicilerin devreye girdiği yer burasıdır (245).

Bir insan hastalığında ilk digenik kalıtım raporu 1994 yılında retinitis pigmentosa içindi (246). Bu rapor inandırıcıydı çünkü birden çok soy ağacından veri içeriyordu ve iki genin protein ürünleri bilinen bir etkileşime sahipti. 1994'ten sonra, 2001'e kadar bir miktar ek DI ilişkili çalışma yayınlanmıştır. Bardet-Biedl sendromu, sağırılık ve diğer başka fenotiplerde DI raporları bildirilmiştir (247, 248).

Tek genli otozomal dominant bir hastalık olarak görünmesine rağmen, HPE'nin aslında çok faktörlü bir durum olduğunu ve herhangi bir bireyde ortaya çıkan fenotipin, çoklu genetik ve çevresel etkilerin kümülatif sonucu olduğunu varsayan çalışmalar mevcuttur. 2002'de Ming ve arkadaşlarının çalışmasında şiddetli fenotip için çoklu genetik değişikliklerin ve/veya doğum öncesi teratojen maruziyetinin gerekli olduğu; yalnızca bir anormal genin kalıtımının, hafif bir belirtiye veya hiçbir klinik anormalliğe yol açmayabileceği tartışılmıştır (157). Bazı fare mutasyonları, HPE'nin iki farklı genin mutasyonlarının eş zamanlı oluşumundan kaynaklanabileceğini göstermektedir. İki genin her ikisi de mutant olan fareler HPE gösterebilirken, sadece bir genin etkilediği bir fare genellikle normal görünür ve HPE göstermez. Örneğin, nodal +/-; HNF3b +/- ve Otx2 +/-; HNF3b +/- ikili heterozigotlar siklopi ve HPE gösterir (249, 250). Siklopi ve ön kafa yapılarının küçülmesi bir Smad2 +/-; nodal +/- ikili heterozigotunda ve bir ActRIIA (aktivin reseptörü II)-/-; nodal +/- ikili mutanında mevcuttu (251, 252). Ayrıca, Noggin +/-; Chordin +/- ve Noggin +/-; Chordin/- ikili mutanlar HPE ile uyumlu bozukluklar gösterir (231, 253). Genel olarak, bu veriler fare modellerinde digenik miras yoluyla HPE'nin oluşabileceğini göstermektedir.

Otozomal dominant HPE'nin fenotipik spektrumu oldukça değişkendir ve herhangi bir bireyin fenotipinin, o kişide bulunan HPE gen mutasyonlarının sayısına ve türüne bağlı olduğunu varsayan yayınlar mevcuttur. Nanni ve arkadaşlarının 1999'daki çalışmasındaki hem *SHH* geninde hem de ikinci bir HPE geninde varyantı olan hasta tanımlanmıştır. Bu HPE'li hasta, *TGIF* geni dahil olmak üzere 18p11 delesyonuna ve *SHH* geninde de bir mutasyona sahipti. Bu olgunun fenotipik olarak normal olan annesi aynı *SHH* mutasyonuna sahiptir ancak 18p, t(1;18)(q43;p11.3) içeren dengeli bir translokasyon taşımaktadır. Böylece, annenin iki *TGIF* kopyası vardır, ancak kızın yalnızca tek bir aleli vardır (254). HPE'li diğer bir hastada hem *TGIF* hem de *SHH* genlerinde bir mutasyon tanımlanmıştır. Bu olgunun klinik olarak normal annesinde *SHH* mutasyonu varken iki normal *TGIF* aleli saptanmıştır. Ancak bu

olgunun babasıyla ilgili veri yoktur (157, 254). HPE'li üçüncü bir hastada ise hem *ZIC2* hem de *SHH* genlerinde mutasyon saptanmıştır. Bu olgunun aile çalışması yoktur. Bu hastaların iki HPE geninde mutasyonlara sahip olması gerçeği, iki mutasyonun tek başına tek mutasyona göre daha ciddi bir fenotipe yol açacak şekilde birleşmesi olasılığını destekleyici niteliktedir. Ayrıca bu test için uygun olan klinik olarak normal ebeveynlerin mutasyonlardan yalnızca birini taşıdığı bulgusu da digenik kalıtımı destekler niteliktedir (157, 254).

Hem *SHH* hem de *TGIF* mutasyonları olan iki vaka; *SHH* ve *ZIC2*; *PTCH1* ve *GLI2* mutasyonları olan birer HPE vakaları daha önce tanımlanmıştır. Örnek sayısı literatürde az olmasına rağmen, digenik kalıtımın HPE ile sonuçlanabileceği, buna karşın tek haplo yetmezliğinin yetersiz olabileceği öngörülmektedir (7, 254, 255). Çok sayıda HPE ile ilişkili gen olması ve bugüne kadar HPE'li hastaların yalnızca %20'sinde bu genlerde mutasyonların tanımlanmış olduğu gerçeği göz önüne alındığında HPE genetiği ile ilgili spekülasyonların yapılması doğaldır. HPE'li bazı hastalarda iki mutasyonun tespit edildiği bulgusu, *SHH* için doz duyarlılığının insanlar ve fareler arasında neden farklı görüldüğüne dair fikir verebilir. Yani, *Shh* mutant homozigot fare, HPE ve siklopi özelliklerine sahiptir ve genellikle embriyonik gelişim sırasında ölürken, heterozigot fare normal görünür. Bu, *SHH* için haployetersizliğinin HPE ile ilişkili olduğu insanların aksinedir. Bu, *SHH*'nin iki mutasyona uğramış aleline sahip insanların erken gebelikten sonra hayatta kalma ihtimalinin düşük olduğu ve incelenen hastaların neredeyse tamamının canlı doğmuş bebekler olduğu gerçeğini yansıtır olabilir. Bir *SHH* mutasyonu için heterozigot olan ve HPE genlerinde başka hiçbir genetik anormallik olmayan hastalarda HPE kliniğinin olmayacağını ve HPE'li hastaların ayrıca farklı bir gende ikinci bir mutasyona sahip olduğunu varsayan literatürler de mevcuttur (157, 202).

3.MATERYAL-METOD

3.1.Olgu Grubu ve Klinik Değerlendirme

Bu çalışma, 2011-2021 yılları arasında prenatal USG'de HPE saptanarak IUMF veya tıbbi termine edilen ve İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğinde postmortem değerlendirilen; daha önce Tıbbi Genetik AD polikliniğinde hazırlanmış klinik dosyalarının değerlendirilmesi ve saklanmış DNA örnekleri ile yürütüldü.

Olguların Tıbbi Genetik Anabilim Dalına ait hasta dosya bilgileri; öykü, üç kuşak aile ağacı, laboratuvar- muayene bulguları, fotoğrafları, mevcut ise otopsi verileri ve ek tetkikleri ile klinik olarak değerlendirildi. Olgu seçim kriterleri arasında antenatal dönemde HPE saptanmış olması, normal karyotip saptanması, ileri incelemeler için olgulara ait prenatal veya postmortem süreçte alınan fetal doku örneklerinden DNA'sının izole edilerek bankalanmış

olması, ailelerin etkilenmiş fetuslarında gerekli moleküler genetik incelemeye onam vermiş olması yer alır. Tez kapsamında 10 olgu çalışmaya dahil edilerek TED yöntemi ile ‘solo’ analiz gerçekleştirilmiş; beklenen kalıtım modeline ve yolak genlerine uygun biyoinformatik yaklaşımlarla genetik etiyoloji araştırılmıştır.

Aile içi segregasyon analizi için olguların aile üyelerinden alınan periferik kan örneğinden elde edilen DNA örneği kullanılmıştır.

3.2.Moleküler Yöntemler

3.2.1. DNA izolasyonu ve DNA kalitesinin değerlendirilmesi

2011-2021 yılları arasında prenatal invazif girişimler (CVS, AS, KS, kardiyosentez) veya postmortem fetal deriden izole edilen DNA özgün kitler (*DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Roche11667327001/Magnapure Large Volume KIT, Roche03730972001 ve EZ1 DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, Qiagen 951054*) ile firma protokollerine uygun şekilde izole edildi ve bankalanan DNA örnekleri -20°C’de saklandı.

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

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait genomik DNA’ların izolasyonunun ardından, her biri için Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c cihazı aracılığıyla spektrofometrik olarak yoğunluk (ng/μl) ve saflık derecesi ölçülerek gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarına göre DNA konsantrasyonlarının gerekli olan >50 ng/μl üzerinde ve A260/A280 oranlarının da 1,8-2,0 arasında olduğu tespit edildi. DNA örnekleri, YND ve PZR işlemleri gerçekleştirilinceye kadar -20°C’de saklandı.

3.2.2. Tüm ekzom dizileme

10 olgudan elde edilen genomik DNA’ların kaliteleri değerlendirilip yeni nesil dizileme işlemleri için uygun oldukları tespit edildikten sonra materyaller tüm ekzom dizileme ıslak laboratuvar çalışmaları için hizmet alımı kapsamında Genetiks Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi ve Laboratuvarlarına gönderildi.

Hizmet alımı kapsamında Genetiks Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi ve Laboratuvarlarında yapılan ıslak laboratuvar çalışmaları kapsamında; dizileme öncesi kütüphane hazırlanması basamağında insan genomunun 37Mb büyüklüğündeki ekzonik bölgelerini hedef alan Qiagen firmasına ait QIAseq Human Exome Kiti kullanıldı. Dizileme işlemi Illumina Novaseq 6000 cihazı ile akabinde bcl’den fastq dönüşümü, kalite değerlendirmeleri, referans genoma haritalama, düşük kalitedeki okuma ve varyantların

filtrelenmesi ve vcf dosyası oluşturma Qiagen CLC Genomics Workbench 12.0.3 üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Islak laboratuvar çalışmaları

YND tekniğiyle genomik DNA'yı dizilemek üzere, QIAseq FX DNA Library Kit kullanılarak ekzom kütüphaneleri hazırlandı.

Fragmantasyon, Uç onarımı ve A-ekleme

50 ng giriş DNA'sı su, 10 mM Tris, Buffer EB içinde hazırlandı. Hazırlanan örnek buz üzerinde eritildi. Bu örnekler, önce vortekslenip kısaca santrifüj edildi ve Tablo 9'da gösterilen termal döngü koşullarında inkübe edildi.

Tablo 9: Parçalanma, son-onarım ve A-ekleme termal döngü koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre
1	4°C	1
2	32°C	22
3	65°C	30
4	4°C	-

Termal döngü bloğu 4°C'ye ulaştığında program duraklatıldı. FX reaksiyon karışımı Tablo 10'da gösterildiği şekilde buz üzerinde bir PCR tüpünde hazırlandı. Her reaksiyona 10 µl FX enzim karışımı 6-8 kez aşağı yukarı pipetlenerek iyice karıştırılarak eklendi. PCR tüpleri kısaca santrifüje edildi ve hemen önceden soğutulmuş termal döngü cihazına (4°C) aktararak döngü programına devam edildi. Termal döngüleyici programı tamamlandığında ve numune bloğu 4°C'ye döndüğünde numuneler çıkarıldı ve buzun üzerine konularak adaptör ligasyon aşamasına geçildi.

Tablo 10: Numune başına FX reaksiyon karışımı.

İçerik	Hacim(µl)
FX tampon, 10x	5
Saflaştırılmış DNA (50 ng)	Değişken
Nükleaz içermeyen su	Değişken
FX Enzim miksi olmadan toplam	40

Adaptörlerin Ligasyonu

Örnek başına ligasyon miksi Tablo 11’de gösterildiği gibi ayrı bir PCR tüpünde buz üzerinde hazırlandı. Toplam 100 µl için her numuneye 45 µl ligasyon miksi eklendi ve ligasyon reaksiyonu için 20°C’de 15 dakika inkübe edildi.

Tablo 11: Örnek başına ligasyon miksi.

Bileşen	Hacim(µl)
DNA Ligase Buffer, 5x	20
DNA ligase	10
Nükleaz içermeyen su	15
Total	45

Sonrasında 0,8x (80 µl) Agencourt AMPure XP boncukları kullanarak adaptör ligasyon temizliğine geçildi ve her numuneye 80 µl yeniden süspanse edilmiş Agencourt AMPure XP boncuk eklendi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Boncuklar manyetik bir stand üzerinde 2 dakika boyunca peletlendi ardından süpernatantı dikkatlice alınıp atıldı. Boncuklar 200 µl %80 etanol eklenerek yıkanıp tekrar manyetik stand üzerinde pelletlenip süpernatantı atıldı. Bu etanol yıkaması 1 kez daha tekrarlandı. Boncuklar manyetik stand üzerinde 5-10 dakika boncuklar kuruyana kadar inkübe edildi. Ürün manyetik standdan alınarak 52.5 µl Buffer EB, pH 8.0 içinde yeniden süspanse edilerek elute edildi. Boncuklar pelletlendi ve 50 µl süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Yeniden süspanse edilmiş Agencourt AMPure XP boncuklarından 1,0x (50µl) eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip boncuklar manyetik bir stand üzerinde 2 dakika boyunca peletlenerek, süpernatantı dikkatlice atıldı. Boncuklar 200 µl %80 etanol eklenerek tekrar yıkandı ve manyetik stand üzerinde pelletlenip süpernatantı atıldı. Bu etanol ile yıkama işlemi birkez daha tekrarlandı. Sonrasında mümkün olduğunca fazla etanol uzaklaştırıp boncuklar manyetik stand üzerinde 5-10 dakika boncuklar kuruyana kadar inkübe edildi. Manyetik standdan alınan örnekler 26 µl Buffer EB içinde yeniden süspanse ederek elute edildi. Boncuklar peletlenip kütüphane amplifikasyonu için 23,5 µl saflaştırılmış DNA örneği dikkatlice yeni bir PCR tüpüne aktarıldı.

Kütüphane Amplifikasyonu

QIAseq HiFi PCR Master Mix ve Primer Mix buz üzerinde çözündürüldükten sonra lokal konsantrasyonları önlemek için hızlı vorteksleme ile iyice karıştırıldı. Buz üzerinde Tablo 12’de gösterildiği şekilde reaksiyon karışımı bir PCR tüpünde hazırlanarak Tablo 13’teki termal döngü koşullarında PZR gerçekleştirildi.

Tablo12: Kütüphane zenginleştirme reaksiyon miksi.

Bileşen	Hacim (µl)
QIAseq HiFi PCR Master Miks 2x	25
Primer Miksi (her biri 10 µM)	1.5
Kütüphane DNA'sı	23.5
Total reaksiyon hacmi	50

Tablo 13: Kütüphane amplifikasyon döngü koşulları.

Zaman	Sıcaklık	Döngü sayısı
2 dakika	98°C	1
30 saniye	60°C	7
1 dakika	72°C	1
∞	14°C	Tutun

PZR tamamlandıktan sonra, her bir tüpe 50 µl yeniden süspansiyon edilmiş Agencourt AMPure XP boncuk karıştırmak için iyice yukarı aşağı pipetlenerek eklendi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Boncuklar manyetik bir stand üzerinde pelletlenip süpernatantı dikkatlice atıldı. Boncuklar 200 µl %80 etanol ekleyerek yıkandı ve boncuklar manyetik stand üzerinde pelletlenerek süpernatant atıldı. Toplamda 2 kez bu etanol yıkaması tekrarlandı ve mümkün olduğunca fazla etanol uzaklaştırıldı. Manyetik stand üzerinde 5-10 dakika boncuklar kuruyana kadar inkübe edildi. Manyetik standdan çıkarılan ürünler 25 µl Buffer EB içinde yeniden süspansiyon ederek elute edildi. Boncuklar manyetik stand üzerinde pelletlenip süpernatantın 23 µl'si dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı. Kapiler elektroforez cihazı kullanarak kütüphane kalitesi ve miktarı değerlendirildi.

Havuz Oluşturma

Her yakalama havuzu için, Tablo 14'te gösterildiği şekilde istenen havuz boyutuna göre kütüphane başına miktarı (ng) belirlendi. Yakalama havuzu başına 3200 ng toplam girdiyi aşmadığından emin olundu.

Tablo 14: Hibridizasyon yakalama için havuz oluşturma.

Havuz oluşturma	
Yakalama havuzu başına önerilen kitaplık sayısı	8
Yakalama havuzu başına maksimum toplam girdi	3200 ng
Kütüphane başına minimum girdi	200 ng

Havuzlama için gereken her bir çoğaltılmış kitaplığın hacmi (μ l) hesaplandı. Her kütüphane için hesaplanan hacimler 1,5 ml'lik bir LoBind tüpüne aktarıldı. Human Exome Probe Set ve bloklama reaktifleri Tablo 15'te gösterildiği şekilde her bir kitaplık havuzuna eklendi.

Tablo 15: Kütüphane havuzunun probler ve bloklama reaktifleri ile oluşturulması.

Bileşen	Hacim (μ l)
Dizinlenmiş kütüphaneler havuzu	Değişken
Man Exome Probe Set	4
One-4-All Blocking Oligos	8
One-4-All Blocking Solution	5

Tamamlanmış kütüphane havuzu vortekslendi, ardından buharlaştırıcı cihaz kullanılarak tamamlanmış kütüphane havuzunun tüm sıvı içeriği tamamen buharlaştırıldı. Buharlaştırılma tamamlandığında, kurutulmuş kütüphane havuzu buz üzerine alınarak hibridizasyon yakalama protokolüne geçildi.

Hibridizasyon Yakalama

Vapor-Lock reaktifi oda sıcaklığında çözöldü. Fast Hybridization Solution bir ısıtma bloğunda 10 dakika boyunca 65°C'ye ısıtıldı ve vortekslenerek tüm çökeltinin çözöndüğünden emin olundu. Tablo 16'da verildiği şekilde ısıtılmalı kapaklı bir termal döngü cihazında inkübasyona başlandı.

Tablo 16: Hibridizasyon yakalama termal döngüsü.

Adım	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon süresi
1	95°C	1 dakika
2	95°C	5 dakika
3	60°C	30 dakika-4 saat
4	60°C	Tut

Termal döngü bloğu 95°C'ye ulaştığında, program adım 1'de duraklatılarak 65°C *Fast Hybridization Solution* vortekslenerek 20 μ l kurutulmuş tamamlanmış kütüphane havuzunu içeren tüpe aktarıldı. Tüp 5 saniye boyunca vorteksleyip, ardından 65°C'de 2 dakika inkübe edildi. Vortekleme ve sonrasında 65°C'de 2 dakika inkübasyon adımları 2 kez daha tekrarlandı. Çözöltinin tamamı 0,2 ml'lik PCR tüpüne aktarıldı ve *pulse spin* yapıldı. Kabarcık kalmadığından emin olunup 30 μ l *Vapor-Lock* reaktifi eklendi. Tüm sıvının tüpün dibinde olduğundan emin olmak için *pulse spin* yapıldı. Tüp termal döngü cihazına aktarıldı ve programa 95°C'de devam edildi. Termal döngü tamamlanarak hibridize hedefleri streptavidin boncuklara bağlama işlemlerine geçildi.

Hibridize Hedefleri Streptavidin Boncuklara Bağlama

Reaksiyon başına 450 µl *Wash Buffer A* alkalize edilip 70°C'ye ısıtıldı. Reaksiyon başına 700 µl *Wash Buffer B* ayrılıp 48°C'ye ısıtıldı. Streptavidin Bağlama Boncukları (*Streptavidin Binding Beads*) vortekslenerek homojenize edildi. 100 µl homojenize Streptavidin Bağlayıcı Boncukları yeni bir 1,5 ml LoBind tüpüne aktarıldı. Her hibridizasyon reaksiyonu için 1 tüp hazırlanarak 200 µl *Post Capture Binding Buffer* pipetlenerek karıştırıldı. Boncuklar manyetik bir stand üzerinde 1 dakika çözelti berraklaşana kadar inkübe edildi, ardından berrak süpernatantı peleti bozulmadan atıldı. Örnekler manyetik standdan alındı. 200 µl *Post Capture Binding Buffer* eklenerek manyetik bir stand üzerinde 1 dakika inkübe edilme ve ardından berrak süpernatantı peleti bozulmadan atılma işlemi 2 kez daha tekrarlandı. Üçüncü yıkamadan süpernatantı çıkardıktan sonra, son bir 200 µl *Post Capture Binding Buffer* eklenip boncuklar vortekslenerek homojenize edildi. Homojenize edilmiş boncuklar oda sıcaklığında tutuldu. Hibridizasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra termal döngü cihazından alınan tüp açılarak *Vapor-Lock* dahil tüm hacim oda sıcaklığındaki homojenize boncuk içeren tüpe hızlıca aktarıldı ve karışım pipetlenerek iyice karıştırıldı. Boncukların çökmesini önlemek için karışım oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bir döndürücü cihaz üzerinde inkübe edildi. Tüm sıvının tüpün dibinde olduğundan emin olmak için tüpe *pulse spin* yapıldı. Boncuklar manyetik bir stand üzerinde 1 dakika çözelti berraklaşana kadar inkübe edilip ardından pelleti bozmadan *Vapor-Lock* içeren berrak süpernatant çıkarılıp atıldı. Tüp manyetik standdan çıkarıldı ve 200 µl önceden ısıtılmış 70°C *Wash Buffer A* eklendi. 70°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra tüp 1 dakika boyunca çözelti berraklaşana kadar manyetik bir stand üzerinde bekletildi, ardından berrak süpernatant peleti bozmadan çıkarıldı ve atıldı. Tüpü manyetik standdan çıkarılıp önceden ısıtılmış 70°C *Wash Buffer A* 'dan 200 µl daha ekleyip 70°C'de 5 dakika inkübe edildi. Tüp *pulse spin* olarak döndürüldü ve boncuklar da dahil olmak üzere tüm hacim yeni bir 1,5 ml LoBind tüpüne aktarıldı. Tüp 1 dakika boyunca çözelti berraklaşana kadar manyetik bir stand üzerine yerleştirildi, ardından berrak süpernatantı peleti bozmadan çıkarıldı ve atıldı. Tüp manyetik standdan alınıp 200 µl önceden ısıtılmış 48°C *Wash Buffer B* eklendi. Tüpe *pulse spin* yapıldı, ardından 48°C'de 5 dakika inkübe edilip tekrar tüp 1 dakika boyunca çözelti berraklaşana kadar manyetik bir stand üzerine konulup süpernatant peleti bozmadan atıldı. Bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı. Son yıkamadan sonra, kalan tüm süpernatant 10 µl'lik bir pipet kullanılarak çıkarıldı. Tüp manyetik standdan alınıp 45 µl RNaz içermeyen su eklendi, pipetlenerek homojenize edildi ve buz üzerinde yakalama sonrası amplifikasyon aşamasında geçildi.

Yakalama Sonrası Amplifikasyon

Reaksiyon karışımı Tablo 17 gösterildiği şekilde buz üzerinde bir PCR tüpünde hazırlandı.

Tablo 17: Yakalama sonrası amplifikasyon için reaksiyon karışımı.

Bileşen	Hacim (µl)
Yakalanan hedefleri içeren boncuk ürünü	22.5
Hibrit Yakalama Sonrası PCR Karışımı	25
Primer Karışımı Illumina Kütüphane Amplifikasyonu	2.5
Toplam reaksiyon hacmi	50

Tablo 18’de verilen koşullara göre PZR gerçekleştirildi. PZR tamamlandıktan sonra, her bir reaksiyona 75 µl yeniden süspansiyon edilmiş *Agencourt AMPure XP Boncuk* yukarı aşağı pipetlenerek eklendi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Boncuklar manyetik bir stand üzerinde peletlenip süpernatantı dikkatlice atıldı. Boncuklar 200 µl %80 etanol ekleyerek yıkandı, manyetik stand üzerinde pelletlenip süpernatant atıldı. Yıkama bir kez daha tekrarlandı ve etanol uzaklaştırıldı. Manyetik stand üzerinde 5-10 dakika boncuklar kuruyana kadar inkübe edildikten sonra manyetik standdan alındı. RNaz içermeyen su içinde yeniden süspansiyon ederek elute edilerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Boncuklar tekrar manyetik stand üzerinde peletlenip berrak süpernatantın 30 µl’si dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı. Kapiler elektroforez cihazı kullanarak kütüphanenin kalitesi ve boyut dağılımı değerlendirildi. Sekanslama işlemi için kütüphaneleri havuzlama ve denatüre etme basamağına geçildi.

Tablo 18: Yakalama sonrası amplifikasyon termal döngü koşulları.

Zaman	Sıcaklık	Döngü sayısı
2 dakika	98°C	1
20 s	98°C	7 döngü
30 s	60°C	
30 s	72°C	
1 dakika	72°C	1
∞	4°C	Tutun

Sekanslama için Kütüphaneleri Havuzlama ve Denatüre Etme

İstenen nihai yükleme konsantrasyonuna bağlı olarak gerekli havuzlanmış kitaplık konsantrasyonları Tablo 19’da gösterilen şekilde belirlendi ve kitaplıklar 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 kullanılarak istenen havuzlanmış kitaplık konsantrasyonu normalleştirildi.

Tablo 19: Nihai yükleme konsantrasyonuna bağlı olarak gerekli havuzlanmış kitaplık konsantrasyonları.

Nihai Yükleme Konsantrasyonu (pM)	Havuzlanmış Kütüphane Konsantrasyonu (nM)
100	0.50
150	0.75
200	1
250	1.25
300	1.50
350	1.75
400	2
450	2.25
500	2.50

Denatüre edilmemiş kütüphane havuzu tüpüne 0,2 N NaOH eklendi ve vortekslendi. 280xg ile 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında denatürasyonu sağlamak için 8 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Nötralize etmek amacıyla 400 mM Tris-HCl, pH 8.0 ilave edildi. Vorteklenen ürün 1dakika 280xg santrifüj edildi.

Kitaplıklar denatüre edilip seyreltildikten sonra Illumina Novaseq 6000 cihazına yüklenerek dizileme işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen sekans verilerinden bcl formatından fastq formatına dönüşüm, vcf dosyası oluşturma, kalite değerlendirmeleri, referans genoma haritalama, düşük kalitedeki okuma ve varyantların filtrelenmesini içeren biyoinformatik iş akışı Qiagen CLC Genomics Workbench 12.0.3 ile yapılarak varyant listesi çıkarıldı.

3.2.2.2.Ekzom verilerinin biyoinformatik analizi

YND işlemleri sonucunda elde edilen veriler ham data halinde (.fastq, .bam, .bai) temin edildi ve filtreleme yüzü ile excel formatında incelemeye alındı. Biyoinformatik analizlere başlamadan önce literatür taraması ve veri madenciliği yapılarak HPE ile ilişkisi bildirilmiş veya olası ilişkili olduğu düşünülen 775 geni içeren bir liste oluşturuldu. İlk filtrelemede çalışmadaki olguların, bu listede yer alan genler açısından TED verileri analiz edildi. Bu analizde, UCSC’de bulunan yaygın tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) dışlandı (UCSC Genome Browser, 1000 Genom, vb), minör allel frekansı (MAF) <0.001 olarak belirlendi ve varyant tipleri ve zigosite gibi parametreler değerlendirmeye alındı. Ayrıca varyantlar ‘*in-house data*’ olarak adlandırılan kurum içinde oluşturulmuş varyant verileri ile karşılaştırılarak sık görülen değişimlerin dışlanması sağlandı. Saptanan varyantlar; protein üzerindeki tahmini etkisi, ekspresyon paternleri, türler arası korunmuşluk gibi farklı parametreler göz önüne

alınarak yorumlandı. Mutasyon tiplerine göre varyantlar anlamsız, çerçeve kayması, kırılma hatası ve yanlış anlamlı olmak üzere öncelik sırasına göre değerlendirildi. Saptanan varyantların patojenitesi *The American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) kriterlerine göre sınıflandırıldı (256, 257). İkinci filtrelemede aday varyantlar *in silico* tahmin araçlarına (SIFT, MutationTaster, Human Splicing Finder, PROVEAN vb.) göre patojenik veya olası patojenik özellik taşıyan tüm genlerdeki değişimler değerlendirmeye alındı (258, 259, 260, 261). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Human Gene Mutation Database (HGMD), Ensembl, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Genecards, ClinVar, Franklin, Varsome ve UCSC Genome gibi portal ve veritabanları aracılığı ile incelendi (262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269). Bütün aday varyantların okuma derinliğinin en az 20X olmasına dikkat edildi ve ham okuma verileri Integrative Genomics Viewer (IGV) programı üzerinden değerlendirildi (270). Varyant sıklıkları için GnomAD (v2.1.1) ve Allele Frequency Aggregator (ALFA) veri tabanlarından yararlanıldı (271, 272). Fenotip ve kalıtım paterni ile uyumlu olduğu düşünülen varyantlar için Sanger dizi analizi ile doğrulama ve ailevi segregasyon çalışmaları planlandı.

3.2.2.2.1. Varyantların sınıflandırılması

Saptanan varyantların değerlendirilmesinde ACMG'nin varyant değerlendirmelerinde kullandığı sınıflandırmalar dikkate alındı (273). ACMG standartlarına göre varyant etkilerinin belirlenmesinde kullanılan değerlendirme kriterleri Tablo 20, Tablo 21 ve Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 20: ACMG varyant puanlama tablosu (273).

Patojenik	1. 1 çok güçlü (PVS1) ve a. ≥ 1 güçlü (PS1-PS4) veya b. ≥ 2 orta (PM1-PM6) veya c. 1 orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya d. ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) 2. ≥ 2 güçlü (PS1-PS4) 3. 1 güçlü (PS1-PS4) ve a. ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya b. 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya c. 1 orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)
Olası patojenik	1. 1 çok güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya 2. 1 güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya 3. 1 güçlü (PS1-PS4) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya 4. ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya 5. 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya 6. 1 Orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 Destekleyici (PP1-PP5)
Önemi bilinmeyen	1. Diğer kriterleri karşılamama veya 2. Zararsız ve patojenik kriterlerin çelişkili olması
Olası zararsız	1. 1 güçlü (BS1-BS4) ve 1 destekleyici (BP1-BP7) veya 2. ≥ 2 destekleyici (BP1-BP7)

Zararsız	1. 1 tek başına (BA1) veya 2. ≥ 2 güçlü (BS1-BS4)
-----------------	---

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

Tablo 21: Patojenik varyantları sınıflandırma kriterleri (273).

Kanıt niteliği	Patojenite kriterleri
Patojeniteye dair çok güçlü kanıtlar	PSV1: Fonksiyon kaybının hastalık mekanizmasında yer aldığı bilinen genlerde lokalize <i>null</i> varyant varlığı (anlamsız mutasyon, çerçeve kayması, ± 1 veya 2 kırılma bölgesi, başlangıç kodonu, tek ya da çoklu ekzon delesyonları)
Güçlü patojenite kanıtları	PS1: Nükleotid değişiminden bağımsız olarak daha önce bildirilmiş bir patojenik varyant ile aynı aminoasit değişimi PS2: Aile öyküsü olmayan hastada saptanan ve parental konfirmasyonu yapılmış olan <i>de novo</i> değişim PS3: Gen veya gen ürününün olası zararlı etkisini destekleyen <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> fonksiyonel çalışmaların varlığı PS4: Etkilenmiş bireylerdeki varyant sıklığının kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olması
Orta derecede patojenite kanıtları	PM1: Mutasyonel <i>hotspot</i> noktada ve/veya kritik ve iyi bilinen fonksiyonel alanda lokalize zararsız olmayan değişim PM2: 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu, Ekzom Dizileme Projesi gibi büyük çalışmalarda kontrol gruplarında bulunmaması veya homozigot frekansının çok düşük olması PM3: Resesif hastalıklarda patojenik bir varyantın trans allelde gösterilmesi PM4: Tekrarlamayan bölgelerdeki çerçeve içindeki delesyon/insersiyon ya da dur kodonu kaybının proteininin uzunluğunda değişime neden olması PM5: Yeni bir yanlış anlamlı değişimin, daha önce patojenik olduğu tanımlı amino asit rezidüsünde görülmesi PM6: <i>De novo</i> olduğu varsayılan fakat ailede segregasyon çalışması ile doğrulanmamış değişim
Patojeniteye dair destekleyici kanıtlar	PP1: Hastalığa neden olduğu bilinen bir gende lokalize varyantın birden fazla etkilenmiş aile üyesinde gösterilmesi PP2: Zararsız yanlış anlamlı varyasyonların düşük sıklıkta görüldüğü ve hastalık etiolojisinde yanlış anlamlı varyantların sık yer aldığı genlerde lokalize değişimler PP3: Gen ya da gen ürününde zararlı etkiye yol açabileceği (korunmuşluk, evrimsel, kırılma etkisi vb.) çeşitli istatistiksel hesaplamalar ile desteklenmiş varyantlar PP4: Hastanın fenotipinin veya aile öyküsünün yüksek oranda tek bir genetik etiolojiye işaret etmesi PP5: Laboratuvar ortamında bağımsız olarak patojenitesi kanıtlanmamış bir varyantın saygın bir kaynak tarafından patojenik olarak rapor edilmiş olması

PVS, pathogenic very strong; PS, pathogenic strong; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting.

Tablo 22: Zararsız varyantları sınıflandırma kriterleri (273).

Kanıt niteliği	Zararsız değişim lehine olan kriterler
Zararsız etkinin tek başına kanıtı	BA1: 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu, Ekzom Dizileme Projesi gibi büyük çalışmalarda allel frekansının >%5 olması
Zararsız etkinin güçlü kanıtları	BS1: Allel frekansının hastalık için beklenenden daha yüksek olması BS2: Sağlıklı bir yetişkin bireyde, erken yaşta tam penetrans beklenen bir hastalık için (resesifler için homozigot, dominant için heterozigot ve X'e bağlı kalıtım için hemizigot) gözlenen değişimler BS3: İyi tanımlanmış <i>in vitro</i> veya <i>in vivo</i> fonksiyonel çalışmalar ile protein fonksiyonunda ya da kırılma etkisinde zararlı etkinin bulunmadığının gösterilmesi BS4: Değişimin ailedeki benzer etkilenmiş bireylerde segrege olmaması
Zararsız etkinin destekleyici kanıtları	BP1: Hastalık mekanizmasında esas olarak trunke edici varyantların yer aldığı genlerdeki yanlış anlamlı varyantlar BP2: Tam penetrans gösteren dominant bir gen/hastalıkta, patojenik bir varyant ile trans konumda bulunması veya herhangi bir kalıtım paterni durumunda patojenik bir varyant ile cis konumda bulunması BP3: Fonksiyonu bilinmeyen tekrar bölgelerinde yer alan çerçeve içi delesyon/insersiyonların varlığı BP4: Gen veya gen ürünüde zararlı etkiye yol açmadığı (korunmuşluk, evrimsel, kırılma etkisi vb.) çeşitli istatistiksel hesaplamalar ile desteklenmiş olan varyantlar BP5: Hastalık için alternatif moleküler temeli saptanmış bir vakada bulunan varyant BP6: Laboratuvar ortamında bağımsız olarak kanıtlanmamış ancak saygın bir kaynak tarafından varyantın zararsız olarak rapor edilmesi BP7: Kırılma hatasına yol açmayan ya da yeni kırılma bölgesi oluşturmayan ve yüksek korunmuş bölgede yer almayan sinonim değişimler

BA, benign stand-alone; BS, benign strong; BP, benign supporting.

3.3.Saptanan Varyantların Sanger Dizileme ile Doğrulanması

3.3.1. Sanger Dizileme İçin Primerlerin Tasarlanması

Saptanan her aday varyant için gen-spesifik primerler saptanan varyantı kapsayacak şekilde; seçilen bölgelerin NCBI veri tabanında varyantın tespit edildiği transkriptin NM kodu baz alınarak ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. Primerler tasarlanırken primerlerdeki oligonükleotidlerin tekrarlayan dizi bölgesinde olmamasına, herhangi bir polimorfizm içermemesine ve içermesi kaçınılmaz ise toplum sıklığının %1'in altında olmasına, primerlerin DNA'ya bağlanma ısılarının birbirine yakın olmasına, A-T ve G-C nükleotit dağılımlarının eşite yakın olmasına dikkat edildi. Ensembl veri tabanından alınan veriler ile tasarlanan primerler, USCS Genome Browser in silico PZR aracı ile bağlanma ısıları, dizi uzunlukları ve spesifiteleri açısından kontrol edildi. Çalışma kapsamında tasarlanan ve kullanılan primer dizilerine ait tablo Tablo 23'te verilmiştir.

Tablo 23: Primer dizileri.

Olgu no	Gen sembolü	NM kodu	Primer F/R	Fragman uzunluğu (bp)	TM (°C)
1	ZIC2	(NM_007129.5)	5'-CGC AAC TCC ACA ACC AGT-3' 5'-GCT GCT GGC TCT TTC GT-3'	600	58-57
	PTCH1	(NM_000264.5)	5'-GCC TAC CTT TGA CTC CTG T-3' 5'-CCA GTA GCA TCC TAG TGG A-3'	463	54-53
2	SHH	(NM_000193.4)	5'-GAC GTG CTC CTC CAC GCT-3' 5'-GCC GAG GTG CGC CAA T-3'	539	62-64
3	SIX3	(NM_005413.3)	5'-GAT TGC GGT GGA ATC GCT GA-3' 5'-CTA GCC CCA TCT CAA CCC CT -3'	1232	66-62
	GLI2	(NM_005270.5)	5'-GAC AAC CCC AGA CTA CCC A-3' 5'-CAC AGC CTC TGC TGT TTC CT-3'	966	60-58
4	KATNIP (KIAA055)	(NM_015202.4) c.1461G>A	5'-CAG ATG GAG AGA CTG AGA CCC T-3' 5'-GAG CCT CTG TAC CTG GCC A-3'	472	62-60
		(NM_015202.4) c.4035delC	5'-GTG GAC CAG TGT CCG CTG TA-3' 5'-CGG AAT GTA CAT CAG AGC AAC T-3'	464	62-60
5	HESX1	(NM_003865.3)	5'-GAG TTC CTG AAA CTA CCT CTA-3' 5'-CCA CTG ATT CTT CAT GCT CT-3'	894	60-58
6	DHCR7	(NM_001360.3)	5'-GGC AAG GCG TGT GTC AGA-3' 5'-GTT GGA GCT GGG ATG CCA-3'	669	62-63

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Primer tasarlanan olgulara ait DNA'lar ve tasarlanan primerler ile termal döngü cihazı kullanılarak PZR çalışması yapıldı. Her bir PZR reaksiyonu için 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific), %0-10 DMSO (Biomatik Corporation), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2 – 0,5 µM ileri ve geri primerler (Sentebiolab), 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Hibrigen) ve 150-200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, distile su (dH₂O) ile son hacim 25 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen her bir bölge, DNA içermeyen negatif kontrol PZR ile birlikte olacak şekilde, Tablo 24'te verilen PZR döngüsel koşulları altında termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) çalışıldı.

Tablo 24: PZR döngü koşulları.

İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	94°C	5 dakika	x1 döngü
Denatürasyon	94°C	30 saniye	x10 döngü
Bağlanma	Primer bağlanma ısısı	30 saniye	

Uzama	72°C	45 saniye-1,5 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	x30 döngü
Bağlanma	Primer bağlanma ısısı	30 saniye	
Uzama	72°C	45 saniye-1,5 dakika	
Uzama	72°C	10 dakika	x1 döngü
Bekleme	4°C	1 saat	x1 döngü
Duraklama	10°C	∞	x1 döngü

Amplifikasyon sonrasında çoğaltılan gen bölgelerinin, hedeflenen bölge olduğunun validasyonu ve deneyin kontamine olup olmadığını tespit etmek amacıyla 5 µl PZR ürünü ile 2 µl *Gel Red* boyası karıştırılarak agaroz jel elektroforezi uygulandı. 50 bç'lik merdiven markörü (*Sigma*) paralelinde 1X TBE tamponu içindeki %1,2'lik agaroz (*Sigma*) jelde, 160 Voltta 30 dakika yürütülerek PZR ürünleri boyutlarına göre ayrıldı. Elektroforez işlemi sonrasında bantlar ultraviyole ışık altında görüntülenerek kaydedildi.

3.3.2.1.PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

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

3.3.3. Dizi PZR Çalışması

PZR için gerekli kimyasalları içeren 5X tampon solüsyonu BigDye buffer, ddNTP ve AmpliTaq DNA polimeraz içeren BigDye v3.1, tek yön primer, saflaştırılmış PZR ürünü ve distile su ilavesiyle, final hacim 10µl olacak şekilde karışım hazırlandı. 96 örneklik *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde aktarıldı. Tablo 25'te gösterildiği şekilde termal döngü cihazında PZR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 25: Dizi PZR termal döngü koşulları.

İşlem	Derece	Süre	Döngü
Denatürasyon	96	10 saniye	x25
Bağlanma	50	5 saniye	
Uzama	60	4 dakika	
Sonlanma	4	∞	x1

3.3.3.1.Dizi PZR Reaksiyonu Ürünlerinin Saflaştırılması

Ürünler 4°C'ye gelen cihazdan dizi PZR reaksiyonu tamamlandıktan sonra alındı. Arta kalan primer ve diğer reaktiflerin uzaklaştırılması amacıyla alkolle çöktürme yöntemi ile saflaştırıldı. Her kuyucuk başına 1'er µl 125 mM EDTA ve 3M sodyum asetat ve 25 µl %100 etanol eklendi. *Plate*, alüminyum koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 3.810 rpm'de 45 dk santrifüj işlemi yapıldı. Ardından koruyucu bant çıkarılıp *plate* ters çevrildi ve 1.100 rpm'de 30 saniye kısa santrifüj yapıldı. Her kuyucuğa 35 µl %70'lik soğuk etanol eklenerek koruyucu bantla tekrar kapatıldı ve 3460 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Koruyucu yapışkan bant tekrar açılıp *plate* ters çevrilerek 1170 rpm'de 60 saniye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (*Highly Deionized Formamid*) eklendi. Örnekler, termal döngü cihazında 97 °C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra 2 dk soğuk blok üzerinde bekletildi.

3.3.3.2. Elektroforez Cihazına Yükleme

Plate ABI3500 otomatik sekiz kapillerli elektroforez cihazına yerleştirilerek yürütme işlemine geçildi. Yürütme işleminde daha önceden kalibre edilmiş dizileme boya seti Dyeset kullanıldı. Ön yürütme voltajı 15 kVolt, yürütme voltajı 13,4 kVolt, injeksiyon voltajı 1,6 kVolt; ön yürütme süresi 180 saniye, yürütme süresi 2.520 saniye, injeksiyon zamanı 8 saniye ve veri gecikmesi (*data delay*) 250 saniye olacak şekilde ürünler yürütüldü.

3.3.3.3. Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller elektroforezden alınan dosya, ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v3.0 analiz programlarında değerlendirildi. SeqScape v.3.0 programında analiz aşamasından önce referans dizi bu programa yüklenerek transkriptin ekzonik ve intronik bölgeleri programa tanıtıldı. Sonrasında Fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklenerek değerlendirildi. Olgular dizisinin hedef gen bölgesindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu, saflaştırma kalitesi, görüntülenen pik kalitesi, dizilenen baz sayısı, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği kontrol edildi. Bu kontrollerde istenilen sonucun alınamadığı durumlarda dizileme protokolü PZR aşamasından, ya da yeterli örnek mevcut ise saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. Sonuçlar elde edilmiş YND sonuçları ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Antenatal USG Bulguları

Beş olguda (%50) alobar HPE, iki olguda lobar HPE (%20), bir olguda MIHV HPE (%10) saptandı. İki olguda ise (%20) prenatal dönemde HPE şüphesi oluşmuştu ve postmortem muayeneleri fenotipik olarak HPE sekansı ile uyumlu idi. Tablo 26’da çalışma grubumuzda yer alan olguların patolojik US bulguları görülmektedir.

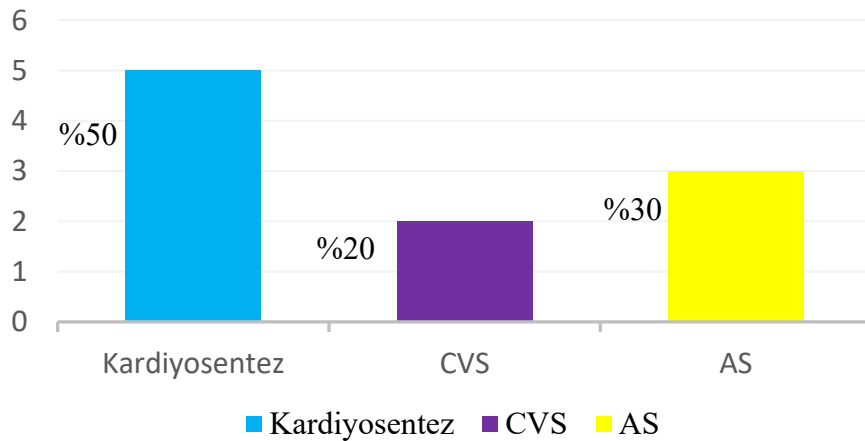
Tablo 26: Çalışma grubumuzda saptanan patolojik USG bulguları.

Olgu	Prenatal US Bulguları
Olgu 1	Alobar HPE
Olgu 2	Lobar HPE, hipoplazik korpus kallozum, hipoplazik CSP, mikrosefali, hipotelorizm
Olgu 3	Alobar HPE, mikrosefali, lens izlenmemesi, hipotelorizm, arini, YDD
Olgu 4	MIHV HPE, CCA, bilateral anoftalmi/mikroftalmi, tek nostril
Olgu 5	HPE şüphesi, ventrikülomegali, serebellar hipoplazi, ağır hipotelorizm, proboscis, arini
Olgu 6	Alobar HPE, arini, orta hatta geniş yarık dudak, malalignent VSD, elde polidaktili
Olgu 7	Alobar HPE, ileri derecede basık alın, fırlak gözler
Olgu 8	Lobar HPE, CCA
Olgu 9	Alobar HPE, tek taraflı anoftalmi, orta hatta YDD, sağ kulakta preaurikular skin tag
Olgu 10	HPE şüphesi, CCA, mikrosefali, mikroftalmi (anoftalmi?), orta hatta YDD

CSP, Kavum septi pellucidum, CCA, Korus Kallozum agenezisi, VSD, Ventriküloseptal defekt, YDD, Yarık damak dudak.

4.2. İnvazif İşlemler

Antenatal dönemde olguların tamamına invazif girişim yapıldı. Girişimlerin %30’u (n=3) amniyosentez (AS), %20’si (n=2) koryon villus biyopsisi (CVS) ve %50’si (n=5) kardiyosentezdi.



Şekil 17: Prenatal invazif girişimlerin dağılımı (n=10).

4.3.Postmortem Fetal Değerlendirme ve Fetal Otopsi

Olgu grubumuzda gebeliğin terminasyonu ve postmortem fetal değerlendirme ortalama 25. GH'nda gerçekleştirildi. USG'de saptanan malformasyonlara ek olarak tüm olgularımızda eşlik eden fasiyal bulgular mevcuttu. Beş olguda (%50) postmortem değerlendirmede US bulgularına eşlik eden fasiyal dismorfik bulgular dışında ek anomali saptanmadı. İki olguda (%20) ek olarak yarık damak/dudak, bir olguda (%10) mikroftalmi/anoftalmi, bir olguda (%10) radyal ve ulnar kemiklerde *bowing*, bir olguda (%10) aplazik/hipoplazik frenulum ve bir olguda (%10) belirgin klitoris saptandı.

Serimizdeki 10 olgudan yalnızca biri (Olgu 8) fetal otopsi ile histopatolojik olarak değerlendirildi. 26. GH'nda termine edilen bu olguda prenatal USG bulgusu olarak lobar HPE ve CCA saptanmıştı ek olarak otopsi ile histopatolojik tanıda olguda lizensefali saptandı.

4.4.Moleküler Bulgular

Çalışmamızda altı olguda sekiz farklı gende hastalık ilişkili veya ilişkili olduğu düşünülen 10 varyant saptandı. Bu varyantlardan altısı yanlış anlamlı, ikisi anlamsız, ikisi ise çerçeve kayması tipinde idi. Saptanan 10 varyantın yedisi ilk kez bu çalışmada tanımlanan *novel* nitelikte değişimlerdi. Tablo 27'de çalışmamızda saptanan varyantlar ve bu varyantlara ait özellikler listelenmiştir. Saptanan bütün değişimler Sanger dizi analizi ile doğrulandı.

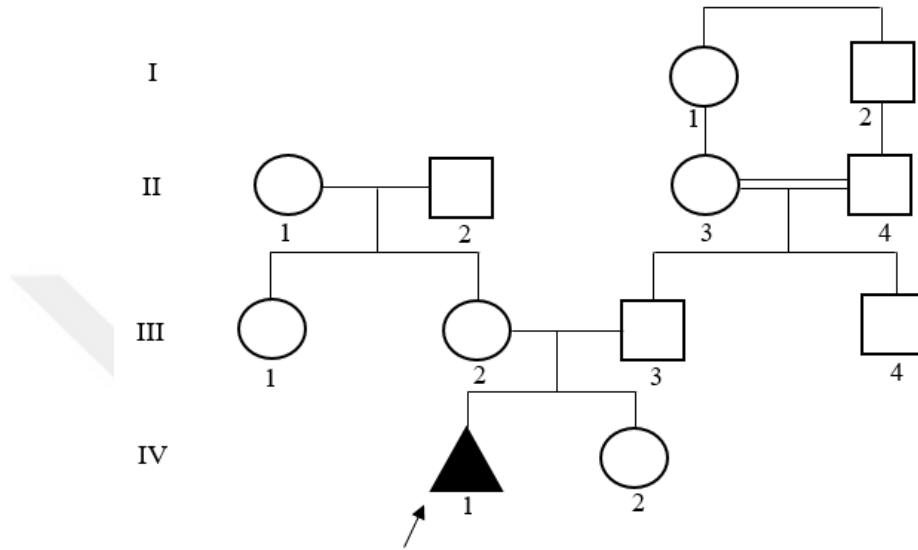
Tablo 27: TED analizi ile saptanan varyantlar ve ilişkili fenotipler.

Olgu no	Gen Transkript	Nükleotid	Lokasyon	Peptid	Varyant tipi	Allel frekansı (gnomAD)	ACMG	İlişkili fenotip (OMIM numarası)
1	<i>ZIC2</i> (NM_007129.5)	c.906C>A	Ekzon 1	p.(Cys302*)	Anlamsız	-	LP PVS1, PM2	HPE5 (MIM#609637)
	<i>PTCH1</i> (NM_000264.5)	c.1409G>T	Ekzon 10	p.(Gly470Val)	Yanlış anlamlı	-	VUS PM2, PP3, PM1	HPE7 (MIM#610828)
2	<i>SHH</i> (NM_000193.4)	c.308A>G	Ekzon 2	p.(Lys103Arg)	Yanlış anlamlı	-	LP PM2, PM1, PP3, PP2	HPE3 (MIM#142945)
3	<i>SIX3</i> (NM_005413.4)	c.305_306insTCTC	Ekzon 1	p.(Gly103fs)	Çerçeve kayması	-	LP PM2, PVS1	HPE2 (MIM#157170)
	<i>GLI2</i> (NM_005270.5)	c.3839A>G	Ekzon 14	p.(Asn1280Ser)	Yanlış anlamlı	0.0000131	VUS PM2, BP4	HPE9 (MIM#610829)
4	<i>KIAA0556</i> (<i>KATNIP</i>) (NM_015202.5)	c.1461G>A	Ekzon 13	p.(Trp487*)	Anlamsız	0.0024%	LP PVS1, PM2	Joubert sendromu 26 (MIM#616784)
		c.4035delC	Ekzon 29	p.(Ile1346Serfs*36)	Çerçeve kayması	-	LP PVS1, PM2	Joubert sendromu 26 (MIM#616784)
5	<i>HESX1</i> (NM_003865.3)	c.385G>A	Ekzon 3	p.(Val129Ile)	Yanlış anlamlı	0.000664	VUS PP2, BS1	SOD (MIM#182230)
6	<i>DHCR7</i> (NM_001360.3)	c.1351T>C	Ekzon 9	p.(Cys451Arg)	Yanlış anlamlı	0.00000402	P PP5, PP3, PM2, PM1, PP2	SLOS (MIM#270400)
		c.976G>T	Ekzon 9	p.(Val326Leu)	Yanlış anlamlı	-	P PP5, PM2, PM5, PM1, PP3, PP2	

4.5.Olgular

4.5.1.Olgu 1

Aralarında akrabalık olmayan 27 yaşında sağlıklı anne ve 31 yaşında sağlıklı babanın 1. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G2 P1 TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.



Şekil 18: Olgu 1'e ait aile ağacı.

4.5.1.1.Postmortem değerlendirme bulguları

24 haftalık erkek fetusun postmortem değerlendirilmesinde boyu 31,5 cm (-0,06 SD), tartısı 620 g (-0,64 SD) baş çevresi 20 cm (-1,76 SD) ve kulaç uzunluğu 30 cm olarak ölçüldü. Mikrocefali, düz ve geriye eğimli alın, düz oksiput, hafif hipertelorizm, periorbital dolgunluk, belirgin infraorbital çizgiler, basık burun kökü, geniş ve basık burun ucu, uzun filtrum, ince dudaklar, çenede horizontal çizgilenme ve bilateral kulaklarda düz heliksler izlendi. Yarık damak ve dudak saptanmadı. Uvula net değerlendirilemedi. Sağ el 5. parmakta klinodaktili, bilateral el parmaklarında uca doğru incelmeye *tapering finger* görünümü ve psödokamptodaktili gözlemlendi. Karyotip ve array-CGH analizi normal sonuçlanmış olan olguda ön planda HPE sekansı düşünüldü.



Şekil 19: Olgu 1'in klinik muayene bulguları. 24 haftalık erkek fetus. (A-B) Mikrosefali, düz ve geriye eğimli alın, düz oksiput, hafif hipertelorizm, periorbital dolgunluk, belirgin infraorbital çizgiler, basık burun kökü, geniş ve basık burun ucu, uzun filtrum, ince dudaklar, çenede horizontal çizgilenme, bilateral kulaklarda düz heliksler. (C-D) Sağ el 5. parmakta klinodaktili, bilateral el parmaklarında *tapering finger* görünümü ve psödokamptodaktili.

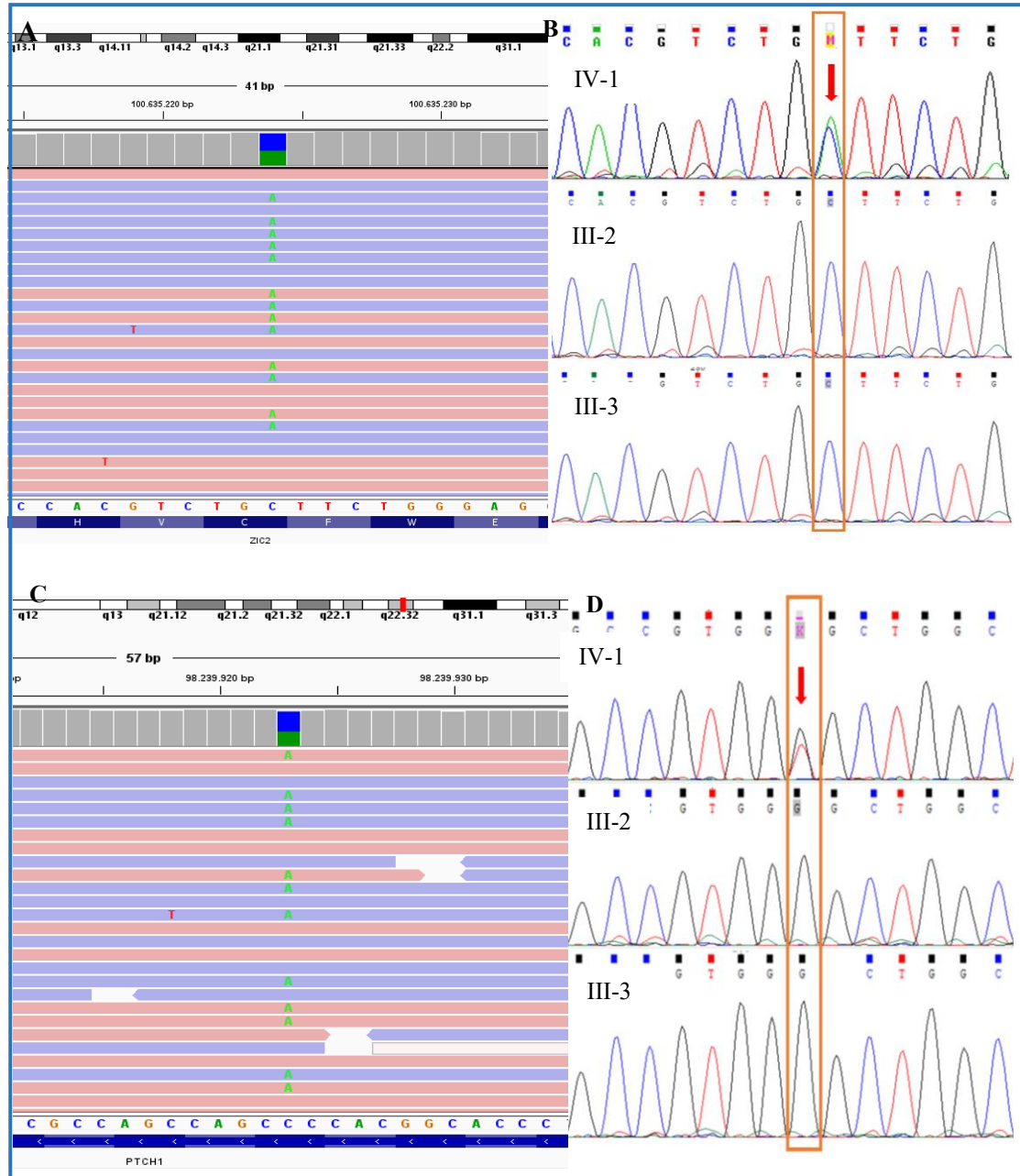
4.5.1.2.Moleküler Bulgular

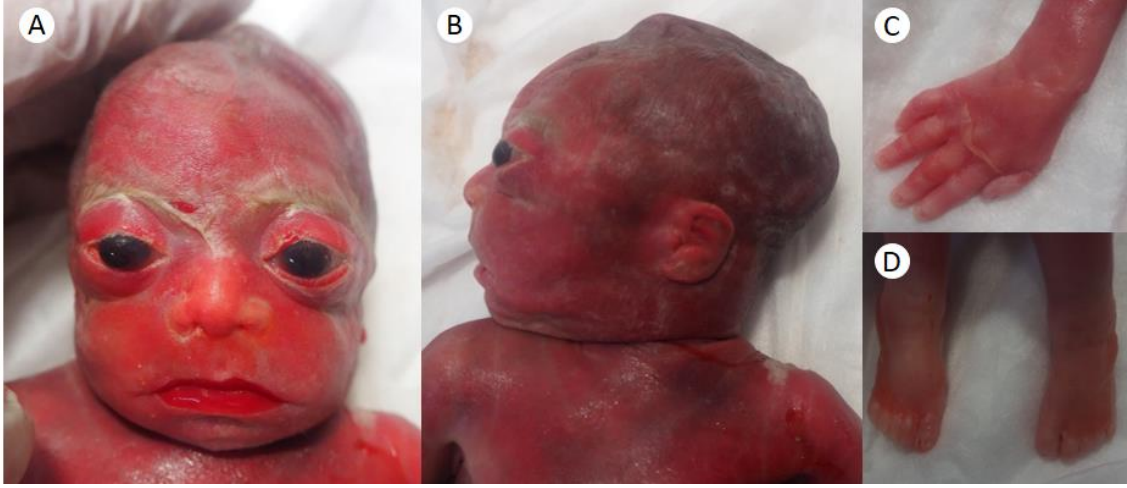
İndeks olgumuza yapılan TED analizinde *ZIC2* geni (13q32.3, *zinc finger protein of cerebellum 2*, NM_007129.5) ekzon 1'de heterozigot c.906C>A/p.(Cys302*) ve *PTCH1* geni (9q22.32, *patched 1*, NM_000264.5) ekzon 10'da heterozigot c.1409G>T/p.(Gly470Val) değişimleri saptandı ve bu varyantlar Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Ailede segregasyon analizinde her iki varyantı da anne ve babanın taşımadığı saptanarak varyantların *de novo* oluştuğu gösterildi. *ZIC2*, özellikle serebellumda yüksek düzeyde eksprese edilen çinko parmak proteinlerinin bir üyesini kodlar. Bu gendeki heterozigot patojenik varyantlar Holoprozensefali 5 (HPE5) (MIM#609637) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Olguda gösterilen bu varyant daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş olup ACMG sınıflandırmasına göre olası patojenik niteliktedir; *PTCH1*, *patched* ailesinin bir üyesini ve hedgehog sinyal yolunun bir bileşenini kodlar. Bu gendeki heterozigot patojenik değişimler ise Holoprozensefali 7 (HPE7) (MIM#610828) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Olguda gösterilen bu varyant daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş olup ACMG sınıflandırmasına göre önemi bilinmeyen niteliktedir.

Tablo 28: Olgu 1’de saptanan *ZIC2* ve *PTCH1* varyantlarına ait bilgiler.

Gen (Transkript)	Variant Nucleotid Peptit	dbSNP ID	ACMG	<i>In-silico</i>			Referans
				MT (score)	SIFT (score)	GERP (score)	
<i>ZIC2</i> (NM_007129.5)	c.906C>A p.(Cys302*)	-	LP PVS1, PM2	D (1.0)	-	U (2.95)	<i>Novel</i>
<i>PTCH1</i> (NM_000264.5)	c.1409G>T p.(Gly470Val)	-	VUS PM2, PP3, PM1	D (1.0)	U (0.001)	U (5.06)	<i>Novel</i>

LP, Likely pathogenic; VUS, Variant of uncertain significance; MT, MutationTaster; D, Damaging / Deleterious; U, Uncertain; *SIFT*, Sorting intolerant from tolerant; *GERP*, Genomic Evolutionary Rate Profiling.





Şekil 22: Olgu 2'nin fizik muayene bulguları. 24 haftalık erkek fetus. (A-B) Mikrosefalik görünüm, geriye eğilimli alın, bilateral belirgin proptotik gözler, yukarı çekik palpebral fissürler, basık burun kökü, belirgin burun kemeri, uzun ve düzleşmiş filtrum, aşağı dönük ağız komissürleri, mikrognatia. (C) Bilateral el 5. parmaklarda klinodaktili. (D) Hipoplazik ayak tırnakları.

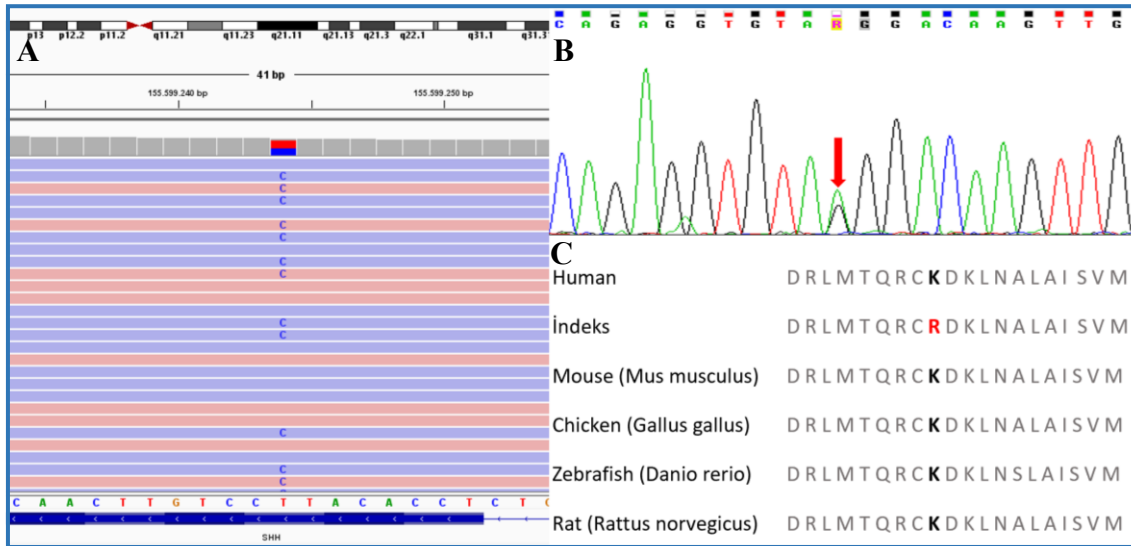
4.5.2.2.Moleküler Bulgular

İndeks olgumuza yapılan TED analizinde *SHH* geni (7q36.3, *sonic hedgehog signaling molecule*, NM_000193.4) ekzon 2'de heterozigot c.308A>G/p.(Lys103Arg) varyantı saptandı ve bu varyant Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Ailede segregasyon analizi gerçekleştirilemedi. *SHH* geni, gelişim sırasında çeşitli noktalarda hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan salgılanmış bir protein olan *sonic hedgehog*'u kodlar. Bu gendeki heterozigot patojenik varyantlar Holoprozensefali 3 (HPE3) (MIM#142945), Kolobom ile beraber mikroftalmi 5 (MIM#611638), Şizensefali (MIM#269160), Soliter mediyen maksiller santral kesici (MIM#147250) fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Olguda gösterilen bu varyant daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş olup ACMG sınıflandırmasına göre olası patojenik niteliktedir.

Tablo 29: Olgu 2'de saptanan *SHH* varyantına ait bilgiler.

Gen (Transkript)	Varyant Nucleotit Peptit	dbSNP ID	ACMG	In-silico			Referans
				MT (score)	SIFT (score)	GERP (score)	
<i>SHH</i> (NM_000193.4)	c.308A>G p.(Lys103Arg)	-	LP PM2, PM1, PP3, PP2	D (1.0)	U (0.027)	U (3.37)	Novel

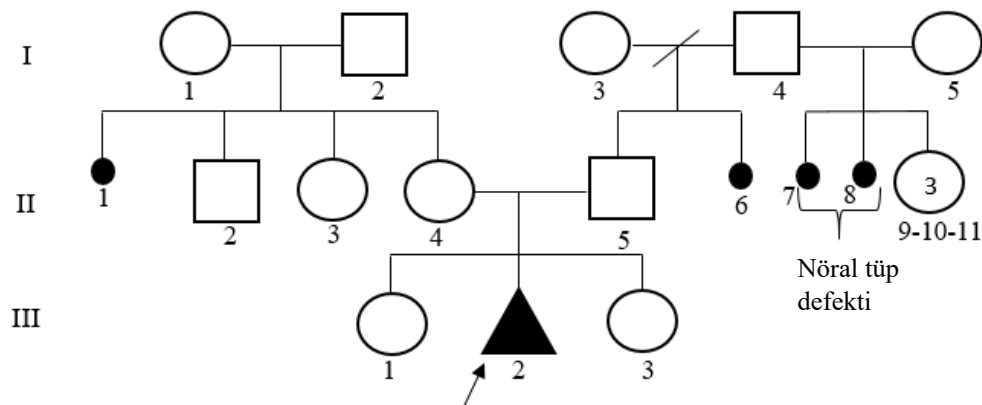
LP: Likely pathogenic, MT, MutationTaster; D, Damaging/Deleterious; U,Uncertain.



Şekil 23: Olgu 2'ye ait moleküler analiz sonuçları ve amino asit dizisinin evrimsel korunumu. (A) İndeks olguda (III-1) *SHH* geninde saptanan heterozigot c.308A>G değişimin IGV görüntüsü. (B) Sanger dizileme ile fetusta (III-1) bu değişim gösterilmiştir. (C) Değişimin bulunduğu bölgedeki amino asit dizisinin türler arasında evrimsel olarak korunmuş olduğu görülmektedir.

4.5.3.Olgu 3

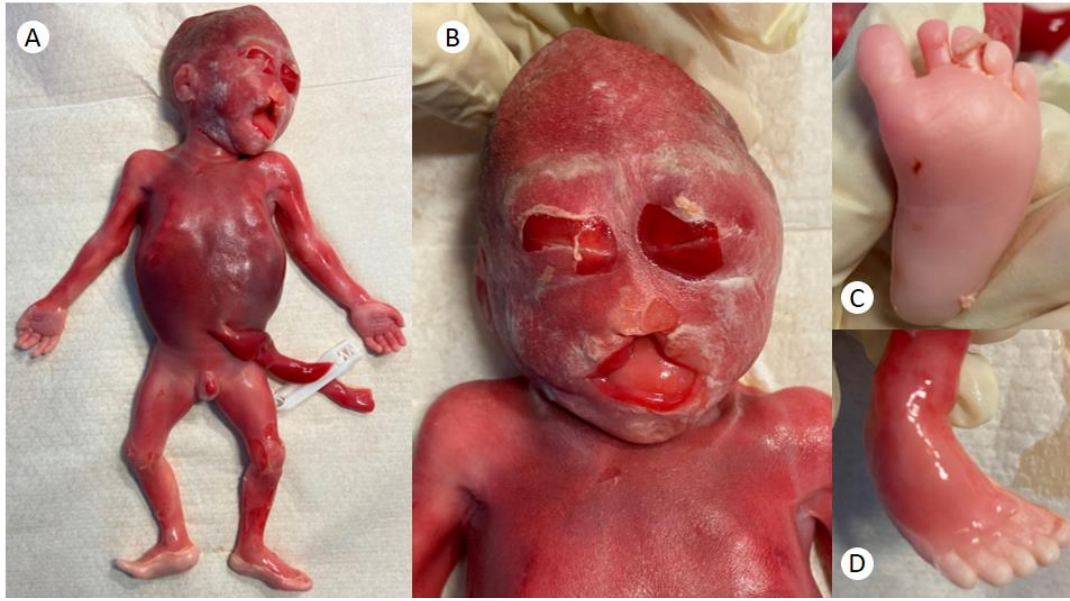
Aralarında akrabalık olmayan 31 yaşında sağlıklı anne ve 30 yaşında sağlıklı babanın 2. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G3 P2 TT1). Ailenin ilk gebeliğinden 2017 doğumlu sağlıklı kız çocukları olduğu öğrenildi. Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.



Şekil 24: Olgu 3'e ait aile ağacı.

Postmortem değerlendirme bulguları

23 haftalık erkek fetusun postmortem değerlendirilmesinde boyu 30,5 cm (0,15 SD), tartısı 580 g (-0,14 SD) ve başçevresi 17 cm (-3,46 SD / 19. GH ile uyumlu) ölçüldü. Mikrosefalik görünüm, hipotelorizm, proptozis, yukarı çekik palpebral fissürler, arini? (dudak yarığının hemen üstünde burun deliği ile uyumlu tek açıklık) izlendi. Üst dudak orta hatta burun deliğine uzanan yarık dudak ve bu bölge seviyesinde orta hatta alveolar çentik saptandı. Bilateral el 5. parmaklarında klinodaktili, sol ayak başparmağı mediyale deviye ve sol ayakta sandal aralık izlendi. Sağ ayakta pes kavus, bilateral fırlak topuklar mevcuttu.



Şekil 25: Olgu 3'ün klinik muayene bulguları. 23 haftalık erkek fetus. A-B: Mikrosefalik görünüm, hipotelorizm, proptozis, yukarı çekik palpebral fissürler, arini? (dudak yarığının hemen üstünde burun deliği ile uyumlu tek açıklık), üst dudak orta hatta burun deliğine uzanan yarık dudak. C: Sol ayakta sandal açıklık D: Sağ ayakta pes kavus.

Moleküler Bulgular

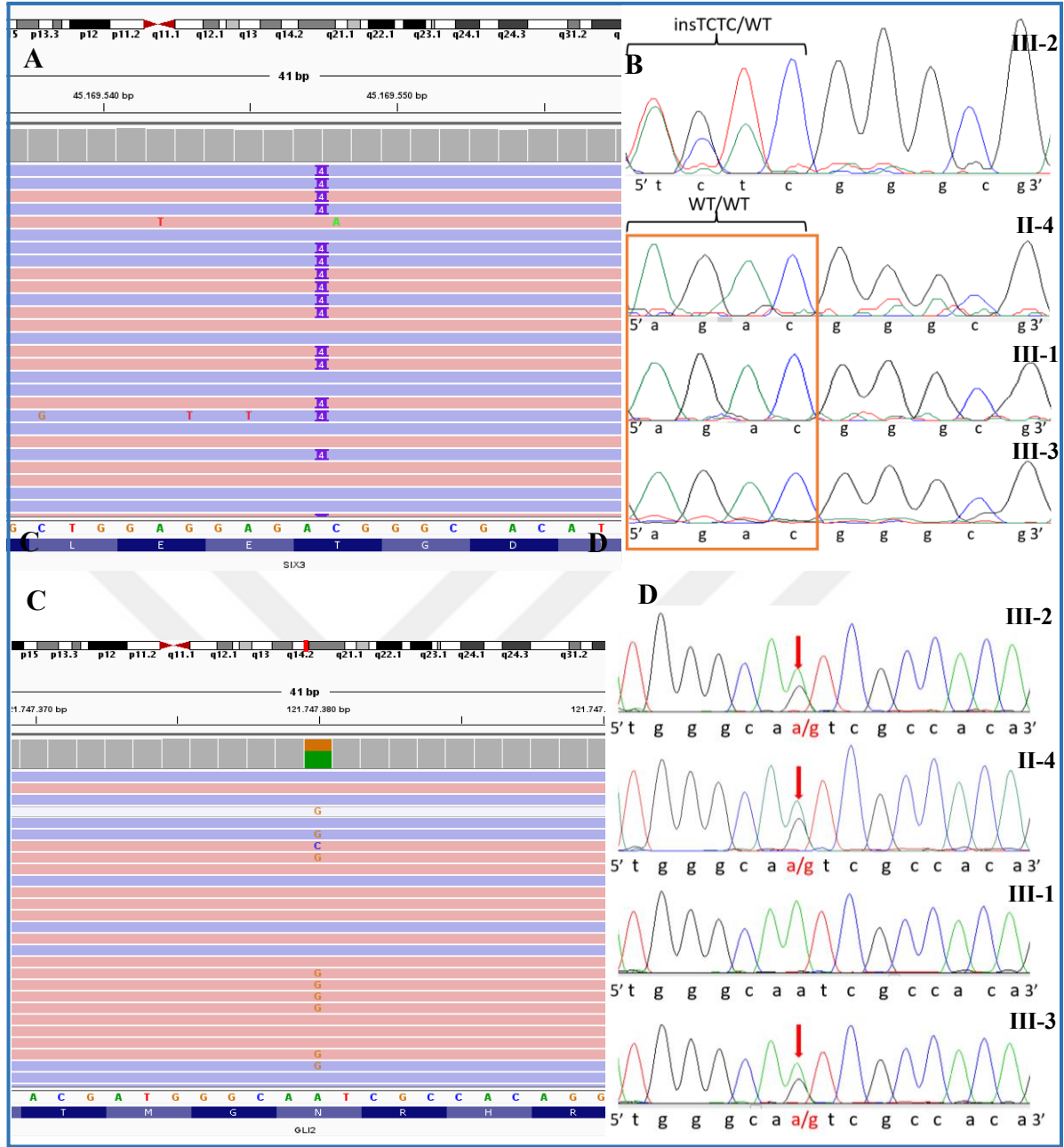
İndeks olgumuza yapılan TED analizinde *SIX3* geni (2p21, *SIX homeobox 3*, NM_005413.4) ekzon 1'de heterozigot c.305_306insTCTC/p.(Gly103fs) varyantı ve *GLI2* geni (2q14.2, *GLI family zinc finger 2*, NM_005270.5) ekzon 14'te heterozigot c.3839A>G (p.Asn1280Ser) varyantı saptandı. Bu varyantlar Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla yapılan incelemeye, indeksin anne ve iki sağlıklı kız kardeşi dahil edildi. Baba da segregasyon çalışması yapılamadı. *SIX3* genindeki varyant anne (II-4) ve iki sağlıklı kız kardeşte (III-1,3) saptamazken, *GLI2*'deki varyant anne ve sağlıklı kız kardeş 2'de (III-3) de saptandı. *SIX3* geni, *sine oculis homeobox* transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesini kodlar.

Kodlanan protein, göz gelişiminde rol oynar. Bu gendeki heterozigot patojenik varyantlar Holoprozensefali 2 (HPE2) (MIM#157170) ve Şizensefali (MIM#269160) fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Olguda gösterilen bu varyant daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş olup ACMG sınıflandırmasına göre olası patojenik niteliktedir. *GLI2* geni, Gli ailesinin C2H2 tipi çinko parmak proteini alt sınıfına ait bir proteini kodlar. Bu alt sınıfın üyeleri, DNA'yı çinko parmak motifleri aracılığıyla bağlayan transkripsiyon faktörleri olarak karakterize edilir. Gli ailesi çinko parmak proteinleri, Shh sinyalinin aracılarıdır ve embriyonal karsinom hücrelerinde güçlü onkogenler olarak yer alırlar. Bu gendeki heterozigot patojenik varyantlar, Culler-Jones sendromu (MIM#615849) ve Holoprozensefali 9 (HPE9) (MIM#610829) fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Olguda gösterilen bu varyant daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş olup ACMG sınıflandırmasına göre önemi bilinmeyen niteliktedir.

Tablo 30: Olgu 3'te saptanan *SIX3* ve *GLI2* varyantlarına ait bilgiler.

Gen (Transkript)	Varyant Nükleotit Peptit	dbSNP ID	ACMG	<i>In-silico</i>			Referans
				MT (score)	SIFT (score)	GERP (score)	
<i>SIX3</i> (NM_005413.4)	c.305_306insTCT C (p.Gly103fs)	-	LP PM2, PVS1	-	-	-	<i>Novel</i>
<i>GLI2</i> (NM_005270.5)	c.3890A>G p.(Asn1280Ser)	rs749812469	VUS PM2, BP4	B (0)	B (0,573)	B (0.37)	<i>Novel</i>

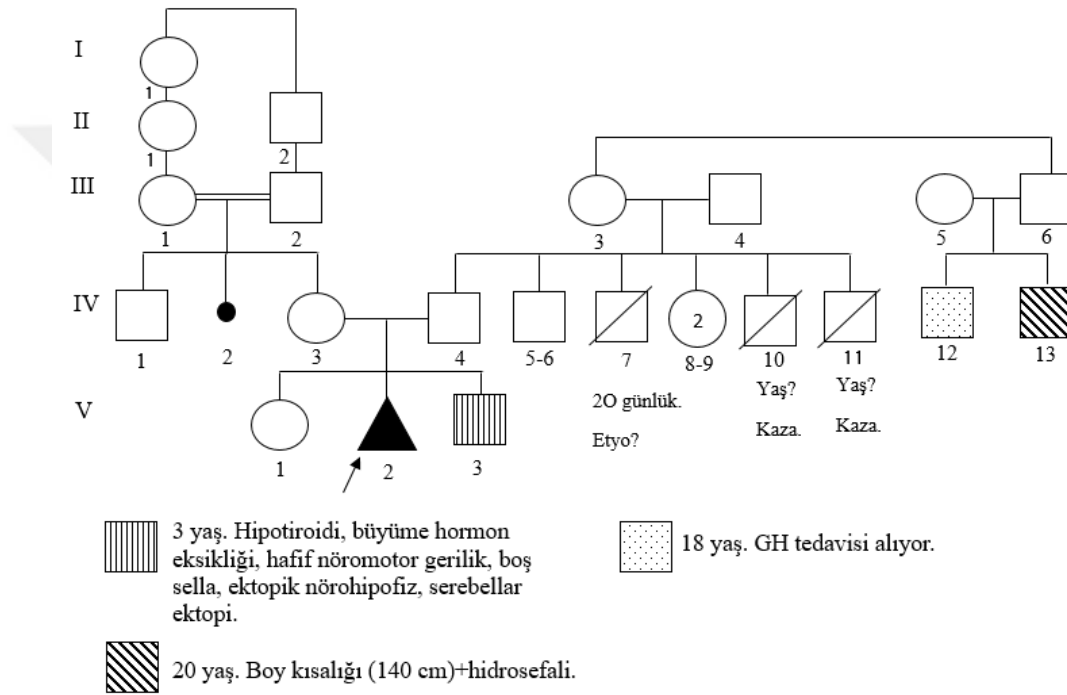
LP, Likely pathogenic;; VUS. Variant of uncertain significance; B, Bening.



Şekil 26: Olgu 3'e ait moleküler analiz sonuçları. (A) İndeks olguda (III-2) *SIX3* geninde saptanan değişimin IGV görüntüsü izlenmektedir. (B) Sanger dizileme ile fetal olgunun (III-2) c.305_306insTCTC değişimini heterozigot taşıdığı; anne (II-4), sağlıklı kız kardeş 1 (III-1) ve sağlıklı kız kardeş 2'nin (III-3) ise homozigot normal olduğu görülmektedir. (C) İndeks olguda (III-2) *GLI2* geninde saptanan değişimin IGV görüntüsü izlenmektedir. (D) Sanger dizileme ile fetal olgu (III-2), anne (II-4) ve sağlıklı kız kardeş 2'nin (III-3) c.3839A>G değişimini heterozigot taşıdığı; sağlıklı kız kardeş 1 (III-1) ise homozigot normal olduğu görülmektedir.

4.5.4.Olgu 4

Aralarında akrabalık olmayan 27 yaşında sağlıklı anne ve 32 yaşında sağlıklı babanın 2. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G3 P2 TT1). Ailenin ilk gebeliğinden 2016 doğumlu sağlıklı kız çocukları olduğu öğrenildi. Ailenin üçüncü gebeliğinden olan üç yaşındaki erkek çocuğunda hipotiroidi, büyüme hormon eksikliği, hafif nöromotor gerilik ve MRG’nde boş sella, ektopik nörohipofiz ve serebellar ektopi bulguları olan olduğu öğrenildi. Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi.



Şekil 27: Olgu 4’e ait aile ağacı.

Postmortem değerlendirme bulguları

35 haftalık dişi fetusun postmortem değerlendirilmesinde boyu 44 cm (-0,73 SD), tartısı 2210 gr (-0,64 SD) ve baş çevresi 31 cm (-0,59 SD) ölçüldü. Hipotelorizm, bilateral anoftalmi/mikroftalmi, belirgin burun kemeri ve kökü, tek *nostril*, küçük ağız, aşağı çekik ağız komissürleri, sekonder alveolar kemer, mikrognati izlendi. Lingual ve superiyor labiyogingival frenulum izlenmedi ve inferiyor labiyogingival frenulum hipoplazik izlendi. Heliksleri katlantılı, antitragusları belirgin ve düşük yerleşimli kulaklar mevcuttu. Bilateral çentikli simian çizgisi, bilateral el 5. parmakta klinodaktili saptandı. Klitoris ve labium minuslar hipoplazik izlendi ve tek ürogenital açıklık saptandı.



Şekil 28: Olgu 4'ün klinik muayene bulguları. 35 haftalık dişi fetus. A-B: Hipotelorizm, bilateral anoftalmi/mikroftalmi, belirgin burun kemeri ve kökü, tek nostril, küçük ağız, aşağı çekik ağız komissürleri, sekonder alveolar *ridge*, mikrognați. Heliksleri katlantılı, antitragusları belirgin ve düşük yerleşimli kulaklar. C: Çentikli Simian çizgisi. D: Klitoris ve hipoplazik labiyum minuslar ve tek ürogenital açıklık.

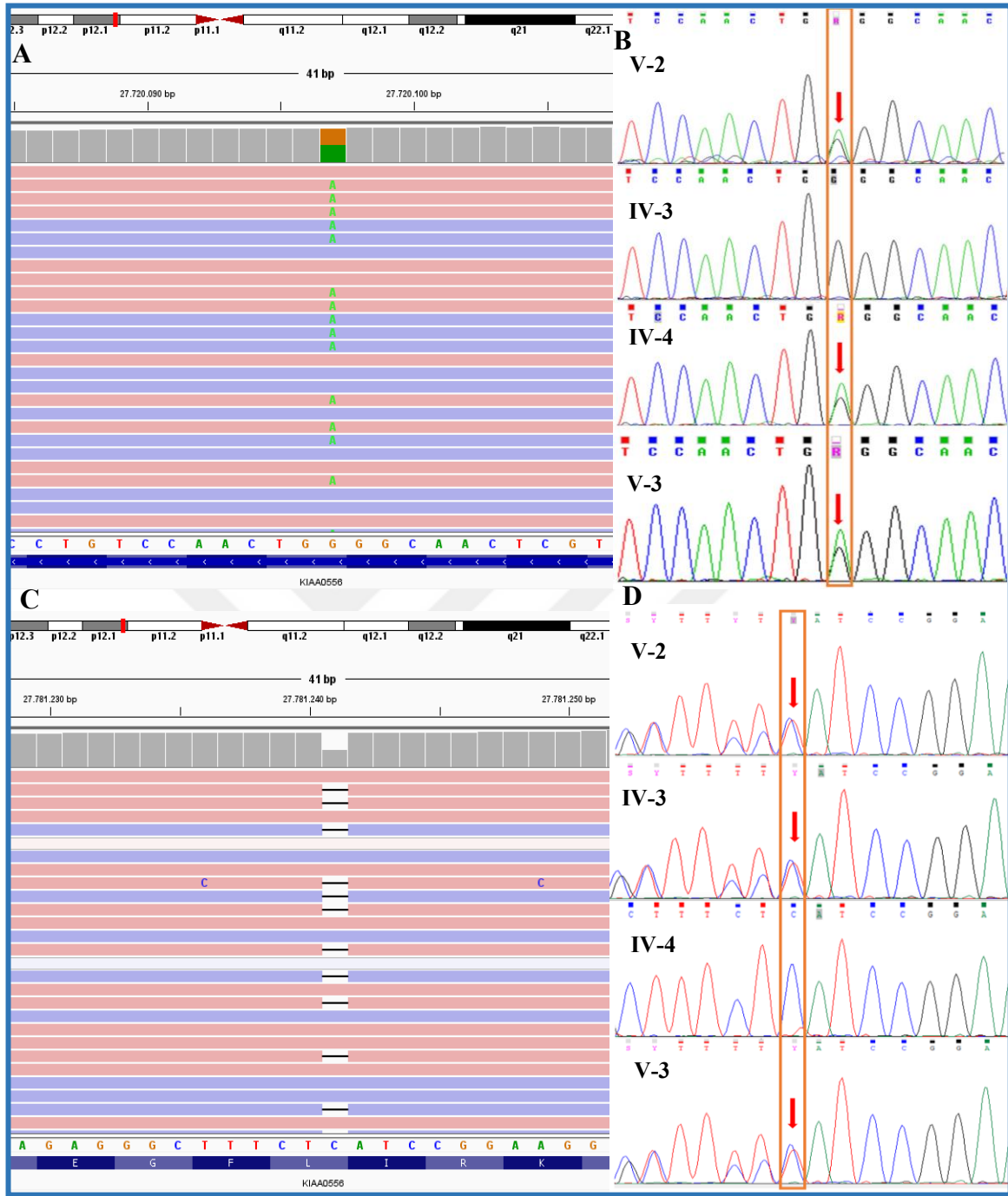
Moleküler Bulgular

İndeks olgumuza yapılan TED analizinde *KATNIP* (*KIAA0556*) geninde (16p12.1, *katanin-interacting protein*, NM_015202.5) ekzon 13'te heterozigot c.1461G>A (p.Trp487*) ve ekzon 21'de heterozigot c.4035delC/p.(Ile1346Serfs*36) varyantları saptandı. Bu varyantlar Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde ve bulguları olan erkek çocuklarında (V-3) yapılan incelemede, annede ekzon 21'deki, babada ise ekzon 13'teki varyantlar heterozigot formda ve V-3'te birleşik heterozigot formda saptandı. *KATNIP* geni, evrimsel olarak korunmuş yeni bir siliyer protein kodlar. İnsanda bu protein, silia tabanında bulunur ve siliyer uçta zenginleştirilir. Protein in vitro olarak mikrotübüllere bağlanır ve aşırı ifade edildiğinde stabiliteyi düzenler. Bu gendeki *null* bir patojenik varyant, ayırt edici bir orta arka beyin ve serebellar malformasyon ile karakterize edilen ve ayrıca sıklıkla daha geniş siliyopati semptomlarıyla ilişkilendirilen resesif bir hastalık olan Joubert sendromu 26 (MIM#616784) ile ilişkilendirilmiştir.

Tablo 31: Olgu 4'te saptanan *KIAA0556* (*KATNIP*) varyantlarına ait bilgiler.

Gen (Transkript)	Varyant Nükleotit peptit	dbSNP ID	ACMG	In-silico			Referans
				MT (score)	SIFT (score)	GERP (score)	
<i>KIAA0556</i> (<i>KATNIP</i>) (NM_015202.5)	c.1461G>A p.(Trp487*)	rs14884924 76	LP PVS1, PM2	D (1.0)	-	U (5.49)	<i>Novel</i>
<i>KIAA0556</i> (<i>KATNIP</i>) (NM_015202.5)	c.4035delC p.(Ile1346Serfs*36)	-	LP PVS1, PM2	-	-	-	<i>Novel</i>

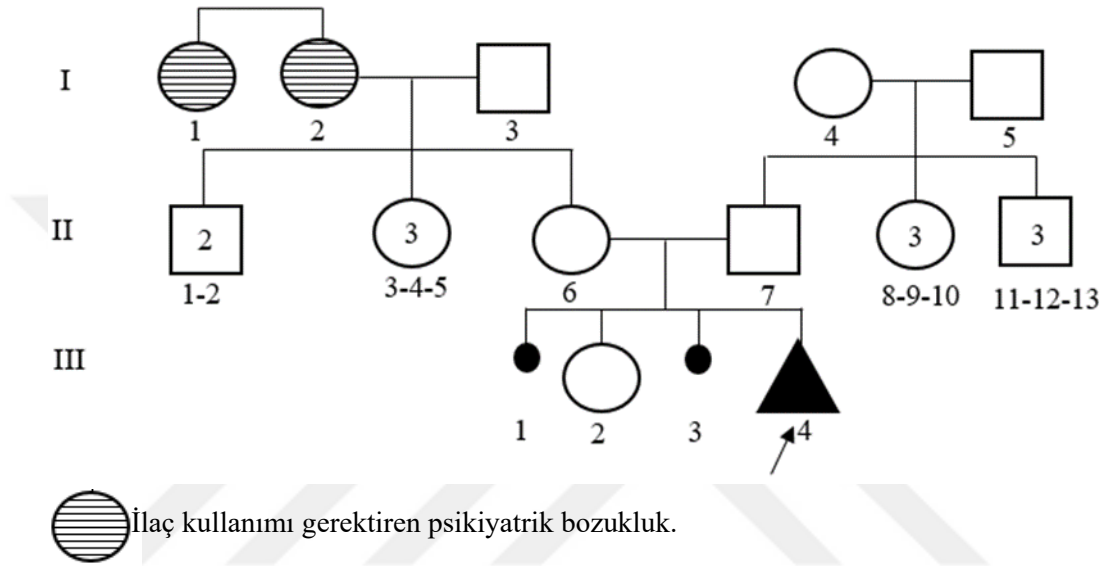
LP, Likel pathogenic; MT, MutationTaster; D, Damaging/Deleterious; U, Uncertain.



Şekil 29: Olgu 4'e ait moleküler analiz sonuçları. (A) İndeks olguda (V-2) *KATNIP* (*KIAA0556*) geninde saptanan c.1461G>A değişiminin IGV görüntüsü izlenmektedir. (B) Sanger dizileme ile fetal olgunun (V-2), baba (IV-4) ve etkilenmiş erkek kardeşin (V-3) c.1461G>A değişimini heterozigot taşıdığı, annenin (IV-3) homozigot normal olduğu görülmektedir. (C) İndeks olguda (V-2) *KATNIP* (*KIAA0556*) geninde saptanan c.4035delC değişiminin IGV görüntüsü izlenmektedir. (D) Sanger dizileme ile fetal olgu (V-2), anne (IV-3) ve etkilenmiş erkek kardeşin (V-3) c.4035delC değişimini heterozigot taşıdığı; babanın (IV-4) ise homozigot normal olduğu görülmektedir.

4.5.5.Olgu 5

Aralarında akrabalık olmayan 31 yaşında sağlıklı anne ve 28 yaşında sağlıklı babanın 4. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G4 P1 A2 TT1). Ailenin ilk gebeliğinin ektopik gebelik olduğu, 2. gebeliğinden 2008 doğumlu sağlıklı kız çocukları olduğu ve 3. gebeliğinin 8. GH'sında spontan abortus olarak sonlandığı olduğu öğrenildi. Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.



Şekil 30: Olgu 5'e ait aile ağacı.

Postmortem değerlendirme bulguları

17 haftalık dişi fetusun postmortem değerlendirilmesinde boyu 16,5 cm, tartısı 270 g, baş çevresi 12 cm ve kulaç uzunluğu 14 cm olarak ölçüldü. Fetusun ileri derecede masere olması nedeniyle postmortem değerlendirme suboptimal olarak yapılabildi. Glabella üzerinde tek deliği görünen burun benzeri yapı (probosis?), belirgin hipotelorizm, sağda mikroftalmi, solda anoftalmi, ileri derecede küçük ağız (mikrostomi) ve orta hatta yarık dudak izlendi. Oral değerlendirme yapılamadı. Sol önkolda bowing, alt bacaklar ve ön kollar göreceli olarak kısa izlendi. Bilateral ayaklarda başparmakları geri yerleşimliydi. Grafisinde sol ön kolda belirgin radyal ve ulnar bowing, sağ ön kolda hafif radyal ve ulnar *bowing* saptandı.

Moleküler Bulgular

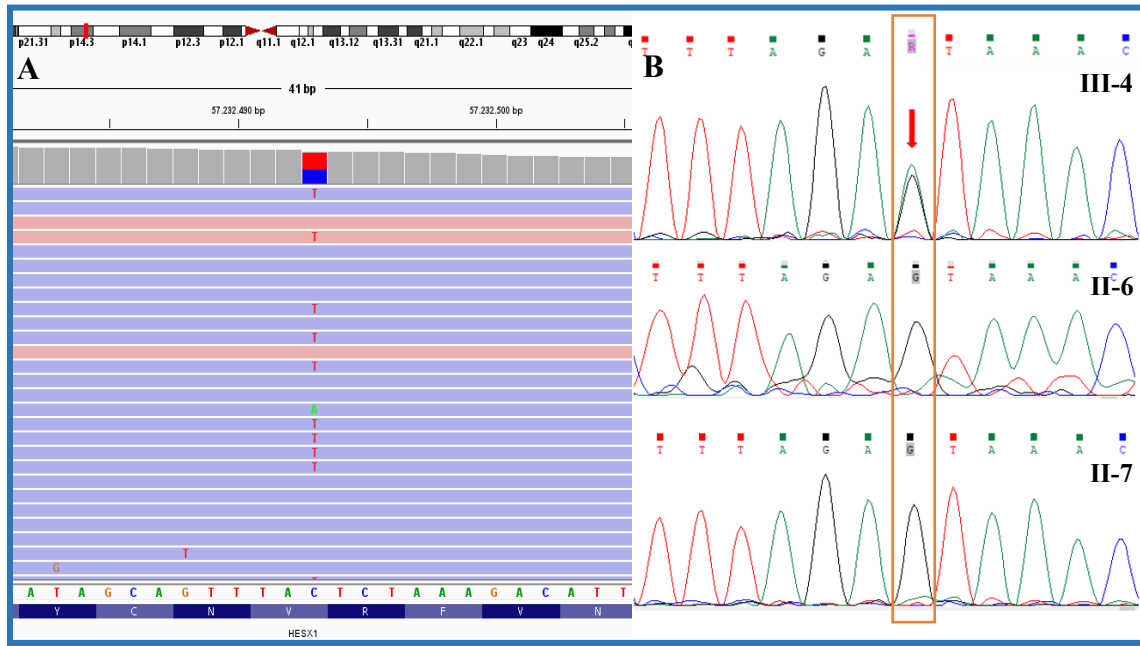
İndeks olgumuza yapılan TED analizinde *HESX1* geni (3p14.3, *HESX homeobox 1*, NM_003865.3) ekzon 3'te c.385G>A/p.(Val129Ile) heterozigot varyantı saptandı ve bu varyant Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde yapılan incelemede, indekste saptanan varyant saptanmadı ve varyantın *de novo* olduğu gösterildi. Bu

gen, gelişmekte olan ön beyin ve hipofiz bezinde transkripsiyonel bir baskılayıcı olan korunmuş bir homeobox proteinini kodlar. Bu gendeki heterozigot patojenik varyantlar Hipofiz anomalileri ile birlikte büyüme hormonu eksikliği (MIM#182230), Kombine hipofiz hormonu eksikliği (MIM#182230) ve Septo-Optik displazi (MIM#182230) fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Olguda gösterilen bu varyant daha önce veri tabanlarında hipotalamik amenore olan olguda bildirilmiştir.

Tablo 32: Olgu 5’te saptanan *HESX1* varyantlarına ait bilgiler.

Gen (Transkript)	Varyant Nükleotit Peptit	dbSNP ID	ACMG	<i>In-silico</i>			Referans
				MT (score)	SIFT (score)	GERP (score)	
<i>HESX1</i> (NM_003865.3)	c.385G>A p.(Val129Ile)	rs143057250	VUS PP2, BS1	D (1.0)	U (0.07)	U (3.81)	274

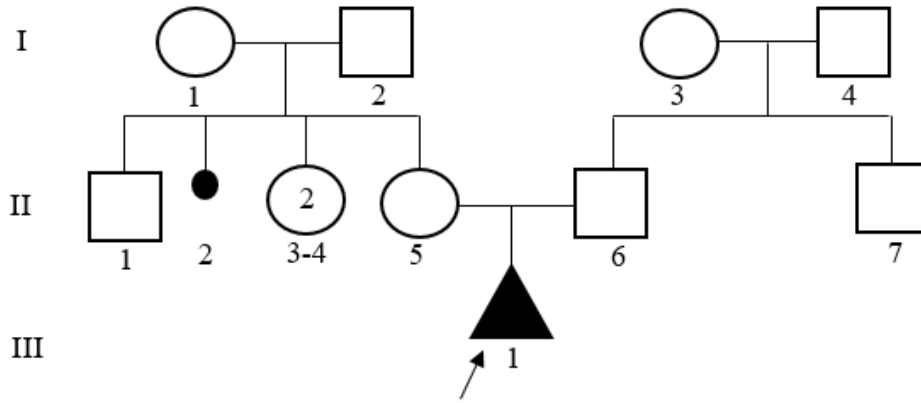
VUS, Variant of uncertain significance; *MT*, MutationTaster; *D*, Damaging/Deleterious; *U*, Uncertain.



Şekil 31: Olgu 5’e ait moleküler analiz sonuçları. Şekil 23: Olgu 2’ye ait moleküler analiz sonuçları ve amino asit dizisinin evrimsel korunumu. (A) İndeks olguda (III-4) *HESX1* geninde saptanan heterozigot c.385G>A değişimin IGV görüntüsü. (B) Sanger dizileme ile fetal olgunun (III-14) *HESX1* geninde c.385G>A değişimini heterozigot taşıdığı; anne (II-6) ve babanın (II-7) ise homozigot normal olduğu görülmektedir.

4.5.6.Olgu 6

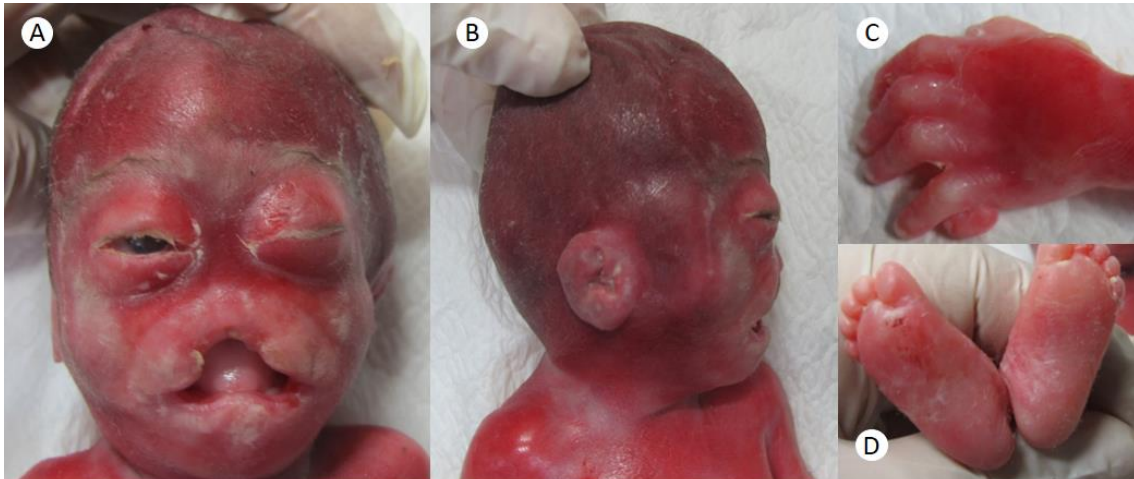
Aralarında akrabalık olmayan 25 yaşında sağlıklı anne ve 26 yaşında sağlıklı babanın 1. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G1TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.



Şekil 32: Olgu 6'ya ait aile ağacı.

Postmortem değerlendirme bulguları

22 haftalık dişi fetusun postmortem değerlendirilmesinde boyu 25 cm, tartısı 340 gr, başçevresi 16,5 cm ölçüldü. Bilateral proptozis, hipotelorizm, arini, orta hatta geniş yarık dudak, eşlik eden komplet yarık damak ve bilateral düşük kulaklar izlendi. Bilateral çentikli simian çizgisi, sol elde metakarpofalangeal eklem hizasından çıkan, tırnak yapısı bulunan postaksiyel polidaktili ve proksimal yerleşimli hafif hipoplazik başparmak izlendi. Bilateral ellerde 2-5. parmaklar arasında proksimal interfalangeal eklemlerde hafif ekstansiyon kısıtlılığı, ayaklarda bilateral pes valgus ve fırlak topuk izlendi. Grafisinde nazal kemik izlenmedi.



Şekil 33: Olgu 6'nın klinik muayene bulguları. 22 haftalık dişi fetus. A-B: Bilateral proptozis, hipotelorizm, arini, orta hatta geniş yarık dudak, eşlik eden komplet yarık damak ve bilateral düşük kulaklar. C: Sol elde metakarpafalangeal eklem hizasından çıkan, tırnak yapısı bulunan postaksiyel polidaktili. D: Bilateral fırlak topuk.

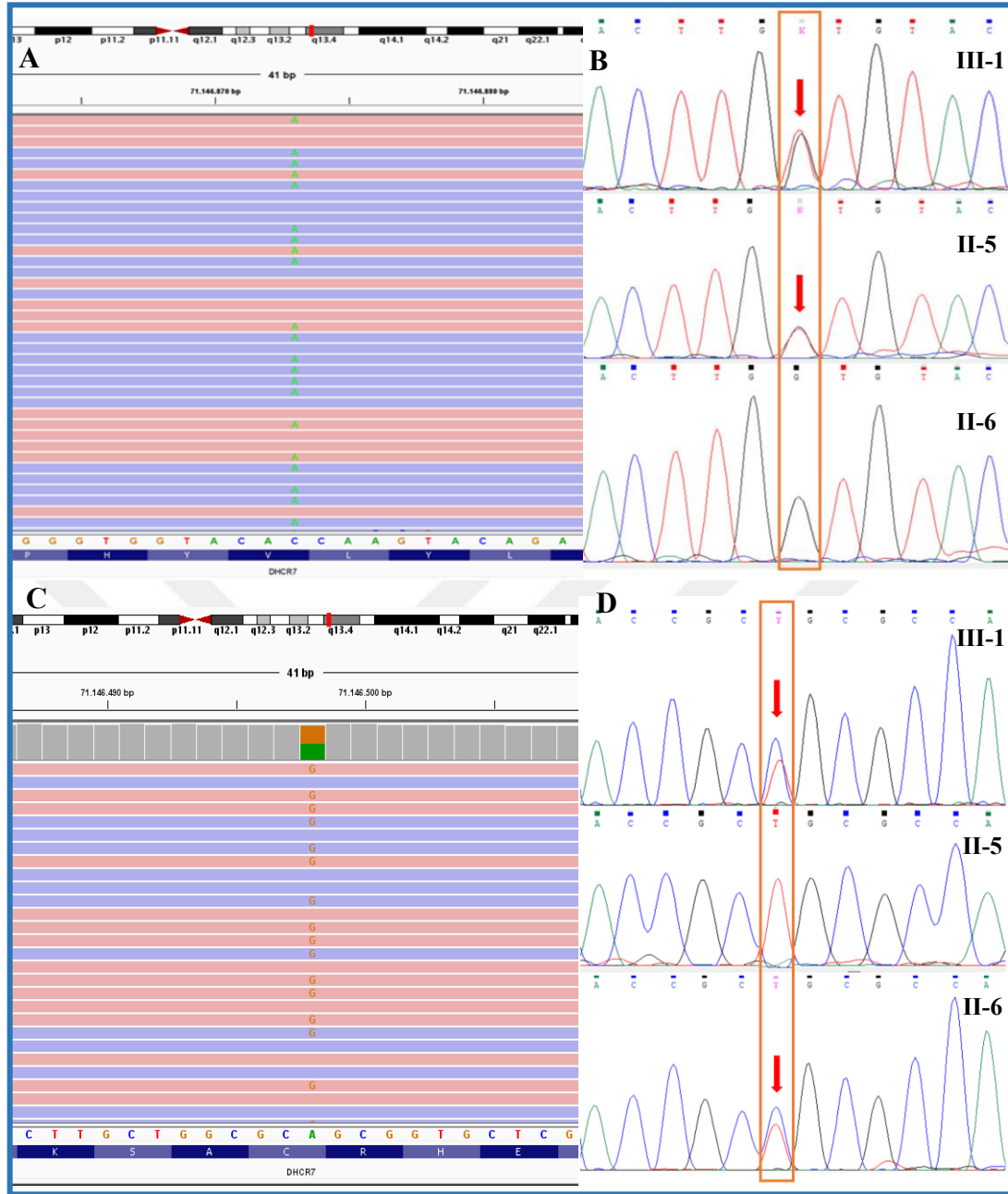
Moleküler Bulgular

İndeks olgumuza yapılan TED analizinde *DHCR7* geni (11q13.4, 7-dehydrocholesterol reductase, NM_001360.3) ekzon 9'da heterozigot c.1351T>C/p.(Cys451Arg) ve heterozigot c.976G>T/p.(Val326Leu) varyantları saptandı. Bu varyantlar Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde yapılan incelemede, annede (II-5) c.976G>T varyantı, babada ise c.1351T>C varyantı saptanarak indekste varyantların birleşik heterozigot formda olduğu gösterildi. *DHCR7* geni, 7-dehidrokolesterolü (7-DHC) kolesterole dönüştüren memeli sterol biyosentezinin sondan bir önceki enzimi olan delta-7-sterol redüktazı kodlar. Bu gen her yerde eksprese edilir ve transmembran proteini endoplazmik retikulum membranına ve nükleer dış membrana lokalize olur. Bu gendeki bi-allelilik patojenik varyantlar Smith-Lemli-Opitz sendromu (SLOS) (MIM#270400) ile ilişkilendirilmiştir. Olguda gösterilen bu varyantlar daha önce veri tabanlarında bildirilmiştir.

Tablo 33: Olgu 6'da saptanan *DHCR7* varyantlarına ait bilgiler.

Gen (Transkript)	Varyant Nükleotit Peptit	dbSNP ID	ACMG	<i>In-silico</i>			Referans
				MT (score)	SIFT (score)	GERP (score)	
<i>DHCR7</i> (NM_001360.3)	c.976G>T p.(Val326Leu)	rs80338859	P PP5, PM2, PM5, PM1, PP3, PP2	D (1.0)	D (0)	U (5.08)	275
<i>DHCR7</i> (NM_001360.3)	c.1351T>C p.(Cys451Arg)	rs761458977	P PP5, PP3, PM2, PM1, PP2	D (1.0)	U (0.001)	U (5.12)	276

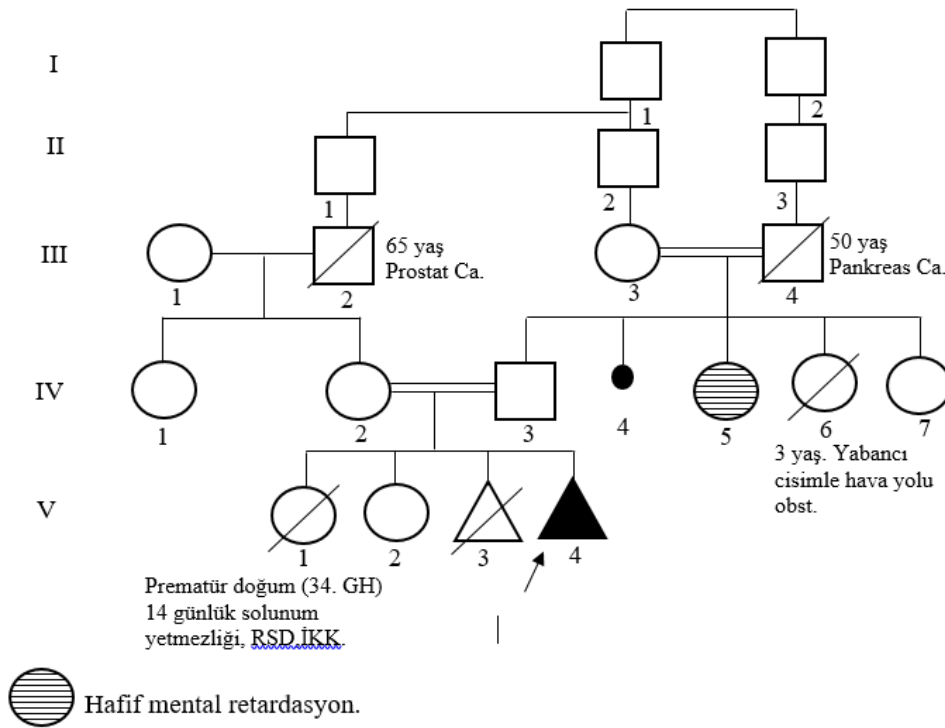
P, Pathogenic, D, Damaging/Deleterious; U, Uncertain



Şekil 34: Olgu 6'ya ait moleküler analiz sonuçları. (A) İndeks olguda (III-1) *DHCR7* geninde saptanan c.976G>T değişiminin IGV görüntüsü izlenmektedir. (B) Sanger dizileme ile fetal olgunun (III-1) ve annenin (II-5) c.976G>T değişimini heterozigot taşıdığı, babanın (II-6) homozigot normal olduğu görülmektedir. (C) İndeks olguda (III-1) *DHCR7* geninde saptanan c.1351T>C değişiminin IGV görüntüsü izlenmektedir. (D) Sanger dizileme ile fetal olgu (III-1), babanın (II-6) c.1351T>C değişimini heterozigot taşıdığı; annenin (II-5) ise homozigot normal olduğu görülmektedir.

4.5.7.Olgu 7

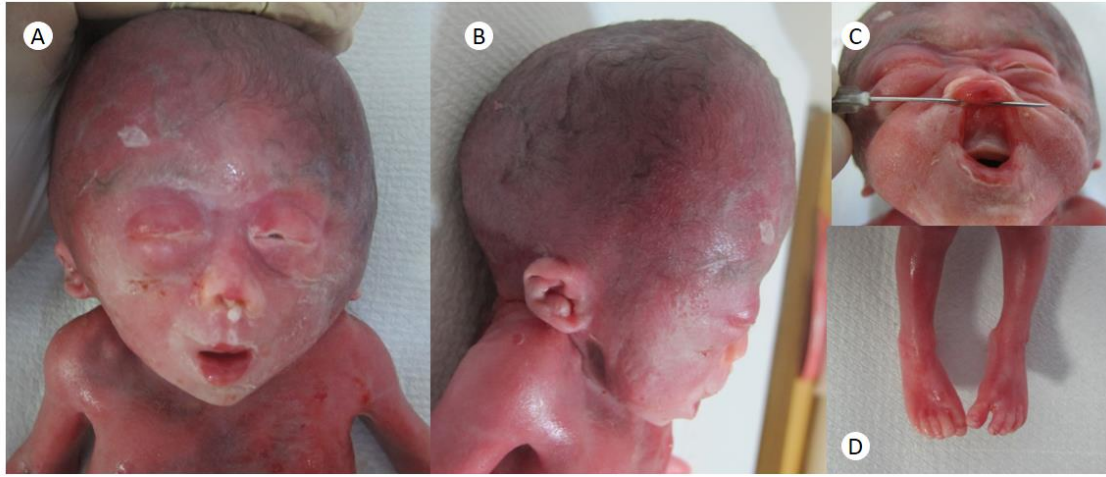
Aralarında 2° kuzen evliliği bulunan 27 yaşında koroner arter hastalığı öyküsü olan anne ve 32 yaşında sağlıklı babanın 4. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G4 P2 IUMF1 TT1). Ailenin 1. gebeliğinden 2004 yılında prematür (32 haftalık) doğum, RDS ve İKK öyküsü olan 14 günlükken eks olan olgu, 2. gebeliğinden 2005 doğumlu sağlıklı kız çocuğu, 3. gebeliğinde 32.GH'sında IUMF olduğu öğrenildi. Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi. Annede bilinen romatizmal mitral kapak ve hafif mitral yetmezlik öyküsü olduğu ve 18-24. GH'ları arasında düşük moleküler ağırlıklı heparin kullandığı öğrenildi. Ayrıca annenin 2. gebeliğinden sonra akut miyokard infarktüsü öyküsü olduğu öğrenildi.



Şekil 35: Olgu 7'ye ait aile ağacı.

Postmortem değerlendirme bulguları

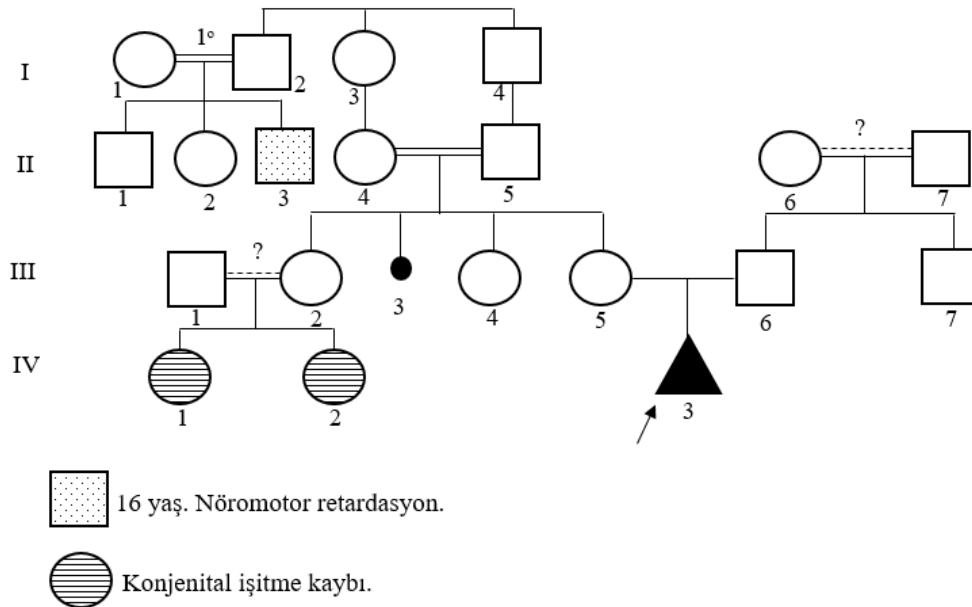
26 haftalık erkek fetusun postmortem değerlendirmesinde boyu 28 cm (-2,3 SD), tartısı 640 g (-1,02 SD) başçevresi 23 cm (-0,16 SD) ölçüldü. Düşük frontal saç çizgisi, lateralde kaşlarla birleşmiş saçlar izlendi. Düz yüz profili, hipotelorizm, proptozis, düz ve basık burun kökü, hipoplazik ve kısa kolumella, düz ve uzun filtrum izlendi. Labial frenulumlar izlenmedi. Sekonder alveoler ridge, dar ve yüksek damak saptandı. Kısa ve kalın boyun yapısı izlendi. Sol ayakta sandal gap saptandı.



Şekil 36: Olgu 7'nin klinik muayene bulguları. 26 haftalık erkek fetus. A-B: Düz yüz profili, hipotelorizm, proptozis, düz ve basık burun kökü, hipoplazik ve kısa kolumella, düz ve uzun filtrum C: Labial frenulumların izlenmemesi. D: Sol ayakta sandal açıklık

4.5.8.Olgu 8

Aralarında akrabalık olmayan 28 yaşında sağlıklı anne ve 30 yaşında sağlıklı babanın 1. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G1 TT1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti öyküsü olmadığı öğrenildi.



Şekil 37: Olgu 8'e ait aile ağacı.

Postmortem değerlendirme bulguları

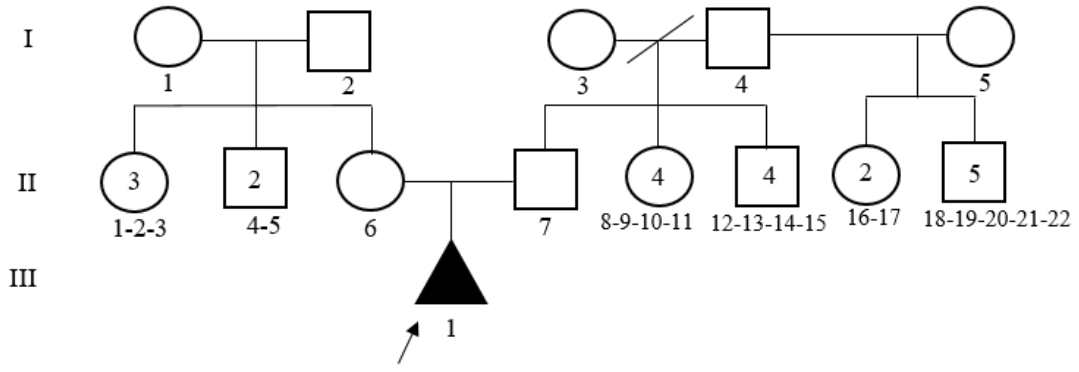
26 haftalık dişi fetusun postmortem değerlendirmesinde boyu 33 cm (-0,29 SD), tartısı 780 g (-0,36 SD), başçevresi 21,5 cm (-1,64 SD) ölçüldü. Yukarı çekik palpebral fissürler, hipertelorizm, uzun filtrum izlendi. El parmakları patülöz sonlanmaktaydı ve bilateral el 5. parmaklarda klinodaktili izlendi. Sağ ayakta parmaklar laterale deviye, solda hafif pes ekinus saptandı. El ve ayak tırnakları hipoplazik izlendi.



Şekil 38: Olgu 8'in klinik muayene bulguları. 26 haftalık dişi fetus. A-B: Yukarı çekik palpebral fissürler, hipertelorizm, uzun filtrum. C: Patülöz sonlanan el parmakları ve 5. parmakta klinodaktili. D: Hafif pes ekinus deformitesi.

4.5.9.Olgu 9

Aralarında akrabalık olmayan 21 yaşında sağlıklı anne ve 25 yaşında sağlıklı babanın 1. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G1 T1). Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi.



Şekil 39: Olgu 9'a ait aile ağacı.

Postmortem değerlendirme bulguları

31 haftalık erkek fetusun postmortem değerlendirmesinde boyu 40 cm (-0,51 SD), tartısı 1400 g (-0,79 SD) ve başçevresi 28 cm (-0,63 SD) ölçüldü. Belirgin metopik suture, yukarı çekik palpebral fissürler, sağda mikroftami, basık ve geniş burun kökü, burun deliklerinden damağa uzanan orta hatta yarık dudak ve damak izlendi. Burun üzerinde skin tag mevcuttu. Sağda preauriküler yaklaşık 1x0,5cm boyutunda dolgun deri katlantısı (*skin tag*), solda preauriküler kıkırdak yapısında 1,5 x1 cm boyutunda iki adet kapalı sinüs (*mirror ear?*) saptandı. Bilateral ayak başparmakları geniş izlendi. Sakral bölgede hipertrikozis ve skin tag izlendi.

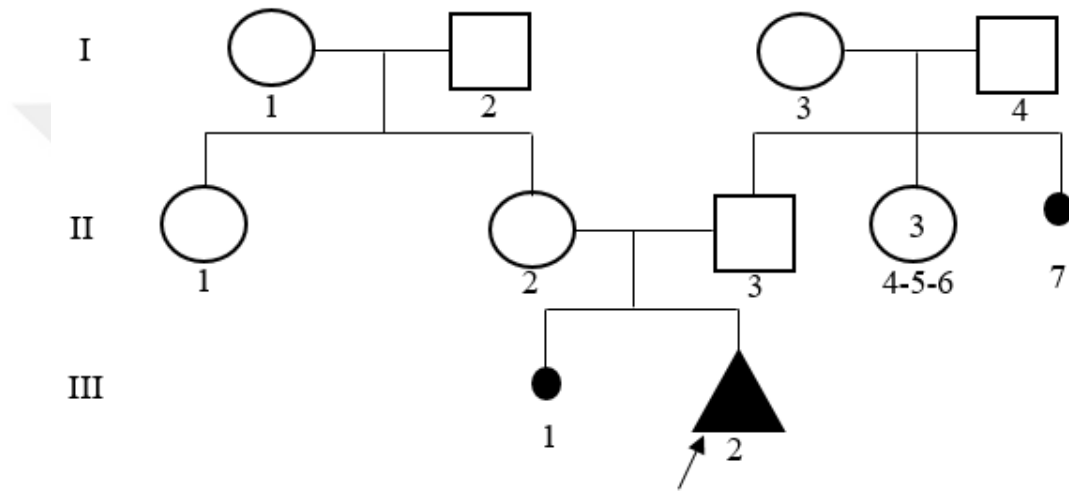


Şekil 40: Olgu 9'un klinik muayene bulguları. 31 haftalık erkek fetus. A: Belirgin metopik suture, yukarı çekik palpebral fissürler, sağda mikroftami, basık ve geniş burun kökü, burun deliklerinden damağa uzanan orta hatta yarık dudak ve damak, burun üzerinde skin tag. B-C: Sağda preauriküler yaklaşık 1x0,5cm boyutunda dolgun deri katlantısı (*skin tag*), solda preauriküler kıkırdak yapısında 1,5

x1 cm boyutunda iki adet kapalı sinüs (mirror ear?). D-E: Geniş ayak başparmakları.

4.5.10.Olgu 10

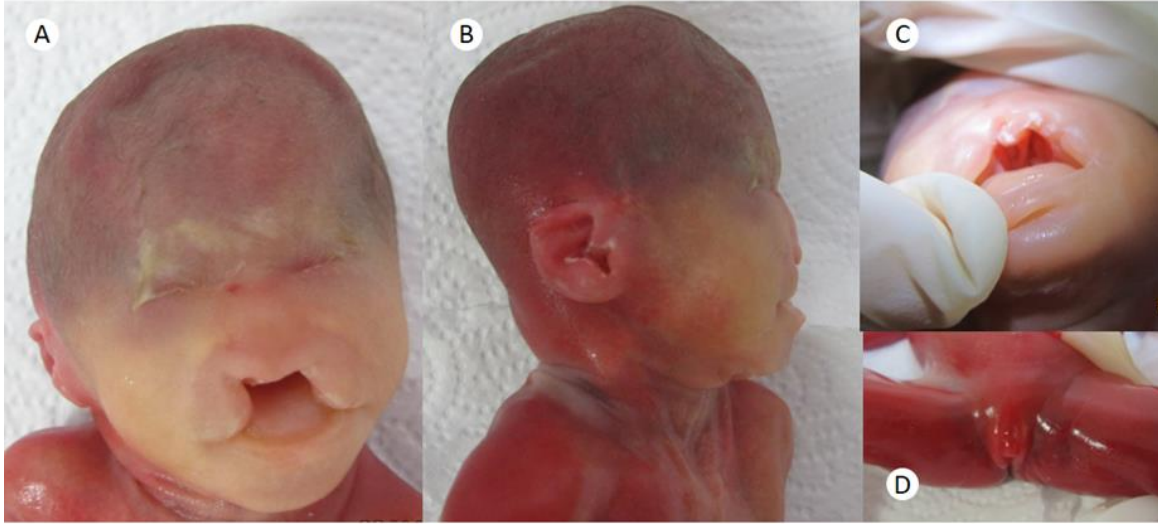
Aralarında akrabalık olmayan 35 yaşında sağlıklı anne ve 43 yaşında sağlıklı babanın IVF ile oluşan 2. gebelik ürünü fetus çalışmamıza dahil edildi (G2 A1 TT1). Ailenin ilk gebeliğinin biyokimyasal gebelik olduğu öğrenildi. Aile öyküsünde benzer etkilenmiş olgu, bilinen maternal hastalık, enfeksiyon/yüksek ateş öyküsü, ilaç kullanımı, radyasyon maruziyeti, abdominal travma öyküsü olmadığı öğrenildi.



Şekil 41: Olgu 10'a ait aile ağacı.

Postmortem değerlendirme bulguları

21 haftalık dişi fetusun postmortem değerlendirmesinde boyu 26 cm, tartısı 380 g (25-50 p.) ve başçevresi 15,5 cm (<2,5 p.) ölçüldü. Mikrosefal görünüm, hipotelorizm, kısa palpebral fissürler, mikroftalmi/anoftalmi? izlendi. Arini benzeri görünüm mevcuttu ancak burun kanatları ve septumun anterior kısmı korunmuştu. Ağız kommissürlerinden burun deliklerinin lateraline uzanan orta hatta yarık dudak ve komplet yarık damak saptandı. Sol elde *sydney* çizgisi, 5. parmakta klinodaktili izlendi. Fetus haricen dişiydi ve belirgin klitorise sahipti.



Şekil 42: Olgu 10'un klinik muayene bulguları. 21 haftalık dişi fetus. A-B: Hipotelorizm, kısa palpebral fissürler, mikroftalmi/anoftalmi?, arini benzeri görünüm (burun kanatları ve septumun anterior kısmı korunmuş). C: Komplet yarık damak. D: Belirgin klitoris

5. TARTIŞMA

HPE, prozensefalonun başarısız ve tam olmayan bölünmesi ile meydana gelen, insanlarda ön beynin en yaygın malformasyonudur. HPE genellikle ilk olarak doğum öncesi ultrasonografik muayenede tanımlanırken, yenidoğan döneminde en sık anormal yüz bulguları ve/veya nörolojik bulguların ileri değerlendirme gerektirmesi ile nörogörüntüleme ile teşhis edilir. Hastalığın etiyopatogenezi oldukça heterojen olup hem genetik hem de çevresel nedenleri içerir. Hastalığın genetik etiyopatogenezinde kromozomal anomaliler, kopya sayısı değişiklikleri, monogenik sendromlar, sendromik olmayan-izole monogenik değişiklikler ve yakın zamanda tarif edilen multiple vuruş ve digenik kalıtım yer alır.

1996'da HPE ilişkili *SHH* geninin keşfini diğer genler *ZIC2*, *SIX3*, *TGIF1* ve *GLI2* genleri takip etmiştir. Bu genleri içeren yolların sonraki çalışmaları, ek HPE genlerinin tanımlanmasına katkıda bulunmuştur. Bazı HPE hastalarında SHH sinyal yolunda yer alan farklı genlerdeki varyantlar (*PTCH1*, *DISP1*, *CDON*, *GAS1*, *BOC*) tanımlanmıştır. Nodal/TGF-beta yolağına ait proteinleri kodlayan *NODAL*, *TDGF1*, *FOXH* genlerinde ilişkili birkaç varyant bildirilmiştir. Fibroblast büyüme faktörü yolunun HPE'deki önemi, *FGF8* ve *FGF8*'in reseptörü *FGFR1*'de tanımlanan varyantlar aracılığıyla gösterilmiştir. Daha yakın zamanlarda, primer siliya oluşumunda yer alan bir gen olan *STIL* genindeki varyantlar da HPE ailelerinde bildirilmiştir (11). Yakın tarihlerde yapılan farklı çalışmalarda *PLCH1* genindeki bi-allelilik patojenik

varyantlar, *CNOT1* genindeki mono-allelık patojenik varyantlar ve X'e bağlı kalıtılan *STAG2* genindeki patojenik varyantlar HPE fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir (238, 239, 240, 241).

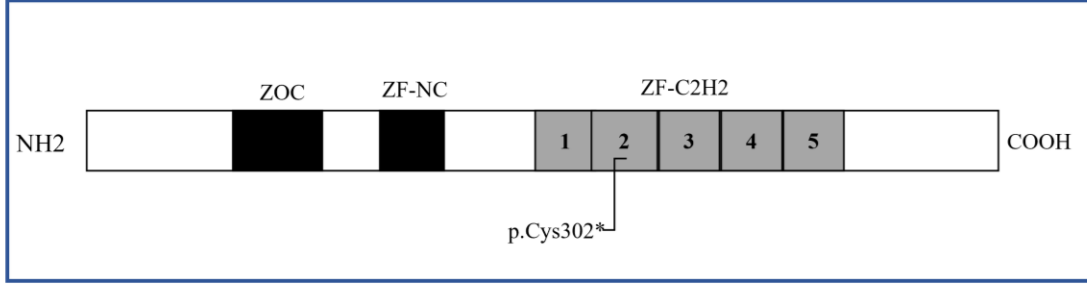
Olgularda belirgin ekspresivite değişkenliği, genotipik ve fenotipik heterojenitenin yanında genetik dışı faktörlerin de etkin olması bu grupta moleküler etiyolojinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. TED analizlerinin yaygınlaşması ile HPE'nin genetik temellerinin anlaşılması hızlanmıştır. Çalışmamız kapsamında, prenatal takipleri ve postmortem muayeneleri merkezimizde yapılmış olan HPE grubunda değerlendirilen 10 fetusta genetik etiyopatogenezin aydınlatılması planlanmış ve bu fetal olgulara solo-TED analizi yapılarak veriler incelenmiştir. Altı olguda fenotip ile ilişkili olabilecek genlerde 10 varyant tespit edilmiştir. Dört olgumuzda ise klinik ile ilişkili olabilecek varyant saptanmamıştır. Genetik ilişki gösterilen olguların dördünce saptanan varyantlar heterozigot formda iken, ikisinde birleşik heterozigot formda bulunmuştur. *ZIC2*, *PTCH1*, *SHH*, *SIX3*, *GLI2* ve *KATNIP* geninde saptanan yedi varyant literatürde daha önce bildirilmemiştir. ACMG kriterlerine göre *novel* nitelikteki yedi varyanttan beşi olası patojenik, ikisi VUS olarak sınıflandırılmıştır.

Prenatal dönemde USG'de alobar HPE saptanarak termine edilen, postmortem değerlendirmede ek olarak fasiyal dismorfik bulgular saptanan, karyotip ve array-CGH analizleri normal sonuçlanan Olgu 1'de ön planda monogenik-nonsendromik HPE düşünölmüştü. Olgu 1'e ait TED analizinde *ZIC2* (*zinc finger protein of cerebellum 2*) geninde heterozigot c.906C>A/p.(Cys302*) ve *PTCH1* (*patched 1*) geninde heterozigot c.1409G>T/p.(Gly470Val) değişimleri saptandı ve bu varyantlar Sanger dizi analizi ile doğrulandı. Ebeveynlere yapılan segregasyon analizinde her iki varyantın indekste *de novo* oluştuğu göröldü.

ZIC2 (MIM*603073), 13q32.3 bölgesinde yer alan ZIC ailesinin bir üyesi olan C2H2 tipi çinko parmak proteinlerini kodlar. Bu protein, transkripsiyonel bir baskılayıcı olarak işlev görür ve dopamin reseptörü D1'in dokuya özğü ifadesini düzenleyebilir. Bu gen *Drosophila odd-paired* (opa) geninin ve zebra balığı *odd-paired-like* (opl) geninin bir homologudur. Zic gen ailesi, Gli proteinlerine bazı benzerlikler taşıyan çinko parmak proteinlerinden oluşur ve Zic2, nöroepitelyumda ifade edilir. Bu transkripsiyon faktörü geninin ön beyin bozukluğuna neden olduğu, 13q-delesyonlarını içeren HPE vakalarında belirlenen 13q32 kritik bölgesi içinde haritalanan aday genlerin mutasyonel taramasıyla ortaya konmuştur (163, 277).

Drosophila Opa ve insan Zic protein domainleri korunmuştur. Zic ailesindeki proteinlerin tümü, beş Cys2His2 tipi çinko parmaktan oluşan korunmuş çinko parmak domaini (*zing finger domain*, ZFD) içerir. Çinko parmak bölgesi, diziye özgü bir DNA bağlama domaini olarak işlev görür. Çinko parmak alanları dışında, iki korunmuş bölge daha mevcuttur. Bunlar N-terminal *flanking* bölgesi (ZF-NC) ve ZOC (*Zic opa conserved motif*) alanıdır. ZF-NC'nin işlevi bilinmemekle beraber, ZOC domaininin transkripsiyonel aktivasyona dahil olduğu ileri sürülmüştür. ZFD'ler çok sayıda ökaryotik proteinde bulunur ve Zic ailesi proteinleri, art arda tekrarlanan beş adet ZFD içerir (278, 279). C2H2-ZF birimleri, amino terminalinden karboksi terminaline kadar ZF1, ZF2, ZF3, ZF4 ve ZF5 olarak belirtilir. Sekans koruması ZF2-ZF5'te ZF1'den daha yüksektir (280). ZF1, iki sistein kalıntısı arasındaki aminoasit dizilerinin sayısının değişken şekilde arttığı dikkate değer bir özelliğe sahiptir. ZF1 ve ZF2, ilk sistein kalıntısından itibaren +2 pozisyonlarında kesinlikle korunmuş triptofan kalıntıları içerir. Bu dizi özelliği tandem CWCH2 (tCWCH2) olarak adlandırılmıştır ve ZF1 ile ZF2 arasındaki etkileşime aracılık ettiği tahmin edilmektedir (281). ZF2-5, kesinlikle korunmuş ek aminoasit dizileri içerir. Zic ZFD'ye DNA bağlama, protein bağlama, transkripsiyonel aktivasyon ve nükleer lokalizasyon dahil olmak üzere çeşitli işlevler atanmıştır. (280, 282). ZOC alanı, ZFD'den uzak olan amino terminal ucunda bulunur. ZOC ilk olarak fare Zic ve sinek *Odd-paired* arasında korunmuş bir alan olarak tanımlanmıştır (283). ZOC alanı, I-mfa proteini ve Pax3 ile etkileşimde görev alır (282, 284).

ZIC2, HPE ile ilişkili saptanabilir genetik varyasyonların en az %3'ünü oluşturur ve yeni sporadik veya ailesel vakaların moleküler değerlendirmesinin bir parçası olarak klinik laboratuvarlarda yaygın olarak taranan *SHH*, *SIX3* ve *TGIF* olmak üzere dört ana genden biridir. Bu gendeki mono-allelilik patojenik değişiklikler Holoprozensefali 5 (MIM#609637) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. HPE'ye neden olan *ZIC2* mutasyonlarının bazıları çinko parmak alanlarında veya çerçeve kaymalarının bir sonucu olarak onları bozarak tanımlanmışken, diğerleri poli-alanın yollarını kodlayan *ZIC2* bölgesindedir (285). Şekil 43'te Zic proteinin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumu şematik olarak gösterilmiştir.



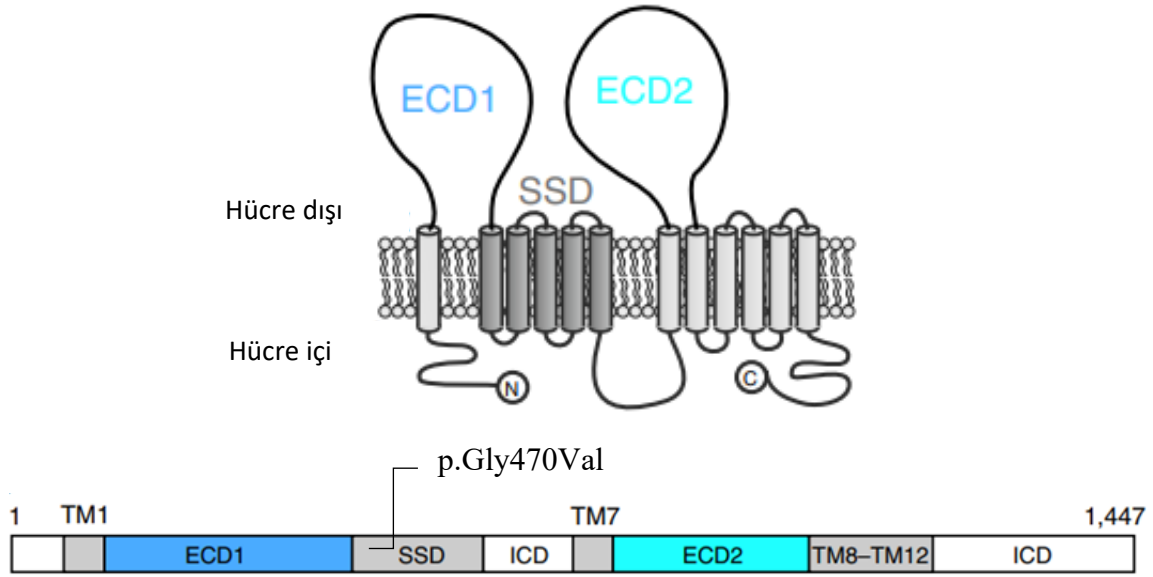
Şekil 43: Zic proteinin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi (286).

Olgumuzda saptanan varyant ZFD2 bölgesinde yer almaktadır. Mutasyon tipi ve lokasyonunun analizleri, çinko parmak bölgesinin (ZFD) fonksiyonel önemini altını çizmektedir ve tüm ZIC2 mutasyonlarının %45,71'i ZFD'de meydana geldiği saptanmıştır. Ayrıca, bu gendeki hiçbir anlamsız mutasyon ve çoğu çerçeve kayması mutasyonu proteine çevrildiğinde tam bir ZFD üretilmez (287). Literatürde bu bölgede alobar, semilobar ve bilinmeyen tipte HPE vakaları bildirilmiştir (288). *ZIC2* geninde şu ana kadar 150'ye yakın değişim tanımlanmış olup bunların büyük kısmını yanlış anlamlı, anlamsız ve küçük delesyon tipi varyantlar oluşturur (2, 226).

Farede *Zic2* ortologunun gelişimsel rolleri üzerine yapılan son çalışmalar, normal gelişim sırasında bu transkripsiyon faktörünün farklı rollerini aydınlatmıştır. Bu roller, erken bir dönemde *Zic2 null* alelli tarafından ortaya konan aksiyal orta hattın gelişimi ile ilişkili rol ve daha sonra dorsal telensefalik gelişimde bir hipomorfik alellin karakteristiği olarak kabul edilen HPE'nin anatomik olarak farklı bir varyantı olan MIHV olarak fenotipe yansıyan diğer roldür (289, 290, 291). Farelerde yapılan çalışmalarda, bir homozigot hipomorfik *Zic2* mutant hattı normal gastrulasyon ve daha sonraki aşamalarda dorsal ön beyin malformasyonları göstermişken; *Zic2 null* alelleri için heterozigotlukta fenotip normal görülmüştür (292). Bu nedenle, farelerde her iki alelin kaybını takip eden siklopi ve ön beyin anomalilerinde, Sonic hedgehog gibi ön beyin modelleme aktiviteleri üzerinde daha sonraki aşamada ikincil etkilerle fenotipin belirlenebileceği öne sürülmüştür. Ancak *Zic2* ve *Shh* bileşik mutantları arasındaki genetik etkileşimlerde herhangi bir sinerji gösterilememiştir, bu durum bu faktörlerin paralel olarak hareket ettiğini, ancak doğrudan bağlantılı moleküler yollarda olmadığını düşündürmektedir. *Zic* ve *Gli* faktörlerinin çinko parmak alanları aynı hedef dizilere bağlanır ve bu gerçekler *Zic2*'nin hedgehog sinyallerinin muhtemel bir aşağı akış efektörü olduğunu göstermektedir (293, 294, 295). Fare modelinde HPE fenotipi üretmek için *Zic2*'nin her iki kopyasının kaybının bir ön koşul olduğunu net bir şekilde anlamamıza rağmen, insanda *ZIC2*

geninin her iki kopyasının aynı anda kaybının hiçbir örneği bugüne kadar bildirilmemiştir. HPE ile ilişkili diğer genler ile ZIC2’de eşzamanlı genetik varyasyonu olan vakalar da literatürde oldukça nadir bildirilmiştir. Bu nedenle bu olgulardaki geniş fenotipik bulguları açıklamak için önerilen ikinci vuruş ve çevresel faktörlerin etkisi hipotezleri patogenezi anlamlandırmak açısından öne sürülmektedir (226).

PTCH1, *Drosophila patched-1* geninin insan homoloğu ve Shh sinyal ağının bir parçasıdır. Ekzon 1’de transkripsiyonel başlangıç bölgesi ve ekzon 23’te sonlandırma bölgesi ile 24 ekzon içerir ve Hh yolunun bir parçası olan 1447-amino asitlik bir transmembran glikoproteinini kodlar. 9q22.3 bölgesinde yer alan *PTCH1*, SHH’nin ligand olduğu 12 geçişli bir transmembran proteindir. Hh yolu, hücre farklılaşmasını, doku polaritesini ve hücre proliferasyonunu kontrol eden embriyonik gelişim ve tümör oluşumunda anahtar bir düzenleyicidir (296). 1447 amino asitten oluşan tam uzunluktaki insan *Ptch1*’in (h*Ptch1*) 12 transmembran domain (TMD), iki ekstraselüler domain (ECD) ve iki intraselüler domain (ICD) içerdiği tahmin edilmektedir (297). ECD, Hh proteininin *PTCH1* proteinine bağlanma bölgeleridir (298). TMD, 12 transmembran heliksten oluşur ve bunların beşi bir sterol algılayıcı alan (*sterol-sensing domain*, SSD) içerir. SSD, vezikül trafiği ve protein lokalizasyonu ile kolesterol homeostazı, hücre sinyali ve sitokinez gibi çeşitli işlemler arasında bağlantı kurmada yer alan düzenleyici bir alan olarak işlev görüyor gibi görünse de tam etki şekli net değildir. Olgumuzda saptanan varyant *PTCH1* proteininin SSD’de yüksek düzeyde korunmuş bir amino asidi etkiler, bu da bu konumdaki bir genetik varyantın muhtemelen zararlı olduğunu düşündürür (299). Literatürde lobar HPE kliniği ile SSD’inde bölgesinde değişim bildirilmiş bir olgu olup intraselüler veya ekstraselüler domainde yer alan *PTCH1* geninde HPE ile ilişkili az sayıda varyant tanımlanmıştır (300). Şekil 44’te *Ptch1* proteinin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumu gösterilmiştir.

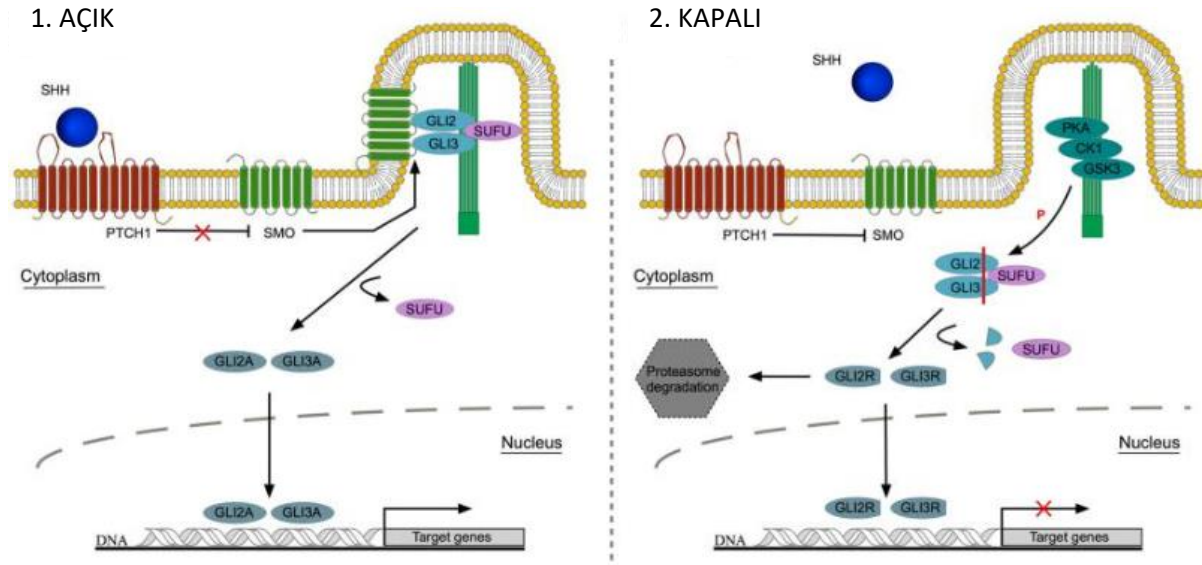


Şekil 44: Ptch1 proteinin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi (301).

ECD, Ekstraselüler domain, ICD, intraselüler domain, TM, transmembran heliks, SS, sterol algılayıcı domain.

PTCH1 geni Bazal hücreli karsinom, somatik (#MIM 605462), Bazal hücreli nevüs sendromu 1 (#MIM 109400), Holoprozensefali 7 (#MIM 610828) fenotipleri ile ilişkilidir. Ayrıca bu gendeki varyantlar literatürde nevoid bazal hücreli karsinom sendromu, izole bazal hücreli karsinom, medulloblastom, menenjiyom, nöroektodermal tümör, meme karsinomu, özofagus skuamöz hücreli karsinom ve trikoepitelyoma klinikleri olan olgularda da bildirilmiştir. *PTCH1* geninde 600'ün üzerinde varyant tanımlanmış olup bunların büyük kısmını yanlış anlamlı, anlamsız ve küçük delesyon tipi varyantlar oluşturur. Bu varyantların büyük çoğunluğu nevoid bazal hücreli karsinom sendromu, ile ilişkilendirilmiştir. *PTCH1* genindeki delesyon veya işlev kaybı mutasyonları nevoid bazal hücreli karsinom sendromu ile ilişkilendirilmişken, HPE, mikrosefali ve gelişimsel gecikme gibi merkezi sinir sistemi anomalileri, bu geni içeren işlev kazanımı mutasyonlarına veya duplikasyonlarına atfedilmiştir (302).

PTCH1 proteininin işlevi, transmembran protein *Smoothed* (SMO)'nun inhibisyonudur. Hücre dışı Hh ligandları, *PTCH1* reseptörüne bağlanarak bu inhibisyonu serbest bırakabilir ve SMO'nun aşağı yönde sinyal vermesine ve GLI transkripsiyon faktörlerini aktive etmesine izin verir. Hh sinyal kaskadı, Hh'nin *Ptch1* proteinine bağlanmasıyla aktive olur (303). *Ptch* kaybı ise, artan Shh sinyal aktivitesine yol açar (166). Şekil 45'te SHH sinyal yolu ile *PTCH1* ilişkisi gösterilmiştir.



Şekil 45: SHH sinyal yolu ile PTCH1 ilişkisi (304). (1) AÇIK durum: SHH proteini, hücre yüzeyi seviyesinde PTCH1 reseptörüne bağlanır. Bu olay, SUFU ayrılması yoluyla GLI aktivasyonunu indüklemek için primer siliyalara hareket edebilen SMO inhibisyonunu ortadan kaldırır. Ardından, GLI2A ve GLI3A, hedef genlerin transkripsiyonunu desteklemek için çekirdeğe doğru yer değiştirir; GLI2A, ana etkinleştirici olarak görev yapar. (2) KAPALI durumu: SHH ligandının yokluğunda, PTCH1 SMO'yu inhibe eder ve GLI'ler, PKA/CK1/GSK3 kompleksi tarafından fosforile edilir. GLI2R ve GLI3R oluşur ve iki olası hedefi takip edebilir: hedef genlerin transkripsiyonunu baskılamak için proteazom bozulması veya çekirdeğe translokasyon. Bu durumda, GLI3R ana baskılayıcıdır.

Literatürde çok sayıda *SHH* geni ile ilişkili HPE tanımlanmış olmasına rağmen daha nadiren *PTCH1* varyantları insan HPE vakalarında tanımlanmıştır. Bu vakaların fenotipi oldukça değişkendir. Ming ve arkadaşları 2002'deki çalışmalarında, büyük ekstraselüler döngülerdeki *PTCH* mutasyonlarının, *PTCH*'nin *SHH*'ye bağlanma yeteneğini etkileyebileceğini ve intraselüler döngülerdeki mutasyonlarının, *PTCH*'nin SMO ile etkileşimini bozabileceğini öne sürmüştür (166).

Daha önce literatürde *ZIC2* ve *PTCH1* patojenik varyant birlikte bildirilen olgu yoktur. Ancak *SHH* genindeki mutasyonlara ek olarak *TGIF* ve *ZIC2*'yi içeren ikinci bir HPE ilişkili gen mutasyonu olan hastaların yanı sıra *GLI2* ve *PTCH1* mutasyonları olan hastalar da literatürde tanımlanmıştır; HPE ile ilişkili iki gende mutasyon varlığında dahi bile, fenotip daha şiddeti artmadan değişken kalmıştır. Bizim olgumuz, iki farklı gendeki varyanta sahip olup alobar HPE ile şiddetli bir fenotip göstermiştir. Fenotipik değişkenlik, HPE vakalarında bir sorun olmaya devam etmekte ve gelişimsel sinyal yollarının zamanlaması ve gücünün yanında genetik çeşitlilik ve çevresel ajanlara maruz kalma arasındaki karmaşık etkileşim de bu senaryoda belirleyici rol oynuyor gibi gözükmektedir (286).

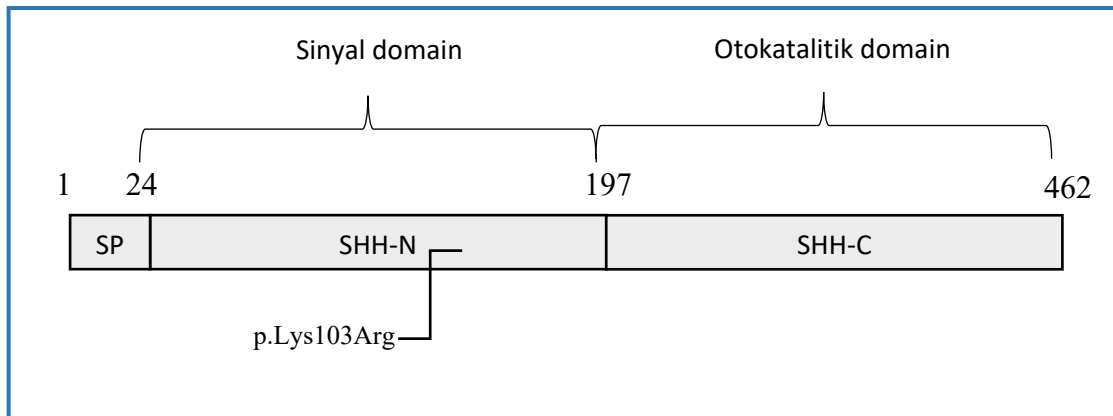
Çalışmamızda Olgu 2’de prenatal dönemde USG’de lobar HPE, hipoplazik CC, hipoplazik CSP, hipotelorizm, mikrosefali saptanmıştı. Postmortem muayenede olguda ek olarak fasiyal dismorfik bulgular dışında majör anomali saptanmamıştı. Karyotip ve array-CGH analizi normal sonuçlanan olgu ön planda nonsendromik-izole monogenik HPE olarak değerlendirilmişti. Bu olguda HPE kliniğini açıkladığı düşünülen *SHH* geninde heterozigot c.308A>G/p.(Lys103Arg) varyantı saptandı. Bu değişim Sanger dizileme yöntemi ile doğrulanmış olup, anne babada segregasyon analizi yapılamamıştır. Olgumuzda saptanan varyant *novel* bir varyanttı. Varyantın olgumuzun kliniği ile uyumlu olması, ACMG sınıflandırmasına göre muhtemel patojenik olması, evrimsel düzeyde korunmuş bir bölgede yer alması nedeniyle klinikle ilişkili olduğu düşünüldü.

SHH 7q36.3 bölgesinde lokalize, gelişim sırasında birkaç noktada hücre kaderlerinin oluşturulmasında yer alan sonic hedgehog kodlar. Bu gendeki patojenik varyantlar Holoprozensefali 3 (MIM#142945) fenotipi ile ilişkilidir. *SHH*, embriyogenez sırasında indükleyici sinyalleri kodlayan *Drosophila* geni 'hedgehog' (hh) ile ilgili bir omurgalı gen ailesine aittir (306, 307). Bu gendeki değişiklikler, insan HPE’inde bulunan ilk genetik etmendir ve sendromik olmayan HPE spektrumuna sahip hastalarda sıkça saptanır. Bu gen HPE ile ilişkili majör gendir; total HPE vakalarının %12,7’si, nokta mutasyonu olan olguların %50’si ve büyük delesyon saptanan olguların %38’ini bu gendeki patojenik değişimler oluşturur (2).

Shh'nin ventral omurilik modelinin kurulmasında, bazal plakanın indüklenmesinde ve motor nöron oluşumunda önemli rol oynadığı ve erken embriyonik gelişimde pek çok işlevi olduğu gösterilmiştir. *SHH* varyantı saptanan ailelerde, eksik penetrans ve son derece geniş fenotipik değişkenlik gözlenir. Bu değişkenlik, HPE’de çevresel faktörler, çoklu vuruş ve digenik kalıtım gibi durumlarla açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu gende bugüne kadar literatürde 300’e yakın değişim bildirilmiş olup bunların çoğunu olgumuzdaki gibi yanlış anlamlı varyantlar oluşturmaktadır. Olgumuzdaki varyant *novel* bir varyanttır ancak literatürde olgumuzda saptanan c.308A>G/p.(Lys103Arg) varyantına yakın konumda yer alan anlamsız Lys105Ter varyantına sahip çok kuşaklı büyük bir aile tanımlamıştır (161). Yine Bizim varyantın konumuna yakın olgumuzdaki gibi yanlış anlamlı c.300G>C/p.(Gln100His) değişimi de novo olarak HPE spektrumuna sahip bir olguda bildirilmiştir (310).

Hedgehog proteinleri iki ana alandan oluşur; bunlar N-terminal ve C-terminal alanlarıdır. Genetik değişiklikler, SHH-N ve SHH-C'nin yanı sıra sinyal peptidinde bulunan kalıntıları etkiler. SHH-N ve SHH-C'deki yanlış anlamlı varyantların, SHH’nin otokatalitik işlenmesinde bir rolü olduğu düşünülmekle beraber bu mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır (308).

SHH işlevleri, ilk olarak *Drosophila*'da olmak üzere kırk yılı aşkın bir süredir kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (309). SHH yolu, insanlar ve birçok deneysel model arasında benzerlikler göstermektedir. Farelerde ve insanlarda %92,4 oranında SHH homolojisi olduğu ve kanonik HH sinyal yolağının ana bileşenlerinin evrimsel olarak korunduğu bildirilmiştir (310). İnsanlarda, bir SHH alelinin kaybı, HPE'ye neden olmak için yeterlidir, oysa farelerde, her iki alelin de kaybı benzer bir fenotip oluşturmak için gereklidir (162). Bunun nedeni muhtemelen SHH ekspresyonunun fare korteksine kıyasla daha büyük ve daha karmaşık insan serebral korteksinde daha yaygın olmasıdır, bu da insanda SHH fonksiyonlarının mutasyonlardan nispeten daha fazla etkilendiği anlamına gelir (311). İnsan olgularında yapılan geniş bir çalışmada, SHH'nin N-terminalini içeren *truncated* mutasyonların, diğer mutasyon tiplerine göre HPE'ye neden olma olasılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, SHH varyantı saptanan olgular karşılaştırıldığında HPE olan hastalara kıyasla HPE saptanmayan olguların da daha fazla olduğu gösterilmiştir (312). Bu durum için muhtemel açıklama, HPE'nin farklı genleri ve çevresel faktörleri içeren iki veya daha fazla olayı gerektiren, çok vuruşlu ve çok genli bir patolojiyi içermesidir (157). Bizim olgumuzda saptanan varyant N-terminal domaininde yer alan yanlış anlamlı bir varyanttır. Dubourg ve arkadaşlarının çalışmasında SHH'de üç anlamsız; üç delesyon ve 11 yanlış anlamlı olmak üzere toplam 17 mutasyon saptanmıştır (237). Şekil 46'da SHH proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumu şematik olarak gösterilmiştir.



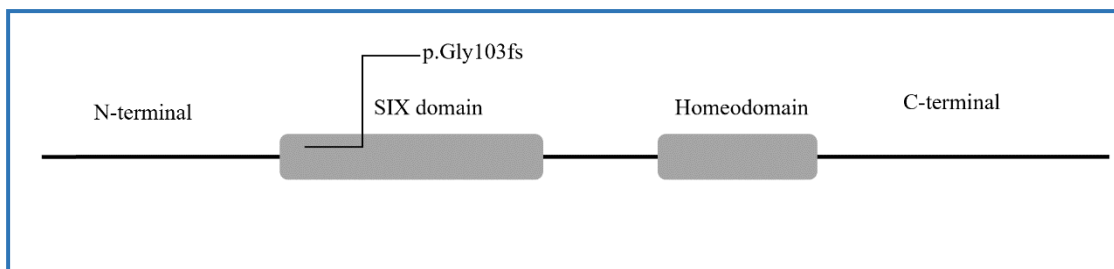
Şekil 46: SHH proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi (313). Sinyal peptidinde (SP, amino asit 1-23) ve sinyalleşme (SHH-N, amino asitler 24-197) ve otokatalitik (SHH-C, amino asitler 198-462) alanlar.

Prenatal USG'de mikrosefali, alobar HPE, arini, hipotelorizm, lens izlenmemesi, yarık damak-dudak saptanarak termine edilen indeks Olgu 3'te postmortem değerlendirmede ek HPE ile uyumlu fasiyal dismorfik bulgular saptanmıştı. Kromozom analizi ve array-CGH analizi

normal sonuçlanan indeks olgumuzda ayırıcı tanıda non-sendromik izole monogenik HPE düşünülmüştü. Olgumuza yapılan TED analizinde *SIX3* geninde heterozigot c.305_306insTCTC p.(Gly103fs) ve *GLI2* geninde heterozigot c.3890A>G/p.(Asn1280Ser) varyantları saptandı. Bu varyantlar Sanger dizileme ile indeks olgumuzda konfirme edildi. Segregasyon amacıyla yapılan incelemeye, indeksin anne ve iki sağlıklı kız kardeşi dahil edildi. Baba da segregasyon çalışması yapılamadı. *SIX3* genindeki varyant anne (II-4) ve iki sağlıklı kız kardeş (III-1,3) saptamazken, *GLI2*'deki varyant anne ve bir sağlıklı kız kardeş (III-3) de saptandı.

SIX3, 2p21 bölgesinde yer alan 2 ekzon, 4.4 kb genomik DNA içeren bir gendir. Bu gen, SHH ifadesinin düzenlenmesi, BMP, Wnt ve Nodal hedeflerinin transkripsiyonel baskısı ve ön beyin gelişimi sırasında hücre kaderini belirlemek için Geminin ile etkileşim dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu gendeki mono-allel patojenik varyantlar insanda HPE 2 (#MIM 157170) fenotipi ile ilişkilidir.

Vertebrallardaki *SIX* genleri, özellikle sineğin gelişen görsel sisteminde ifade edilen *Drosophila* 'sine oculis' (so) geninin homologlarıdır. Six protein ailesinin tüm üyeleri, homeobox alanına ek olarak, SIX alanı olarak adlandırılan yüksek oranda korunmuş bir bölge içerirler (314). SIX gen ailesinin üyeleri hem DNA bağlanma özgülüğünün belirlenmesinde hem de protein-protein etkileşimlerine aracılık etmede yer alabilen, farklı bir DNA-bağlanma homeodomaini ve bir yukarı akış SIX domaini ile karakterize edilen proteinleri kodlar. SIX ailesindeki genlerin vertebra gelişiminde rol oynadığı veya dokuların farklılaşmış durumunun korunmasında rol oynadığı gösterilmiştir (315).



Şekil 47: *SIX3* proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi (90).

SIX3 genindeki patojenik varyantlar, tüm insan HPE vakalarının %1,3'ünü oluşturmaktadır (316). İnsanlarda, *SIX3* genindeki varyantlar inkomplet penetransa sahiptir ve aynı varyanta sahip aileler içinde bile değişken ekspresyon gösterir (317). Lacbawan ve arkadaşlarının 2009'daki HPE'li 800 proband ve akrabalarını içeren çalışmasında, olguların %4,7'sinde *SIX3* geninde patojenik varyant tespit edilmiştir. *SIX3*'teki patojenik varyantlar ile ilişkili HPE, diğer

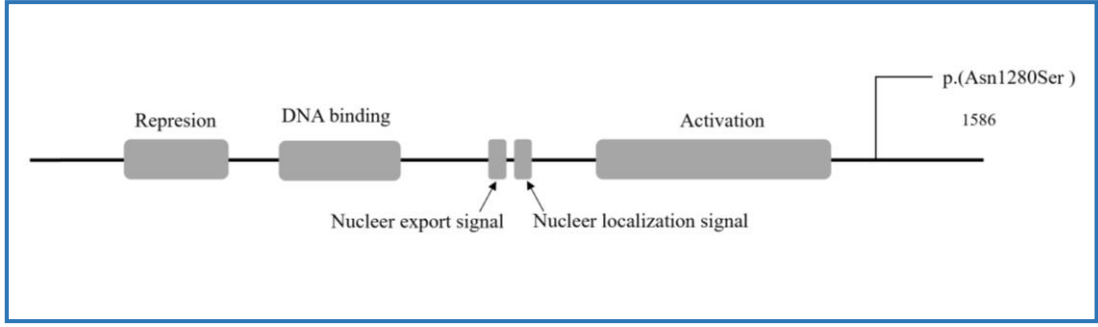
kromozomal ve/veya sendromik olmayan HPE vakalarına göre daha şiddetli bir fenotip ile sonuçlanmıştır ve bu olgularda geniş bir aile içi klinik özellik aralığı tanımlanmıştır. Bu çalışmada *SIX3* genindeki patojenik varyantların nispeten şiddetli HPE'ye yol açtığı, ancak fenotipik değişkenliğin çoklu vuruş mekanizmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür (90).

Zebra balığı ile yürütülen *in vivo* çalışmalarda, HPE ile ilişkili *Six3* mutant proteinlerinin hipomorf olarak işlev gördüğü belirlenmiştir. Fare modellerinin analizinde ise, *Six3*'ün haploetersizliğinin HPE'ye neden olduğu ve *Six3* ile *Shh*'nin HPE patogenezinde iş birliği yaptığı ortaya konmuştur; yani, bir hipomorfik *Six3* mutasyonu varlığında ek olarak *Shh*'nin bir kopyasının kaybı, HPE fenotipine sahip embriyoların yüzdesini önemli ölçüde artırmıştır. Bu bulgular, HPE'nin patogenezi için önerilen çoklu vuruş hipotezini destekler nitelikte kanıtlar sunmaktadır (157). *SIX3*'teki hipomorfik değişimler, *SHH* sinyalini bozan farklı genlerdeki değişimlerle birleştirildiğinde haploetersiz hale gelmektedir. *Six3*'ün *Shh*'nin doğrudan yukarı yönlü bir aktivatörü olduğu ve *Six3* aktivitesinin ventral ön beyinde *Shh* ifadesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (316). *Shh* sinyali, ön beyin gelişimi sırasında ventral orta hattın oluşturulması, göz alanının ayrılması ve telensefalonun büyümesi ve şekillenmesi dahil olmak üzere birçok rol oynar (208, 318). HPE fenotipinin şiddetinin *Shh* sinyal yolundaki bozuklukların meydana geldiği aşama ile yakından ilişkili olduğunu yani, değişiklik ne kadar erken olursa, ortaya çıkan HPE fenotipinin de o kadar şiddetli olduğunu doğrular nitelikte çalışmalar mevcuttur (319). *Six3*, *Shh* ifadesinin doğrudan yukarı akış düzenleyicisi olarak tanımlanmış ve prekordal plaktan gelen *Six3* ve *Shh* sinyalinin rostral diensefalon ventral orta hatta *Shh* ifadesini sinerjik olarak aktive ettiği gösterilmiştir. Ancak, *Shh*'nin *Six3* transkripsiyonel aktivitesini nasıl düzenlediği henüz açıklanamamıştır. İnsandaki *SIX3* mutasyonları hafif (mikroform) ile şiddetli (siklopi) arasında değişen HPE fenotipleri ile ilişkilidir. Bu fenotipik varyasyonlara muhtemelen ek genetik modifiye edicilerin neden olduğu düşünülmüştür (316). Farelerde, *Shh*'nin bir kopyasının tek başına çıkarılması malformasyonlara neden olmazken, ek olarak *Six3*'ün bir kopyası da silinirse, semilobar HPE'ye neden olduğu gösterilmiştir (38). Hastalarda, *SHH*'nin bir kopyasının veya *SIX3*'ün bir kopyasının kaybı HPE'ye neden olabilir, ancak *SHH* ve *SIX3* mutasyonları birlikte bildirilmemiştir (91).

GLI2, 2q14.2 bölgesinde yer alan, 14 ekzon içeren ve 1.586 amino asit içeren *GLI2* proteini kodlayan genidir. Gli proteinleri, transkripsiyonel aktivite için gerekli bir karboksi-terminal alanı ve diziye özgü bir şekilde DNA'yı bağlayan bir çinko parmak alanı içerir. Çinko parmak içeren Gli proteinleri, Hedgehog sinyaline yanıt vermeye aracılık eder ve Gli2, farelerde *SHH* sinyal yolağında ana transkripsiyonel aktivatör görevi görür. Roessler ve arkadaşları, *GLI2*-

delta-N'nin *in vivo* güçlü transkripsiyonel aktivite sergilediğini göstermiştir. Tam uzunluktaki GLI2'nin *in vitro* transkripsiyonel aktivitesi, daha önce tüm GLI2 proteinini temsil ettiği düşünülen GLI2-delta-N'ninkinden 30 kata kadar daha düşüktür 4 ekzon tarafından kodlanan bir N-terminal represör alanı (GLI2-delta-N) 1.258 amino asit içerir ve N-terminal baskılayıcı alanından yoksundur (320). *GLI2*'deki patojenik varyantlar Culler-Jones sendromu (MIM#615849) ve Holoprozensefali 9 (MIM#610829) fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. Culler-Jones sendromu *GLI2*'deki patojenik varyantların neden olduğu hipofiz anomalileri, polidaktili ve HPE ile tutarlı yüz özellikleri ile karakterizedir (320, 321).

GLI2, SHH sinyal iletiminin zorunlu aracıları olarak gösterilen üç omurgalı transkripsiyon faktöründen biridir yani SHH sinyal ağında üç Gli proteini yer alır. Etkileşen bu moleküller, çinko-parmak transkripsiyon faktörlerini kodlar. Gli1 ve Gli2, Shh yolağı aktivitesi üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olan Gli3'ün aksine aktive edici etkilere sahiptir. Gli2^{-/-} fare embriyolarının arka beyinde şiddetli ventral modelleme kusurları gösterdiği gösterilmiştir. *GLI2* aktivatör fonksiyonunun, ventral nöral tüpte motor nöronlar ve internöronlar haline gelecek spesifik progenitor hücreleri kodlayan bir gen sınıfının ekspresyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir. Gli2 eksikliği olan hayvan modellerinde normal hipofiz gelişiminin değişken kaybıyla birlikte, Gli2'nin gebeliğin erken döneminde hipofiz gelişiminde özel bir rol oynadığı gösterilmiştir (191). *GLI2*'deki tanımlanan patojenik varyantların çoğu heterozigottur ve eksik penetrans ve ekspresivite gösterir. Gerçek HPE, tek alel *GLI2* patojenik varyantları olan birkaç kişide tanımlanmış olsa da çoğu durumda hipofiz yetmezliği ve/veya yüz dismorfolojisi gibi daha ince anormalliklerde tanımlanmıştır (322). 2003'te Roessler ve arkadaşları tarafından önerilen açıklama, HPE'nin *GLI2* haployetersizliği durumuna eklenen ek çevresel ve genetik etkilerden kaynaklandığıdır (167). Bu, HPE etiolojisinin geniş çapta kabul gören kapsayıcı bir önermesi haline gelmiştir ve bazı etiyojik faktörler tanımlanmış olmasına rağmen, vakaların çoğu açıklanamaktadır (322). N-terminal baskı alanı, yüksek oranda korunmuş bir DNA bağlama alanı, nükleer lokalizasyon ve eksportu sinyaller alanları ve C-terminal aktivasyon alanı sahiptir (323).



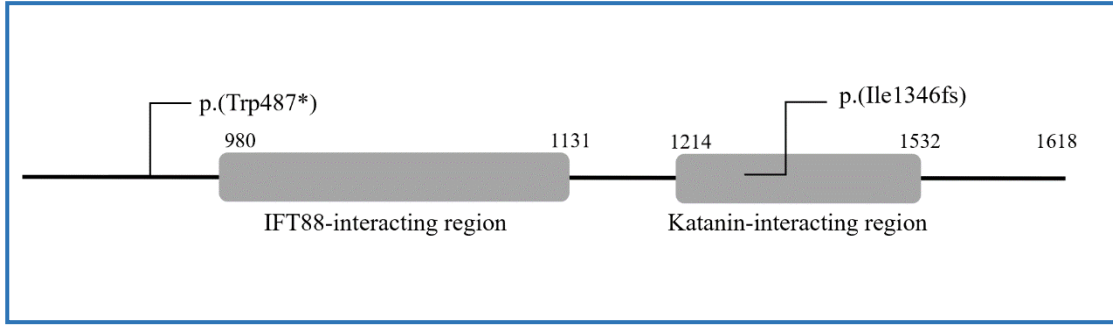
Şekil 48: GLI2 proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi (323).

Literatürde, bizim olgumuzdaki gibi birden fazla genetik faktörün (bizim olgumuzda *SIX3* ve *GLI2*) bir hastalık fenotipi oluşturmak için birlikte hareket ettiği HPE olguları bildirilmiştir (324). Literatürde *SIX3* ve *GLI2*'de beraber heterozigot varyant saptanan; anozmi, olfaktör bulbus agenezisi, bilateral hipoplastik olfaktör sulkuslar, hipogonadotropik hipogonadizm, bilateral kriptorşidizm ve mikropenis bulguları olan, ancak eşlik eden orta hat anomalileri, postaksiyal polidaktili, santral kesici diş ve anormal MRG'si olmayan bir olgu tariflenmiştir (325). Konjenital hipogonadotropik hipogonadizmde varyantların ve/veya di/oligojenik kalıtımın aditif etkileri literatürde daha önce gösterilmiştir. *SIX3*'te yeni bir yanlış anlamalı değişiklik ve *GLI2*'de başka bir nadir yanlış anlamalı varyant saptanan bu olgu, Kallmann sendromu ve HPE arasında genetik bir örtüşme olasılığını gösterir niteliktedir. Bununla birlikte, HPE'deki fenotip değişkenliğine birden fazla gendeki mutasyonlardan daha çok genetik ve çevresel etkileşimlerin katkıda bulunma olasılığının daha yüksek olduğu bu yayında öne sürülmüştür (326). Olgumuzda saptanan *GLI2* varyantının anne (II-4) ve sağlıklı kardeşte (III-3) saptanması ile bu varyantın maternal kökenli kalıtıldığı gösterilmiştir. Baba da segregasyon analizi yapılamadığı için *SIX3* varyantının kalıtım kökeni netleştirilememiştir. Ancak her iki gendeki değişimler değişken fenotip özellikleri, eksik penetrans ve değişken ekspresivite ile yakından ilişkilidir. Bu açıdan *GLI2*'de varyant saptanan anne (II-4) ve sağlıklı kardeşte (III-3) klinik muayenede bulgu saptanmaması varyantın “tesadüfi” olmasını dışlamamakla birlikte eksik penetrans niteliğini de göz ardı edilemez. Son yayınlar HPE etiolojinde digenik kalıtımın düşünüldüğü kadar nadir olmadığını ve YND teknikleri sayesinde bu gibi örneklerin arttığını gösterir niteliktedir (9). İndeksteki ağır HPE fenotipi ve eşlik eden bulguları bu iki gendeki değişimlere sekonder olduğu ve *GLI2*'deki değişimin maternal kalıtıldığı multigenik kalıtıma bir örnek olduğu da söylenebilir.

Prenatal dönemde MIHV HPE, CCA, bilateral anoftalmi/mikroftalmi, tek nostril saptanan Olgu 4'te, postmortem değerlendirmede ek olarak HPE ile uyumlu orta hat

anomalileri, dismorfik bulgular, hipoplazik klitoris ve labium minuslar ve tek ürogenital açıklık saptanmıştı. Yapılan karyotip ve array-CGH analizi normal sonuçlanan olguda bu bulgular ile ayırıcı tanıda non-sendromik-izole monogenik HPE formları düşünülmüştü. Olgumuzun TED analizinde *KATNIP* (*KIAA0556*) geninde heterozigot c.1461G>A/p.(Trp487*) ve heterozigot c.4035delC/ p.(Ile1346fs) varyantları birleşik heterozigot formda saptandı. Ailenin hipotiroidi, büyüme hormon eksikliği, hafif nöromotor gerilik ve MRG’nde boş sella, ektopik nörohipofiz ve serebellar ektopi bulguları olan 3 yaş erkek çocuğunda (V-3) da indekste var olan varyantlar birleşik heterozigot formda saptandı. Annede c.4035delC/p.(Ile1346Serfs*36), babada c.1461G>A/p.(Trp487*) varyantları heterozigot formda saptanarak aile segregasyonunun otozomal resesif kalıtım modeli ile uyumlu olduğu gösterildi.

KATNIP (*KIAA0556*) genindeki bi-allelilik patojenik varyantlar Joubert sendromu 26 (MIM# 616784) ile ilişkilendirilmiştir. Serebellar hipoplazi ile ilişkili global gelişimsel gecikme, hipotoni ve hipofiz anormallikleri dahil değişken ek anormallikler ile karakterize otozomal resesif kalıtım paterni gösteren bu klinik bir siliyopati sendromudur. Joubert sendromunun ayırt edici özelliği, serebellar vermis hipoplazisi, superior serebellar pedinküllerin uzaması ve kalınlaşması ile derin bir interpedinküler fossadan kaynaklanan 'molar diş işareti' olarak adlandırılan MRG ile tanımlanmış bir orta beyin anomalisidir. Siliyopati grubunda yer alan Joubert sendromu ve siliyer temelli bu bozuklukta sıklıkla fenotip göz, böbrek, iskelet ve kraniyofasiyal yapılar gibi pek çok sistemle ilişkili bulguları içerecek şekilde genişir. Beyin, göz, böbrek ve diğer birçok sistemi, ilgili genlere bağlı olarak farklı kombinasyonlarda etkileyen oldukça heterojen bir hastalık grubu olan siliopatilerde digenik veya oligogenik nedenlerin varlığı öne sürülmüştür (327). Joubert sendromunda gözlenen geniş aile içi fenotipik değişkenliğe dayanarak, oligogenik katkının varlığı ve/veya genetik düzenleyici etkilerin varlığı ile ortaya çıktığı varsayılmıştır ve literatürde klinik vaka raporları ile bu durum tartışılmıştır (328). Literatürde bu gende c.222_232del, p.(Asn74GluTer11) değişimi olgumuzdaki c.1461G>A/p.(Trp487*) aynı bölgede yer almakta olup bu değişimin protein fonksiyonunu ya proteinin erken sonlanması yoluyla ya da anlamsız değişime sekonder transkriptin tamamen kaybı yoluyla etkileyeceği tahmin edilmiş ve her iki durumda da bilinen tüm işlevsel alanlar kaybolduğundan, bu mutasyonun *null* bir alel üreteceği öngörülmüştür (329).



Şekil 49: KATNIP proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi (329).

Siliyalar, çoğu ökaryotik hücrenin yüzeyinden uzanan, hücre ve sıvı motilitesinde ve duyuşsal algıda önemli rollere hizmet eden mikrotübül tabanlı yapılardır. Bu organeller ayrıca gelişim sırasında Shh, trombosit türevi büyüme faktörü (*platelet-derived growth factor*) ve *Wingless* gibi hücre-hücre iletişimde yer alan ligandlardan ipuçlarını ileterek kritik sinyal merkezleri olarak işlev görürler (330). Shh sinyal yolu, hemen hemen her hücrede bulunan ve çeşitli kimyasal, mekanik veya ışık sinyalleri almak ve iletmek için hücresel antenler olarak hareket eden fonksiyonel birincil siliyalar ve mikrotübül tabanlı organeller gerektirir. İnsanlarda siliyaların işlev bozukluğu, çoğu organı etkileyen ve en şiddetli biçimleri ön beyin malformasyonları da dahil olmak üzere çeşitli bulgular gösteren siliyopatiler adı verilen hastalıklara yol açar. HPE'ye siliyopatilerde çok nadiren rastlanmaktadır. Siliyopati genlerinin fare modellerinde, gelişimin erken aşamalarında iki telensefalik hemisferin eksik veya gecikmeli olarak ayrılmasıyla karakterize edilen hafif bir HPE fenotipi bildirilmiştir (331, 332, 333). Literatürde, siliyopati ile ilişkili *STK36*, *IFT172*, *B9D1*, *MKS1*, *TCTN3* ve *TULP3* genlerinde tanımlanmış varyantların nadiren HPE'de modifiye edici olduğu da öne sürülmüştür (9).

KATNIP genindeki patojenik varyantlar, ilk olarak Sanders ve arkadaşları tarafından 2015'te Suudi Arabistanlı ebeveynlerden doğan ve hafif bir Joubert sendromu formuna sahip 3 çocukta bildirilmiştir. Bu olgularda değişken derecelerde hipotoni, yenidoğan döneminde geçici taşipne, tekrarlayan enfeksiyonlar, global gelişimsel gecikmeye ek olarak hipotiroidizm ve büyüme hormonu eksikliği ile birlikte panhipopitüitarizm, değişken serebellar hipoplazi, ön hipofizde hipoplazi/aplazi ve ektopik arka hipofiz bulguları bildirilmiştir. Bu olgularda eşlik eden böbrek anomallisi tariflenmemiştir (328). Yakın zamanda literatürde dismorfik özelliklerle birlikte büyüme hormonu eksikliği, merkezi hipotiroidizm, kranial MRG'sinde

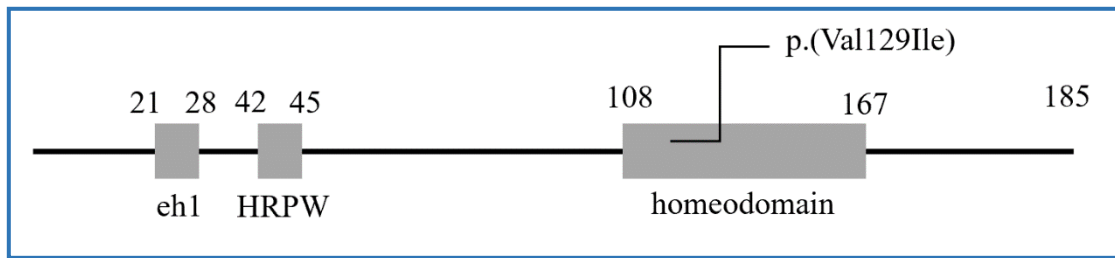
Arnold Chiari tip I, ektopik nörohipofiz ve klasik molar diş bulgusu olmaksızın hafif vermiş hipoplazisi olan olgularda da *KATNIP* geninde birleşik heterozigot patojenik varyantlar tanımlanmıştır. İndeks olgumuzda postmortem değerlendirmede saptanan lingual ve superiyor labiyogingival frenulum izlenmemesi ve hipoplazik inferiyor labiyogingival frenulum ve hipoplazik klitoris ve labium minuslar ile tek ürogenital açıklık bulguları siliyopati grubu hastalıkların geniş klinik prezentasyonuna örnek olarak verilebilir. Joubert spektrumunda eşlik edebilen orta hat anomalileri HPE ile arasında ilişkiyi akla getirir. Sanders ve arkadaşlarının çalışmasında bildirilen olguda eşlik eden mikropenis bulgusu bizim olgumuzda daha ağır bir klinik olarak hipoplazik klitoris ve labium minuslar ile tek ürogenital açıklık bulguları ile karşımıza gelmiş olabilir (333).

KATNIP, siliyaların bazal gövdesinde lokalize olan bir siliyer proteini kodlar ve *KATNIP* varyantlarına sahip Joubert sendromlu bireylerin fibroblastları, daha az sayıda siliyer hücre gösterir. *KATNIP* ve Shh sinyal yolu arasındaki ilişki doğrudan kanıtlanmamış olsa da insan hücreleri ve nematodlar kullanılarak yapılan deneyler, bu genin siliyer mikrotübül stabilitesini ve dinamiklerini düzenlediğini göstermiştir. *KATNIP* geninin fonksiyon kaybı varyantları, siliyaların temel yapısal bileşeninin yokluğuna neden olur, bu da muhtemelen siliyogenezi bozar ve sonuç olarak Shh sinyalinin aşağı regülasyonuna yol açar. V-3'e ait klinik bulgular literatür bilgileri ışığında indeks olgumuzda saptanan bi-allelilik patojenik varyantlar ile açıklanmaktadır. Her ne kadar literatürde farklı siliyopati genlerinin HPE açısından modifiye edici olduğu ve *KATNIP* geninin Shh sinyal yolu ile ilişkili olduğunu tartışan yayınlar mevcut olsa da *KATNIP* genindeki varyantlar açısından V-3 ile aynı genotipe sahip indeks olgumuzdaki ağır fenotipik bulguları açıklamak için yetersizdir. Kromozom ve array-CGH analizleri normal sonuçlanarak kromozom anomalileri ve patojenik kopya sayısı değişiklikleri dışlanan olgumuzda ağır fenotipik bulguları açıklamak açısından digenik kalıtım, ek başka modifiye edici genler ve non-genetik faktörlerin fenotipi etkilediği düşünülebilir. Bu gen ve fenotipik yansımaları açısından ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Olgumuzda var olan şiddetli fenotipi açıklayabilecek ikinci bir patojenik varyant TED analizinde saptanmamakla beraber TED analizinin kısıtlılıkları nedeniyle ek derin bir intronik varyant eşliği dışlanamamıştır

Çalışmamızda Olgu 5'te prenatal dönemde HPE şüphesi, ventrikülomegali, serebellar hipoplazi, probosis, arini, ağır hipotelorizm gösterilmişti. Postmortem muayenede ek olarak sağda mikroftalmi, solda anoftalmi, mikrostomi, orta hatta yarık dudak, sağda radyal ve ulnar *bowing* saptanmıştı. Karyotip analizi normal sonuçlanan olgunun postmortem değerlendirme bulguları ile ayırıcı tanıda monogenik nonsendromik-izole HPE düşünülmüştü. Bu olgumuza

yapılan TED analizinde *HESX1* geninde heterozigot c.385G>A/p.(Val129Ile) varyantı saptandı. Olgumuzda saptanan bu varyant daha önce literatürde hipotalamik amenoresi olan bir olguda bildirilmiştir. Bu gendeki değişiklikler Hipofiz anomalileri ile birlikte büyüme hormonu eksikliği (MIM#182230), Kombine hipofiz hormonu eksikliği (MIM #182230) ve Septo Optik displazi (MIM#182230) fenotipleri ile ilişkilidir. Hipofiz bezinin gelişimi, transkripsiyon faktörlerinin ve sinyal moleküllerinin sıralı zamansal ve uzaysal ifadesine bağlıdır. *HESX1*, *PROP1*, *POU1F1*, *LHX3*, *LHX4*, *PITX1*, *PITX2*, *OTX2*, *SOX2* ve *SOX3* transkripsiyon faktörleri konjenital hipopitüitarizmin etiyolojisinde yer alır. Hipofiz gelişiminde yer alan genlerin herhangi birindeki mutasyonlar, bir veya daha fazla hipofiz hormonunda eksiklik olarak ortaya çıkan konjenital hipopitüitarizm ile sonuçlanabilir. Bu genlerdeki değişimlerde fenotip oldukça değişken olabilir ve izole hipopitüitarizm, SOD veya HPE gibi daha karmaşık bozukluklara neden olabilir (334). *Hesx1*, *paired-like class of homeobox* gen sınıfının bir üyesidir ve ilk olarak fare embriyogenezi sırasında gastrulasyon başlarken anterior orta hat visseral endodermdeki küçük bir hücre parçasında eksprese edilmiştir. Visseral endodermden gelen kritik bir sinyalin ardından, komşu ektodermde ventral prozensefalonun ortaya çıkmasına yönelik bir alanda ekspresyon indüklenir ve bu da ön beyni oluşturacaktır. Farelerde *Hesx1*'i hedefleyen bozulmalar, SOD'yi anımsatan anoftalmi veya mikroftalmi ve orta hatta nörolojik kusurlara neden olmaktadır (335).

HESX1 proteinleri, DNA bağlanması sorumlu bir homeoalan ve biri N-terminalde (eh1 ve HRPW motifleri) ve biri C-terminal homeodomainde olmak üzere iki baskılayıcı alan içerir. N-terminalindeki eh1 ve HRPW alanları, *HESX1*'in TLE/Groucho ailesinin ortak baskılayıcıları ile etkileşimi, C-terminalindeki homeodomain ise DNA bağlanması ve nükleer ortak baskılayıcı ile etkileşime aracılık eder. Olgumuzdaki değişim, çekirdek bağlama bölgelerinin tanınması için gerekli olan yüksek oranda korunmuş homeodomain içinde yer alır. Literatürde aynı bölgede yer alan değişimler SOD gibi ağır fenotipli olgulara ek hipofiz anomalileri ile büyüme hormonu eksikliği fenotipleri ile bildirilmiştir (336).



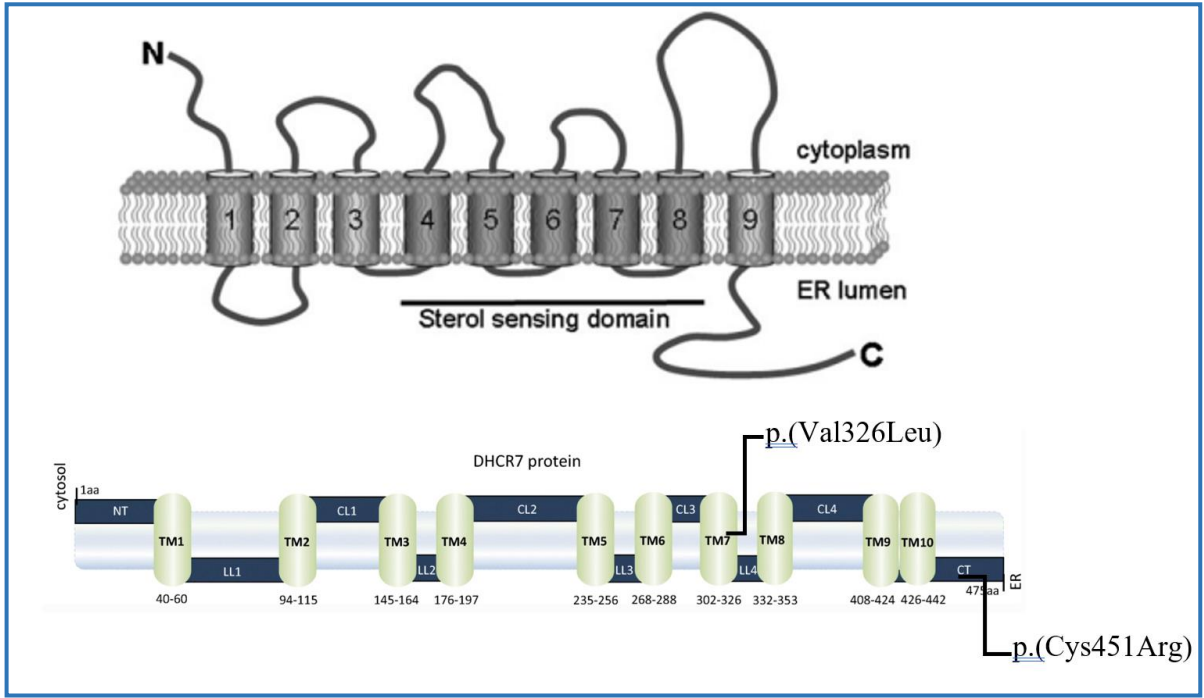
Şekil 50: *HESX1* proteininin yapısı ve indeksteki varyantın protein üzerindeki konumunun şematik gösterimi (336).

Literatürde pek çok olguda homozigot ve heterozigot *HESX1* patojenik değişimleri tanımlanmıştır. Bu olgularda net bir genotip-fenotip korelasyonu yoktur ve klinik özellikler idiyopatik büyüme hormon eksikliğinden kombine hipofiz hormon eksikliklerine kadar değişir ve bazı vakalarda SOD, hipofiz malformasyonları ve diğer ön beyin gelişim kusurları gibi anomalilerle ilişkilendirilmiştir (314). Bugüne kadar bu gende bildirilmiş 33 varyant mevcuttur ve bunların çoğu olgumuzdaki gibi yanlış anlamlı varyantlardır. Literatürde bu gendeki varyantlar bizim olgumuzdan daha hafif fenotiplerle ilişkilendirilmiştir ancak biliyoruz ki *HESX1* geni embriyonal dönemde ön beyin gelişiminde aktif bir rol oynamaktadır (334, 335). Bu nedenle saptanan varyant olgumuzdaki fenotip ile ilişkili olabilir. Ancak olgumuzdaki ağır fenotipin bu varyant ile açıklanması yetersizdir. Bu açıdan incelendiğinde digenik kalıtım veya çoklu vuruş açısından olgumuzda TED analizde ek bir varyant saptanmadı. Ancak yöntemin teknik kısıtlılıkları nedeniyle ek derin bir intronik varyant ya da promoter bölgesindeki olası değişimlerin eşliği dışlanamamıştır. Ağır fenotipik bulgular bu gendeki değişime ek olarak öyküde teratolojik bir etken tariflenmemesine rağmen non-genetik etkenlerin kliniği etkiyeleyerek daha ağır bir fenotip oluşmasına da neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda prenatal dönemde USG’de alobar HPE, orta hatta geniş yarık dudak, arini, elde polidaktili, malalignent VSD olan ve postmortem muayenede ek olarak komplet yarık damak ve fasiyal dismorfik bulgular saptanarak monogenik HPE spektrumunda değerlendirilen Olgu 6’da *DHCR7* geninde c.1351T>C/p.(Cys451Arg) ve c.976G>T/p.(Val326Leu) değişimleri heterozigot olarak saptandı. Segregasyon amacıyla ebeveynlerde yapılan incelemede, annede (II-5) c.976G>T varyantı, babada ise c.1351T>C varyantı saptanarak indekste varyantların birleşik heterozigot formda olduğu gösterilmiştir. *DHCR7* (MIM*602858) geni otozomal resesif kalıtım modeline sahip SLOS ile ilişkilidir. SLOS, 7-dehidrokolesterol redüktaz enziminin eksikliğinden kaynaklanan kolesterol metabolizmasındaki bozukluğun neden olduğu bir multipl konjenital anomali / zihinsel yetersizlik sendromudur. Prenatal ve postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, zihinsel yetersizlik ve çok sayıda majör ve minör malformasyonlar ile karakterizedir. Malformasyonlar arasında karakteristik fasiyal dismorfik bulgular, yarık damak, kardiyak anomaliler, erkeklerde az gelişmiş dış genital organlar, postaksiyal polidaktili ve ayak parmaklarında 2-3 sindaktili bulunur. Prenatal dönemde, SLOS bulguları arasında ense ödemi, intrauterin gelişme geriliği, yarık damak, polidaktili, belirsiz cinsel organlar ve böbreklerin, kalbin ve beynin yapısal malformasyonları yer alabilir. Bununla birlikte, bu bulgular SLOS'a özgü değildir ve diğer çeşitli konjenital malformasyon sendromlarında da gözlenebilir (192).

SLOS vakalarında plazma kolesterol ve kolesterol prekürsörü dezmosterol düzeyi düşük veya alt sınırdadır, 7-DHC ve spontan izomeri olan 8-DHC düzeyi ise yüksektir. Etkilenmiş gebeliklerde steroid yapım defektinin bir göstergesi olarak konjuge olmamış serum E3 (uE3) düzeyi düşüktür. Üçlü tarama testinde saptanabilen uE3 düşüklüğüne ek patolojik US bulgularının eşlik etmesi halinde, nadir görülen bu sendrom prenatal dönemde bile tanınabilir. SLOS’unda klinik spektrum geniştir ve normal gelişim gösteren ve yalnızca minör malformasyonlara sahip olgular da tanımlanmıştır (337). Olgularda kesin bir genotip-fenotip korelasyonu kurulması zordur çünkü çoğu birey bileşik heterozigot formda varyantlara sahiptir (338). Literatürde farklı veya aynı ailelerde aynı *DHCR7* genotipine sahip olgularda, hastalığın şiddeti ve plazma 7-DHC seviyeleri açısından belirgin şekilde farklı fenotipler bildirilmiştir (337, 339). Bu nedenle literatürde SLOS’un, diğer genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerden önemli ölçüde etkilenen Mendeliyan bir bozukluk olduğu tartışılmıştır (340, 341, 342). Gebelik sırasında maternal-fetal kolesterol transferi maternal diyet, maternal apolipoprotein seviyelerine ve muhtemelen diğer bazı faktörlere bağlıdır ve bu durumun SLOS fenotipi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu varsayan yayınlar mevcuttur (343).

11q13.4 bölgesinde bulunan *DHCR7* geni, dokuz ekzon içerir ve ekzon 3’ten 9’a kadar olan kısım 7-dehidrokolesterol redüktazı kodlar. 7-dehidrokolesterol redüktaz enzimi kolesterol biyosentezinde 7-dehidrokolesterolün C7-C8 çift bağının indirgenmesi ile kolesterole dönüşmesini katalize eder. 7-dehidrokolesterol redüktaz, dokuz trans-membran sarmalından ve bir sterol algılama alanından oluşur. Bu gendeki varyantlar *DHCR7* proteininin transmembran alanı, dördüncü sitoplazmik döngü ve C-terminal alanında kümelenme göstermektedir. Olgumuzda saptanan c.976G>T/p.(Val326Leu) değişimi dokuz trans-membran sarmalından yedincisinde yani sterol algılama alanında, c.1351T>C/p.(Cys451Arg) değişikliği ise C-terminal domaininde yer almaktadır. Mutasyon bölgesi ve kodlama sekansı üzerindeki etki, klinik ve biyokimyasal ciddiyet için sadece kısmen öngörücü olup bizim olgumuzdaki c.976G>T (p.(Val326Leu) değişimi gibi *DHCR7* proteininin sterol algılama alanını değiştiren, buna müdahale eden veya kesen mutasyonların daha ciddi bir klinik ve biyokimyasal SLOS fenotipine neden olması muhtemel olarak bildirilmiştir (344). Literatürde *DHCR7* mutasyonlarının HPE patogenezinde yer alıp almadığını belirlemek amacıyla transmembran domainde c.1031G>A/ G344D değişimine sahip HPE’li olgunun enzim aktivite çalışmasında mutant G344D, kontrol ile karşılaştırıldığında enzim aktivitesinin %50’den daha az olduğu bulunmuştur (328). cDNA 1425 baz çiftlik bir açık okuma çerçevesine sahiptir, 475 amino asitlik bir polipeptit üretir ve alternatif *splicing* tanımlanmamıştır (344).



Şekil 51: DHCR7 proteininin öngörülen yapısı ve membran topolojisi ile olgumuzdaki varyantların protein üzerindeki konumu (339). Dokuz transmembran sarmalı ve bir sterol algılama alanı görülmekte. *CL*, Sitosolik loop; *CT*, C-terminal alanı; *LL*, ER lümen; *NT*, N-terminal alanı; *TM*, transmembran alanı.

Bu gendeki patojenik değişimler tüm gen boyunca belirgin *hotspot* noktalar olmaksızın meydana gelir. Bu gende 200'ün üzerinde patojenik varyant tanımlanmıştır ve bunların çoğunu yanlış anlamlı varyantlar oluşturur. SLOS hastalarının çoğunda bir yanlış anlamlı ve bir anlamsız varyant kombinasyonu ve yaklaşık %30'unda iki yanlış anlamlı varyant bulunmaktadır (337). Memeli hücrelerinde *DHCR7* mutasyonlarında p.(Arg450Leu); C-terminus) hariç tüm yanlış anlamlı patojenik varyantların kararsız proteinle sonuçlandığı gösterilmiştir (343).

SLOS'lu bireylerin sadece yaklaşık %5'inde HPE vardır ve bu sendromun en şiddetli formunu temsil eder (344, 345). SLOS'nda HPE fenotipini açıklamak açısından çeşitli hipotezler öne sürülmüş ve sterol ara ürünlerinin birikiminin bir rolü olabileceği düşünülmüş olsa da net olarak hangi mekanizma ile ortaya çıktığı kesin olarak bilinmemektedir. Bazı teoriler, düşük kolesterol ve/veya yüksek 7-DHC'nün SHH, PTCH-1 ve PTCH-2 dahil olmak üzere bir veya daha fazla sinyal proteininin veya reseptörlerinin işlevini etkilediğini ileri sürmektedir (135, 346). Spesifik bir *DHCR7* genotip-fenotip korelasyonu tanımlanmamıştır ancak HPE bildirilen SLOS vakalarının çoğu iki *null* varyant taşımaktadır (346). Ancak,

literatürde *DHCR7* geninde homozigot *null* varyantların rapor edildiği ve HPE bildirilmeyen vakalar da mevcuttur (347). Transmembran alanında patojenik varyant taşıyan SLOS olguları, *null* varyantları olan olgulardan daha az ciddi şekilde etkilenmiştir.

Olgumuzda saptanan c.1351T>C/p.(Cys451Arg) varyantı literatürde prenatal USG'de anhidramnios, hekzadaktili ve higroma bulguları saptanarak 18. GH'nda termine edilen fetusta diğer heterozigot c.452G>A/p. (Trp151*) varyantı olarak bildirilmiştir. Bu olgunun postmortem değerlendirmesinde fasiyal dismorfik bulguları SLOS sendromu ile uyumlu olarak belirtilmiştir. Olguda majör beyin anomalisi olarak Dandy-Walker kisti izlenmiştir. Bilateral ellerde polidaktili, ayak 2-3. parmaklar arasında sindaktili saptanmıştır. Ayrıca bu olguda atriyoventriküler septal defekt, bilateral renal agenezi, psödovajinal perineoskrotal hipospadias, bifid uvula/epiglottis, katarakt, sakral gamze bulgularının eşlik ettiği bildirilmiştir (276). Olgumuzda saptanan diğer varyant olan c.976G>T (p.Val326Leu) varyantı literatürde SLOS kliniği ile uyumlu pek çok olguda bildirilmiştir ve bu gende sık rastlanan varyantlardan biridir (348). Yanlış anlamlı c.976G>T varyantı transmembran domaininde, yanlış anlamlı c.1351T>C varyantı ise C-terminal domaininde yer alır. İnaktif öncü bir protein olarak salgılanan SHH proteini aktif bir protein oluşturmak üzere N-terminal ve C-terminal olmak üzere otokatalitik bölünmeye uğrar ve N-terminaline bir kolesterol eklenir. Bu nedenle, HPE'de *DHCR7* genindeki patojenik değişimler, kolesterolün SHH'yi değiştirememesine ve işlevini ortadan kaldırmasına neden olabilir. Bu durum, *Dhcr7* inhibitörü verilen farelerde yüksek bir HPE frekansı gözlemlenmesiyle desteklenmektedir (349). Bizim olgumuzdaki HPE, anormal kolesterol metabolizmasına sekonder Sonic Hedgehog sinyalinin ciddi şekilde bozulmasından kaynaklanmış olabilir. Prenatal dönemde HPE saptanan olgularda SLOS ayırıcı tanıda yer almalıdır. HPE 'ye eşlik eden patolojiler açısından prenatal US ile değerlendirme ve postmortem değerlendirme oldukça kıymetlidir. Olgumuzda da ağır HPE dışındaki bulgular da bu sendromun komponenti olarak açıklanmaktadır. Olgumuzda saptanan alobar HPE varyantının şiddetli bir form olması nedeniyle SLOS'ta HPE'nin ciddiyetine katkıda bulunan henüz belirlenmemiş başka faktörler de olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda prenatal dönemde HPE saptanan olgulara yapılan TED analizinde altı olguda sekiz farklı gende hastalık ilişkili veya ilişkili olduğu düşünülen 10 varyant saptandı. Bu varyantlardan altısı yanlış anlamlı, ikisi anlamsız, ikisi ise çerçeve kayması tipinde idi. Saptanan 10 varyantın yedisi ilk kez bu çalışmada tanımlanan *novel* nitelikte değişimlerdi. Literatürde *SIX3* ve *GLI2*'de beraber heterozigot varyant saptanan bir olguya ağır HPE fenotipi olan olgumuzda da bu iki gende değişim saptanarak bu iki gen ile ilişkili HPE fenotipi ve multigenik kalıtıma bir örnek eklenmiş olduğu düşünüldü. Ağır HPE fenotipi olan bir

olgumuzda *ZIC2* ve *PTCH1* genlerinde patojenik varyant birlikteliği saptanarak bu genlerdeki varyant birlikteliği HPE fenotipinde ilk kez gösterilmiş oldu. *KATNIP* geninde saptanan değişimler ile HPE fenotipi ile siliyopati grubu hastalıklar arasında ilişkili olabileceği gösterildi.

Kısıtlı örnek sayısı ile yapılan çalışmamızda, TED analizinin tanıdaki rolü %60 (6/10) olarak bulundu. 4 olguda hastalığın moleküler etiyopatogenezi TED analizi ile aydınlatılamamıştır. Literatürde HPE etiyolojisi açısından TED verimliliği ile ilgili bir çalışma yoktur. HPE etiyolojisi açısından klinik genetik testler teknolojik gelişmelerle iyileşmiştir ancak halen familial vakaların %70'inde halen net bir moleküler tanı konulamamaktadır (9). HPE olgularının geniş klinik spektrumunun yanı sıra HPE varyantlarının eksik penetrans ve değişken ekspresyonu göz önüne alındığında, HPE'de düşük tanısal verimin kısmen HPE'nin karmaşık etiyolojisinden kaynaklandığı literatürde sıkça tartışılmıştır. Moleküler tanıda TED, en son keşfedilenler de dahil olmak üzere hemen hemen tüm genleri ve klinisyenin ayırıcı tanılarıyla hem ilişkili hem de bunların dışında olan genleri aynı anda araştırma fırsatı verir. Bu nedenle, HPE gibi heterojen fenotipleri, atipik ve inkomplet prezentasyonları olan genetik hastalıkların teşhisinde özellikle yararlıdır. Literatürde Yahudi kökenli 18'inde pozitif ilgili aile öyküsü olan 45 ailede tek (yalnızca fetus), üçlü (fetus ve ebeveynler) veya dörtlü (iki fetus ve ebeveyn) tasarım ile sonlandırılmış ve devam eden gebeliklerden fetal olgulara yapılan TED analizinde genel tanısal verim %28,9 (13/45), fetal US anomalileri olan ailelerde %31,7 (13/41) ve prenatal US anomalileri ve ilgili aile öyküsü olan ailelerde %55,6 (10/18,) olarak bulunmuştur. Aynı yayında spesifik organ/vücut sistemi tutulumuna bakıldığında, beyin (%60), böbrek (%42,9) ve kas-iskelet sisteminde (%55,6) fetal US anomalileri olan ailelerde kardiyak US anormallikleri (%16,7) veya artmış NT/ödem/hidrops belirtileri (%27,3) olanlara göre daha yüksek tanı oranları saptanmıştır (350). Bununla birlikte bu oran, yakın zamanlarda yapılan iki büyük ölçekli fetal TED çalışmasında bulunan %8,5 ve %10,3 oranlarından ciddi oranda daha yüksektir (351, 352).

Çalışmamızda TED analizi ile moleküler etiyopatogenezi aydınlatılamayan 4 olguda fenotipten sorumlu gen henüz tanımlanmamıştır. Bunun nedeni ilişkili genlerde mozaikizm olasılığı, henüz fenotipi tanımlanmamış genlerin HPE etiyolojisine yol açması, kopya sayısı değişiklikleri veya sorumlu varyantın TED ile saptanamayacak bölgelerde yer alması (promoter, derin intronik bölgeler vb.) gibi durumlar sayılabilir. Yaklaşık 1.500 gendeki nadir varyantlar, beyin gelişimini veya embriyonik gelişimi etkileyen hastalıklarla ilişkilendirilmiştir ve bu genlerin birçoğunun gelecekte HPE ile bağlantılı olacağını öngören yayınlar mevcuttur (353, 354). HPE etiyolojisi daha fazla anlaşıldıkça, genetik tanı hastalarımız ve aileleri için

prognoz, tedavi ve genetik danışmanlık konularında fayda sağlayacaktır. Sonraki aşamada array-CGH analizleri yapılamayan üç olgumuzun (Olgu 5, 6, 7) CNV değişiklikleri açısından array-CGH analizlerinin tamamlanması ve moleküler tanı konulamayan dört olgunun (Olgu 7, 8, 9, 10) tüm genom dizi analizi açısından değerlendirilmesi planlanmıştır. HPE saptanan olgularda gerçekleştirilen YND araştırmaları, yeni HPE ilişkili genlerin ve digenik kalıtım örneklerinin artarak tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bu bilgiler ışığında, çalışmamıza benzer araştırmaların artışı ile HPE ilişkili daha birçok aday genin, yolakların ve mekanizmaların keşfedileceği öngörülebilir.

Bu tez çalışması ile prenatal dönemde tanı alan HPE olgularında moleküler tanı konularak HPE etiyopatogenezinin aydınlatılması hem ailelere uygun genetik danışmanlık sağlanmış hem de literatüre katkı sunulmuştur.

Umuyoruz ki çalışmamızdan çıkan yeni varyantlar, genotip-fenotip ilişkilerini incelemek ve kompleks HPE etiyolojisini açıklamak için mevcut modellere ve verilere de katkı sağlar.

KAYNAKLAR

1. Gropman AL, Muenke M. Holoprosencephaly. In: Cassidy SB, Allanson JE, eds. *Management of Genetic Syndromes*. New York, NY: Wiley-Liss, Inc; 2005;279-96.
2. Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:8.
3. Hahn JS, Barnes PD, Clegg NJ, Stashinko EE. Septopreoptic holoprosencephaly: a mild subtype associated with midline craniofacial anomalies. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010;31:1596–601.
4. Croen LA, Shaw GM, Lammer EJ. Risk factors for cytogenetically normal holoprosencephaly in California: a population-based case-control study. *Am J Med Genet*. 2000;90:320–325.
5. Repetto M, Maziere JC, Citadelle D, Dupuis R, Meier M, Biade S, et al. Teratogenic effect of the cholesterol synthesis inhibitor AY 9944 on rat embryos in vitro. *Teratology*. 1990;42:611–18.
6. Kruszka P, Muenke M. Syndromes associated with holoprosencephaly. *Am J Med Genet*. 2018;178:229–37.
7. Krauss RS. Holoprosencephaly: new models, new insights. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9:1–17.
8. Dubourg C, Carre W, Hamdi-Roze H, Mouden C, Roume J, Abdelmajid B, et al. Mutational spectrum in holoprosencephaly shows that FGF is a new major signaling pathway. *Hum Mut*. 2016;37:1329–39.
9. Kim A, Savary C, Dubourg C, Carré W, Mouden C, Hamdi-Rozé H, et al. Integrated clinical and omics approach to rare diseases: novel genes and oligogenic inheritance in holoprosencephaly. *Brain*. 2019; 142(1):35-49.
10. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80.
11. Dubourg C, Kim A, Watrin E, de Tayrac M, Odent S, David V, et al. Recent advances in understanding inheritance of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2018;178(2):258-69.
12. De Lahunta A, Glass EN, Kent M. Embryonic Development of the Central Nervous System. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2016;46(2):193-216.
13. Huang, SB, Doherty D. Congenital Malformations of the Central Nervous System. *Avery's Diseases of the Newborn*. 2018;857–878.e5.

14. Volpe JJ. Overview: normal and abnormal human brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2000;6(1):1-5.
15. DEMYER W, ZEMAN W. Alobar holoprosencephaly (arhinencephaly) with median cleft lip and palate: clinical, electroencephalographic and nosologic considerations. *Confin Neurol.* 1963;23:1-36.
16. Volpe P, Campobasso G, De Robertis V, Rembouskos G. Disorders of prosencephalic development. *Prenat Diagn.* 2009;29(4):340-54.
17. Leech RW, Shuman RM. Holoprosencephaly and related midline cerebral anomalies: a review. *J Child Neurol.* 1986;1(1):3-18.
18. Adré J. du Plessis, Joseph J. Volpe, Du Plessis. *Prosencephalic Development. Volpe's Neurology of the Newborn (Sixth Edition), Elsevier.* 2018;34-57.
19. Santo S, D'Antonio F, Homfray T, Rich P, Pilu G, Bhide A, et al. Counseling in fetal medicine: agenesis of the corpus callosum. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;40(5):513-21.
20. Raybaud C. The corpus callosum, the other great forebrain commissures, and the septum pellucidum: anatomy, development, and malformation. *Neuroradiology.* 2010;52:447-77.
21. Li Y, Sansgiri RK, Estroff JA, Mehta TS, Poussaint TY, Robertson RL, et al. Outcome of fetuses with cerebral ventriculomegaly and septum pellucidum leaflet abnormalities. *AJR Am J Roentgenol.* 2011;196(1):83-92.
22. Kelberman D, Dattani MT. Genetics of septo-optic dysplasia. *Pituitary.* 2007;10(4):393-407.
23. Elster AB, McAnarney ER. Maternal age re septo-optic dysplasia. *J Pediatr.* 1979;94(1):162-3.
24. Patel L, McNally RJ, Harrison E, Lloyd IC, Clayton PE. Geographical distribution of optic nerve hypoplasia and septo-optic dysplasia in Northwest England. *J Pediatr.* 2006;148(1):85-8.
25. Ahmad T, Garcia-Filion P, Borchert M, Kaufman F, Burkett L, Geffner M. Endocrinological and auxological abnormalities in young children with optic nerve hypoplasia: a prospective study. *J Pediatr.* 2006;148(1):78-84.
26. Cohen MM Jr. Holoprosencephaly: A mythologic and teratologic distillate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010;154C(1):8-12.
27. Harm-Gerd K. Blaas. Holoprosencephaly. *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care.* 2018; 190–204.
28. Orioli IM, Castilla EE. Epidemiology of holoprosencephaly: Prevalence and risk factors. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010;154C(1):13-21.

29. Matsunaga E, Shiota K. Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. *Teratology*. 1977;16(3):261-72.
30. Yamada S, Uwabe C, Fujii S, Shiota K. Phenotypic variability in human embryonic holoprosencephaly in the Kyoto Collection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004;70(8):495-508.
31. Kagan KO, Staboulidou I, Syngelaki A, Cruz J, Nicolaides KH. The 11-13-week scan: diagnosis and outcome of holoprosencephaly, exomphalos and megacystis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010;36(1):10-4.
32. Blaas HG, Eriksson AG, Salvesen KA, Isaksen CV, Christensen B, Møllerløkken G, et al. Brains and faces in holoprosencephaly: pre- and postnatal description of 30 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002 ;19(1):24-38.
33. Chen CP, Chern SR, Lin CJ, Lee CC, Wang W, Tzen CY. A comparison of maternal age, sex ratio and associated anomalies among numerically aneuploid, structurally aneuploid and euploid holoprosencephaly. *Genet Couns*. 2005;16(1):49-57.
34. Croen LA, Shaw GM, Lammer EJ. Holoprosencephaly: epidemiologic and clinical characteristics of a California population. *Am J Med Genet*. 1996;64:465-472.
35. EUROCAT. Arrhinencephaly/holoprosencephaly: <http://www.eurocat-network.eu/>; 2010.
36. Leoncini E, Baranello G, Orioli IM, Annerén G, Bakker M, Bianchi F, et al. Frequency of holoprosencephaly in the International Clearinghouse Birth Defects Surveillance Systems: searching for population variations. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008;82(8):585-91.
37. Raam MS, Solomon BD, Muenke M. Holoprosencephaly: a guide to diagnosis and clinical management. *Indian Pediatr*. 2011;48(6):457-66.
38. Geng X, Oliver G. Pathogenesis of holoprosencephaly. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1403-13.
39. Lewis AJ, Simon EM, Barkovich AJ, Clegg NJ, Delgado MR, Levey E, et al. Middle interhemispheric variant of holoprosencephaly: A distinct cliniconeuroradiologic subtype. *Neurology*. 2002; 59:1860–65.
40. Simon EM, Hevner RF, Pinter JD, Clegg NJ, Delgado M, Kinsman SL, et al. The middle interhemispheric variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002; 23:151–155.
41. Barkovich AJ, Quint DJ. Middle interhemispheric fusion: an unusual variant of holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1993; 14:431–40.

42. Hahn JS, Barnes PD. Neuroimaging advances in holoprosencephaly: refining the spectrum of the midline malformation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010;154C:120–32.
43. Hahn JS, Plawner LL. Evaluation and management of children with holoprosencephaly. *Pediatr Neurol.* 2004;31:79–88.
44. Adré J. du Plessis, Joseph J. Volpe. Prosencephalic development and defects. Chapter 2 - Prosencephalic Development. Volpe's neurology of the newborn (6th ed.). Elsevier. 2018; 34–57
45. Marcorelles P, Laquerriere A. Neuropathology of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010;154C(1):109-19.
46. Simon EM, Hevner RF, Pinter J, Clegg NJ, Delgado M, Kinsman SL, et al. The dorsal cyst in holoprosencephaly and the role of the thalamus in its formation. *Neuroradiology.* 2001;43(9):787-91.
47. Simon EM, Hevner R, Pinter JD, Clegg NJ, Miller VS, Kinsman SL, et al. Assessment of the deep gray nuclei in holoprosencephaly. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000;21(10):1955-61.
48. Tekendo-Ngongang C, Muenke M, Kruszka P. Holoprosencephaly overview. In Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, & Amemiya A.(Eds.), 1993; GeneReviews(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
49. Simon EM, Barkovich AJ. Holoprosencephaly: new concepts. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2001;9(1):149-ix.
50. Winter TC, Kennedy AM, Woodward PJ. Holoprosencephaly: a survey of the entity, with embryology and fetal imaging. *Radiographics.* 2015;35(1):275-90.
51. Kousa YA, du Plessis AJ, Vezina G. Prenatal diagnosis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2018;178(2):206-13.
52. Fallet-Bianco C. Neuropathology of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2018;178(2):214-28.
53. Lazaro L, Dubourg C, Pasquier L, Le Duff F, Blayau M, Durou MR, et al. Phenotypic and molecular variability of the holoprosencephalic spectrum. *Am J Med Genet A.* 2004;129A(1):21-4.
54. Achiron R, Achiron A. Transvaginal ultrasonic assessment of the early fetal brain. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1991;1(5):336-44.
55. Kushnir U, Shalev J, Bronstein M, Bider D, Lipitz S, Nebel L, et al. Fetal intracranial anatomy in the first trimester of pregnancy: transvaginal ultrasonographic evaluation. *Neuroradiology.* 1989;31(3):222-5.

56. Anderson N, Boswell O, Duff G. Prenatal sonography for the detection of fetal anomalies: results of a prospective study and comparison with prior series. *AJR Am J Roentgenol.* 1995;165(4):943-50.
57. Bernaschek G, Stuempflen I, Deutinger J. The value of sonographic diagnosis of fetal malformations: different results between indication-based and screening-based investigations. *Prenat Diagn.* 1994;14(9):807-12.
58. Van Mieghem T, Hindryckx A, Van Calsteren K. Early fetal anatomy screening: who, what, when and why? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015;27(2):143-50.
59. Souka AP, Pilalis A, Kavalakis Y, Kosmas Y, Antsaklis P, Antsaklis A. Assessment of fetal anatomy at the 11-14-week ultrasound examination. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;24(7):730-4.
60. Rossi AC, Prefumo F. Accuracy of ultrasonography at 11-14 weeks of gestation for detection of fetal structural anomalies: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2013;122(6):1160-7.
61. Salomon LJ, Alfirevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, et al. ISUOG Clinical Standards Committee. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(1):116-26.
62. Malinger G, Paladini D, Haratz KK, Monteagudo A, Pilu GL, Timor-Tritsch IE. ISUOG Practice Guidelines (updated): sonographic examination of the fetal central nervous system. Part 1: performance of screening examination and indications for targeted neurosonography. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2020; 56: 476–484.
63. Paladini D, Malinger G, Birnbaum R, Monteagudo A, Pilu G, Salomon LJ, et al. ISUOG Practice Guidelines (updated): sonographic examination of the fetal central nervous system. Part 2: performance of targeted neurosonography. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.* 2021;57(4), 661–71.
64. Blaas HG, Eik-Nes SH. Sonoembryology and early prenatal diagnosis of neural anomalies. *Prenat Diagn.* 2009;29(4):312–25.
65. Sepulveda W, Dezerega V, Be C. First-trimester sonographic diagnosis of holoprosencephaly: value of the “butterfly” sign. *J Ultrasound Med.* 2004;23(6):761–5 quiz 6-7.
66. Sepulveda, W, Illescas T, Adiego B, Martinez-Ten P. Prenatal Detection of Fetal Anomalies at the 11- to 13-Week Scan- Part I: Brain, Face and Neck. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.* 2013;7, 359–68.

67. Pilu G, Buyukkurt S, Malinger G. Anomalies of ventral induction. In: Timor-Tritsch IE, Monteagudo A, Pilu G, Malinger G, eds. *Ultrasonography of the prenatal brain*, 3rd ed. New York, NY: The McGraw-Hill Company; 2012:228–45.
68. Bernard JP, Drummond CL, Zaarour P, Molho M, Ville Y. A new clue to the prenatal diagnosis of lobar holoprosencephaly: the abnormal pathway of the anterior cerebral artery crawling under the skull. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002;19:605–7.
69. Kline-Fath BM, Calvo-Garcia MA. Prenatal imaging of congenital malformations of the brain. *Semin Ultrasound CT MR*. 2011;32(3):167-88.
70. Malinger G, Ben-Sira L, Lev D, Ben-Aroya Z, Kidron D, Lerman-Sagie T. Fetal brain imaging: a comparison between magnetic resonance imaging and dedicated neurosonography. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2004;23(4):333-40.
71. Paladini D, Quarantelli M, Sglavo G, Pastore G, Cavallaro A, D'Armiento MR, et al. Accuracy of neurosonography and MRI in clinical management of fetuses referred with central nervous system abnormalities. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;44(2):188-96.
72. Malinger G, Paladini D, Pilu G, Timor-Tritsch IE. Fetal cerebral magnetic resonance imaging, neurosonography and the brave new world of fetal medicine. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;50(6):679-80.
73. Timor-Tritsch IE, Monteagudo A, Santos R. Three-dimensional inversion rendering in the first- and early second-trimester fetal brain: its use in holoprosencephaly. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32(6):744–50.
74. Stashinko EE, Clegg NJ, Kammann HA, Sweet VT, Delgado MR, Hahn JS, et al. A retrospective survey of perinatal risk factors of 104 living children with holoprosencephaly. *Am J Med Genet A*. 2004;128A(2):114-9.
75. Mercier S, Dubourg C, Belleguic M, Pasquier L, Loget P, Lucas J, et al. Genetic counseling and "molecular" prenatal diagnosis of holoprosencephaly (HPE). *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):191-6.
76. Wenghoefer M, Ettema AM, Sina F, Geipel A, Kuijpers-Jagtman AM, Hansmann H, et al. Prenatal ultrasound diagnosis in 51 cases of holoprosencephaly: craniofacial anatomy, associated malformations, and genetics. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010;47(1):15-21.
77. Joó GJ, Beke A, Papp C, Tóth-Pál E, Szigeti Z, Bán Z, et al. Prenatal diagnosis, phenotypic and obstetric characteristics of holoprosencephaly. *Fetal Diagn Ther*. 2005;20(3):161-6.
78. Levey EB, Stashinko E, Clegg NJ, Delgado MR. Management of children with holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C:183–90.

79. Bullen PJ, Rankin JM, Robson SC. Investigation of the epidemiology and prenatal diagnosis of holoprosencephaly in the North of England. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(6):1256-62.
80. Whiteford ML, Tolmie JL. Holoprosencephaly in the west of Scotland 1975-1994. *J Med Genet.* 1996;33(7):578-84.
81. Olsen CL, Hughes JP, Youngblood LG, Sharpe-Stimac M. Epidemiology of holoprosencephaly and phenotypic characteristics of affected children: New York State, 1984-1989. *Am J Med Genet.* 1997;73(2):217-26.
82. Marcucio R, Hallgrimsson B, Young NM. Facial Morphogenesis: Physical and Molecular Interactions Between the Brain and the Face. *Curr Top Dev Biol.* 2015;115:299-320.
83. Petryk A, Graf D, Marcucio R. Holoprosencephaly: signaling interactions between the brain and the face, the environment and the genes, and the phenotypic variability in animal models and humans. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015;4(1):17-32.
84. DeMyer W, Zeman W, Palmer CG. The face predicts the brain: diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arrhinencephaly). *Pediatrics.* 1964;34:256.
85. Cohen MM Jr. Perspectives on holoprosencephaly: part III. Spectra, distinctions, continuities, and discontinuities. *Am J Med Genet.* 1989;34(2):271-88.
86. Plawner LL, Delgado MR, Miller VS, Levey EB, Kinsman SL, Barkovich AJ, et al. Neuroanatomy of holoprosencephaly as predictor of function: beyond the face predicting the brain. *Neurology.* 2002;59(7):1058-66.
87. Cohen MM Jr, Sulik KK. Perspectives on holoprosencephaly: Part II. Central nervous system, craniofacial anatomy, syndrome commentary, diagnostic approach, and experimental studies. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1992;12(4):196-244.
88. Roach E, Demyer W, Conneally PM, Palmer C, Merritt AD. Holoprosencephaly: birth data, benetic and demographic analyses of 30 families. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1975;11(2):294-313.
89. Solomon BD, Lacbawan F, Mercier S, Clegg NJ, Delgado MR, Rosenbaum K, et al. Mutations in ZIC2 in human holoprosencephaly: description of a novel ZIC2-specific phenotype and comprehensive analysis of 157 individuals. *J Med Genet.* 2010;47:513–24.
90. Lacbawan F, Solomon BD, Roessler E, El-Jaick K, Domené S, Vélez JI, et al. Clinical spectrum of SIX3-associated mutations in holoprosencephaly: correlation between genotype, phenotype and function. *J Med Genet.* 2009;46(6):389-98.

91. Solomon BD, Lacbawan F, Jain M, Domené S, Roessler E, Moore C, et al. A novel SIX3 mutation segregates with holoprosencephaly in a large family. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(5):919-25.
92. Richieri-Costa A, Ribeiro LA. Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotypes: Review of facial and molecular findings in patients from a craniofacial hospital in Brazil. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C:149–57.
93. Hahn JS, Hahn SM, Kammann H, Barkovich AJ, Clegg NJ, Delgado MR, et al. Endocrine disorders associated with holoprosencephaly. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2005;18(10):935-41.
94. Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Mercier S, Raam MS, Odent S, Muenke M. Holoprosencephaly flashcards: A summary for the clinician. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):3-7.
95. Gabbay-Benziv R, Reece EA, Wang F, Yang P. Birth defects in pregestational diabetes: Defect range, glycemic threshold and pathogenesis. *World Journal of Diabetes*, 6(3). 2015, 481–88.
96. Johnson CY, Rasmussen SA. Non-genetic risk factors for holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):73-85.
97. Tinker SC, Gilboa SM, Moore CA, Waller DK, Simeone RM, Kim SY, et al. Specific birth defects in pregnancies of women with diabetes: National Birth Defects Prevention Study, 1997-2011. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;222(2):176.e1-176.e11.
98. Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Miller RK. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: Congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2015;105(1), 53–72.
99. Correa A, Botto L, Liu Y, Mulinare J, Erickson JD. Do multivitamin supplements attenuate the risk for diabetes-associated birth defects? *Pediatrics*. 2003;111(5 Pt 2):1146-51.
100. Correa A, Gilboa SM, Botto LD, Moore CA, Hobbs CA, Cleves MA, et al. Lack of periconceptional vitamins or supplements that contain folic acid and diabetes mellitus-associated birth defects. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(3):218.e1-13.
101. Anderson JL, Waller DK, Canfield MA, Shaw GM, Watkins ML, Werler MM. Maternal obesity, gestational diabetes, and central nervous system birth defects. *Epidemiology*. 2005;16(1):87-92.
102. Orioli IM, Castilla EE. Clinical epidemiologic study of holoprosencephaly in South America. *Am J Med Genet Part A* 143A:2007, 3088–99.

103. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Prieto L, Frías JL. Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in gestational diabetic mothers. *Am J Med Genet.* 1998;78(2):140-5.
104. Correa A, Gilboa SM, Besser LM, Botto LD, Moore CA, Hobbs CA, et al. Diabetes mellitus and birth defects. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199(3):237.e1-9.
105. Cohen MM Jr, Shiota K. Teratogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet.* 2002;109(1):1-15.
106. Barr M Jr, Hanson JW, Currey K, Sharp S, Toriello H, Schmickel RD, et al. Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. *J Pediatr.* 1983;102(4):565-8.
107. Byrne PJ, Silver MM, Gilbert JM, Cadera W, Tanswell AK. Cyclopia and congenital cytomegalovirus infection. *Am J Med Genet.* 1987;28(1):61-5.
108. Rasmussen SA, Moore CA, Khoury MJ, Cordero JF. Descriptive epidemiology of holoprosencephaly and arhinencephaly in metropolitan Atlanta, 1968-1992. *Am J Med Genet.* 1996;66(3):320-33.
109. Kilic N, Yazici Z. A case of holoprosencephaly and cebocephaly associated to torch infection. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005;69(9):1275-8.
110. Khudr, G. Cyclopia. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine.* 1973;125(1), 120.
111. Miller EA, Rasmussen SA, Siega-Riz AM, Frías JL, Honein MA; National Birth Defects Prevention Study. Risk factors for non-syndromic holoprosencephaly in the National Birth Defects Prevention Study. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010;154C(1):62-72.
112. Keller K, McCune H, Williams C, Muenke M. Lobar holoprosencephaly in an infant born to a mother with classic phenylketonuria. *Am J Med Genet.* 2000;95(2):187-8.
113. Weber MA, Sebire NJ. Genetics and developmental pathology of twinning. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(6):313-8.
114. Opitz JM, Gilbert EF. Pathogenetic analysis of congenital anomalies in humans. *Pathobiol Annu.* 1982;12:301-49.
115. Suslak L, Mimms GM, Desposito F, Opitz JM, Reynolds JF. Monozygosity and holoprosencephaly: Cleavage disorders of the "midline field". *American Journal of Medical Genetics.* 1987;28(1), 99-102.
116. Odent S, Le Marec B, Munnich A, Le Merrer M, Bonaïti-Pellié C. Segregation analysis in nonsyndromic holoprosencephaly. *Am J Med Genet.* 1998 May 1;77(2):139-43.
117. Källén B, Castilla EE, Lancaster PA, Mutchinick O, Knudsen LB, Martínez-Frías ML, et al. The cyclops and the mermaid: an epidemiological study of two types of rare malformation. *J Med Genet.* 1992;29(1):30-5.

118. Berry SM, Gosden C, Snijders RJ, Nicolaides KH. Fetal holoprosencephaly: associated malformations and chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther*. 1990;5(2):92-9.
119. Roach E, Demyer W, Conneally PM, Palmer C, Merritt AD. Holoprosencephaly: birth data, genetic and demographic analyses of 30 families. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1975;11(2):294-313.
120. Forrester MB, Merz RD. Epidemiology of holoprosencephaly in Hawaii, 1986-97. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2000;14(1):61-3.
121. Ong S, Tonks A, Woodward ER, Wyldes MP, Kilby MD. An epidemiological study of holoprosencephaly from a regional congenital anomaly register: 1995-2004. *Prenat Diagn*. 2007;27(4):340-7.
122. Benawra R, Mangurten HH, Duffell DR. Cyclopia and other anomalies following maternal ingestion of salicylates. *J Pediatr*. 1980;96(6):1069-71.
123. Agapitos M, Georgiou-Theodoropoulou M, Koutselinis A, Papacharalampus N. Cyclopia and maternal ingestion of salicylates. *Pediatr Pathol*. 1986;6(2-3):309-10.
124. Koyama N, Komori S, Bessho T, Koyama K, Hiraumi Y, Maeda Y. Holoprosencephaly in a fetus with maternal medication of sulfasalazine in early gestation. A case report. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 1996;23(3):136-40.
125. Sezgin I, Süngü S, Bekar E, Cetin M, Ceran H. Cyclopia-astomia-agnathia-holoprosencephaly association: a case report. *Clin Dysmorphol*. 2002;11(3):225-6.
126. Kotzot D, Weigl J, Huk W, Rott HD. Hydantoin syndrome with holoprosencephaly: a possible rare teratogenic effect. *Teratology*. 1993;48(1):15-9.
127. Holmes LB, Harvey EA. Holoprosencephaly and the teratogenicity of anticonvulsants. *Teratology*. 1994;49(2):82.
128. Rosa F. Holoprosencephaly and antiepileptic exposures. *Teratology*. 1995;51(4):230.
129. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnash ND, Benke PJ, Braun JT, et al. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*. 1985 Oct 3;313(14):837-41. Rosa F, Piazza-Hepp T, Goetsch R. Holoprosencephaly with 1st trimester topical tretinoin. *Teratology*. 1994;49(418):9.
130. Kalter H. Cyclopia produced in a very early retinoic acid experiment. *Teratology*. 1992;46(3):207-8.
131. Sulik KK, Dehart DB, Rogers JM, Chernoff N. Teratogenicity of low doses of all-trans retinoic acid in presomite mouse embryos. *Teratology*. 1995;51(6):398-403.
132. Stabile M, Bianco A, Iannuzzi S, Buonocore MC, Ventruto V. A case of suspected teratogenic holoprosencephaly. *Journal of medical genetics*. 1985;22(2):147-9.

133. Ronen GM, Andrews WL. Holoprosencephaly as a possible embryonic alcohol effect. *American Journal of Medical Genetics*. 1991;40(2):151-4.
134. Schroeder AC, Privalsky ML. Thyroid hormones, t3 and t4, in the brain. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:40.
135. Kelley RI, Roessler E, Hennekam RC, Feldman GL, Kosaki K, Jones MC, et al. Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog?. *American journal of medical genetics*. 1996;66(4):478-84.
136. Incardona JP, Roelink H. The role of cholesterol in Shh signaling and teratogen-induced holoprosencephaly. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2000;57:1709-19.
137. Kolf-Clauw M, Chevy F, Siliart B, Wolf C, Mulliez N, Roux C. Cholesterol biosynthesis inhibited by BM15. 766 induces holoprosencephaly in the rat. *Teratology*. 1997;56(3):188-200.
138. Roux C, Wolf C, Mulliez N, Gaoua W, Cormier V, Chevy F, et al. Role of cholesterol in embryonic development. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(5):1270S-9S.
139. Roessler E, Muenke M. How a Hedgehog might see holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 2003;12 Spec No 1:R15-R25.
140. Edison RJ, Muenke M. Mechanistic and epidemiologic considerations in the evaluation of adverse birth outcomes following gestational exposure to statins. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2004;131(3):287-98.
141. Edison RJ, Muenke M. Central nervous system and limb anomalies in case reports of first-trimester statin exposure. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(15):1579-82.
142. Edison RJ, Muenke M. Gestational exposure to lovastatin followed by cardiac malformation misclassified as holoprosencephaly. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(26):2759-.
143. Bönnemann C, Meinecke P. Holoprosencephaly as a possible embryonic alcohol effect: another observation. *American journal of medical genetics*. 1990;37(3):431-2.
144. Coulter CL, Leech RW, Schaefer GB, Scheithauer BW, Brumback RA. Midline cerebral dysgenesis, dysfunction of the hypothalamic-pituitary axis, and fetal alcohol effects. *Archives of neurology*. 1993;50(7):771-5.
145. Sulik KK, Johnston MC. Embryonic origin of holoprosencephaly: interrelationship of the developing brain and face. *Scan Electron Microsc*. 1982;(Pt 1):309-22.
146. Webster WS, Walsh DA, McEWEN SE, Lipson AH. Some teratogenic properties of ethanol and acetaldehyde in C57BL/6J mice: implications for the study of the fetal alcohol syndrome. *Teratology*. 1983;27(2):231-43.

147. Blader P, Strähle U. Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo. *Developmental biology*. 1998;201(2):185-201.
148. Higashiyama D, Saitsu H, Komada M, Takigawa T, Ishibashi M, Shiota K. Sequential developmental changes in holoprosencephalic mouse embryos exposed to ethanol during the gastrulation period. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2007;79(7):513-23.
149. Burck U, Held KR, Kitschke HJ, Opitz JM. Occurrence of cyclopia, myelomeningocele, deafness, and abducens paralysis in siblings. *American Journal of Medical Genetics*. 1982;11(4):443-8.
150. Ronen GM. Holoprosencephaly and maternal low-calorie weight-reducing diet. *American journal of medical genetics*. 1992;42(1):139-.
151. Karaman B, Ergin S, Kayserili Karabey H, Yüksel A, Satkın N B, Kalelioğlu İ H, Has R, Başaran S. Holoprozensefali: 127 antenatal olgunun etyopatogenezinde kromozom anomalileri. *İstanbul Tıp Fakultesi Dergisi*. 2021; 84(2):186-91.
152. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145C(4):335-45.
153. Norman M. Congenital malformations of the brain. Pathological, embryonal, clinical, radiological and genetics aspects. Oxford: Oxford University Press. 1995;9, 187–221.
154. Roessler E, Muenke M. Holoprosencephaly: A paradigm for the complex genetics of brain development. *J Inher Metab Dis*. 1998;21:481–97.
155. Solomon BD, Rosenbaum KN, Meck JM, Muenke M. Holoprosencephaly due to numeric chromosome abnormalities. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C(1):146-8.
156. Muenke M, Beachy PA. Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2000;10:262–269.
157. Ming JE, Muenke M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *American Journal of Human Genetics*. 2002;71:1017-32.
158. Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet*. 1998;63:1153–59.
159. Tyshchenko N, Lurie I, Schinzel A. Chromosomal map of human brain malformations. *Hum Genet*. 2008;124:73–80.

160. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet.* 1996;14:353–56.
161. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, et al. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.* 1996;14:357–60.
162. Dubourg C, Lazaro L, Pasquier L, Bendavid C, Blayau M, Le Duff F, et al. Molecular screening of SHH, ZIC2, SIX3, and TGIF genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2004;24:43–51.
163. Brown SA, Warburton D, Brown LY, Yu CY, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S, et al. Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of *Drosophila* odd-paired. *Nat Genet.* 1998;20:180–83.
164. Wallis DE, Roessler E, Hehr U, Nanni L, Wiltshire T, Richieri-Costa A, et al. Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.* 1999; 22:196–98.
165. Bendavid, C, Dupé, V, Rochard, L, Gicquel, I, Dubourg, C, David, V. Holoprosencephaly: An update on cytogenetic abnormalities. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics.* 2010;154C(1), 86–92.
166. Ming JE, Kaupas ME, Roessler E, Brunner HG, Golabi M, Tekin M, et al. Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Human Genetics.* 2002; 110:297–301.
167. Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillessen-Kaesbach G, et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100:13424–29.
168. Roessler E, Ma Y, Ouspenskaia MV, Lacbawan F, Bendavid C, Dubourg C, et al. Truncating loss-of-function mutations of DISP1 contribute to holoprosencephaly-like microform features in humans. *Human Genetics.* 2009; 125:393–400.
169. Roessler E, Ouspenskaia MV, Karkera JD, Velez JI, Kantipong A, Lacbawan F, et al. Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including FOXH1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly. *American Journal of Human Genetics.* 2008;83:18–29.
170. Petracchi F, Crespo L, Michia C, Igarzabal L, Gadow E. Holoprosencephaly at prenatal diagnosis: Analysis of 28 cases regarding etiopathogenic diagnoses. *Prenatal Diagnosis.* 2011;31:887–91.

171. Toufaily MH, Roberts DJ, Westgate MN, Holmes LB. Triploidy: Variation of Phenotype. *Am J Clin Pathol.* 2016;145:86–95.
172. Rosa RFM, Correia EPE, Bastos CS, da Silva GS, Correia JD, da Rosa EB, et al. Trisomy 18 and holoprosencephaly. *Am J Med Genet A.* 2017;173:1985–7.
173. Hsu HF, Hou JW. Variable expressivity in Patau syndrome is not all related to trisomy 13 mosaicism. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(15):1739–48.
174. Lehman CD, Nyberg DA, Winter TC 3rd, Kapur RP, Resta RG, Luthy DA. Trisomy 13 syndrome: prenatal US findings in a review of 33 cases. *Radiology.* 1995; 194(1):217–22.
175. Lin HY, Lin SP, Chen YJ, Hsu CH, Kao HA, Chen MR, et al. Clinical characteristics and survival of trisomy 13 in a medical center in Taiwan, 1985-2004. *Pediatr Int.* 2007;49(3):380-6.
176. Papp C, Beke A, Ban Z, Szigeti Z, Toth-Pal E, Papp Z. Prenatal diagnosis of trisomy 13: analysis of 28 cases. *J Ultrasound Med.* 2006; 25(4):429–35.
177. Cereda A, Carey JC. The trisomy 18 syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:81.
178. Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, et al. Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet.* 2000;25(2):205-8.
179. Turleau C. Monosomy 18p. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:4.
180. Basu S, Kumar A, Das BK. Down syndrome (trisomy 21) with premaxillary agenesis and semilobar holoprosencephaly. *Am J Med Genet A.* 2009;149A(11):2578–80.
181. Epstein CJ, Seto S, Golabi M. Chance vs. causality in the association of Down syndrome and holoprosencephaly. *Am J Med Genet.* 1988;30(4):939–42.
182. Hamada H, Arinami T, Koresawa M, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H. A case of trisomy 21 with holoprosencephaly: the fifth case. *Jinrui Idengaku Zasshi.* 1991; 36(2):159–63.
183. Fahmi F, Schmerler S, Hutcheon RG. Hydrocephalus in an infant with trisomy 22. *J Med Genet.* 1994;31(2):141–4.
184. Isada NB, Bolan JC, Larsen JW Jr, Kent SG. Trisomy 22 with holoprosencephaly: a clinicopathologic study. *Teratology.* 1990;42(4):333–6.
185. Kehinde FI, Anderson CE, McGowan JE, Jethva RN, Wahab MA, Glick AR, et al. Co-occurrence of non-mosaic trisomy 22 and inherited balanced t(4;6)(q33;q23.3) in a liveborn female: case report and review of the literature. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(12):3187-93.
186. Hu T, Kruszka P, Martinez AF, Ming JE, Shabason EK, Raam MS, et al. Cytogenetics and holoprosencephaly: A chromosomal microarray study of 222 individuals with holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2018;178:175–86.

187. Schroeder HW Jr, Forbes S, Mack L, Davis S, Norwood TH. Recombination aneusomy of chromosome 5 associated with multiple severe congenital malformations. *Clin Genet*. 1986;30:285–92.
188. Campeau PM, Ah Mew N, Cartier L, Mackay KL, Shaffer LG, Der Kaloustian VM, et al. Prenatal diagnosis of monosomy 1p36: A focus on brain abnormalities and a review of the literature. *Am J Med Genet*. 2008;Part A 146A:3062–9.
189. Simovich MJ, Bland SD, Peiffer DA, Gunderson KL, Cheung SW, Yatsenko SA, et al. Delineation of the proximal 3q microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(13):1729-35.
190. Roessler E, Hu P, Muenke M. Holoprosencephaly in the genomics era. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2018;178(2):165-74.
191. Bear KA, Solomon BD, Antonini S, Arnhold IJ, França MM, Gerkes EH, et al. Pathogenic mutations in *GLI2* cause a specific phenotype that is distinct from holoprosencephaly. *Journal of Medical Genetics*. 2014;51(6):413–8.
192. Travessa A, Dias P, Rocha P, Sousa AB. Prenatal diagnosis of holoprosencephaly associated with Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS) in a 46,XX fetus. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2017;56(4):541-4.
193. Brown LY, Odent S, David V, Blayau M, Dubourg C, Apacik C, et al. Holoprosencephaly due to mutations in *ZIC2*: alanine tract expansion mutations may be caused by parental somatic recombination. *Hum Mol Genet*. 2001;10:791–6.
194. Roessler, E, Muenke M. The molecular genetics of holoprosencephaly. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2010;154C(1), 52–61.
195. Solomon BD, Mercier S, Vélez JI, Pineda-Alvarez DE, Wyllie A, Zhou N, et al. Analysis of genotype-phenotype correlations in human holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010;154C:133–41.
196. Keaton AA, Solomon BD, Kauvar EF, El-Jaick KB, Gropman AL, Zafer Y, et al. TGIF Mutations in Human Holoprosencephaly: Correlation between Genotype and Phenotype. *Mol Syndromol*. 2010;1(5):211-22.
197. Sampath K, Rubinstein AL, Cheng AM, Liang JO, Fekany K, Solnica-Krezel L, et al. Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature*. 1998;395:185–9.
198. Lowe LA, Yamada S, Kuehn MR. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development*. 2001;128(10):1831-43.

199. Andersson O, Reissmann E, Jörnvall H, Ibáñez CF. Synergistic interaction between Gdf1 and Nodal during anterior axis development. *Dev Biol.* 2006;293(2):370-81.
200. Roessler E, Pei W, Ouspenskaia MV, Karkera JD, Veléz JI, Banerjee-Basu S, et al. Cumulative ligand activity of NODAL mutations and modifiers are linked to human heart defects and holoprosencephaly. *Mol Genet Metab.* 2009;98(1-2):225-34.
201. de la Cruz JM, Bamford RN, Burdine RD, Roessler E, Barkovich AJ, Donnai D, et al. A loss-of-function mutation in the CFC domain of TDGF1 is associated with human forebrain defects. *Hum Genet.* 2002;110(5):422-8.
202. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 1996;383:407–13.
203. Loo CKC, Pearen MA, Ramm GA. The Role of Sonic Hedgehog in Human Holoprosencephaly and Short-Rib Polydactyly Syndromes. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9854.
204. Cooper MK, Wassif CA, Krakowiak PA, Taipale J, Gong R, Kelley RI, et al. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet.* 2003;33:508–13.
205. Buglino JA, Resh MD. Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem.* 2008;283:22076–88.
206. Wassif CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile S, Lin D, Linck LM, Connor WE, et al. Mutations in the human sterol $\Delta 7$ -reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet.* 1998;63:55–62.
207. Dennis JF, Kurosaka H, Iulianella A, Pace J, Thomas N, Beckham S, et al. Mutations in Hedgehog acyltransferase (Hhat) perturb Hedgehog signaling, resulting in severe acrania-holoprosencephaly-agnathia craniofacial defects. *PLoS Genet.* 2012;8(10):e1002927.
208. Huang X, Litingtung Y, Chiang C. Ectopic sonic hedgehog signaling impairs telencephalic dorsal midline development: implication for human holoprosencephaly. *Hum Mol Genet.* 2007;16:1454–68.
209. Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K, et al. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell.* 2002;111(1):63-75.
210. Zhang XM, Ramalho-Santos M, McMahon AP. Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell.* 2001;106:781–92.

211. Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 1997;277:1109–13.
212. Jenkins D. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal*. 2009;21:1023–34.
213. Ding Q, Motoyama J, Gasca S, Mo R, Sasaki H, Rossant J, et al. Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development*. 1998;125:2533–2543.
214. Matisse MP, Epstein DJ, Park HL, Platt KA, Joyner AL. Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development*. 1998;125:2759–70.
215. Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW. The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development*. 1998;125:2315–25.
216. Taniguchi K, Anderson AE, Sutherland AE, Wotton D. Loss of Tgif function causes holoprosencephaly by disrupting the SHH signaling pathway. *PLoS Genet*. 2012; 8:e1002524.
217. Kang JS, Zhang W, Krauss RS. Hedgehog signaling: cooking with Gas1. *Sci STKE*. 2007;2007(403):pe50.
218. Allen BL, Tenzen T, McMahon AP. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during Mouse development. *Genes Dev*. 2007;21:1244–57.
219. Cole F, Krauss RS. Microform holoprosencephaly in mice that lack the Ig superfamily member Cdon. *Curr Biol*. 2003;13:411–5.
220. Seppala M, Depew MJ, Martinelli DC, Fan CM, Sharpe PT, Cobourne MT. Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. *J Clin Invest*. 2007;117:1575–84.
221. Bartholin L, Powers SE, Melhuish TA, Lasse S, Weinstein M, Wotton D. TGIF inhibits retinoid signaling. *Mol Cell Biol*. 2006;26(3):990-1001.
222. Gongal PA, Waskiewicz AJ. Zebrafish model of holoprosencephaly demonstrates a key role for TGIF in regulating retinoic acid metabolism. *Hum Mol Genet*. 2008;17:525–38.
223. Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol*. 2005;287:390–402.
224. Storm EE, Garel S, Borello U, Hebert JM, Martinez S, McConnell SK, et al. Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development*. 2006;133:1831–44.

225. Hayhurst M, Gore BB, Tessier-Lavigne M, McConnell SK. Ongoing sonic hedgehog signaling is required for dorsal midline formation in the developing forebrain. *Dev Neurobiol.* 2008;68:83–100.
226. Roessler E, Lacbawan F, Dubourg C, Paulussen A, Herbergs J, Hehr U, et al. The full spectrum of holoprosencephaly-associated mutations within the ZIC2 gene in humans predicts loss-of-function as the predominant disease mechanism. *Hum Mutat.* 2009;30(4):E541-54.
227. Arauz RF, Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Gropman AL, Parsons JA, Roessler E, et al. A hypomorphic allele in the FGF8 gene contributes to holoprosencephaly and is allelic to gonadotropin-releasing hormone deficiency in humans. *Mol Syndromol.* 2010;1:59–66.
228. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal.* 2004;16:291–9.
229. Gazzero E, Canalis E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev EndocrMetab Disord.* 2006;7:51–65.
230. Ross JJ, Shimmi O, Vilmos P, Petryk A, Kim H, Gaudenz K, et al. Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature.* 2001;410:479–83.
231. Fernandes M, Gutin G, Alcorn H, McConnell SK, Hebert JM. Mutations in the BMP pathway in mice support the existence of two molecular classes of holoprosencephaly. *Development.* 2007;134:3789–94.
232. Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, Belo JA, Anderson RM, May SR, et al. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature.* 2000;403(6770):658-61.
233. Lana-Elola E, Tylzanowski P, Takatalo M, Alakurtti K, Veistinen L, Mitsiadis TA, et al. Noggin null allele mice exhibit a microform of holoprosencephaly. *Hum Mol Genet.* 2011;20:4005–15.
234. Zakin L, De Robertis EM. Inactivation of Mouse Twisted gastrulation reveals its role in promoting Bmp4 activity during forebrain development. *Development.* 2004;131:413–24.
235. Graf D, Timmons PM, Hitchins M, Episkopou V, Moore G, Ito T, et al. Evolutionary conservation, developmental expression, and genomic mapping of mammalian Twisted gastrulation. *Mamm Genome.* 2001;12:554–60.
236. Kauvar EF, Hu P, Pineda-Alvarez DE, Solomon BD, Dutra A, Pak E, et al. Minimal evidence for a direct involvement of twisted gastrulation homolog 1 (TWSG1) gene in human holoprosencephaly. *Mol Genet Metab.* 2011;102(4):470-80.
237. Dubourg C, Lazaro L, Pasquier L, Bendavid C, Blayau M, Le Duff F, et al. Molecular screening of SHH, ZIC2, SIX3, and TGIF genes in patients with features of holoprosencephaly

- spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2004;24(1):43-51.
238. Drissi, I, Fletcher, E, Shaheen, R, Nahorski M, Alhashem AM, Lisgo S, et al. Mutations in phospholipase C eta-1 (PLCH1) are associated with holoprosencephaly. *Journal of medical genetics.* 2022;59(4), 358–65.
 239. De Franco E, Watson RA, Weninger WJ, Wong CC, Flanagan SE, Caswell R, et al. A Specific CNOT1 Mutation Results in a Novel Syndrome of Pancreatic Agenesis and Holoprosencephaly through Impaired Pancreatic and Neurological Development. *Am J Hum Genet.* 2019;104(5):985-9.
 240. Kruszka, P, Berger SI, Weiss K, Everson JL, Martinez AF, Hong S, et al. **A CCR4-NOT transcription complex, subunit 1, CNOT1, variant associated with holoprosencephaly.** *Am. J. Hum. Genet.* 2019; 104: 990-3.
 241. Kruszka P, Berger SI, Casa V, Dekker MR, Gaesser J, Weiss K, et al. Cohesin complex-associated holoprosencephaly. *Brain.* 2019;142(9):2631-43.
 242. Mouden C, Dubourg C, Carré W, Rose S, Quelin C, Akloul L, et al. Complex mode of inheritance in holoprosencephaly revealed by whole exome sequencing. *Clin Genet.* 2016;89(6):659-68.
 243. Beaudet A, Scriver C, Sly W, Valle D. Genetics, biochemistry, and molecular bases of variant human phenotypes. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds) *The Metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, 2001;3–45.
 244. Scriver CR. Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: explanations in the era of genomics. *J Pediatr.* 2002;140:502-6.
 245. Schäffer, A. A. Digenic inheritance in medical genetics. *Journal of Medical Genetics.* 2013;50(10), 641-52.
 246. Kajiwarra K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations in the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science.* 1994;264:1604–8.
 247. Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, et al. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science.* 2001;293:2256–9.
 248. Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Hum Mutat.* 2001;18(5):460.
 249. Varlet I, Collignon J, Norris DP, Robertson EJ. Nodal signaling and axis formation in the mouse. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1997;62:105-13.

250. Jin O, Harpal K, Ang SL, Rossant J. Otx2 and HNF3beta genetically interact in anterior patterning. *Int J Dev Biol.* 2001;45(1):357-65.
251. Nomura M, Li E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature.* 1998;393:786–90.
252. Song J, Oh SP, Schrewe H, Nomura M, Lei H, Okano M, et al. The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. *Dev Biol.* 1999;213(1):157-69.
253. Klingensmith J, Stottmann R, Nordgren A, Anderson R. The mouse organizer and its secreted factors Chordin and Noggin are unnecessary for anterior-posterior axis formation but are required for head development. *Dev Biol.* 2001;235: 283-4.
254. Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die- Smulders C, et al. The mutational spectrum of the Sonic Hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet.* 1999;8:2479–88.
255. Nanni L, Ming JE, Du Y, Hall RK, Aldred M, Bankier A, et al. SHH mutation is associated with solitary median maxillary central incisor: a study of 13 patients and review of the literature. *Am J Med Genet.* 2001;102:1–10.
256. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
257. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 2015;68–74.
258. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-4.
259. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-2.
260. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):e67.
261. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics.* 2015;31(16):2745-47.
262. Amberger JS, Hamosh A. Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®): A Knowledgebase of Human Genes and Genetic Phenotypes. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2017;58:1.2.1-1.2.12.

263. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003;21(6):577-81.
264. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D988-D995./
265. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, et al. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D840-D845.
266. Stelzer, G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2016;54:1.30.1-1.30.33.
267. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-D1067.
268. Rodrigues EdS, Griffith S, Martin R, Antonescu C, Posey J E, Coban-Akdemir Z, et al Variant-level matching for diagnosis and discovery: Challenges and opportunities. *Human Mutation*, 2022;43, 782– 90.
269. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics.* 2019 ;35(11):1978-80.
270. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011 Jan;29(1):24-6.
271. Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, Collins RL, Wang Q, Alföldi J, et al. A genome-wide mutational constraint map quantified from variation in 76,156 human genomes. *bioRxiv* 2022; 485034.
272. L. Phan, Y. Jin, H. Zhang, W. Qiang, E. Shekhtman, D. Shao, D. Revoe, R. Villamarin, E. Ivanchenko, M. Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, J. B. Holmes, V. Lyoshin, K. Kaur, E. Moyer, M. Feolo, and B. L. Kattman. "ALFA: Allele Frequency Aggregator." *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 2020.*
273. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.

274. Delaney A, Burkholder AB, Lavender CA, Plummer L, Mericq V, Merino PM, et al. Increased Burden of Rare Sequence Variants in GnRH-Associated Genes in Women With Hypothalamic Amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(3):e1441-e1452.
275. Ciara E, Nowaczyk MJ, Witsch-Baumgartner M, Malunowicz E, Popowska E, Jezela-Stanek A, et al. DHCR7 mutations and genotype-phenotype correlation in 37 Polish patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet*. 2004;66(6):517-24.
276. Schoner K, Witsch-Baumgartner M, Behunova J, Petrovic R, Bald R, Kircher SG, et al. Smith-Lemli-Opitz syndrome-Fetal phenotypes with special reference to the syndrome-specific internal malformation pattern. *Birth Defects Res*. 2020;112(2):175-85.
277. Brown S, Russo J, Chitayat D, Warburton D. The 13q- syndrome: the molecular definition of a critical deletion region in band 13q32. *Am J Hum Genet*. 1995;57(4):859-66.
278. Wolfe SA, Neklodova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2000;29:183-212.
279. Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(2):532-50.
280. Aruga J, Kamiya A, Takahashi H, Fujimi TJ, Shimizu Y, Ohkawa K, et al. A wide-range phylogenetic analysis of Zic proteins: implications for correlations between protein structure conservation and body plan complexity. *Genomics*. 2006;87(6):783-92.
281. Hatayama M, Aruga J. Characterization of the tandem CWCH2 sequence motif: a hallmark of inter-zinc finger interactions. *BMC Evol Biol*. 2010;10:53.
282. Mizugishi K, Hatayama M, Tohmonda T, Ogawa M, Inoue T, Mikoshiba K, et al. Myogenic repressor I-mfa interferes with the function of Zic family proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(1):233-40.
283. Aruga J, Nagai T, Tokuyama T, Hayashizaki Y, Okazaki Y, Chapman VM, et al. The mouse zic gene family. Homologues of the Drosophila pair-rule gene odd-paired. *J Biol Chem*. 1996;271(2):1043-7.
284. Himeda CL, Barro MV, Emerson CP Jr. Pax3 synergizes with Gli2 and Zic1 in transactivating the Myf5 epaxial somite enhancer. *Dev Biol*. 2013;383(1):7-14.
285. Marchini S, Poynor E, Barakat RR, Clivio L, Cinquini M, Fruscio R, et al. The zinc finger gene ZIC2 has features of an oncogene and its overexpression correlates strongly with the clinical course of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(16):4313-24.
286. Hursh DA, Stultz BG. Odd-Paired: The Drosophila Zic Gene. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1046:41-58.

287. Barratt KS, Arkell RM. ZIC2 in Holoprosencephaly. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1046:269-99.
288. Xiong J, Xiang B, Chen X, Cai T. Case report: a novel mutation in ZIC2 in an infant with microcephaly, holoprosencephaly, and arachnoid cyst. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(10):e14780.
289. Warr N, Powles-Glover N, Chappell A, Robson J, Norris D, Arkell RM. Zic2-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation. *Hum Mol Genet.* 2008;17(19):2986-96.
290. Cheng X, Hsu CM, Currle DS, Hu JS, Barkovich AJ, Monuki ES. Central roles of the roof plate in telencephalic development and holoprosencephaly. *J Neurosci.* 2006;26(29):7640-9.
291. Monuki ES. The morphogen signaling network in forebrain development and holoprosencephaly. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Jul;66(7):566-75.
292. Nagai T, Aruga J, Minowa O, Sugimoto T, Ohno Y, Noda T, et al. Zic2 regulates the kinetics of neurulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(4):1618-23.
293. Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol.* 1990;10(2):634-42.
294. Pavletich NP, Pabo CO. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science.* 1993;261(5129):1701-7.
295. Mizugishi K, Aruga J, Nakata K, Mikoshiba K. Molecular properties of Zic proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins. *J Biol Chem.* 2001;276(3):2180-8.
296. Reinders MG, van Hout AF, Cosgun B, Paulussen AD, Leter EM, Steijlen PM, et al. New mutations and an updated database for the patched-1 (PTCH1) gene. *Mol Genet Genomic Med.* 2018;6(3):409-15.
297. Gong X, Qian H, Cao P, Zhao X, Zhou Q, Lei J, et al. Structural basis for the recognition of Sonic Hedgehog by human Patched1. *Science.* 2018;361(6402):eaas8935.
298. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature.* 1996;384(6605):176-9.
299. Kuwabara PE, Labouesse M. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet.* 2002;18(4):193-201.
300. Ribeiro LA, Murray JC, Richieri-Costa A. PTCH mutations in four Brazilian patients with holoprosencephaly and in one with holoprosencephaly-like features and normal MRI. *Am J Med Genet A.* 2006;140(23):2584-6.

301. Rudolf AF, Kinnebrew M, Kowatsch C, Ansell TB, El Omari K, Bishop B, et al. The morphogen Sonic hedgehog inhibits its receptor Patched by a pincer grasp mechanism. *Nat Chem Biol.* 2019;15(10):975-82.
302. Derwińska K, Smyk M, Cooper M L, Bader P, Cheung S W, Stankiewicz P. *PTCH1* duplication in a family with microcephaly and mild developmental delay. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(2):267–71.
303. Mastronardi FG, Dimitroulakos J, Kamel-Reid S, Manoukian AS. Co-localization of patched and activated sonic hedgehog to lysosomes in neurons. *Neuroreport.* 2000;11(3):581-5.
304. Fernandes-Silva H, Correia-Pinto J, Moura RS. Canonical Sonic Hedgehog Signaling in Early Lung Development. *J Dev Biol.* 2017;5(1):3.
305. Ribeiro LA, Queizi RG, Nascimento A, Bertolacini CP, Richieri-Costa A. Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotype and GAS1 DNA sequence changes: Report of four Brazilian patients. *Am J Med Genet.* 2010; Part A:152A:1688–94.
306. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell.* 1993;75(7):1417-30.
307. Li X, Li Y, Li S, Li H, Yang C, Lin J. The role of Shh signalling pathway in central nervous system development and related diseases. *Cell Biochem Funct.* 2021;39(2):180-9.
308. de Castro VF, Mattos D, de Carvalho FM, Cavalcanti DP, Duenas-Roque MM, Llerena J Jr, et al. New SHH and Known SIX3 Variants in a Series of Latin American Patients with Holoprosencephaly. *Mol Syndromol.* 2021;12(4):219-33.
309. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980;287(5785):795-801.
310. Odent S, Atti-Bitach T, Blayau M, Mathieu M, Aug J, Delezo de AL, et al. Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum Mol Genet.* 1999;8(9):1683-9.
311. Memi F, Zecevic N, Radonjić N. Multiple roles of Sonic Hedgehog in the developing human cortex are suggested by its widespread distribution. *Brain Struct Funct.* 2018;223(5):2361-75.
312. Solomon BD, Bear KA, Wyllie A, Keaton AA, Dubourg C, David V, Mercier S, et al. Genotypic and phenotypic analysis of 396 individuals with mutations in Sonic Hedgehog. *J Med Genet.* 2012;49(7):473-9.

313. Traiffort E, Dubourg C, Faure H, Rognan D, Odent S, Durou MR, et al. Functional characterization of sonic hedgehog mutations associated with holoprosencephaly. *J Biol Chem*. 2004;279(41):42889-97.
314. Granadino B, Gallardo ME, López-Ríos J, Sanz R, Ramos C, Ayuso C, et al. Genomic cloning, structure, expression pattern, and chromosomal location of the human SIX3 gene. *Genomics*. 1999;55(1):100-5.
315. Boucher CA, Winchester CL, Hamilton GM, Winter AD, Johnson KJ, Bailey ME. Structure, mapping and expression of the human gene encoding the homeodomain protein, SIX2. *Gene*. 2000;247(1-2):145-51.
316. Geng X, Speirs C, Lagutin O, Inbal A, Liu W, Solnica-Krezel L, et al. Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev Cell*. 2008;15(2):236-47.
317. Stokes B, Berger SI, Hall BA, Weiss K, Martinez AF, Hadley DW, et al. SIX3 deletions and incomplete penetrance in families affected by holoprosencephaly. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2018;58(1):29-32.
318. Shimamura K, Rubenstein JL. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development*. 1997;124(14):2709-18.
319. Zhang W, Kang JS, Cole F, Yi MJ, Krauss RS. Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Dev Cell*. 2006;10(5):657-65.
320. Roessler E, Ermilov AN, Grange DK, Wang A, Grachtchouk M, Dlugosz AA, et al. A previously unidentified amino-terminal domain regulates transcriptional activity of wild-type and disease-associated human GLI2. *Hum Mol Genet*. 2005;14(15):2181-8.
321. Bear KA, Solomon BD. GLI2 mutations typically result in pituitary anomalies with or without postaxial polydactyly. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(10):2491-2.
322. Galen W, Heyne, Joshua L, Everson, Lydia J, Ansen-Wilson, Cal G, Melberg, Dustin M, Fink, Kia F, Parins, et al. *Gli2* gene-environment interactions contribute to the etiological complexity of holoprosencephaly: evidence from a mouse model. *Dis Model Mech*. 2016; 9 (11): 1307–15.
323. Fernández-Zapico ME. Primers on molecular pathways GLI: more than just Hedgehog? *Pancreatology*. 2008;8(3):227-9.
324. Cohen MM Jr. Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2006;76(9):658-73.

325. Wannasilp N, Solomon BD, Warren-Mora N, Clegg NJ, Delgado MR, Lacbawan F, et al. Holoprosencephaly in a family segregating novel variants in ZIC2 and GLI2. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(4):860-4.
326. Vaaralahti K, Raivio T, Koivu R, Valanne L, Laitinen EM, Tommiska J. Genetic Overlap between Holoprosencephaly and Kallmann Syndrome. *Mol Syndromol*. 2012;3(1):1-5.
327. Davis EE, Katsanis N. The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22(3):290-303.
328. Sanders AA, de Vrieze E, Alazami AM, Alzahrani F, Malarkey EB, Soroush N, et al. KIAA0556 is a novel ciliary basal body component mutated in Joubert syndrome. *Genome Biol*. 2015;16:293.
329. Cauley, E.S., Hamed, A., Mohamed, I.N. et al. Overlap of polymicrogyria, hydrocephalus, and Joubert syndrome in a family with novel truncating mutations in ADGRG1/GPR56 and KIAA0556. *Neurogenetics*. 2019;20, 91–98
330. Stottmann RW, Tran PV, Turbe-Doan A, Beier DR. Ttc21b is required to restrict sonic hedgehog activity in the developing mouse forebrain. *Dev Biol*. 2009;335(1):166-78.
331. Gorivodsky M, Mukhopadhyay M, Wilsch-Braeuninger M, Phillips M, Teufel A, Kim C, et al. Intraflagellar transport protein 172 is essential for primary cilia formation and plays a vital role in patterning the mammalian brain. *Dev Biol*. 2009;325(1):24-32.
332. Laurianne Besse, Mariame Neti, Isabelle Anselme, Christoph Gerhardt, Ulrich Rüther, Christine Laclef, et al. Primary cilia control telencephalic patterning and morphogenesis via Gli3 proteolytic processing. *Development*. 2011; 138 (10): 2079–88.
333. Aksu Uzunhan T, Ertürk B, Aydın K, Ayaz A, Altunoğlu U, Yazar MH, et al. Clinical and genetic spectrum from a prototype of ciliopathy: Joubert syndrome. *Clin Neurol Neurosurg*. 2023;224:107560.
334. Brickman JM, Clements M, Tyrell R, McNay D, Woods K, Warner J, et al. Molecular effects of novel mutations in Hesx1/HESX1 associated with human pituitary disorders. *Development*. 2001;128(24):5189-99.
335. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Mårtensson IL, et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet*. 1998 Jun;19(2):125-33.
336. Pozzi S, Tan WH, Martinez-Barbera J. Characterization of a novel *HESX1* mutation in a pediatric case of septo-optic dysplasia. *Clin Case Rep*. 2017;5(4):463-70.

337. Temple SEL, Sachdev R, Ellaway C. Familial DHCR7 genotype presenting as a very mild form of Smith-Lemli-Opitz syndrome and lethal holoprosencephaly. *JIMD Rep.* 2020;56(1):3-8.
338. Nowaczyk MJM, Wassif CA. Smith-Lemli-Opitz Syndrome. 1998 Nov 13 [Updated 2020 Jan 30]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023.
339. Waterham HR, Hennekam RC. Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160C(4):263-84.
340. Jezela-Stanek A, Ciara E, Malunowicz EM, Korniszewski L, Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E, et al. Mild Smith-Lemli-Opitz syndrome: further delineation of 5 Polish cases and review of the literature. *Eur J Med Genet.* 2008;51(2):124-40.
341. Anstey AV, Azurdia RM, Rhodes LE, Pearse AD, Bowden PE. Photosensitive Smith-Lemli-Opitz syndrome is not caused by a single gene mutation: analysis of the gene encoding 7-dehydrocholesterol reductase in five U.K. families. *Br J Dermatol.* 2005;153(4):774-9.
342. DeBarber AE, Eroglu Y, Merckens LS, Pappu AS, Steiner RD. Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e24.
343. Witsch-Baumgartner M, Gruber M, Kraft HG, Rossi M, Clayton P, Giros M, et al. Maternal apo E genotype is a modifier of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet.* 2004;41(8):577-84.
344. Jira PE, Waterham HR, Wanders RJ, Smeitink JA, Sengers RC, Wevers RA. Smith-Lemli-Opitz syndrome and the DHCR7 gene. *Ann Hum Genet.* 2003;67(Pt 3):269-80.
345. Caruso PA, Poussaint TY, Tzika AA, Zurakowski D, Astrakas LG, Elias ER, et al. MRI and 1H MRS findings in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Neuroradiology.* 2004;46(1):3-14.
346. Kelley RI, Hennekam RC. The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet.* 2000;37(5):321-35.
347. Jezela-Stanek A, Małunowicz E, Anna S, Kucharczyk M, Goryluk-Kozakiewicz B, Sadowska H, Krajewska-Walasek M. Trends in prenatal diagnosis of non-specific multiple malformations disorders with reference to the own experience and research study on Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Ginekolog Pol.* 2015;86(8):598-602.
348. Weaver DD, Solomon BD, Akin-Samson K, Kelley RI, Muenke M. Cyclopia (synophthalmia) in Smith-Lemli-Opitz syndrome: First reported case and consideration of mechanism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010;154C(1):142-5.

349. Shim YH, Bae SH, Kim JH, Kim KR, Kim CJ, Paik YK. A novel mutation of the human 7-dehydrocholesterol reductase gene reduces enzyme activity in patients with holoprosencephaly. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(1):219-23.
350. Greenbaum L, Pode-Shakked B, Eisenberg-Barzilai S, Dicastro-Keidar M, Bar-Ziv A, Goldstein N, et al. Evaluation of Diagnostic Yield in Fetal Whole-Exome Sequencing: A Report on 45 Consecutive Families. *Front Genet*. 2019;10:425.
351. Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet*. 2019;393(10173):747-57.
352. Petrovski S, Aggarwal V, Giordano JL, Stosic M, Wou K, Bier L, et al. Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet*. 2019;393(10173):758-67.
353. Kruszka P, Martinez AF, Muenke M. Molecular testing in holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2018;178(2):187-193.
354. Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet*. 2015; 385(9975):1305–14.

GEN LİSTESİ

SHH, SIX3, ZIC2, GLI2, PTCH1, TGIF1, CDON, FOXH1, FGF8, FGFR1, NODAL, DISP1, HPE1, STAG2, CNOT1, GAS1, DLL1, HPE8, HPE6, TDGF1, STIL, LOC110008580, PLCH1, SMC1A, LOC100507346, PRRX1, OTX2, DHCR7, SUFU, GLI3, SEC31A, RAD21, GPKOW, PPP1R12A, TRAPPC10, WDR81, SMO, SMC3, FGFR3, LSS, MNX1, EMX2, LHX4, HESX1, PROP1, CHRD, POU1F1, BOC, SBE2, MATN4, TGIF2, ZRSR2, PPP2R3C, EAPP, SIM2, VIPR2, ZIC4, ZIC1, KMT2D, NPAS3, NOG, LRP2, CTBP1, DKK1, EYA4, NR4A3, IGBP1P1, APOE, NOTCH1, DHH, FGFR2, TWSG1, APOB, ZIC5, HDAC1, BMP6, HHIP, TWIST1, FOXG1, ICAM5, GLI4, SMAD2, WIF1, CUBN, FBXW11, VIPR1, NPY, RAC3, VIP, ADCYAP1, HCRT, GDF1, KAZALD1, PRDM15, LOC110599567, DEL1Q41Q42, GLI1, TXNDC15, HUWE1, IHH, SOX3, LHX3, CHD7, LMBR1, PWP2, PAX6, FKRP, FKTN, ZBTB14, CHML, ESX1, KIFC2, NSD1, FHL3, G6PD, CSTB, HCFC1, IL16, MORC1, MT-CO1, ARX, ALDH1A2, BCL11A, HOXD13, TMEM107, TMEM216, DYNC2I1, ATXN10, SOX2, HPCAL4, KLHL8, PNRC2, PRICKLE4, PPP2R2B, ATN1, XYLT1, JPH3, POLE2, HOXA13, RAB23, TET3, GSDME, MUC13, ZNF2, PRSS58, ATXN8OS, MIR130A, NUTM2B-AS1, MIR1271, POMGNT1, GMPPB, POMT1, SALL1, POMT2, B3GALNT2, LARGE1, CC2D2A, VANG2, C2CD3, CEP290, TCTN3, MKS1, RPRGIP1, RPRGIP1L, TCTN2, TMEM67, B9D2, CSPP1, TCTN1, TMEM231, TMEM237, B9D1, RTTN, BMP4, CREBBP, CDH2, TUBA1A, DCC, ERCC2, SETD2, ARID1B, MED12, STXB1P1, IFT80, BUB1, BUB1B, RB1, L1CAM, MTHFR, BUB3, FOXA2, SEMA3E, CEP57, CILK1, HOXA2, TRIP13, DLX5, TRIM59-IFT80, DEL3Q13.31, DLX6, SIX6, DYNC2H1, GNAI3, PRICKLE1, PGAP1, EXOSC8, PIGN, PIGV, OTX1, DDHD1, KRT86, MPPE1, ABI3BP, PIGW, PRRX2, TMEM260, AADACL2, TEX30, PGAP4, AADACL4, ERICH2, RALGAP1, SNX6, IFT122, TTC21B, EVC2, PALS1, WDR19, COL4A1, NEK1, ADRB2, CYP3A4, CALCR, DHFR, CD8A, CFC1, TNFRSF1A, LMNA, GPHN, FLI1, ETS1, TP63, CLCN1, TSPAN1, C12orf29, MCF2L2, SOX2-OT, BUB1B-PAK6, EEC1, JBS, DEL13Q14, DEL18P, ZIC3, LAMA5, KIF7, RAD51C, MNX1-AS2, ZRS, WDR26, TP53BP2, HERC1, NVL, FBXO28, SUS4, GATA4, TBX5, NKX2-5, DCAF8, CDK5RAP2, NOSIP, AFP, AGO2, PAPP, PGF, HLCS, TBX1, RHCE, PLAC4, IFT27, PPP2CA, PPP2R1A, PPP2CB, UBE2D3, PPP2R2A, PCNT, ADNP, AUTS2, BORCS5, HDAC8, DAG1, DMD, LAMA2, NIPBL, SGCA, FOXF1, SGO1, POMGNT2, POMK, RXYLT1, CRPPA, KIAA0586, MTHFSD, MN1, RHO, PITX2, MSX2, TGFA, NPC1, SMCHD1, DYNC2I2, CPLANE1, ITGA7, ATP6V1A, EXT1, AGRN, SOX9, DPM1, RDH12, TRPS1, USH1C, CD5, IFT88, TCOF1, B3GNT2, CCP110, DPM3, IFT140, LIMS1, WDR35, CEP120, DOLK, ESCO2, IMPG2, IQCE, KIF3A, ZP2, ARL13B, IFT57, PKHD1, TAAR1, TRAF3IP1, CEP152, EGFLAM, EVC, IFT74, LARGE2, MED22, DPM2, MED30, CEP89, CEP97, CNTLN, EPPIN, IFT52, KIF24, ZBTB11, IFT20, CCDC138, IFT46, TMEM218, ZNF141, ZNF518A, BBIP1, IFT22, MED11, RAD21L1, ANKUB1, IGHV4-38-2, SPRY2, GPC5, SCUBE2, AMER1, COL26A1, KRBOX4, FLT3, HERC2, ASXL1, U2AF1, DHX30, HACE1, RHD, SRSF2, UBE3B, HYLS1, STOX1, KLHL15, RNF170, WDR62, ASB10, FBXO31, FBXO38, LUC7L2, DGCR5, HDAC6, TP53, ATM, CBL, EP300, PIK3CA, PTEN, ZAP70, LDLR, PLK1, SMARCA4, PHGDH, PIK3R1, TACR3, DRD2, KCNMA1, MST1R, SMARCA2, ABCA1, CYP17A1, CYP19A1, KDM6A, LIPA, MALT1, PON1, PRKCE, ADSL, CYP11A1, GNRHR, GP1BA, PKD2, PLK4, PSAT1, PTK6, ATRX, BIRC3, CD38, CDK9, CHD1, CYP27A1, GP9, HMGCR, HMGCS2, KISS1R, MYCN, NECTIN1, PAX2, SEMA3A, AKR1C2, ARID1A, BCL6, CFL1, DHCR24, ERCC6, LAMA1, NEK9, ORC1, PKD1,

PRODH, SOX10, SSTR3, STS, ARL3, BCL10, CENPE, CGA, CHD4, EBP, EYA1, FDFT1, FGF3, I L11RA, INVS, LEFTY2, LGR5, MAD2L1, MSMO1, NSDHL, PDE6D, RSP01, SQLE, STAR, CDC20, CDT1, CHD3, DNAH11, GCNT2, GDF6, GNB4, GP1BB, HS6ST1, IRF6, JAM3, KIF2A, KIRREL3, KRT13, MAK, MGAT1, NPHP1, ORC4, PROK2, PTPA, SREBF2, TAC3, BANF1, CDK20, CYP7A1, EFTUD2, HTR6, NLRP7, NSD2, OFD1, POU3F2, PPP2R5C, PROKR2, PUF60, RERE, SCAP, SERPINB5, SLC26A4, STRA6, AFDN, AFF2, AHI1, ALMS1, APCDD1, BBS4, CEP164, CHD8, CHGB, DSCAM, EFHC1, GJD2, HCCS, HPGDS, IQCB1, KDM4C, MCHR1, NBEAL2, NDE1, NEDD9, NEK8, NIN, NTM, POGZ, RAD52, SC5D, SDCCAG8, SMARCA5, TBX20, TUBGCP6, TULP3, BBS10, BBS2, CDH7, CEP41, CHAMP1, CYP46A1, DHRS9, DNAI1, EXOC4, EXOC5, GNRH1, HEPACAM, IFT172, LARP7, NKX2-2, NPHP4, NSMF, PAEP, RFX2, RPGR, SMOC1, SOX11, TTC8, ANAPC2, ANOS1, ARHGAP32, BAZ1A, BAZ2A, BBS5, BBS9, BLOC1S6, CEP63, DNAH5, DYNC2LI1, FANCB, GBX2, GFI1B, GPR161, HPS4, IFT43, INSIG1, KIF3B, LCA5, MKKS, ORC6, RAB8A, RGS12, SEPTIN4, SFXN4, SIX2, SMARCA1, SNTB2, TECTA, TMEM138, UGT3A1, VSX2, WDPCP, ALG12, ALX4, BBS1, BBS7, CDH19, DSCAML1, NFRKB, NPHP3, RAB3D, ACSS3, AMELX, CDH20, CHD6CTNNAL1, DAND5, DCHS1, FEZ1, FOXJ1, GALNTL5, IGDCC3, INTU, KIF17, KNL1, LGALS4, NRG1, ODF2, PSMG2, RAB3IP, SHROOM3, SOX8, TTC26, TTLL12, ARHGAP28, CEP83, CHD9, DYNLT2B, FAM172A, FOXE3, GEMIN6, MOK, MRPS2, PATJ, SLC25A33, SNX19, SPAG16, VAX1, ANKS3, B4GAT1, BARX1, BBS12, CCNB3, DEFA3, ENOSF1, EXOC1, FOXL1, FRA10AC1, HIVEP3, MED9, SARNP, TMEM115, TTC30B, TXNDC2, ZWILCH, BARX2, CDH26, CLUL1, TBCC, THYN1, ZG16, ALX3, C2CD2, CEP19, FAM124B, FAM76B, IFT25, SCLT1, SLIRP, TMEM17, EXOC3L2, KHDC3L, L3MBTL4, ZNF778, ZNF786, BSX, CC2D2B, CGB7, FBF1, HTN1, MORN1, NYAP1, TCAF2, ARL13A, NKX1-1, TMEM185A, CIPC, PWWP2B, TMEM80, ZNF862, FOXI3, H2AC18, OR10S1, PIFO, FAM180B, AKAIN1, C7orf33, CLLU1, LCE4A, ZBED10P, CMAHP, EP400P1, IQCA1L, RNU4ATAC, MIR432, DLGAP1-AS2, RNU6ATAC, SENCN, MIR15A, LINC01003, MIR767, PTPRD-DT, LINC00550, HS6ST2-AS1, LOC101928861, FRA11B, KMT2C, ACVR2B, ADIPOQ, IL23R, IFNL3, SMAD3, GH1, MTA1, RHEB, PAFAH1B1, TRPM2, KATNB1, SLC19A1, DCX, RELN, RLBP1, RBBP8, RBP3, GHRHR, CENPF, CRX, DHX9, NRL, PORCN, SIX4, ZNF526, AKT1, XIAP, PRKDC, RPS6KB1, PDK1, COL18A1, IRS1, CNTNAP2, SIN3A, SKI, ADARB1, HHAT, HTR5A, SKIL, EN1, SYVN1, TBX19, WDR11, LHX2, EVI5L, CLRN3, RTP3, LOC102724159

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
(tel: 0212 414 2000/ 32564-32327-35067-32347)

MOLEKÜLER ARAŞTIRMALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Proje Adı: Prenatal Dönemde Holoprozensefali Saptanan Olgularda Genetik Etyopatogenezin Yeni Nesil Dizileme Yöntemi İle Araştırılması

Bu proje kapsamında, kromozom anomalileri ve submikroskopik delesyon/duplikasyon sendromları dışlanmış, prenatal ultrasonografide holoprozensefali saptanarak postmortem klinik değerlendirmesi yapılmış fetal olgularda tüm ekzom dizileme yöntemi ile patogeneze rol oynayan genlerin ve mutasyonların belirlenmesi hedeflenmektedir.

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

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

1. Projeye Katılım için Gerekli Kriterler:

Projemize prenatal dönemde holoprozensefali saptanarak postmortem klinik muayeneleri yapılan ve etyopatogeneze gros ve submikroskopik kromozom anomalilerin dışlanmış olduğu gebelik ürünlerinin dahil edilmesi planlanmıştır.

2. Yapılacak işlemin tanımı:

Prenatal dönemde holoprozensefali saptanarak tarafımızca postmortem fetal klinik genetik değerlendirmesi yapılan **olgularımızdan, 4mm çapında fetal deri örneklerinden DNA bankalama prosedürü daha önce onamınız dahilinde gerçekleştirilmişti.** TED yapılabilmesi amacıyla biyolojik örnek olarak fetal deri örneklerinin kullanılması planlanmıştır. Moleküler analizlerde indekste bir varyant saptanması durumunda, aile içi segregasyon analizlerinin yapılabilmesi amacıyla, sizlerden 2 ml kan örneği alınması gerekecektir. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir ve gönüllü katılım esastır

3. Örnek Alımının Olası riskleri:

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

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler:

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

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

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

Olası yararlar: Bu çalışmanın esas amacı, ailenizde görülen hastalığa neden olan genetik faktörlerin araştırılmasıdır. Biz bu aşamada henüz yapılacak testlerin, size ve ailenize doğrudan ya da dolaylı bir yararının olup olmayacağını bilmiyoruz. Fakat bu çalışmalar tamamlandığında, testlerde sonuç elde edilebilmesi durumunda, olası gebeliklerinizde tekrar riski ve yönde prenatal/preimplantasyon genetik tanı seçeneklerinin sunulabilme ihtimali olduğunu belirtmek istiyoruz. Ayrıca, kesin olan bir diğer nokta da araştırma tamamlandıktan

sonra bu klinik tablonun nedenleri konusunda daha çok şey öğrenebileceğimiz ve böylece hem sizlere hem de gelecekte bu tür hastalara daha çok yardımcı olabileceğimizeyizdir.

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

Hastanın/Katılımcının Beyanı

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

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

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

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

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; mesai saatleri içinde, +902124142000/32564 nolu telefon ve İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’ndan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda olmadığımı biliyorum. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

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

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

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

Yapılması önerilen testler ile ilgili bilgileri okudum ve anladım.

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

Hastalığımla ilgili yapılacak araştırma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin;

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

Tarih:

Genetik Danışmanın adı ve imzası

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

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

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı

*Araştırma amaçlı DNA için kan alınan hastalara imzalatılmalıdır.

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**Prenatal Dönemde Holoprozensefali Saptanan Olgularda Genetik Etyopatogenezin Yeni Nesil
Dizileme Yöntemi İle Araştırılması**

Hasta Takip Formu

T.C.Kimlik No:

Tarih:

Olgu No:

Ad Soyad:

Protokol No:

Gestasyon Haftası:

DNA No:

Anne Adı Soyadı:

Cinsiyet:

Adres bilgileri:

Tel:

Akrabalık:

Prenatal Öykü

Perinatoloji- Tıbbi Genetik konsey değerlendirmesi / II. Düzey US

Aile ağacı:

Postmortem fetal fizik muayene:

Postmortem radyolojik bulgular:

Fetal karyotip ve array analizi:

Ek genetik tetkikler: