

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**KRANİYOSİNOSTOZLARDA PRİMER FİBROBLAST  
KÜLTÜRÜNDE TRANSKRİPTOM ÇALIŞMASI**

Dr. Arda ÇETİNKAYA

Tıbbi Genetik Programı

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2014

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**KRANİYOSİNOSTOZLARDA PRİMER FİBROBLAST  
KÜLTÜRÜNDE TRANSKRİPTOM ÇALIŞMASI**

Dr. Arda ÇETİNKAYA

Tıbbi Genetik Programı

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Alikaşifoğlu

ANKARA

2014



Tıp Fakültesi Dekanlığı'na;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Programı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Mehmet ALIKAŞIYOĞLU  
(Danışman) Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. A. Nurten AKARSU  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Koray BODUROĞLU  
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu kararlarıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent SİVRİ  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Bu uzmanlık tezinin gerçekleşmesi sürecinde bana yol gösteren, araştırmayı şekillendirmekte yardımcı olan ve tez için uygun koşulları sağlayan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Alikashifoğlu'na; bilgisini ve düşüncelerini esirgemeyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nurten Akarsu'ya; bölümün olanaklarını ve deneyimini benimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı Başkanı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Koray Boduroğlu'na, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Gülen Eda Utine ve Yrd. Doç. Dr. Pelin Özlem Şimşek Kiper'e; tez çalışmasına katılmak isteyebilecek hastalara ulaşabilmem konusunda zamanını benden esirgemeyen Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gökhan Tunçbilek'e; kontrol grubu hastalarına ulaşabilmem konusunda zaman ve emeğini benden esirgemeyen Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Tutku Soyer'e; deneysel süreçlerin her aşamasında bilgi ve deneyimini benimle paylaşan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ekim Taşkıran'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, bu tezin gerçekleştirildiği Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı'na bağlı poliklinik ve laboratuvarların tüm çalışanlarına, özellikle tez sürecinde kurulan hücre kültürlerini gerçekleştirmek konusunda yardımını benden esirgemeyen Biyolog Dilek Özdağ'a (MSc) teşekkür ederim. Son olarak, tezim sürecinde beni hep destekleyen ve bu tezin gerçekleşmesindeki gizli kahramanlar olan anne ve babam başta olmak üzere tüm aileme ve uzmanlık öğrenciliğim döneminde kaybettiğim, yaşamdaki duruşu ve hayata bakışı ile bana hep örnek olacak dedem Yrd. Doç. Dr. Ali Sedat Törel'e teşekkür ederim.

Son olarak, bu uzmanlık tez çalışmasının gerçekleşmesi için HÜBAB 6385 nolu projesi kapsamında beni maddi olarak destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

## ÖZET

**Çetinkaya A. Kraniyosinostozlarda primer fibroblast kültüründe transkriptom çalışması. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Uzmanlık Tezi, Ankara 2014.** Kraniyal sütürler, kafa kemiklerinin arasında bulunan kemikleşmemiş bağ dokusundan oluşan ve gelişim sırasında bu kemiklerin büyümesine izin veren yapılardır. Bu yapıların zamanından önce kemikleşmesine kraniyosinostoz adı verilir. Apert Sendromu, kraniyosinostoz, diğer iskelet anomalileri ve dismorfik bulguların yanısıra başka sistemik anomalilerin de eşlik edebildiği otozomal dominant kalıtılan bir sendromdur. *FGFR2* genindeki iki tane ligand bağımlı işlev kazanımına neden olan missens mutasyon hastaların çoğunda Apert Sendromu'nun nedenidir. Bu çalışmada, 3 Apert Sendromlu hastadan ve kraniyosinotozu olmayan kontrol bireylerinden kurulan primer deri fibroblastı kültürleri transkriptom mikrodizini yöntemiyle birbiriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca, primer fibroblastların *FGF2*'ye yanıtları da değerlendirilmiştir. Sonuçta, 181 genin ifadesinde deney grupları arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Bu 181 genden Apert Sendromlu hastalara ait fibroblastları kontrol grubundan ayıran 10 gen ortak bir iletişim ağının içinde ve ortak GO terimlerine sahip genlerdir. Bunlardan *COL11A1*, *COMP*, *CPXM2*, *ITGA8*, *MGF* ve *TNC* ekstrasellüler matriks organizasyonu ile ilişkili iken *FRZB*, *SFRP2*, *TBX5* ve *WNT2* mezenkimal farklılaşma ile ilişkilidir. Her iki yolağın uyarılması, Apert Sendromu primer fibroblast kültüründe kemik dokusuna farklılaşma eğiliminin arttığını göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları Apert Sendromu'ndaki kraniyosinostozun, sütürlerdeki bağ dokunun hızlıca kemiğe farklılaşarak kapanması sonucu ortaya çıktığı görüşünü desteklemiştir. Ek olarak, bu çalışma sonucunda Apert Sendromu ile ilgili araştırmalarda model olarak primer dermal fibroblast kültürlerinin kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: kraniyosinostoz, Apert sendromu, *FGFR2*, transkriptom mikrodizini, fibroblast

Bu çalışma HÜBAB 6385 tarafından desteklenmiştir.

**ABSTRACT**

**Çetinkaya A. Transcriptome study in primary fibroblast cultures in craniosynostosis. Hacettepe University, Faculty of Medicine, Medical Genetics Specialty Thesis, Ankara 2014.** Cranial sutures are unossified connective tissue structures between the cranial bones, which allow the expansion of these bones during development. Premature ossification of these structures is called craniosynostosis. Apert Syndrome is an autosomal dominantly inherited syndrome, which is characterized by craniosynostosis, other skeletal anomalies and dysmorphic findings, as well as other systemic abnormalities. Two missense mutations in *FGFR2* gene which result in ligand-dependent gain of function is responsible for most of Apert Syndrome in affected individuals. In this study, primary skin fibroblast cultures obtained from 3 individuals with Apert Syndrome and 3 controls without craniosynostosis were compared with transcriptome microarray. In addition, primary fibroblast response to FGF2 was evaluated. As a result, 181 genes were shown to be differentially expressed between experimental groups. Among these 181 genes, 10 genes, which significantly differ in Apert Syndrome fibroblasts compared to controls, were shown to be involved in a common interaction network and have common GO terms. Among these *COL11A1*, *COMP*, *CPXM2*, *ITGA8*, *MGF* and *TNC* are related with extracellular matrix organization and *FRZB*, *SFRP2*, *TBX5* and *WNT* are related with mesenchymal differentiation. Upregulation of both pathways show that Apert Syndrome primary fibroblast cultures have an increased tendency towards bone differentiation. The results of this study have supported the notion that craniosynostosis in Apert Syndrome is the result of fast and early differentiation of connective tissue in the sutures. Furthermore, this study demonstrates the potential of using primary dermal fibroblast cultures as a model in research related to Apert Syndrome.

Keywords: craniosynostosis, Apert syndrome, FGFR2, transcriptome miroarray, fibroblast

This study is supported by HÜBAB 6385.

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kraniosinostozlar	3
2.1.1. Kraniosinostozların Tanımı	3
2.1.2. Kraniosinostozların Sınıflandırılması	4
2.2. Kraniosinostozlara Klinik Yaklaşım	7
2.2.1. Kraniosinostozların Tanısı	7
2.2.2. Sendromik Kraniosinostozlar	10
2.2.2.1. Apert Sendromu (MIM 101200)	11
2.2.2.2. Crouzon Sendromu (MIM 123500)	12
2.2.2.3. Akantozis Nigrikanslı Crouzon Sendromu (MIM 612247)	13
2.2.2.4. Pfeiffer Sendromu (MIM 101600)	13
2.2.2.5. Jackson-Weiss Sendromu (MIM 123150)	14
2.2.2.6. Beare-Stevenson <i>Cutis Gyrate</i> Sendromu (MIM 123790)	15
2.2.2.7. Skafosefali, Maksiller Retrüzyon, Mental Retardasyon Sendromu (MIM 609579)	15
2.2.2.8. Eğik Kemik Displazisi Sendromu ( <i>Bent Bone Dyplasia Syndrome</i> ) (MIM 614592)	15



	Sayfa
2.2.2.9. Muenke Sendromu (MIM 602848)	16
2.2.2.10. Saethre-Chotzen Sendromu (MIM 101400)	17
2.2.2.11. Boston tipi Kraniosinostoz (Kraniosinostoz Tip2) (MIM 604757)	17
2.2.2.12. Kraniofrontonazal Sendrom (MIM 304110)	18
2.2.2.13. Baller-Gerold Sendromu (MIM 218600)	19
2.2.2.14. Antley-Bixler Sendromu (MIM 201750, MIM 207410)	19
2.2.2.15. Radyohumeral Füzyon ile Diğer İskelet ve Kraniofasyal Anomaliler Sendromu (MIM 614416)	20
2.2.2.16. Carpenter Sendromu (MIM 201000, MIM614976)	20
2.2.2.17. Kranioektodermal Displazi (MIM 218330, MIM 613610, MIM 614099, MIM 614378)	21
2.2.2.18. <i>Philadelphia</i> Tipi Kraniosinostoz (MIM 601222)	21
2.2.2.19. Shprintzen-Goldberg Kraniosinostoz Sendromu (MIM 182212)	21
2.2.2.20. Kraniosinostoz ve Diş Anomalileri Sendromu (Kreiborg-Pakistani Sendromu) (MIM 614188)	22
2.2.2.21. Kraniosinostoz ile İlişkili Diğer Sendromlar	22
2.2.3. Nonsendromik Kraniosinostozlar	28
2.2.4. Kraniosinostozun Sonuçları ve Tedavisi	29
2.3. FGFR2 ve Kraniosinostoz İlişkisi	31
2.3.1 FGFR2 Proteini, İşlevi ve Kraniosinostoz Patogenezinde Önemi	31
2.3.2 <i>FGFR2</i> ve Mutasyonları	35
2.3.3 FGFR2 ve Kraniosinostoz İlişkisinde Gen İfadesi Çalışmaları	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme, Çözelti ve Cihazlar	41
3.1.1. Periferik Kandan DNA Eldesi ve DNA Dizi Analizi	41
3.1.2. Deri Biyopsisi	41

	Sayfa
3.1.3. Hücre Kültürü	42
3.1.4. RNA Eldesi ve Kalitesinin Saptanması	42
3.1.5. Transkriptom Mikrodizini	42
3.2. Hastaların Değerlendirilmesi	43
3.3. Periferik Kandan DNA Eldesi ve DNA Dizi Analizi	44
3.4. Hastalardan Dermal Primer Fibroblast Kültürlerinin Kurulması ve Saklanması	46
3.5. Transkriptom Çalışması için Uygun Koşulların Belirlenmesi	47
3.6. RNA Eldesi ve Kalitesinin Saptanması	48
3.7. RNA Mikrodizini	49
3.8. RNA Mikrodizini Sonuçlarının Kalitesinin Değerlendirilmesi ve Analizi	52
4. BULGULAR	54
4.1. Hastaların Değerlendirilmesi	54
4.2. DNA Dizi Analizi ile Apert Sendromu Tanısının Konması	55
4.3. Transkriptom Çalışması için Uygun Koşulların Belirlenmesi	55
4.4. RNA Eldesi ve Kalitesinin Saptanması	57
4.5. Transkriptom Mikrodizininin Kalitesinin Saptanması	60
4.6. Transkriptom Mikrodizinde Gruplar Arasında Bulunan Anlamlı Farklar ve Bu Farkların Değerlendirilmesi	62
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	78
EKLER	86
EK-1. Hasta ve Kontrol Grupları için Aydınlatılmış Onam Formları	86

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

3MC Sendromu	Mingarelli-Malpuech-Michels-Carnevale Sendromu
aCGH	<i>array Comparative Genomic Hybridization</i> (karşılaştırmalı genom hibridizasyonu mikrodizini)
aRNA	amplifiye RNA
BMP2	<i>Bone Morphogenic Protein 2</i> , Kemik Morfojenik Proteini 2
CLADIST	<i>Clustering Algorithm and Distance Integratory Statistics Tool</i> (Kümeleme Algoritması ve Uzaklık Bütünleştirici İstatistik Aracı)
COMP	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i> (Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini)
CNV	<i>Copy Number Variation</i> (Kopya Sayısı Değişiklikleri)
COL8A1	Kollajen VIII alfa 1
COL10A1	Kollajen X alfa 1
COL11A1	Kollajen XI alfa 1
COL12A1	Kollajen XII alfa 1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo-Nükleik Asit
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (Ekstrasellüler Matriks)
EDTA	Etilen-Diamin-Tetra-Asetik asit
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötal Sığır Serumu)
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü)
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i> (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1)
FGFR2	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i> (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2)

FGFR3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i> (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3)
FRZB	<i>Frizzled related protein</i> (Frizzled ilişkili Protein)
GAPDH	Gliseraldehit-1-Fosfat Dehidrogenaz
GO	Gen Ontolojisi
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i> (İnsan Gen Mutasyonu Veritabanı)
HRAS	<i>Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i> (Harvey sıçan sarkomu viral onkogen homoloğu)
HRASLS	<i>HRAS like suppressor</i> (HRAS benzeri baskılayıcı)
IVT	<i>in vitro</i> Transkripsiyon
ITGA8	İntegrin alfa 8
JAK-STAT	<i>Janus Activated Protein Kinase – Signal Transducers and Activators of Transcription</i> (Janus Uyarılan Protein Kinaz – Sinyal İleticileri ve Transkripsiyon Uyarıları)
MAPK, MAP Kinaz	Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
MAS 5.0	<i>Microarray Suite 5.0</i>
MGP	Matriks Gama-karboksi glutamik asit Proteini
OD	Otozomal Dominant
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (Çevrimiçi İnsanlardaki Mendelyan Kalıtım)
OR	Otozomal Resesif
PCA	<i>Principal Component Analizi</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polimeraz Zincir Tepkimesi)
PI3K-PKB	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase – Protein Kinase B</i> , (Fosfatidil İnositol-3-kinaz – Protein Kinaz B)
PLC-γ	<i>Phospholipase C-gamma</i> (Fosfolipaz C-gama)
Poli-A	Poli Adenin
RAPADILINO	<i>RAdial, PATella and PALate, DIarrhea and Dislocated joints, Little size and LImb malformations, and NOse and NOrmal intelligence</i> (Radyal, Patella ve Damak, İshal ve Disloke

	eklemler, Küçük boyut ve Uzun malformasyonları, Burun ve Normal zeka)
RMA	<i>Robust Microarray Analysis</i>
RNA	Ribo-Nükleik Asit
rpm	<i>rotations per minute</i> (dakikadaki döngü)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi)
SFRP	<i>Secreted Frizzled Related Protein</i> (Salgılanan <i>Frizzled</i> ilişkili Protein )
SFRP2	<i>Secreted Frizzled Related Protein 2</i> (Salgılanan <i>Frizzled</i> ilişkili Protein 2)
SFRP3	<i>Secreted Frizzled Related Protein 3</i> (Salgılanan <i>Frizzled</i> ilişkili Protein 3)
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimeraz
TNC	<i>Tenascin C</i>
TBX5	<i>T-Box 5</i> , (T-kutusu 5)
WNT	<i>Wingless-Type MMTV integration site family</i>
WNT2	<i>WNT family member 2</i> (WNT üyesi 2)

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Nörokranium kemikleri ve major kraniyal sütürler	4
2.2. Başlıca kraniyosinostoz tipleri ve oluşturdukları kafa şekilleri	6
2.3. Sefalik indeksin hesaplanması için kullanılan kafa ön-arka çap ve biparietal çap ölçümleri	8
2.4. FGFR2 geni, ekzonları, protein domainleri ve mutasyonları	32
2.5. FGFR'lerin uyardığı hücre içi sinyal iletim yolları.	34
3.1. <i>GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array</i> için örneklerin hazırlanma protokolü.	50
4.1. Çalışmaya dahil edilen Apert Sendromlu 3 bireyin Sanger dizilemesi sonuçları.	55
4.2. Farklı FCS derişimlerine sahip besi yerlerinde izlenen kontrol grubuna ait dermal fibroblastlar.	56
4.3. Jel elektroforezi ile RNA kalitesinin saptanması.	59
4.4. Deney gruplarında transkriptom mikrodizinindeki sinyal şiddetlerinin dağılımı.	61
4.5. Transkriptom mikrodizininin üçlü <i>Principal Component Analizi</i> (PCA).	62
4.6. Karşılaştırmalarda farklı gen ifadesi saptanan genlerden birbiriyle biyolojik ilişki kuranlar.	64
4.7. STRING'te Küme I'de yer alan ve sık bulunan GO terimlerini taşıyan genlerin ifade profillerinin karşılaştırılması.	67

**TABLULAR**

	Sayfa
2.1. Ana bulguları arasında kraniyosinostoz olan sendromlar	24
2.2. <i>FGFR2</i> ile ilişkilendirilmiş hastalıklarda HGMD’de bildirilen mutasyon çeşit ve sayıları.	37
4.1 Çalışmaya dahil edilen bireylerin klinik özellikleri.	54
4.2 Spektrofotometrik ölçüm ile RNA kalitesinin saptanması.	58
4.3. Transkriptom mikrodizininde her bir deney grubunda kapsanan genler ve örneklerdeki RNA yıkımını gösteren GAPDH 3’ ucu ile 5’ ucu oranları.	60
4.4. Transkriptom mikrodizinindeki 4 deney grubu için yapılan 4 karşılaştırmada anlamlı olarak farklı düzeyde ekspresyonu saptanan genler.	63
4.5. Karşılaştırmalarda farklı gen ifadesi saptanan genler için anlamlı ölçüde sık bulunan GO terimleri.	66

## 1. GİRİŞ

Kraniyal sütürler, kafa kemiklerinin arasında bulunan ve normal çocukluk döneminde belli bir süre kemikleşmeyerek, açık kalarak, çocukluk döneminde beynin yeterli büyüebilmesine izin veren kemikleşmemiş bağ dokusundan oluşan yapılardır (1,2). Kranial sütürlerin erken kapanması sonucu ortaya çıkan hastalıklara kraniyosinostozlar adı verilir. Kraniosinostozların genetik pek çok nedeni saptanmıştır; ancak bir kısmının genetik nedeni henüz bilinmemektedir. Özellikle, bir sendromun parçası olabilen, genetik nedenleri iyi tanımlanmış ve patogenez mekanizmaları genişçe araştırılmış ve araştırılmaya devam edilen birçok kraniyosinostoz bulunmaktadır. Genetik sorunlarla ilişkili bu kraniyosinostozların nedenleri incelendiğinde özellikle fibroblast büyüme faktörü reseptörü (*Fibroblast Growth Factor Receptor*, FGFR) ve bununla ilişkili olan yolları ilgilendiren genlerdeki sorunlar etyolojik neden olarak göze çarpmaktadırlar (3). Buna ek olarak, kraniyosinostozların patogenezi üzerine yapılan, genleri bilinen hastalıklar dışındaki araştırmalar da FGFR ve ilişkili yolları işaret etmektedir (3,4).

FGFR ve ilişkili yolların hücre içi en önemli ortak hedeflerinin transkripsiyon olduğu gösterilmiştir. Bu yollar hücre zarından çekirdeğe uzanan ve gen ifadesini etkileyen ikincil mesajcıları uyardırlar (5). FGFR'nin uyardığı ikincil mesajcıların özellikle sütürde bulunan mezenkimal hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir (1). Kemikleşme sürecinin hızlanmasının ise sütürün hızlıca kemik dokusuna farklılaşarak kraniyosinostozu neden olduğu düşünülmektedir (1).

Apert Sendromu, %98'i *FGFR2* genindeki 2 tane işlev kazanımına neden olan missens mutasyon sonucu ortaya çıkan bir sendromik kraniyosinostozdur (3). 1995 yılından beri genetik nedenleriyle beraber bilinen Apert Sendromu ve diğer FGFR ilişkili kraniyosinostoz sendromlarına ait çeşitli biyolojik örnekler, kraniyosinostozların patogenezinin araştırılmasında sıklıkla model olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Apert Sendromlu hastalara ait sütür dokusu, sindaktiliye maruz kalan doku ve kafa derisine ait örnekler test



edilirken bu hastaların başka bölgelerinden alınmış deri fibroblastları üzerine çalışma yapılmamıştır. Ayrıca, FGFR2'nin FGF tarafından uyarılmasının tüm gen ifadesi düzeyinde nasıl bir değişiklik yaptığına ilişkin de kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Bu tezin amacı, genetik kraniyosinostozlar için bir model olarak Apert Sendromu'nu kullanarak deri fibroblastlarında tüm gen ifadesi düzeyinde normalden sapmaları ortaya koymaktır. Bu amaçla, Apert Sendromlu bireylerden ve kraniyosinostozu olmayan bireylerden alınan deri örneklerinden dermal fibroblast kültürleri kurulup örnekler arasındaki gen ifadesi farklılıkları transkriptom mikrodizini yöntemi ile karşılaştırılacaktır. Bu karşılaştırma için bugüne kadar yapılan çalışmalardan farklı olarak sütürlerden uzak bölgelerdeki dermal fibroblastlar kullanılacak ve bu fibroblastların FGF2 ile uyarılmasının etkisi incelenecektir. Saptanan farklılıklar Apert Sendromu'nun ve kraniyosinostozların patogenezinin anlaşılması için bilgi sağlayacaktır. Ayrıca, farklı ifade edilen genlerin kraniyosinostoz araştırmalarında ön plana çıkacak hedef moleküller veya hedef yollar olarak kullanılmaları mümkündür.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kraniosinostozlar

#### 2.1.1. Kraniosinostozların Tanımı

Kafa kemikleri prenatal dönemde nöral krestten köken alan mezenkimal bağ dokusunun intramembranöz osifikasyonla kemik dokusuna farklılaşması ile oluşurlar. Bebekler, kafa kemikleri arasındaki birleşme noktalarındaki bu bağ dokunun kemikleşmesi tamamlanmadan doğarlar. Kafa kemikleri doğumun ardından da kemik dokusuna farklılaşmaya devam ederler. Intramembranöz osifikasyon süreci ile kafa kemikleri arasında yer alan sütürlerdeki bağ dokusu zamanla kemikleşerek birleşir, veya başka bir deyişle kapanırlar (6). Bebeklerin beyinleri, hayatın ilk yılının sonunda doğumdaki ile karşılaştırıldığında hacminin yaklaşık dört katına çıkar (7). Beynin büyümesine izin verebilecek şekilde kranial sütürlerin doğumun ardından bir süre açık kalması normal beyin büyümesi ve nörolojik gelişim için büyük öneme sahiptir.

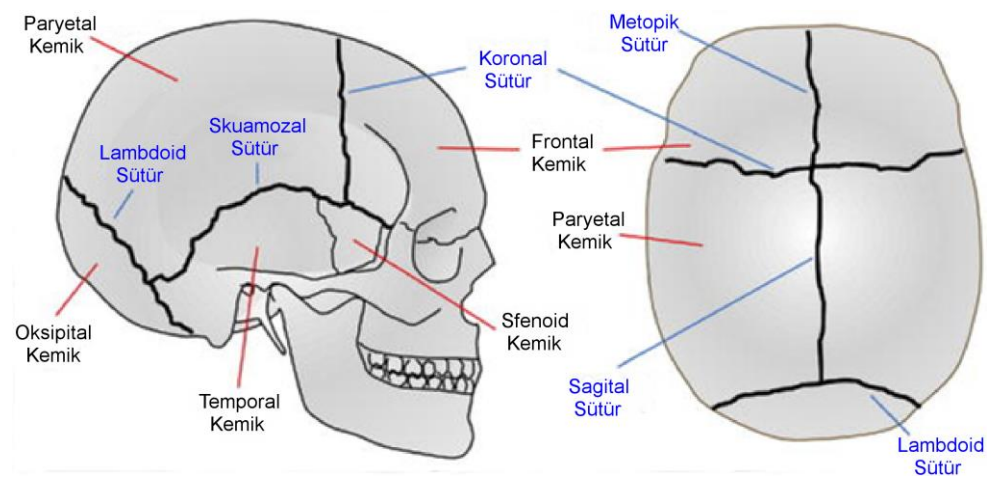
Kraniosinostoz, kranial sütürlerin kemikleşmesinin zamanından önce gerçekleşmesi durumuna verilen addır (3). Yapılan çalışmalarda kraniosinostozların görülme sıklığının her canlı doğumda yaklaşık 1/1500 ile 1/2500 arasında olduğu tahmin edilmektedir (3,8,9). Sıklığı açısından nadir olarak değerlendirilen bir hastalık olsa da kraniosinostozlar insanlık tarihi kadar eski hastalıklardır. Günümüzde, insanlarda bilinen en eski kraniosinostoz olgusu, İspanya'da bulunmuş, 530.000 yıl önce yaşadığı tahmin edilen "Benjamina" isimli bir fosildir (10). Kraniosinostozların tıp bilimi içinde değerlendirilmesinin tarihi ise Hipokrat dönemine kadar uzanmaktadır (11).

İlk Çağ'dan beri bilinen bir hastalık olan kraniosinostozların etkilenen bireylerde kolaylıkla fark edilebilir başlıca bulgusu kafa şekil bozukluğudur. Bu bozukluğun nedeni erken kapanan sütürdeki kemik büyümesinin yavaşlaması olduğu kadar bunu kompanse etmek için diğer sütürlerdeki kemik büyümesinin de hızlanmasıdır (12). Özellikle, erken kapanan sütüre yakın olan sütürde kemik büyümesinin hızlanması kafadaki şekil bozukluğunun oluşmasına katkı sağlar (12).

### 2.1.2. Kraniosinostozların Sınıflandırılması

Kraniosinostozlardaki kafa şekil bozukluğu hangi suture veya sutürlerin etkilendiği konusunda da bilgi vermektedir. Etkilenen suture göre ayırımın sadece fizik muayene ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile yapılabilmesi nedeniyle etkilenen suture göre sınıflandırma klinik pratikte sıklıkla kullanılmaktadır. Hastaların tanı anında sınıflanabilmesi ve altta yatan nedenin genetik olup olmadığı konusunda da fikir vermesi nedeniyle etkilenen sutürlere göre sınıflandırılma büyük önem arz etmektedir (3).

Nörokraniumu çevreleyen kemiklerdeki sutürler majör ve minör sutürler olarak ikiye ayrılmaktadır. Majör sutürler, frontal kemiğin iki parçası arasında orta hatta yer alan "metopik sutür"; iki paryetal kemiğin arasında orta hatta yer alan "sagital sutür"; frontal kemik ile paryetal kemikler arasında yer alan bilateral "koronal sutürler", oksipital kemik ile paryetal ve temporal kemikler arasında yer alan bilateral "lambdoid sutürler"; temporal kemik ile oksipital ve paryetal kemikler arasında yer alan "skuamozal sutürlerdir" (Şekil 2.1). Metopik sutür yaşamın 1. yılının sonlarında tamamen kapanırken diğer majör sutürlerin tamamen kapanması yetişkin dönemde tamamlanır (7). Minör sutürler ise temporoskuamozal, frontonazal ve frontosfenoidal sutürlerdir. Minör sutürlerin kraniosinostozu hakkında daha az bilgi vardır (1).



Şekil 2.1. Nörokranium kemikleri ve major kranial sutürler (1).

Sagittal kraniyosinostozlar, sagittal sütün erken kapanması sonucu oluşup tüm kraniyosinostoz olgularının yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (3). Bu tür kraniyosinostozların büyük bir çoğunluğu ailesel olmayan sporadik durumlardır (13). Sagittal kraniyosinostozlar erkeklerde daha sık görülmekte ve çevresel etkenlerin hastalığın oluşumundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (13). Sagittal sütün erken kapanması kafanın transvers eksenindeki büyümesini engeller. Bunu kompanse etmek amacıyla kafa anteroposterior ekseninde daha hızlı büyür. Böylece, sagittal kraniyosinostozdan etkilenmiş çocuklarda uzun; ancak dar bir kafa şekli gözlenir. Bu duruma “dolikosefali” denir. Ayrıca kafa şekli kayığa da benzetildiği için bu durum “skafosefali” olarak da adlandırılır (7) (Şekil 2-2.A).

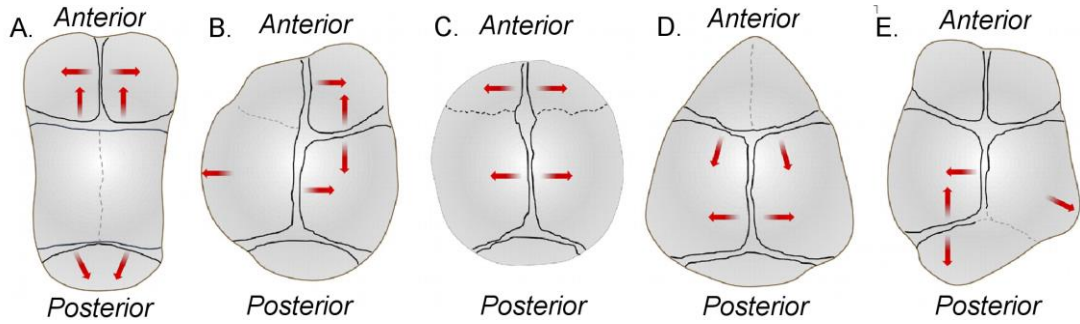
Koronal kraniyosinostozlar, yaklaşık %20 oranla ve ikinci sıklıkta görülen kraniyosinostozlardır. Ana bulgusu kraniyosinostoz olan sendromların birçoğunda tek taraflı ya da bilateral koronal kraniyosinostoz görülür. Etyolojisinde bir tek gen hastalığı saptanabilen koronal kraniyosinostozlar tüm koronal kraniyosinostozların yaklaşık üçte birini oluştururlar (3,4,8,9). Koronal sütürlerden birinin tek taraflı olarak erken kapanması durumunda sütün kapalı olduğu tarafta frontoparyetal düzleşme olurken bunu kompanse etmek için karşı taraf temporal kemikte büyüme olur. Bu şekilde oluşan asimetric kafa şekline “frontal plagiosefali” denir (Şekil 2-2.B). Koronal sütürlerin iki taraflı olarak erken kapanması durumunda kafanın ön-arka eksenindeki büyüme yavaşlar ve bunu kompanse etmek amacıyla kafa yanlara doğru büyür. Böylece geniş; ancak kısa bir kafa yapısı oluşur. Bu kafa şekline “brakisefali” adı verilir (Şekil 2-2.C) (7). Bazı durumlarda kafa yukarıya doğru da büyüyebilir. Bu duruma ise “turrisefali” denir (7). Koronal kraniyosinostozda frontal kemiğin öne doğru büyümesi de azalır. Böylece, orbitanın kemik tabanının gelişmesi de yavaşlar ve koronal kraniyosinostoz olan tarafta proptoz ortaya çıkar.

Metopik kraniyosinostoz yaklaşık %10 sıklıkta görülür. Frontal kemiğin iki parçası arasındaki sütün erken kapanması sonucu frontal kemik büyüyen kafaya göre dar kalır ve alnın yukarıdan bakıldığında bir üçgen şeklinde görülmesine neden olur. Bu duruma “trigonosefali” denir (Şekil 2-2.D) (7). Trigonosefalide, aynı zamanda, orbitaların da kafanın büyümesi ile beraber birbirlerinden uzaklaşmalarını

engellenir ve hipotelorizm ortaya çıkar. Metopik kraniyosinotoza neden olan pek çok sendrom vardır. Bu nedenle, trigonosefali görülen hastaların sendromik olabilecekleri akılda tutulmalıdır.

Lambdoid sütürlerin erken kapanması ise tüm kraniyosinostozlar içerisinde %2-3 oranında görülür. Lambdoid kraniyosinostoz durumunda sinostoz olan tarafta oksipital kemiğin düzleştiği, aksi tarafta ise kompensatuar büyümenin olduğu “posterior plagiosefali” görülür (Şekil 2-2.E) (7).

Çoklu sütür kraniyosinostozlarında kafa kemiklerinin büyümeleri pek çok açıdan engellenebilir. Böyle durumlarda “*kleebblattschädel*” veya yonca yaprağı kafa denilen tepeden bakıldığında sütürlerin büyümesinin azaldığı; ancak sütürden uzak kafa kemiklerinin dışarıya bombeleştiği üç yapraklı bir yoncaya benzeyen kafa şekli oluşur (7).



Şekil 2.2. Başlıca kraniyosinostoz tipleri ve oluşturdukları kafa şekilleri (1). Herbir şekilde kesikli siyah çizgiler erken kapanan sütürü gösterirken kırmızı oklar kraniyosinostozu kompanse etmek için gerçekleşen hızlı büyümenin pozisyonunu ve yönünü göstermektedir. A. Sagittal kraniyosinostozda “skafosefali”. B. Unilateral koronal kraniyosinostozda “anterior plagiosefali”. C. Bilateral koronal kraniyosinostozda “brakisefali”. D. Metopik kraniyosinostozda “trigonosefali”. E. Lambdoid kraniyosinostozda “posterior plagiosefali”.

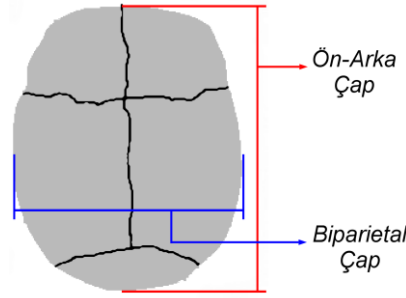
## 2.2. Kraniyosinostozlara Klinik Yaklaşım

### 2.2.1. Kraniyosinostozların Tanısı

Bebeklerin değerlendirilmesinde, kraniyosinostozun varlığını araştırmak için öncelikli basamak fizik muayenedir. Fizik muayenede kraniyosinostoz açısından şüpheyi ilk uyandıracak bulgular, kafa şekil bozuklukları, ön fontanelin erken kapanması ve kafa çevresi ölçümlerinde geri kalmadır (14).

Kafa hacminin artmasında en önemli uyarıcı beyin büyümesidir. Beynin büyümesinin oluşturduğu mekanik basınç ve lokal biyolojik uyarıcıların, sütür ve fontanelerin açık kalmasını sağladığı düşünülmektedir (9). Bu nedenle, beyin büyümesinin primer (konjenital mikrosefali sendromları) veya sekonder (perinatal hipoksiye bağlı beyin hasarı) nedenlerle azaldığı durumlarda kafa kemiklerinin büyüme hızı beyin büyüme hızının önünde kalır. Bu durum ön fontanelin erken kapanması durumu ve kafa çevresinin küçük kalması ile sonuçlanabilir. Hatta, bu nedenle sütürler erken kapanabilir. Ancak beyin gelişimindeki bir geriliğe bağlı böyle bir durumda kapalı sütürü kompanse edecek büyümeler de olmamaktadır. Bundan dolayı, kafada şekil bozukluğu ortaya çıkmaz (14). Bu durum kafa çevresinin küçük kalmasındaki asıl sorunun kraniyosinostoz olmadığına göstergesidir. Bu nedenle, fizik muayenede kafa şeklinin kuş bakışı, önden arkadan ve her iki yandan dikkatlice değerlendirilmesi kraniyosinostoz tanısı açısından büyük önem arz etmektedir. Kraniyosinostoz şüphesi varlığında kafa şeklinin değerlendirilmesi yanında sütürler palpe edilmeli ve hareketliliği değerlendirilmelidir.

Fizik muayenede kafa şeklinin değerlendirilmesinde sefalik indeksin hesaplanması yardımcı olmaktadır. Sefalik indeks biparietal çapın kafa ön-arka çapına oranı olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.3). Bu oranın %83 üzerinde olması dolikosefali olarak değerlendirilirken %76'in altında olması brakisefali olarak değerlendirilmektedir (8).



Şekil 2-3. Sefalik indeksin hesaplanması için kullanılan kafa ön-arka çap ve biparietal çap ölçümleri.

Bebeklerin kafa şekil bozukluklarının en sık görülen nedeni kraniyosinostozdan çok deformasyondur (14). Deformasyon kafa kemikleri ve suturelerin infantlardaki plastisitesi sonucu eksternal kuvvetler sebebiyle kafa şeklinin değişmesine verilen addır. Özellikle bebeklerin sırt üstü yatırılması durumlarında sık görülmektedir. Kafanın deformasyonuna bağlı kafa şekil bozukluğunun hayatın ilk 4 ayı içerisinde görülme sıklığının %20 kadar yüksek olduğu düşünülmektedir (15). Özellikle, asimetrik olan oksipitoparyetal plagiosefali ve simetrik oksipital deformasyonel brakisefali sırt üstü yatış pozisyonlarında en sık görülen deformasyonlardır (15). Deformasyon için sabit yatış ve beslenme şekilleri, erkek cinsiyet, ilk doğum, çoklu doğum, ileri anne yaşı, karın üstü zaman, baş-boyun hareketlerinde kısıtlılık yaratan durumlar (tortikollis gibi) ve motor gelişim basamaklarında gecikme risk faktörleridir (15). Nörolojik, metabolik, genetik veya baş-boyun kaslarına özgü lokal sorunlara bağlı yatış anında kafa pozisyonunun sabit kalmasına bağlı deformasyonun ortaya çıkabileceği akılda tutulmalı ve deformasyonu olan olgularda motor gelişim basamakları dikkatlice değerlendirilmelidir. Deformasyonu kraniyosinostozdan ayıran en belirgin özellikler deformasyonda diğer sutureler çevresinde kompensatuar büyümenin olmaması ve deforme kemiklerin karşılıklı olarak birbirlerine paralellliğini korumasıdır (15). Deformasyonun önlenmesi için ise yatış ve beslenme anlarında bebeğin pozisyonlarının değiştirilmesi ile bebek uyanık iken karın üstü pozisyonda vakit geçirmesi önerilmektedir (15).

Deformasyon sonucu olmayan kafa şekil bozukluklarında kraniyosinostoz akla gelmelidir. Değerlendirmede kafa şeklinin dikkatli muayenesi etkilenen sütür veya sütürleri anlamaya ve bu yönden sınıflamaya yardımcı olmaktadır. Özellikle tek sütürün etkilendiği durumlarda sadece fizik muayene tanıyı koymakta ve hangi sütürün etkilendiğini saptamakta yeterlidir. Radyolojik tetkiklerin kullanımı ise özellikle karmaşık çoklu sütür füzyonlarının çözümlenmesi ve cerrahi öncesi ameliyat planının yapılması gibi durumlarda gerekebilmektedir (16).

Direk grafinin kraniyosinostoz tanısındaki önemi sınırlıdır ve kullanımı hayatın ilk 3 ayından sonra kafa kemiklerinin mineralizasyonun artması ile sütürlerin görünür hale gelmesi ile başlamaktadır (16). Direk grafi, özellikle sütür hatlarının açıklığının görülmesinde, fontanelerin değerlendirilmesinde ve kafa içi basınç artışının kabaca değerlendirilmesinde önemlidir (16). Direk grafide kafa içi basınç artışının ana bulgusu “dövülmüş bakır manzarası”dır. Ancak, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) hem kafa içi basınç artışının değerlendirilmesinde daha başarılıdır hem de eşlik edebilecek diğer beyin anomalileri açısından da bilgi vermektedir (16). Radyolojik tetkiklerden özellikle 3 boyutlu bilgisayarlı tomografi (3D-BT) kraniyosinostozun tam olarak yerinin belirlenmesi ve kraniyosinostozla bağlı veya eşlik eden yüz kemikleri ve orbita şekil bozukluklarının saptanmasında değerlidir (16). Bu nedenle cerrahi tedavinin planlanması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.

Kraniyosinostozlar izole olabilecekleri (nonsendromik) gibi pek çok başka organ sistemini ilgilendiren bir hastalığın parçası veya çok sayıda sütürün hastalıktan etkilendiği ağır bir fenotip olarak (sendromik) da ortaya çıkabilirler. Sendromik kraniyosinostozlu hastalarda kraniyosinostozun değerlendirilmesi dışında tüm vücut fizik muayenesi de önemlidir. Fizik muayene ile özgül sendrom tanısının konabilmesi ve sendroma eşlik edebilecek ve tedavi edilebilir durumların önceden saptanması mümkün olur.

Kraniyosinostozun prenatal tanısı da günümüzde ilerleyen prenatal görüntüleme teknolojileri ile mümkün hale gelmiştir. Özellikle, 20 hafta sonrası yapılan prenatal ultrason ve hızlı MRG tekniklerinin prenatal kraniyosinostoz



tanısında kullanıldığı bildirilmiştir (17). Kraniosinostozun altında yatan genetik neden saptandığında ise fetal örnekleme ile genetik kraniosinostozların araştırılması mümkün olmaktadır.

İzleyen bölümde kraniosinostoz ilişkili sendromlar ve bunlar genetik kökenlerine ilişkin bilgi verilecektir. Bu bilgiler kraniosinostozların genetik nedenlerinin hangi biyolojik mekanizmaların etkilenmesi sonucu oluştuğunun anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.

### 2.2.2. Sendromik Kraniosinostozlar

Sendromik kraniosinostozlar, kraniosinostozla başka organ bulgularının eşlik ettiği durumlardır. Aralarında kromozom hastalıkları, kopya sayısı değişiklikleri ve tek gen mutasyonlarının da olduğu 200 civarında sendromda kraniosinostoz tanımlanmıştır (18). Kraniosinostozlu hastaları 10 yıl boyunca prospektif olarak inceleyen bir çalışmada tüm kraniosinostozların %21'inde genetik bir etyoloji saptanmıştır (19). Bu hastalıkların bir bölümünde kraniosinostoz hastalığının temel bulgusu olması nedeniyle özellikle önem kazanmaktadır.

Kromozom anomalileri ve kopya sayısı değişikliklerine (*Copy Number Variation*, CNV) bağlı olduğu bildirilen çok fazla sayıda sendrom vardır. Bu sendromların pek çoğu tek vaka düzeyinde bildirilmiş olup söz konusu kromozom anomalisi veya CNV ile ilişkisi kesin değildir. Kraniosinostoz ilişkisi birden fazla vakada gösterilmiş durumlar arasında del(9)(p22); del(11)(q23.3q24.3); dup(22)(q11.2) ve del(22)(q11.2); mozaik dup(11)(q11.1q11.3); del(1)(p36.6), dup(1)(p36.6) ve trp(1)(p36.6); trp(15)(q26); dup(2)(q35) vardır (18,20).

Bildirilen kromozom anomalileri arasında özellikle del(9)(p22) sendromundaki metopik kraniosinostozun genetik patogenezi detaylı olarak araştırılmıştır. Bu lokusta bulunan *FREM1* geninin delesyonları ve nokta mutasyonları, hayvan modelleri ile de desteklenerek kraniosinostoz ile ilişkilendirilmiştir (21). 9. kromozomdaki bu bölgenin monozomisini içeren durumlarda da metopik kraniosinostozunun da bir bileşen olduğu olgular bildirilmiştir (22).

Bunun dışında tek gen hastalığı olarak kraniyosinostoza neden olduğu bilinen lokusları ilgilendiren CNV'ler ve kromozom anomalileri de bildirilmiştir. Genomun büyük bir kısmını etkileyen bu değişikliklerin ilgili lokustaki geni veya genleri etkileyerek hastalığa neden olduğu bilinmektedir (23).

Sendromik kraniyosinostozların tek gen hastalığı şeklinde ortaya çıkan çok sayıda farklı türü bilinmektedir. Bu sendromların bir kısmında, kraniyosinostoz sendromun ana bileşenlerinden biri olup hastalığın tanısının konabilmesi için mutlaka bulunması gereken veya sıklıkla hastalıkla beraber görülen bir durumdur. Kraniyosinostoz sendromları olarak tanımlanabilecek bu hastalıklar Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

#### 2.2.2.1 Apert Sendromu (MIM 101200)

Apert Sendromu, kraniyosinostoz ve diğer iskelet anomalileri yanısıra başka sistemik anomalilerin de eşlik edebildiği bir hastalıktır. Apert Sendromu'nda koronal kraniyosinostoz mutlaka görülürken buna diğer sütürlerin erken kapanması da eşlik edebilir (3,8). Apert Sendromlu bireylerin çoğunda fontaneler geniştir ve kafa kemikleri arasında büyük boşluklar bulunabilir; ancak bu kemikler arası boşluklar sonunda kapanırlar. Apert Sendromlu hastaların yüz görünümleri de genellikle etkilenir. Hipertelorizm, aşağı eğimli palpebral aralıklar, ince çadır şeklinde üst dudak ve orta yüz hipoplazisi Apert Sendromu'nda sık görülen yüz özellikleridir (8). Yarık damak, kulak kemiklerinin füzyonuna bağlı iletim tipi işitme kaybı da görülebilir (8). Orbita anomalilerine bağlı görme kaybı ve şaşılık da Apert Sendromu'nda görülebilen özellikler arasındadır (24). Hidrosefaliye bağlı veya bağlı olmayan gelişme geriliği Apert Sendromu'nda görülebilir.

Apert Sendromu'nda kafa kemikleri dışındaki iskelet sistemi bulguları da sık görülür. Bunlar arasında el ve ayağın, özellikle postaksiyal, sindaktilileri yaygındır (3,8). Bunun yanında servikal vertebralarda, özellikle C5-C6'da, füzyon (%68) ve radyohumeral füzyon da görülebilen iskelet sistemi bulguları arasındadır (8). Apert Sendromu'nda iskelet sistemi dışında kardiyak anomaliler (%10) ve ürogenital anomaliler (%10) de görülebilir (8).

Apert Sendromu *FGFR2* geninde oluşan ve ligand bağımlı işlev kazanımı ile sonuçlanan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar . Otozomal dominant olarak kalıtılan Apert Sendromu ailesel geçişli olabileceği gibi *de novo* olarak da ortaya çıkabilir. *De novo* mutasyonlar için ileri baba yaşı bir risk faktörüdür (25). Bunun sebebinin *FGFR2*'nin işlev kazandıran mutasyonlarının FGF/FGFR yolağının uyarılmasının yaşamlarının devamında önemli olduğu bilinen sperm öncüllerine seçici bir avantaj sağlaması olduğu öne sürülmüştür (25).

*FGFR2*'nin Immüoglobulin-benzeri (Ig-benzeri) 2. ve 3. protein *domain*leri arasında ortaya çıkan p.Ser252Trp ve p.Pro253Arg missens mutasyonları hastaların %98'inde Apert Sendromu'nun nedenidir. Bunun dışında Ekzon 8b'nin delesyonu ve bu bölgeye bir transpozon olan Alu dizilerinin girmesi ise Apert Sendromlu bireylerin geri kalan %2'sindeki mutasyonları açıklamaktadır (26,27). Apert Sendromu'nun en sık görülen 2 mutasyonu arasında da bazı fenotipik farklılıklar olduğu belirtilmiştir. p.Ser252Trp mutasyonunda yarık damak ve görme keskinliğinde azalma daha sık görülürken p.Pro253Trp mutasyonunda daha şiddetli bir sindaktili fenotipi görülmektedir (28).

#### 2.2.2.2 Crouzon Sendromu (MIM 123500)

Crouzon Sendromu'ndaki asıl bulgu da koronal kraniyosinostozdur. Koronal sütürle beraber diğer sütürleri de ilgilendiren daha ağır bir kraniyosinostoz tablosu görülebilir. Kraniyosinostozla eşlik eden yüz bulguları arasında orta yüz hipoplazisi, hipertelorizm, belirgin ekzoftalmi ve prognati vardır (8).

Crouzon Sendromu'nda yüz ve kafa dışındaki bulgulara sık rastlanmaz. Hayatı etkileyebilecek, yüz ve kafa gelişim sorunlarına bağlı önemli komplikasyonlar arasında işitme kaybı, görme kaybı ve gelişme geriliği ile beraber çeşitli merkezi sinir sistemi anomalileri vardır (8). Özellikle ilerleyici hidrosefali %30 kadar yüksek bir oranda görülmektedir (8). Buna eşlik eden serebellar tonsillerin herniasyonu da sıkça görülebilmektedir. Bu sendromda ekstremitte anomalileri ve diğer sistemik bulgulara sık rastlanmamaktadır.

Crouzon Sendromu'nda bugüne kadar saptanmış genetik sorunlar Apert Sendromu'ndaki gibi *FGFR2*'deki otozomal dominant kalıtılan mutasyonlar sonucu olmaktadır. *FGFR2*'nin çeşitli bölgelerine yayılan mutasyonların büyük çoğunluğu ekzon 7 ve 8b'de yoğunlaşmış ve Ig-benzeri 3. protein *domain*inde bulunmaktadır. Bunun yanında *FGFR2*'deki başka mutasyonlar da Crouzon Sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyonlar genellikle hücre içi protein kinaz *domain*ine denk gelmektedir. Apert Sendromu'ndaki ligand bağımlı işlev kazanımına neden olan mutasyonların aksine Crouzon Sendromu'ndaki mutasyonlar proteinde ligandan bağımsız bir işlev kazanımına neden olmaktadır (29).

#### 2.2.2.3 Akantozis Nigrikanslı Crouzon Sendromu (MIM 612247)

Crouzon Sendromu'ndaki yüz fenotipine deri katlantıların hiperpigmentasyonun eşlik ettiği sendroma Akantozis Nigrikanslı Crouzon Sendromu adı verilmektedir (8). Vertebra korpuslarında kısalık da hastalığa eşlik edebilmektedir. Daha önceden Crouzon Sendromu ile beraber değerlendirilen Akantozis Nigrikanslı Crouzon Sendromu'nun günümüzde ayrı bir hastalık olarak değerlendirilmesinin nedeni tüm hastalarda genetik etyolojinin tek bir mutasyondan kaynaklanmasıdır. Bu mutasyon otozomal dominant olarak kalıtılan *FGFR3* genindeki p.Ala391Glu mutasyonudur (8). Mutasyon proteinin transmembran *domain*inde bulunmaktadır.

#### 2.2.2.4 Pfeiffer Sendromu (MIM 101600)

Pfeiffer Sendromu, koronal ve diğer sütürlerin de erken kapanmasının eşlik edebildiği kraniyosinostoz ile beraber yüz ve ekstremitte bulgularının da olduğu bir kraniyosinostoz sendromudur. Şiddetli orta yüz hipoplazisinin olabildiği, ekzoftalminin eşlik edebildiği bu sendromda özellikle el ve ayak başparmaklarının tutulduğu ekstremitte bulguları çarpıcıdır. Geniş ve kısa olan başparmakların ellerde laterale, ayaklarda medyale dönmesi ve değişken brakidaktili bu kraniyosinostoz sendromunu diğerlerinden ayıran önemli bulgulardır (8).

Pfeiffer Sendromu hastalığın şiddetine göre 3 farklı tipe ayrılmıştır. Bunlardan tip 1 hastalığın hafif tipi iken bu tipte sadece koronal sinostoz ve ekstremitte bulguları vardır. Tip 1'de mental durum korunmuştur ve genelde hidrosefali ve işitme kaybı vardır (8). Tip 2'de çoklu sütür tutulumu ve bazen prenatal dönemde bile saptanabilen yonca yaprağı kafa şekli bulunur (8). Genelde şiddetli ekzoftalmoz bu tipe eşlik eder ve gelişim geriliği yaygındır. Radyohumeral füzyon, koanal atrezi ve hidrosefali bulunabilir (8). Tip 3'de ise yonca yaprağı kafa şekli yoktur; ancak diğer açılardan tip 2'ye benzemektedir (8).

Pfeiffer Sendromu'ndaki mutasyonların çoğu da *FGFR2*'deki otozomal dominant kalıtılan mutasyonlar sonucu olmaktadır. Bu mutasyonların büyük çoğunluğu ekzon 7 ve 8b'de yoğunlaşmış ve Ig-benzeri 3. protein *domaininde* bulunmaktadır. Pfeiffer Sendromu'ndan sorumlu mutasyonların yaklaşık %5'i ise *FGFR1* geninde saptanmıştır. *FGFR1*'de sadece p.Pro252Arg mutasyonu Pfeiffer Sendromu ile ilişkili bulunmuştur. Bu mutasyon tip 1 Pfeiffer Sendromu'na neden olmaktadır ve Apert Sendromu'ndan sorumlu *FGFR2*'deki p.Pro253Arg mutasyonunun *FGFR1* homologudur (8).

#### 2.2.2.5 Jackson-Weiss Sendromu (MIM 123150)

Bu sendromda görülen kraniyosinostoz ve yüz fenotipi Crouzon Sendromu'na benzetilmiştir. Jackson-Weiss Sendromu'nu Crouzon Sendromu ve diğer kraniyosinostoz sendromlarından ayıran ayak bulgularıdır. Ayakta 2. ve 3. parmaklar arasında sindaktili, geniş ve medyale dönmüş başparmaklar, tarsal ve metatarsal kemik füzyonları ve kısa, geniş 1. metatarsal bulunmaktadır (30). Fenotipik yelpazesi geniş olan Jackson-Weiss Sendromu'nda özellikle radyografik ayak bulguları sabittir (30).

Bu sendromdaki mutasyonlar *FGFR2*'nin ekzon 8b'sinde bulunmaktadır. Otozomal dominant kalıtılan hastalıkta az sayıda mutasyon bildirilmiştir (30).

#### 2.2.2.6 Beare-Stevenson *Cutis Gyrate* Sendromu (MIM 123790)

Beare-Stevenson *Cutis Gyrate* Sendromu'nun kraniyosinostoz ve yüz görünümü açısından bulguları Crouzon Sendromu'na benzemektedir. Crouzon Sendromu'ndan ayırt edici farkı bu sendromda bulunan dermatolojik bulgulardır. En belirgin deri bulgusu el, ayak, gövde, boyun, alın, yüz ve kafa derisinde bulunabilen aşırı kırışık deri görünümüdür (31). Bu görünüme *cutis gyrate* adı verilir. Buna ek olarak akantozis nigrikans, deri çıkıntıları (*skin tags*), aksesuar meme uçları gibi dermatolojik bulgular ve prenatal dişler ile ürogenital anomaliler de bildirilmiştir (31).

Beare-Stevenson *Cutis Gyrate* Sendromu'na neden olan 2 mutasyon *FGFR2*'de bulunan p.Tyr375Cys ve p.Ser372Cys mutasyonlarıdır. Bu hastalık otozomal dominant geçişlidir (31).

#### 2.2.2.7 Skafosefali, Maksiller Retrüzyon, Mental Retardasyon Sendromu (MIM 609579)

Skafosefali, Maksiller Retrüzyon, Mental Retardasyon Sendromu sadece 3 nesilli 1 ailede toplam 11 etkilenmiş bireyde bildirilmiştir. Hastalığın fenotipik özellikleri arasında skafosefali, makrosefali, hipertelorizm, maksiller gerilik ve hafif zihinsel gerilik vardır. Sagittal sütün kraniyosinostozunun olması bu sendromu diğer *FGFR2* ilişkili kraniyosinostozlardan ayıran önemli bir özelliktir. Bu sendromdan sorumlu olan genetik etyolojinin *FGFR2*'deki p.Lys526Glu mutasyonu öne sürülmüştür (32).

#### 2.2.2.8 Eğilmiş Kemik Displazisi Sendromu (*Bent Bone Dysplasia Syndrome*) (MIM 614592)

Bu sendrom 4 otopsi olgusunda tanımlanmış prenatal dönemde ölümcül olan ağır bir sendromdur. Koronal kraniyosinostoz, orta yüz hipoplazisi, mikrognati, kulak kemiklerinin yokluğu, prenatal dişler, hipoplastik klavikular, çan şeklinde göğüs kafesi, eğilmiş uzun kemikler, brakidaktili ve kemik mineralizasyonunda azalma hastalığın genel özelliklerindedir (33).

Eğilmiş kemik sendromunda 2 mutasyon tanımlanmıştır ve her ikisi de *FGFR2*'nin transmembran *domaininde* yerleşen *de novo* heterozigot mutasyonlar olarak ortaya çıkmışlardır. Proteinin membran yerleşimini bozan p.Tyr381Asp ve p.Met391Arg mutasyonlarının protein işlevi üzerine etkisi ise kesin olarak belirlenememiş; ancak işlev kaybı ile ilişkili oldukları düşünülmüştür (33).

#### 2.2.2.9 Muenke Sendromu (MIM 602848)

Muenke Sendromu'ndaki klinik fenotip keskin sınırlara sahip değildir. Fenotipik özellikler aynı aile içerisinde bile çok değişken olabilmektedir. Mutasyona sahip kişilerin %20'sinde klinik önem ifade eden bir kraniyosinostoz bulunmamaktadır (8). Klinik öneme sahip kraniyosinostozu bulunan olgularda unilateral veya bilateral koronal kraniyosinostoz ile beraber orta yüz hipoplazisi ve hipertelorizm bulunmaktadır. Ağır durumlarda diğer sütürler de kraniyosinostozu dahil olmaktadır. Bu sendromda, bazı hastalarda ekstremiteler de etkilenmektedir. Özellikle brakidaktili, karpal kemiklerde füzyon ve koni şekilli epifizler görülebilen bulgular arasındadır. Mental durum genelde etkilenmemiştir; ancak işitme kaybı görülebilir (8).

Hastalık otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır ve sorumlu tek mutasyon *FGFR3* genindeki p.Pro250Arg mutasyonudur (8). Bu mutasyon *FGFR2*'deki Apert Sendromu'ndan sorumlu p.Pro253Arg mutasyonunun protein homolojisi olarak *FGFR3* karşılığıdır ve Apert Sendromu'ndan sorumlu mutasyonlardaki gibi ligand bağımlı işlev kazanımına neden olmaktadır (8). *FGFR3*'teki p.Pro250Arg mutasyonu tek başına kraniyosinostozlarda görülen en sık genetik değişikliktir ve bir çalışmada kraniyosinostozu olan tüm olguların %5'inden sorumlu olduğu gösterilmiştir (8). İzole kraniyosinostozu olan ve eşlik eden bulguları olmayan; ancak Muenke Sendromu mutasyonuna sahip bireyler klinikte nonsendromik kraniyosinostoz olarak değerlendirilirler (8).

#### 2.2.2.10 Saethre-Chotzen Sendromu (MIM 101400)

Saethre-Chotzen Sendromu tek veya çift taraflı koronal sinostoz ile beraber düşük saç çizgisi, asimetrik yüz, gaga şeklinde burun, pitoz, belirgin çene ve küçük, belirgin *crus*ları olan kulakların olduğu bir yüz görünümü şeklinde bulgu veren bir kraniyosinostoz sendromudur (8). Elde 2. ve 3. parmakların sindaktilisi, parietal foramina, radyoular sinostoz, yarık damak, *hallux valgus*, boy kısalığı ve kalp anomalileri de bildirilmiştir (8). Kulak anomalilerine bağlı işitme kaybı da görülebilen bulgular arasındadır. Zihinsel gerilik ise genellikle görülmez. Saethre-Chotzen Sendromu bazen çok hafif bulgularla ortaya çıkabilir ve ailede başka bir bireyde saptanmadan önce hafif fenotipe sahip bireyler fark edilemeyebilir (8).

Saethre-Chotzen Sendromu'ndan sorumlu mutasyonlar *TWIST1* geninde bulunmaktadır. Bir bazik *helix-loop-helix* transkripsiyon faktörünü kodlayan bu genin işlev kaybı mutasyonlarında haplo-yetmezlik sonucu hastalık ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, hastalık otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır (8). Hastalığı ortaya çıkaran mutasyonlar nokta mutasyonları olabileceği gibi genin kısmi delesyonları, kısmi duplikasyonları veya genin tam delesyonları da olabilir. 7p21.1 lokusunda yer alan *TWIST1*'in tüm gen delesyonlarına yakın genlerin delesyonları da eşlik edebilir. Bu türden Saethre-Chotzen Sendromlu olgularda zihinsel gerilik de dahil pek çok başka klinik bulgunun da eşlik ettiği bir sendrom olarak ortaya çıkar (23).

Yakın dönemde *TCF12* isimli *TWIST1* ile beraber çalışan başka bir bazik *helix-loop-helix* transkripsiyon faktörünün mutasyonlarının da pek çok hafif ve ağır kraniyosinostozdan sorumlu olduğu gösterilmiştir. *TCF12* geninin mutasyonlarının gösterildiği olgular arasında daha önceden Saethre-Chotzen tanısı almış bireyler de bulunmaktadır (34).

#### 2.2.2.11 Boston Tipi Kraniyosinostoz (Kraniyosinostoz Tip 2) (MIM 604757)

*Boston* tipi kraniyosinostoz bir tanesi yakın zamanda olmak üzere iki ailede bildirilmiştir (35). Bu kraniyosinostoz sendromunda, kraniyosinostoz fenotipi çok çeşitlilik gösterebilmektedir. Hafif frontoorbital gerilikten, yonca yaprak kafa şekline kadar değişen kafa fenotipleri ile beraber metopik, sagittal ve koronal sütürlerin



kraniosinostozları bildirilmiştir (35). Bunun yanında el 4. ve 5. sindaktili ile el ve ayaklarda brakimezofalanji bu sendromda bildirilen diğer iskelet bulgularıdır.

*Boston* tipi kraniosinostoz otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır ve hastalıktan sorumlu gen *MSX2*'dir. *MSX2*'nin işlev kaybı mutasyonları ve delesyonları daha çok parietal foramina ve eşlik edebilen kleidokraniyal displazi ile ilişkilendirilmişken aynı amino asidi ilgilendiren iki işlev kazanımı mutasyonu *Boston* tipi kraniosinostoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyonlar bir *homeobox* transkripsiyon faktörü olan *MSX2*'nin *homeodomain*ini ilgilendiren p.Pro148His ve p.Pro148Leu mutasyonlarıdır (35).

#### 2.2.2.12 Kraniofrontonazal Sendrom (MIM 304110)

Kraniofrontonazal Sendrom da koronal kraniosinostozun olduğu sendromlara bir başka örnektir. Bu sendromda kraniosinostoz ek olarak hipertelorizm, alında V şeklinde saç çizgisi (*widow's peak*), aşağı eğimli palpebral aralıklar, bifid burun ucu, uzunlamasına tırnak çatlakları görülmektedir (8). Bu bulguların yanında daha nadir olmak üzere Sprengel deformitesi, yarık damak ve dudak, korpus kallozum agenezisi, eklem hareket kısıtlılıkları, göğüs kafesi deformiteleri ve diyafram hernisi de görülmektedir (8). Nadiren zihinsel gerilik de bulgular arasında yer almaktadır (8).

Kraniofrontonazal Sendrom X-bağımlı dominant olarak kalıtılan bir hastalıktır. Hastalık, paradoksik olarak heterozigot olan kadınlarda hemizigot olan erkeklere oranla daha ağır bir fenotip sergilemektedir (8). Genelde, erkeklerde görülen tek bulgu hipertelorizmdir (8). Hastalıktan sorumlu gen X kromozomu üzerindeki *EFNB1*'dir ve hücre-hücre bağları ve sinyal iletiminden sorumlu Efrin B1 proteinini kodlamaktadır. Genin işlev kaybına neden olan nokta mutasyonları ile genin bir kısmını veya tamamını ilgilendiren mutasyonların hastalığa neden olduğu gösterilmiştir (8). Kadınlarda görülen daha ağır fenotip ise mutant Efrin B1 üreten ve normal Efrin B1 üreten hücreler arasındaki dengesizliklere bağlanmıştır (36).

#### 2.2.2.13 Baller-Gerold Sendromu (MIM 218600)

Baller-Gerold Sendromu koronal kraniyosinostoz ile beraber radius aplazisinin olduğu bir hastalıktır. Bazı olgularda çoklu kraniyosinostoz da bildirilmiştir. Radius aplazisi ve buna eşlik edebilen başparmak yokluğu, karpal ve metakarpal kemiklerin yokluğu, ulna kısalığı ve eğilmesi hastalığı diğer kraniyosinostozlardan ayıran en önemli özelliklerdir. Hastalıktaki üst ekstremitte anomalileri asimetrik olarak ortaya çıkabilir. Genelde bu sendromda büyüme geriliği ve boy kısalığı da bulgulara eşlik etmektedir (37).

Baller-Gerold Sendromu'nda bazen görülebilen bulgular arasında hipertelorizm, belirgin burun kökü, orta hat kapiller hemanjiyomları, poikiloderma genitoüriner anomaliler ve zihinsel gerilik vardır.

Baller-Gerold Sendromu otozomal resesif olarak kalıtılmakta ve *RECQL4* genindeki işlev kaybına neden olan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Aynı gendeki mutasyonlar kraniyosinostozun sık görülen bir klinik bulgu olmadığı RAPADILINO Sendromu ve Rothmund-Thomson Sendromu ile de ilişkilendirilmiştir (37). *RECQL4* proteini bir DNA helikazdır ve özellikle oksidatif stres ilişkili DNA tamirinde görevleri olduğu gösterilmiştir (37).

#### 2.2.2.14 Antley-Bixler Sendromu (MIM 201750, MIM 207410)

Antley-Bixler Sendromu, koronal ve lambdoid sütürleri ilgilendiren çoklu kraniyosinostozun görülebildiği bir kraniyosinostoz sendromudur. Ana yüz bulguları arasında propitoz, frontal belirginleşme, aşağı eğimli palpebral aralıklar, koanal atrezinin de eşlik edebildiği şiddetli burun kökü basıklığı ve düşük kulaklar vardır. İskelet bulguları arasında özellikle radyohumeral sinostoz ve ulnanın medyale eğilmesi ile özellikle femur başta olmak üzere uzun kemiklerdeki eğilmeler dikkati çekmektedir. Bunun dışında eklem kontraktürleri ve ilerlemiş kemik yaşı görülebilir. İskelet sistemi dışı bulguları arasında konjenital kalp hastalıkları ve renal anomaliler vardır (38).

Antley-Bixler Sendromu'nun iki alt tipi tanımlanmıştır. Bu alttiplerden birincisi (MIM 201750) kız bebeklerde genitalyanın virilizasyonu, bozulmuş steroid

sentezi ve karaciğerin azalmış detoksifikasyon kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu alttipten sorumlu nokta mutasyonları bir Sitokrom P450 oksidoredüktaz enzimini kodlayan *POR* geninde bulunmaktadır. Bu mutasyonlar işlev kaybına neden olurlar. Hastalık otozomal resesif kalıtılmaktadır (38). *POR* mutasyonları sonucu olan Antley-Bixler Sendromu oldukça ağır bir klinik tabloya yol açmakta ve büyük oranda bebeklik döneminde ölümlerle sonuçlanmaktadır (38). Buna karşın, bu bulguların olmadığı; ancak diğer bulguları ile Antley-Bixler Sendromu tanısı alan hastalarda (MIM207410) *FGFR2* mutasyonları etyolojiden sorumlu tutulmuştur. *FGFR2* mutasyonlarının olduğu durumdaki kalıtım otozomal dominanttır (38).

#### 2.2.2.15 Radyohumeral Füzyon ile Diğer İskelet ve Kraniofasyal Anomaliler Sendromu (MIM 614416)

Bu sendrom 2 ailede tanımlanmış olup koronal ve lambdoid kraniosinostozla beraber şiddetli iskelet bulgularının bulunduğu bebeklik döneminde ölümlerle sonuçlanan bir sendromdur. Bulguları arasında kafa kemiklerinin hipoplazisi, oksipital ensefalosel, radyohumeral sinostoz, el ve ayakta oligodaktili ve ilerlemiş kemik yaşı vardır (39).

Hastalıktan sorumlu mutasyonlar bir sitokrom P450 oksidoredüktaz kodlayan *CYP26B1* geninde bulunmaktadırlar. Bu mutasyonlar genin işlevini azaltan nokta mutasyonlarıdır. Hastalık otozomal resesif kalıtılmaktadır. *CYP26B1* enziminin özellikle retinoik asit katabolizmasında görev aldığı ve parçalanamayan retinoik asidin Radyohumeral Füzyon ile Diğer İskelet ve Kraniofasyal Anomaliler Sendromu'nun patogeneğinde rol aldığı öne sürülmüştür (39).

#### 2.2.2.16 Carpenter Sendromu (MIM 201000, MIM 614976)

Carpenter Sendromu her türlü kraniosinostozun eşlik edebildiği bir nonmotil silyopati Sendromu'dur. Kraniosinostoz dışı bulguları arasında preaksiyel polidaktili, brakidaktili, sindaktili, orta falankların hipoplazisi/aplazisi, zihinsel gerilik, obezite, konjenital kalp sorunları, hipogonadizm vardır (40).

Hastalıktan *RAB23* ve *MEGF8* genlerinin işlev kaybı mutasyonları sorumlu olup hastalık otozomal resesif olarak kalıtılmaktadır (40,41).

2.2.2.17 Kraniyoektodermal Displazi (MIM 218330, MIM 613610, MIM 614099, MIM 614378)

Kraniyoektodermal displazi, Sensenbrenner Sendromu olarak da bilinen kraniyosinostozun eşlik ettiği bir nonmotil silyopati sendromudur. Bu sendromda görülen diğer bulgular arasında dar göğüs kafesi, kısa ekstremiteler ve brakidaktili yer almaktadır. İskelet dışı bulguları arasında ise nefronofitiz, hepatik fibroz, konjenital kalp anomalileri ve retinitis pigmentosa vardır (42).

Hastalıktan sorumlu mutasyonlar *IFT122*, *WDR35*, *IFT43*, *WDR194* genlerinde saptanmıştır. Herbir gendeki mutasyonlar otozomal resesif bir kalıtım göstermektedir (42).

2.2.2.18 Philadelphia Tipi Kraniyosinostoz (MIM 601222)

*Philadelphia* Tipi Kraniyosinostoz az sayıda ailede tanımlanmış bir sendromudur. Bu sendromda görülen kraniyosinostoz sagittal bir kraniyosinostozdur. Kraniyosinostozla ek olarak kemik füzyonun olmadığı el ve ayak sindaktilileri ve preaksiyal polidaktili bulunmaktadır (43).

Bu hastalıktan sorumlu olabilecek ve aynı lokusu kapsayan üç CNV bildirilmiştir. Bu CNV'lerin ortak lokusu *IHH* geninin yakınlarında bulunan evrimsel olarak korunmuş bir alandır ve *IHH* geninin ekspresyonunu kontrol ettiği öne sürülmüştür (43).

2.2.2.19 Shprintzen-Goldberg Kraniyosinostoz Sendromu (MIM 182212)

Shprintzen-Goldberg Kraniyosinostoz Sendromu marfonoid bulguların eşlik ettiği genelde sagittal sütürün erken kapandığı bir sendromdur. Bunun dışındaki bulguları arasında yüz bulguları dikkati çekmektedir. Bu bulgular hipertelorizm, aşağı eğimli palpebral aralıklar, yüksek damak, mikrognati ve düşük kulaklardır. İskelet bulguları arasında araknodaktili, pektus deformitesi, kamptodaktili, skolyoz, aşırı

eklem hareketliliği bulunmaktadır. Sık görülen sistemik bulguları arasında gelişme geriliği, aort kökü genişlemesi ve yumuşak doku hernileri bulunmaktadır (44).

Shprintzen-Goldberg Kraniosinostoz Sendromu'nun genetik nedeni olan TGF $\beta$  sinyal iletim yolağında inhibe edici görevi olduğu bilinen SKI'nin işlev kaybına neden olan mutasyonları saptanmıştır. SKI geninin mutasyonları otozomal resesif olarak kalıtılmaktadır (44).

#### 2.2.2.20 Kraniosinostoz ve Diş Anomalileri Sendromu (Kreiborg-Pakistani Sendromu) (MIM 614188)

Kreiborg-Pakistani Sendromu, 5 ailede bildirilmiş yeni bir fenotiptir. Her türden kraniosinostozla beraber orta yüz hipoplazisinin ve çeşitli diş anomalilerinin olduğu bir sendromdur. Bazı olgularda geniş ayak başparmağı, hallux valgus, ayakta 2-3 sindaktili ve proptoz eşlik edebildiği bildirilmiştir (45).

Hastalıktan sorumlu gen olarak *IL11RA*'daki otozomal resesif olarak kalıtılan nokta mutasyonları gösterilmiştir (45).

#### 2.2.2.21 Kraniosinostoz ile İlişkili Diğer Sendromlar

Ana bulguları arasında kraniosinostoz olmayan ancak kraniosinostozun birden fazla olguda bildirildiği başka birçok genetik sendrom da vardır. Bunlar arasında 3MC (Mingarelli–Malpuech–Michels–Carnevale) Sendromu (Oküloskeletoabdominal Sendrom) (etyolojide *MASP1*, *COLEC11*), Loey-Dietz Sendromu Tip1 (etyolojide *TGFR1*, *TGFR2*), Marfan Sendromu (etyolojide *FBN1*), Greig Sefalopolisindaktili Sendromu (etyolojide *GLI3*), Kraniosinostozlu Noonan Sendromu (etyolojide *KRAS*), Otozomal Dominant Hiper-IgE Rekürren Enfeksiyon Sendromu (etyolojide *STAT3*), Mainzer-Saldino Sendromu (etyolojide *IFT140*), Frontonazal Displazi (etyolojide *ALX4*) OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, Çevrimiçi İnsanlardaki Mendelyan Kalıtım) veritabanında özellikle dikkati çekmektedir (46). Bunlara ek olarak FGFR ilişkili kemik displazilerinden bazılarında da klinik tabloda kraniosinostoz olabilir. Özellikle, Osteoglofonik Displazi (etyolojide *FGFR1*),

Akondroplazi (etyolojide *FGFR3*), Tanatoforik Displazi Tip 1 ve Tip 2 (etyolojide *FGFR3*) kraniyosinostoz bildirilen FGFR ilişkili kemik displazisi sendromlarıdır (46).

Bunun dışında daha pek çok sendromda kraniyosinostoz klinik tabloya eşlik edebilir. Özellikle beyin büyümesinin azalmasına bağlı mikrosefalinin olduğu sendromlarda kafa hacminin büyümesindeki azalmasına karşın kafa kemiklerinin normal hızda büyümeleri sütürlerin erken kapanması ile sonuçlanabilir. Bu nedenle örneğin primer mikrosefali sendromları gibi primer olarak sütürün hastalığı olmayan; ancak kraniyosinostoz ile sonuçlanan sendromlar da kraniyosinostozların ayırıcı tanısında akılda tutulmalıdır.

Tablo 2.1. Ana bulguları arasında kraniyosinostoz olan sendromlar (Tablonun devamı sonraki 3 sayfadadır)

Sendrom	Kraniyosinostoz Tipi	Yüz Görünümü	Diğer İskelet Sistemi Bulguları	Diğer Sistemik Bulgular	Kalıtım Şekli/Sıklığı	Etkilenen Gen(ler)	En sık Mutasyon(lar)
Apert Sendromu	Koronal , diğer sinostozlar da eşlik edebilir	Orta yüz hipoplazisi, hipertelorizm	El-ayakta sindaktilliler, Servikal vertebra füzyonları	Kardiyak anomaliler, İşitme kaybı, Ürogenital anomaliler	OD 1/80.000	FGFR2	p.Ser252Trp, p.Pro253Arg
Crouzon Sendromu	Koronal , diğer sinostozlar da eşlik edebilir	Orta yüz hipoplazisi, hipertelorizm, ekzoftalmi, prognatizm	-	Görme kaybı, İşitme kaybı, merkezi sinir sistemi anomalileri	OD 1/60.000	FGFR2	Ekzon 7 ve 8b'nin mutasyonları
Akantozis Nigrikanslı Crouzon Sendromu	Crouzonoid	Crouzonoid	Vertebra korpuslarında kısalık	Görme kaybı, İşitme kaybı, merkezi sinir sistemi anomalileri	OD Nadir	FGFR3	p-Ala391Gln
Pfeiffer Sendromu	Koronal , diğer sinostozlar da eşlik edebilir	Orta yüz hipoplazisi, hipertelorizm, ekzoftalmi,	El-ayakta başparmakları geniş, kısa ve deviyeye, brakidaktilli, radyohumeral füzyon, koanal atrezi	Görme kaybı, İşitme kaybı	OD 1/100.000	FGFR2 FGFR1	Ekzon 7 ve 8b'nin mutasyonları
Jackson-Weiss Sendromu	Crouzonoid	Crouzonoid	Ayakta tarsal-metatarsal füzyonlar, kısa 1. metatarsus	-	OD Nadir	FGFR2	Ekzon 8b'nin mutasyonları
Beare-Stevenson <i>Cutis Gyrata</i> Sendromu	Crouzonoid	Crouzonoid	Prenatal dişler	<i>Cutis gyrata</i> , akantozis nigrikans, deri çıkıntıları, akseuar meme uçları, ürogenital anomaliler	OD Nadir	FGFR2	Ekzon 9'un mutasyonları

Tablo 2.1 (Devamı). Ana bulguları arasında kraniyosinostoz olan sendromlar (Tablonun devamı sonraki 2 sayfadadır)

Sendrom	Kraniyosinostoz Tipi	Yüz Görünümü	Diğer İskelet Sistemi Bulguları	Diğer Sistemik Bulgular	Kalıtım Şekli/Sıklığı	Etkilenen Gen(ler)	En sık Mutasyon(lar)
Skafosefali, Maksiller Retrüzyon, Mental Retardasyon Sendromu	Sagittal	Maksiller gerilik, hipertelorizm	-	-	OD Nadir	FGFR2	p.Lys526Glu
Eğilmiş Kemik Displazisi ( <i>Bent Bone Dysplasia</i> ) Sendromu	Koronal	Orta yüz hipoplazisi, mikrognati, kulak kemiklerinin yokluğu, prenatal dişler	Hipoplastik klavikülalar, çan şeklinde göğüs kafesi, eğrilmiş uzun kemikler, brakidaktili ve kemik mineralizasyonunda azalma	Intrauterin letal	OD Nadir	FGFR2	p.Tyr381Asp, p.Met391Arg
Muenke Sendromu	Koronal , diğer sinostozlar da eşlik edebilir	Orta yüz hipoplazisi, hipertelorizm	Brakidaktili , karpal kemiklerde füzyon ve koni şekilli epifizler	İşitme kaybı	OD 1/30.000	FGFR3	p.Pro250Arg
Saethre-Chotzen Sendromu	Koronal	Düşük saç çizgisi, asimetric yüz, gaga şeklinde burun, pitoz, belirgin çene, küçük, belirgin <i>crusları</i> olan kulaklar, yarı damak	Elde 2. ve 3. parmakların sindaktilisi, parietal foramina, radyoular sinostoz,, <i>hallux valgus</i> , boy kısalığı	Kalp anomalileri	OD 1/50.000	TWIST1, TCF12	Tüm gende nokta mutasyonları ve delesyonlar



Tablo 2.1 (Devamı). Ana bulguları arasında kraniyosinostoz olan sendromlar (Tablonun devamı sonraki sayfadadır)

Sendrom	Kraniyosinostoz Tipi	Yüz Görünümü	Diğer İskelet Sistemi Bulguları	Diğer Sistemik Bulgular	Kalıtım Şekli/Sıklığı	Etkilenen Gen(ler)	En sık Mutasyon(lar)
Boston Tipi Kraniyosinostoz	Koronal, metopik, sagittal	-	El 4. ve 5. sindaktili, el ve ayak brakimezofalanji	-	OD Nadir	MSX2	p.Pro148His, p.Pro148Leu
Kraniyo-fronto-nazal Sendrom	Koronal	Hipertelozizm, <i>widow's peak</i> aşağı eğimli palpebral aralıklar, bifid burun ucu	Sprengel deformitesi, yarık damak ve dudak	Uzunlamasına tırnak çatlakları	X-bağımlı dominant 1/100.000	EFNB1	Tüm gende nokta mutasyonları ve delesyonlar
Baller-Gerold Sendromu	Koronal, diğer sinostozlar da eşlik edebilir	Hipertelozizm, belirgin burun kökü	Radyal aplazi, başparmak yokluğu, karpal metakarpal kemik eksiklikleri	Kapiller hemanjiyom, poikiloderma genitoüriner anomaliler	OR Nadir	RECQL4	Nokta mutasyonları
Antley-Bixler Sendromu	Koronal, Lambdoid	Propitoz, frontal belirginleşme, aşağı eğimli palpebral aralıklar, koanal atrezi, basık burun kökü, düşük kulaklar	Radyohumeral sinostoz, uzun kemiklerde eğilmeler, ilerlemiş kemik yaşı	Konjenital kalp hastalıkları ve renal anomaliler, kadınlarda virilizasyon	Tip 1 – OR Nadir Tip 2 – OD Nadir	POR FGFR2	Nokta mutasyonları
Radyohumeral Füzyon ile Diğer İskelet ve Kraniyofasial Anomaliler Sendromu	Koronal, Lambdoid	-	Kafa kemiklerinin hipoplazisi, oksipital ensefalosel, radyo humeral sinostoz, el ayakta oligodaktili, ilerlemiş kemik vasci	-	OR Nadir	CYP26B1	Nokta mutasyonları

Tablo 2.1 (Devamı). Ana bulguları arasında kraniyosinostoz olan sendromlar

Sendrom	Kraniyosinostoz Tipi	Yüz Görünümü	Diğer İskelet Sistemi Bulguları	Diğer Sistemik Bulgular	Kalıtım Şekli/Sıklığı	Etkilenen Gen(ler)	En sık Mutasyon(lar)
Carpenter Sendromu	Çeşitli	-	Preaksiyel polidaktili, brakidaktili, sindaktili, orta falanksların hipoplazisi/aplazisi	Zihinsel gerilik, obezite, konjenital kalp sorunları, hipogonadizm	OR Nadir	<i>RAB23</i>	Nokta mutasyonları
Kraniyo-ektodermal Displazi	Çeşitli	-	Dar göğüs kafesi, kısa ekstremiteler, brakidaktili	Nefronofitiz, hepatik fibroz, konjenital kalp anomalileri, retinitis pigmentosa	OR Nadir	<i>IFT122, WDR35, IFT43, WDR194</i>	Nokta mutasyonları
<i>Philadelphia</i> tipi Kraniyosinostoz	Sagittal	-	El ve ayak sindaktilileri, preaksiyel polidaktili	-	OD Nadir	<i>IHH</i> promotör bölgesi	CNV'ler
Shprintzen-Goldberg Kraniyosinostoz Sendromu	Sagittal	Hipertelorizm, aşağı eğimli palpebral aralklar, yüksek damak, mikrognati düşük kulaklar	Araknodaktili, pektus deformitesi, kamptodaktili, skolyoz, aşırı eklem hareketliliği	Aort kökü genişlemesi ve yumuşak doku hernileri	OD Nadir	<i>SKI</i>	Nokta mutasyonları
Kraniyosinostoz ve Diş Anomalileri Sendromu	Çeşitli	Orta yüz hipoplazisi, proptoz	Çeşitli dış anomalileri, geniş ayak başparmağı, hallux valgus, ayakta 2-3 sindaktilisi	-	OR Nadir	<i>IL11RA</i>	Nokta mutasyonları

### 2.2.3. Nonsendromik Kraniosinostozlar

Nonsendromik kraniosinostozlar, kraniosinostozun tek başına bulunduğu veya kraniosinostozla ikincil komplikasyonların eşlik ettiği kraniosinostozlardır. Nonsendromik kraniosinostozlar bir tek gen hastalığı sonucu ortaya çıkabilir veya multifaktöryal bir genetik durumun parçası olabilirler; ancak nonsendromik kraniosinostozlarda diğer organ sistemlerini ilgilendiren ek bulgular yer almaz.

Nonsendromik kraniosinostozların patogeneğinde genetik veya çevresel pek çok neden öne sürülmüştür. Günümüze kadar yapılmış ikiz çalışmalarını toplayan bir meta-analizde genetik olarak eş olan ve benzer intrauterin koşullarda gelişen monozigotik ikizlerde, genetik olarak farklı olan; ancak gene benzer intrauterin koşullarda gelişen dizigotik ikizlere oranla kraniosinostozla anlamlı düzeyde daha fazla rastlanmıştır (47). Bu sonuç genetik faktörlerin nonsendromik kraniosinostoz patogeneğinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Yine aynı meta-analiz, ikiz çocuk oranının kraniosinostozlu bireylerde kontrol grubuna göre yaklaşık 2,5 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir (47). Bu sonuç ise nonsendromik kraniosinostozlarda çevresel ve epigenetik faktörlerin rol oynadığını göstermektedir.

Nonsendromik kraniosinostoz için risk faktörü olarak pek çok çevresel faktör öne sürülmüştür; ancak hiçbirini için kesin kanıt olabilecek nedensellik ilişkileri kurulamamıştır. Özellikle intrauterin sıkışma, annede sigara kullanım öyküsü ve bazı teratojenlere maruziyet gibi durumların kraniosinostoz ile ilişkili çevresel etkenler olabileceği öne sürülmüştür (48).

Nonsendromik kraniosinostozu olan 186 hasta üzerine yapılan bir karşılaştırmalı genom hibridizasyonu mikrodizini (*array Comparative Genomic Hybridization*, aCGH) çalışmasında 14 bireyde daha önceden çalışmanın kontrol popülasyonunda saptanmamış CNV'lere rastlanılmıştır (20). Bu CNV'lerden özellikle *RUNX2* geninin tamamını içerisine alan 6p21'deki bir duplikasyon üzerinde araştırmacılar yoğunlaşmışlardır. *RUNX2* transkripsiyon faktöründe işlev kaybı, patogeneğinde intramembranöz kemikleşmenin bozulduğu bilinen kleidokraniyal disostozla neden olmaktadır. Bu transkripsiyon faktörünün olasılıkla işlev kazanımı

ile sonuçlanan genetik duplikasyonunun ise intramembranöz kemikleşme sürecini hızlandırarak kraniyosinostoza neden olabileceği düşünülmektedir (20).

Nonsendromik kraniyosinostoza neden olduğu belirtilen genetik etkenler arasında pek çok tek gen hastalığı da bildirilmiştir. Bunlar arasında özellikle metopik kraniyosinostozla ilişkilendirilenler *FGFR1* ve *FREM1* mutasyonları iken koronal kraniyosinostoz ilişkilendirilen mutasyonlar *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *TCF12* ve *ERF* mutasyonlarıdır. Bu genlerden birçoğundaki mutasyonlar değişken fenotiplere neden olduğu bilinen kraniyosinostoz sendromlarının mutasyonları ile örtüşmektedir. *ERF*, *TCF12* ve *FREM1* genlerine ait mutasyonlar ise yakın zamanda bildirilmiştir. Bunlardan, *ERF*, MAP (Mitojenle Aktive olan Protein) Kinaz yolağının işlevlerini düzenlemektedir ve işlev kaybına neden olan mutasyonları haplo-yetmezlik ile otozomal dominant nonsendromik kraniyosinostoza neden olmaktadır (49). *TCF12* ise *TWIST1* ile beraber çalışan bir bazik *helix-loop-helix* transkripsiyon faktörüdür (34).

Bu genler dışında mutasyonları doğrudan kraniyosinostoza neden olmayan; ancak kraniyosinostoza yatkınlık yapan genler de vardır. Bu genler arasında *homeobox* transkripsiyon faktörleri olan *ALX4* ve *SOX6* ile efrin protein ailesinin bir üyesi olan *EFNA4* bildirilmiştir (50-52).

#### **2.2.4. Kraniyosinostozun Sonuçları ve Tedavisi**

Kraniyosinostozun yarattığı sorunlar kafa hacminin büyümesindeki azalma veya kafa kemiklerindeki lokal büyüme geriliklerine bağlıdır. Bu nedenle, kraniyosinostozların en önemli ve sık görülen komplikasyonu kafa içi basınç artışıdır (53). Kraniyosinostozlarda kafa içi basınç artışının büyüyen beynin kafatası içerisinde sıkışması kadar sıkışan venler sonucu kafa içi venöz drenajın bozulması sonucuyla da ortaya çıktığı düşünülmektedir (53). Kafa büyümesini daha çok kısıtlayan çoklu kraniyosinostoz durumlarında kafa içi basınç artışı daha sıklıkla görülmektedir. Tedavisi yapılmayan kafa içi basınç artışı, çocuklarda çeşitli nöropsikiyatrik değişikliklere neden olabilmektedir (53). Kraniyosinostozların neden oldukları lokal sorunlar ise arasında kafa sinirlerinin sıkışmasına bağlı sorunlar önemlidir. Bu

sorunlar sonucu kafa sinirlerinde fonksiyon kaybı, körlüğe kadar gidebilen görme sorunları, işitme kayıpları ortaya çıkabilir (53). Ayrıca, yüz ve kafa kemikleri aradındaki boşlukların azalmasına bağlı olarak ortaya çıkan anatomik darlıklar da çeşitli sorunlara neden olabilir. Bu sorunlar arasında obstrüktif uyku apnesi gibi komplikasyonlar önemlidir (53). Son olarak, kraniyosinostozlarda hem kraniyosinostozlu kafa kemiklerinin büyümelerinin engellenmesi hem de kompensatuar büyümeden dolayı estetik sorunlar oluşmaktadır (53).

Günümüzde kraniyosinostozun tedavisinde en çok kullanılan yöntem komplikasyonların varlığında veya şüphesinde yapılan cerrahilerdir. Cerrahi özellikle sinostozu uğrayan sütün açılması için yapılır. Cerrahi girişimlerin yapılması için özellikle 1 yaşının sonları tercih edilir (54). Böylece, hem kafa içi basınç artışı için erken önlem alınmış olunur hem de yara iyileşmesi ve cerrahi sonucu oluşacak kemik defektlerin ossifikasyonu hızlı olur.

Yakın dönemde kraniyosinostozların patogenezi ile ilgili bilginin artması sebebiyle de farmakolojik tedavi için de çeşitli denemeler başlamıştır. Bu denemelerde özellikle FGFR2'nin işlev kazanımının engellenmesine yönelik farmakolojik ajanların geliştirilmesinde yol kat edilmiştir. Özellikle 2 molekül hayvan deneylerinde başarılı sonuçlar vermiştir. Bu moleküllerden biri FGFR2 proteininin doğrudan inhibitörü olan PD173074'tir. Bu inhibitörün Crouzon Sendromu fare modellerinden kurulmuş kalvaryal (kafatası) organ kültürlerinde koronal sütün kapanmasını engellediği gösterilmiştir (55). Bir diğeri ise MAP Kinaz sinyal iletiminde yer alan MEK1/2 (MAPK/ERK Kinaz) proteinlerini inhibe eden U0126'dır. MAP Kinaz yolağı FGFR2 proteininin uyardığı önemli sinyal iletim yollarından biridir. Apert Sendromu'nda FGFR2'deki işlev kazanımına bağlı olarak MAP Kinaz sinyal iletim yolağının aktivitesi artmıştır. Yapılan Apert Sendromu fare modeli deneylerinde, heyecan verici şekilde, MAP Kinaz yolağının inhibitörü olan U0126'nın prenatal dönemde uygulanmaya başlandığında kraniyosinostoz oluşumunu engellediği gösterilmiştir (56). Kraniyosinostozların patogenezi konusundaki bilgi birikimi artıp kraniyosinostozlara neden olan biyolojik aksaklıklar ortaya kondukça gelecekte kraniyosinostozlar için farmakolojik tedavilerin önü açılacaktır.

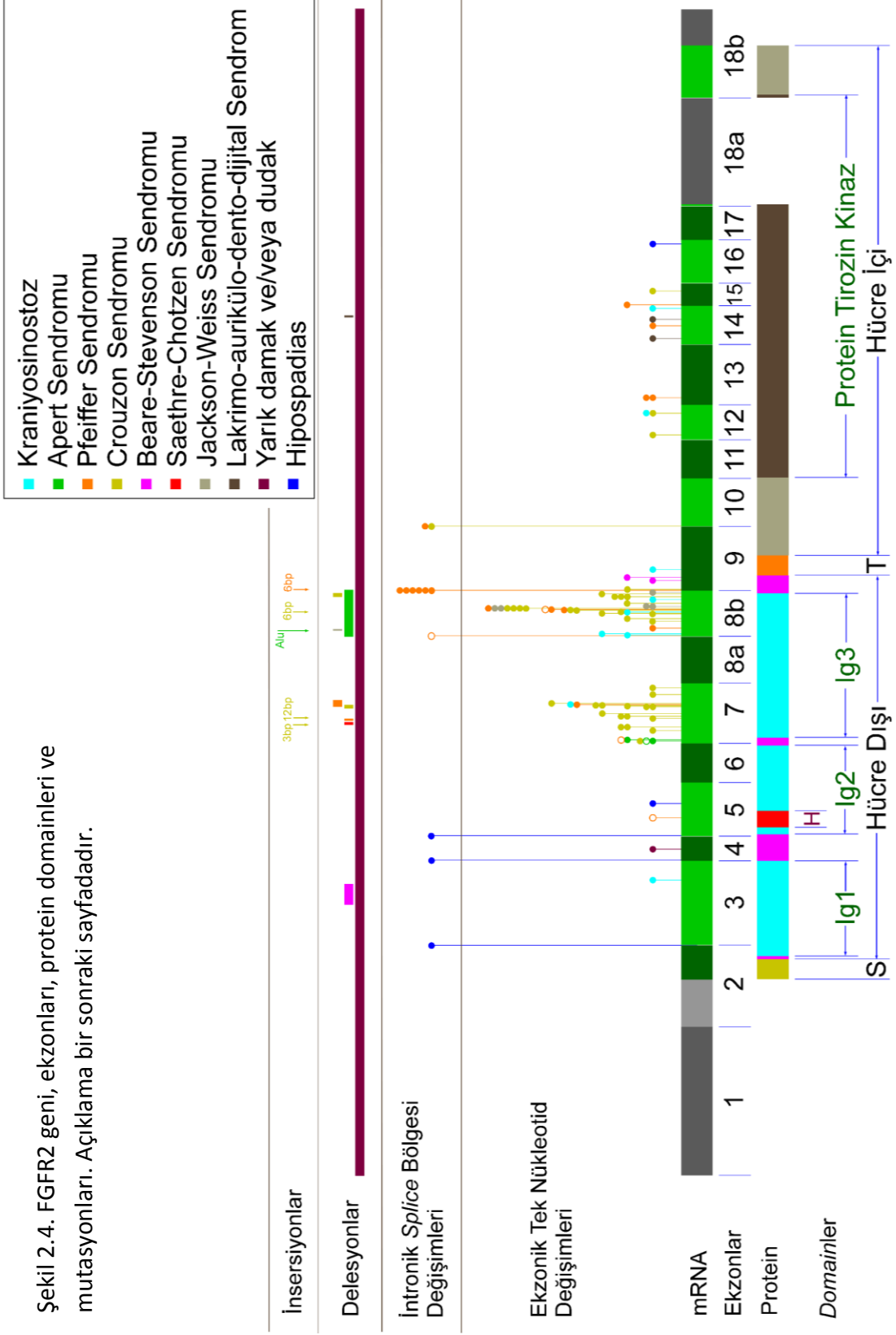
## 2.3. FGFR2 ve Kraniosinostoz İlişkisi

### 2.3.1. FGFR2 Proteini, İşlevi ve Kraniosinostoz Patogenezinde Önemi

Koronal kraniosinostoz sendromlarının büyük bir çoğunluğu aynı ortak yolağın kusurları sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu ortak yolak, FGF'lerin (*Fibroblast Growth Factor*, Fibroblast Büyüme Faktörü) hücreler tarafından tanınıp uygun cevabın verilmesini sağlayan sinyal iletim yollarıdır. FGF'lerin hücreler tarafından algılanmasını sağlayan ilk proteinler hücre yüzeyi reseptörü olan FGFR'lerdir. FGFR proteinlerinde aşırı işlev artımına neden olan mutasyonlar, FGFR'lerin ligandları olan FGF'ler olmadığında bile çalışmalarına veya ligandları varlığında gereğinden fazla çalışmalarına neden olmaktadır (29). FGFR'ler dışında başka proteinler de hücre dışı FGF sinyallerinin hücreler tarafından algılanmasını kontrol etmektedirler. Bu proteinlerden *TWIST1* normal koşullar altında FGFR genlerinin ifadesini azaltarak dolaylı yoldan FGFR sinyal iletim yollarını inhibe etmektedir. Bu nedenle *TWIST1*'de işlev kaybına neden olan mutasyonlar FGFR'lerin sentezinin artmasıyla sonuçlanmaktadır ve böylece aşırı bir FGFR aktivitesi ortaya çıkmaktadır (8).

Bir hücre yüzeyi reseptörü olan ve 22 farklı tipteki FGF isimli büyüme faktörlerinden bir kısmını tanıyan FGFR2'nin hücre dışı bölümünde başlıca 3 adet Ig benzeri *domain* vardır (Şekil 2.4) (57). Bunlardan 2. ve 3.'sü ligandın tanınması için özellikle önemli *domain*lerdir. Bu *domain*ler, *FGFR2* geninin 2 farklı *splice* varyantı tarafından kodlanan protein alttipleri olan FGFR2b ve FGFR2c'nin ligand özgüllüğünden sorumlu olan *domain*lerdir. FGFR2'nin ligand seçiciliğinin FGFR2 ilişkili kraniosinostoz sendromlarında önemli olduğu öne sürülmektedir (29). Apert Sendromu'nda FGFR2'nin ligand seçiciliği azalırken bağlandığı ligand tarafından da daha fazla aktive edilmektedir (29). Crouzon Sendromu'nda ise FGFR2 proteininin ligandlardan bağımsız olarak aktive olması durumu söz konusudur (29). Ayrıca, Ig-benzeri 2. protein *domaini* üzerinde protein işlevi için mutalaka gerekli olan heparin bağlanma bölgesi de bulunur (29).

Şekil 2.4. FGFR2 geni, ekzonları, protein domainleri ve mutasyonları. Açıklama bir sonraki sayfadadır.



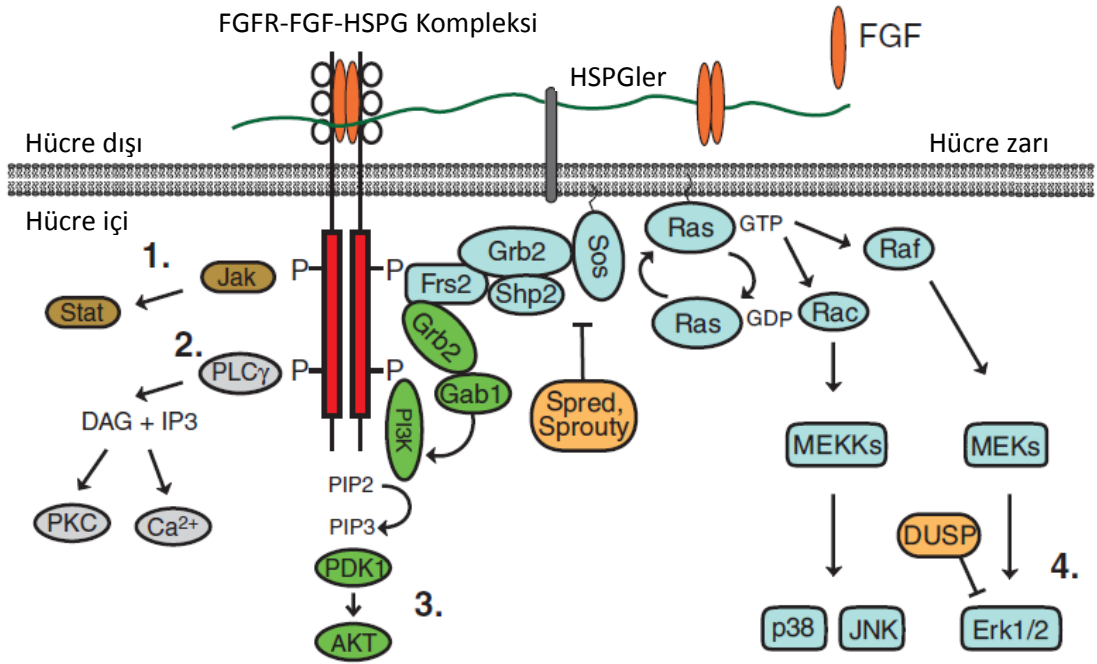
Şekil 2.4. FGFR2 geni, ekzonları, protein domainleri ve mutasyonları. FGFR2'nin mRNA'sı ve mRNA üzerindeki ekzonların yerleşimi ve numaralandırılması gösterilmiştir. mRNA'nın altındaki bölümde mRNA'nın protein kodlayan kısmına ait protein *domainleri* belirtilmiştir. mRNA'nın üstündeki bölümde ise *FGFR2*'nin HGMD'de günümüze kadar saptanan patojenik mutasyonları belirtilmiştir (58). Mutasyonların renklendirilmesi şeklin sağ üst köşesindeki renk koduna göre ilgili mutasyonun hangi hastalık fenotipine neden olduğunu belirtmektedir. Nokta mutasyonları ve intronik *splice* mutasyonları için mutasyonun olduğu noktayı; delesyonlar için ekzon içerisinde silinen nükleotidleri; insersiyon içinse insersiyonun olduğu nükleotidleri göstermektedir. İçi boş olarak gösterilen nokta mutasyonları ve intronik *splice* mutasyonları indelleri göstermektedir. Ig1: Immünoglobulin benzeri *domain 1*; Ig2: Immünoglobulin benzeri *domain 2*; Ig3: Immünoglobulin benzeri *domain 3*; H: Heparin Bağlanma Bölgesi; S: Sinyal Peptidi; T: Transmembran *domaini* temsil etmektedir.

FGFR2'nin transmembran *domaini* hücre zarına yerleşim ve hücre dışı sinyallerin hücre içine iletiminden sorumludur. Hücre içi protein tirozin kinaz *domaini* ise FGFR2 ligandını tanıdığı anda dimerize olarak aktive olur ve FGFR2'nin otofosforilasyonu ile çeşitli sinyal iletim yollarını uyararak proteinlerin tirozinlerinin fosforilasyonu yapar. Bu yollardan en başta olanları aşağıdaki 4 yoldur (Şekil 2.5)

(5):

- MAPK (Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz),
- JAK-STAT (Janus Activated Protein Kinase – Signal Transducers and Activators of Transcription, Janus Uyarılan Protein Kinaz – Sinyal İleticileri ve Transkripsiyon Uyarıcıları),
- PI3K-PKB (*Phosphatidylinositol-3-Kinase* – Protein Kinase B, Fosfatidil İnositol-3-kinaz – Protein Kinaz B),
- PLC- $\gamma$  (*Phospholipase C-gamma*, Fosfolipaz C-gama)





Şekil 2.5. FGFR'lerin uyardığı hücre içi sinyal iletim yollarları (5).

1. JAK-STAT yolağı; 2. PLC-γ yolağı; 3. PI3K-PKB yolağı; 4. MAPK yolağını ve bu yollarla ilişkili proteinleri göstermektedir.

Hücre içi sinyal yollarının iki grup hücre içi hedefi vardır. Bunlardan birincisi hücrenin metabolik işlevlerinin post-translasyonel protein modifikasyonları ile değiştirilmesidir. Bu grup hedeflerin uyarılması, metabolizma açısından genel olarak hücrenin büyümeye ve bölünmeye hazır hale gelecek ve işlevlerini değiştirerek farklılaşmasını sağlayacak şekilde protein sentezinin hızı, enerji üretimi gibi metabolik aktivitelerini artırmaya yönelik değişiklikler göstermesine neden olur. Sinyal yollarının ikinci ve asıl hedefi ise hücrenin gen ifadesinde değişimlere neden olmasıdır. Bahsedilen dört sinyal yolağının hepsi de pek çok transkripsiyon faktörünün uyarılması veya susturulması ile sonuçlanır. Fibroblastların binlerce geninin ifadelerinde değişikliğe ortaya çıkan değişiklikler fibroblastların osteoblastlara farklılaşması sağlar. FGFR'nin aşırı aktivite ile çalışması sütürlerde ve perikraniyumda bulunan fibroblastların aşırı ve hızlı bir şekilde osteoblastlara farklılaşmasına neden olur. Bu durumun hem buradaki osteoblastta farklılaşma

potansiyeli olan kök hücre özelliğindeki fibroblastların sayılarının azalması hem de aşırı kemik doku oluşması sonucu sütürlerin erken kapanmasına yol açtığı hastalığın oluşum mekanizması için literatürde genel kabul görmektedir (59,60).

Gen ifadesi değişiminin FGFR2 ilişkili kraniyosinostozların oluşumundaki temel mekanizma olması sebebiyle, literatürde bu hastalığın oluşum mekanizmaları ile ilgili yapılmış araştırmaları çalışma metodlarına göre kabaca iki başlık altında toplamak mümkündür. Bunlardan birincisi, gen ifadesindeki değişimlerin ölçümü ile ilgili olanlar, ikincisi ise genlerin nihai ürünleri olan proteinlerin, protein aktivitesinin ve bu aktiviteler sonucu oluşan ürünlerin ölçümü ilgili olanlardır. Her iki metodun da belli bir yolak üzerine odaklanarak araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmaların sonucunda özellikle kemik dokuya farklılaşma ile ilgili genlere ait transkriptlerin miktarlarının ve kemik yapımından sorumlu proteinlerin hem miktarının hem de aktivitesinin sendromik kraniyosinostozlarda arttığı gösterilmiştir (61-63). Ayrıca, kemik yıkımından sorumlu ve hücre bölünmesinden sorumlu proteinlerin aktivitesinin de azaldığı bulunmuştur.

### 2.3.2. FGFR2 ve Mutasyonları

*FGFR2*, 10q26.13 bölgesinde yer alan bir fibroblast büyüme faktörü reseptörü olup bu aileye ait insan genomunda bulunan 4 genden birisidir. *FGFR2*, 20 ekzondan oluşmaktadır; ancak protein sentezinde bu ekzonların hepsi kullanılmamaktadır. Özellikle 8. ekzonun alternatif *splicing*'i protein işlevi açısından çok önemlidir. FGFR2 8a ekzonunun veya 8b ekzonunun protein yapısına katılmasına göre FGFR2 proteinin sırasıyla FGFR2b ve FGFR2c alt tipleri oluşur (29). Bu iki alt tip farklı işlevlere sahiptir. FGFR2b epidermal kaynaklı hücrelerde; FGFR2c ise mezenkimal kaynaklı hücrelerde bulunmaktadır. Her iki reseptör farklı ligandlara yüksek afinite göstermektedir (29).

*FGFR2*'nin HGMD'de (*Human Gene Mutation Database*, İnsan gen mutasyonu veritabanı) günümüze kadar 101 tane patojenik mutasyonu tanımlanmıştır (58). Bu mutasyonların 68 tanesi ekzonik nokta mutasyonları olup çoğu kraniyosinostozlarla

ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyonlardan 9'u özel bir sendrom ismi belirtilmemiş kraniyosinostozla, 7'si Apert Sendromu'yla, 23'ü Pfeiffer Sendromu'yla, 42'si Crouzon Sendromu'yla, 3'ü Beare-Stevenson *Cutis Gyrate* Sendromu'yla, 1'i Saethre-Chotzen Sendromu'yla, 6'sı Jackson-Weiss Sendromu'yla ilişkilendirilmiştir. Kraniyosinostozlarla ilişkilendirilmemiş mutasyonları arasında 5 adet hipospadiasa neden olan 1 adet artmış meme ekanseri riski ile ilişkilendirilmiş olan ve 2 adet yarık damak veya dudak ile ilişkilendirilmiş mutasyon vardır. Bunlar dışında ise 3 adet Lakrimo-Aurikülo-Dento-Dijital Sendrom ile ilişkilendirilmiş mutasyon bulunmaktadır (Bkz. Şekil 2.4) (Tablo2.2).

*FGFR2* mutasyonlarının özellikle Ig-benzeri üçüncü *domain* yakınlarında yoğunlaştığı görülmektedir. Bu mutasyonların çoğunluğu *FGFR2* proteininde işlev kazanımına neden olan ve *FGFR2* aracılı sinyal iletimini artıran mutasyonlardır. LADD Sendrom mutasyonları ise *FGFR2* proteininde işlev kaybına neden olan mutasyonlardır (64).

Tablo 2.2. *FGFR2* ile ilişkilendirilmiş hastalıklarda HGMD’de bildirilen mutasyon çeşit ve sayıları. Mutasyonların gen üzerindeki yerleşimi için bakınız Şekil 2.4

Hastalık	Nokta Mutasyonları	Intronik <i>Splice</i> Bölgesi Değişimleri	Küçük Delesyonlar	Küçük insersiyonlar	Küçük indeller	Büyük Delesyonlar	Büyük insersiyonlar	Toplam
Kraniyosinostoz	9	-	-	-	-	-	-	9
Apert Sendromu	2	-	-	-	1	1	3	7
Pfeiffer Sendromu	9	7	2	1	4	-	-	23
Crouzon Sendromu	36	1	2	3	-	-	-	42
Beare-Stevenson <i>Cutis Gyrate</i> Sendromu	2	-	-	-	-	1	-	3
Saethre-Chotzen Sendromu	-	-	1	-	-	-	-	1
Jackson-Weiss Sendromu	5	-	1	-	-	-	-	6
Lacrimo-auriculo-dento-digital Sendromu	2	-	1	-	-	-	-	3
Yarık damak ve/veya dudak	1	-	-	-	-	1	-	2
Hipospadias	2	3	-	-	-	-	-	5
<b>Toplam</b>	<b>68</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>101</b>

### 2.3.3. FGFR2 ve Kraniosinostoz İlişkisinde Gen İfadesi Çalışmaları

Kraniosinostozların nedenlerinin araştırıldığı transkriptom düzeyindeki çalışmalar da mevcuttur. Kraniosinostozlar konusunda hastalığın patogenezi açıklamak amacıyla literatürde insan fibroblastları ile yapılmış mikrodizin analizi kullanılarak tüm transkriptomun incelendiği 5 çalışma vardır. Bu çalışmalardan en kapsamlı olanı kafa derisi fibroblastları ve sindaktili izlenen parmaklardan alınmış deri fibroblastlarında yapılmıştır. Bu çalışmada, Apert Sendromu (*FGFR2*), Saethre-Chotzen Sendromu (*TWIST1*), Muenke Sendromu (*FGFR3*) olan ve sendromla ilişkili olmayan kraniosinostozu olan her gruptan on hastaya ait fibroblastlarda tüm transkriptom çalışılmıştır. Sendromik olmayan kraniosinostoz grubu ile karşılaştırıldığında transkriptom düzeyinde en yüksek farklılığı gösteren grup Apert Sendromu grubudur. Diğer iki hastalık grubu ile sendromik olmayan grup arasında tüm transkripsiyon düzeyinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sendromik olan ve olmayan kraniosinostozların tümü her gen açısından tek tek karşılaştırıldığında 46 gen ürünü için gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bunlar, özellikle hücre-hücre iletişimi ve sinyal iletimi ile ilişkili genlerdir. Bu iki yolağa ait bu çalışmada ifadesi artan genler *ASS1*, *IL15*, *ITGA11*, *PDLIM1*, *SHROOM3*, *STMN2* ve *TPD52L1* iken ifadesi azalan genler *CA12*, *DCBLD2*, *DDX17*, *DOCK2*, *HMGA2*, *ITGA2*, *ITGA6*, *MMP1*, *MT1E*, *NPR3*, *PHLDA1*, *PODXL*, *RAPGEF2*, *SPRY2* ve *THBD*'dir (65). Bu çalışmanın gösterdiği ve kanıtladığı çok önemli bir durum da aslında kraniosinostoz patogeneziyle bir ilişkisi olmayan deri fibroblastlarının bile sendromik ve sendromik olmayan kraniosinostozlu bireyler arasında transkripsiyon düzeyinde farklılık gösteriyor olmasıdır.

Tüm transkriptom çalışmalarının ikincisinde araştırmacılar 1 Apert Sendromu olan ve 4 sendromik olmayan kraniosinostoz hastasına ait örnekleri kullanmışlardır (2). Araştırmacılar kapanmış / kapanmak üzere veya açık olan sendromik olan veya sendromik olmayan kraniosinostozu olan bireylerin pek çok sütür dokusunu birbiriyle karşılaştırmışlardır. Bu çalışma sonuçlarına göre sütür hücreleri arasında sendromik veya sendromik olmayan kraniosinostozlu hastalara ait fibroblastlar arasında sadece küçük farklılıklar bulunmuştur; ancak çalışmaya sadece bir tane

Apert Sendromlu hastanın dahil edilmesi farklılıkların az örnek nedeniyle yakalanamamış olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, kapanmış / kapanmak üzere olan ve açık sütürler ile farklı sütür lokalizasyonları arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur (2).

Üçüncü çalışmada ise 2 Crouzon ve 1 Apert sendromu'na sahip bireylerin periosteal fibroblast örnekleri birbirleri ile tüm transkripsiyon düzeyinde karşılaştırılmıştır (66). Bu çalışmada iki grup arasında kemiğe farklılaşma, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, sinyal iletimi, hücre iskeleti ve veziküler iletim ile ilgili 70 transkript arasında farklılık bulunmuştur (66).

Tüm transkriptom düzeyinde yapılan bir diğer çalışmada ise 7 Apert Sendromlu hastasının periosteal fibroblastları ile kontrol fibroblastları karşılaştırılmıştır (67). Bu çalışmanın sonuçlarında da 118 gen ürünün Apert Sendromu'nda arttığı gösterilirken 145 gen ürününün miktarının azaldığı saptanmıştır. Sonuçta Apert Sendromu için belirteç olabilecek ve onu kontrol grubundan ayırt eden bir gen ifadesi profili saptanmıştır (67). Ayrıca, normal fibroblastlarda çok yüksek FGF2 derişiminde Apert Sendromu'na benzer bir durum taklit edilmiş ve gen ifadesi profilinin Apert Sendromu'na benzediği gösterilmiştir (67).

Tüm transkriptom düzeyinde yapılan son bir çalışmada da ise üçer tane Apert Sendromlu hasta ve kontrol grubundan sütürler civarındaki periosteal fibroblastlar kültüre edilerek mikrodizin ile incelenmiştir (68). Kültür aşamasında fibroblastlar iki gruba bölünerek bir grubun bsiyerine FGF2 eklenmiş ve FGF2'nin farklı düzeyde eksprese edilen gen profilini nasıl değiştirdiği de incelenmiştir. Bu analiz sonucunda Apert Sendromlu hastalara ve kontrol grubuna ait fibroblastlar arasında özellikle hücre hareketliliği ve hücre büyümesi ile ilişkili genlerde farklılık gözlenmiştir. FGF2'nin ise Apert Sendromlu fibroblastlar üzerine istatistiksel olarak en anlamlı etkisi biyosentetik olaylar üzerine olmuştur. Bu araştırmada araştırmacılar özellikle sterosilin proteininin etkisi üzerinde durmuşlar ve bu proteinin ifade artışının Apert Sendromundaki merkezi sinir sistemi bulgularına katkısı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (68).

FGFR2'nin alt sinyal yollarından özellikle MAPK yolağının ve ikinci sıklıkta JAK-STAT yolağının önemi üzerinde durulmuştur. Bu yollardan MAPK yolağı hücre büyümesi ve bölünmesini uyarırken JAK-STAT yolağı daha çok, fibroblastların osteoblastlara farklılaşması gibi, hücre farklılaşması süreçlerini uymaktadır. FGFR2 ilişkili kraniyosinostozlarda iki yolağın da aktive olmasının hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar vardır.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme, Çözelti ve Cihazlar

##### 3.1.1. Periferik Kandan DNA Eldesi ve DNA Dizi Analizi

Amonyum asetat (Sigma)  
Tris klorür (Sigma)  
Sodyum klorür (Sigma)  
Disodyum EDTA (Etilen-Diamin-Tetra-Asetik asit) (Sigma)  
Sodyum dodesil sülfat (Sigma)  
Proteinaz K (Sigma)  
Taq Polimeraz Kiti (*ThermoScientific*)  
Agaroz (Sigma)  
*BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)*  
*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)*  
*ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit (Zymo Research)*  
Formamid (*Applied Biosystems*)  
Etidyum Bromür (Sigma)  
*Orange G (Sigma)*  
Gliserol (Sigma)  
*UVP BioSpectrum 500 Jel Görüntüleme Sistemi*  
*Nanodrop® 2000c (ThermoScientific)*  
*GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)*  
*3130 – Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*

##### 3.1.2. Deri Biyopsisi

Punch biyopsi seti (4mm) (Kai Medical)  
*Jetokain® Lidokain içeren lokal anestetik (Adeka)*



### 3.1.3. Hücre Kültürü

DMEM – Yüksek Glukoz (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (*Biological Industries*)

FCS (*Fetal Calf Serum*, Fötal Sığır Serum) (*Biological Industries*)

Tripsin-EDTA (*Biological Industries*)

L-glutamin (*Biological Industries*)

Penisilin/Stereptomisin (*Biological Industries*)

Gentamisin (*Biological Industries*)

İzopropanol (*Sigma*)

DMSO (Dimetil sülfoksit) (*Sigma*)

Rekombinan insan FGF2 (*Sigma*)

### 3.1.4. RNA Eldesi ve Kalitesinin Saptanması

Trizol Reagent (*Sigma*)

Kloroform (*Sigma*)

Etanol (*Sigma*)

Sodyum Asetat (*Sigma*)

### 3.1.5. Transkriptom Mikrodizini

*GeneChip® 3' IVT (in vitro* Transkripsiyon) *Express* Kiti (*Affymetrix*)

İçeriği:

Poli-A (Poli Adenin) RNA kontrol

Poli-A kontrol seyreltme tamponu

İlk zincir tampon karışımı

İlk zincir enzim karışımı

İkinci zincir tampon karışımı

İkinci zincir enzim karışımı

IVT biyotin işareti

IVT işaretleme tampon karışımı

IVT enzim karışımı

RNA bağlayan boncukları

aRNA (amplifiye RNA) bağlama tamponu  
aRNA yıkama çözeltisi  
aRNA seyreltme tamponu  
Manyetik stand  
5X Fragmantasyon tamponu  
Kontrol Oligo B2  
20X Hibridizasyon çözeltisi

*GeneChip®* Hibridizasyon, Yıkama ve Boyama Kiti (Affymetrix)

İçeriği:

Pre-hibridizasyon karışımı  
2X hibridizasyon çözeltisi  
DMSO  
Boyama karışımı-1  
Boyama karışımı-2  
Çip yükleme tamponu  
Yıkama tamponu-A  
Yıkama tamponu-B

*GeneChip®* Hibridizasyon fırını 645 (Affymetrix)

*GeneChip®* Fluidics istasyonu 450 (Affymetrix)

*GeneChip® 3000 Scanner* (Tarayıcı) (Affymetrix)

*GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (Affymetrix)

### **3.2. Hastaların Değerlendirilmesi**

Çalışmaya dahil edilecek hastaların saptanması amacıyla Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı'na ve Hacettepe Üniversitesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı'na başvuran hastalar arasında klinik bulgularına göre Apert Sendromu düşünülen hastalar değerlendirmeye alındılar. Bu değerlendirme amacıyla hastaların yaşı, cinsiyeti gibi demografik özellikleri; tanı

yaşı, kraniyosinostoz tipi, dismorfik bulguları, zihinsel gerilik varlığı, merkezi sinir sistemi anomalileri, kafa içi basınç artışı öyküsü, vertebral anomali, konjenital kalp hastalığı, görme kaybı, işitme kaybı, uygulanan tedavi, aile öyküsü gibi klinik bulguları kaydedildi. Aynı gruptaki örneklerin benzer gen ifade profili gösterebilmelerini sağlamak için, büyümenin sabit bir hız izlediği ve hormonal dalgalanmanın yüksek olmadığı 2,5 ile 10 yaşlar arasında, klinik olarak Apert Sendromu ile uyumlu bulguları olan, çalışmaya katılmak için ailesinden ve uygun koşullarda kendisinden aydınlatılmış onamı alınan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Kontrol grubuna girmeye aday bireyler ise 2,5 ile 10 yaşları arasında olan, herhangi bir kraniyosinostozu olmayan, başka bir nedenle deri örneği alınmış, çalışma için ailesinden ve uygun koşullarda kendisinden aydınlatılmış onamı alınmış bireyler seçildi. Kontrol grubundaki bireylerden bağ dokusunu ve deriyi ilgilendiren bir hastalığı olmayan bireyler bu gruba dahil edildiler.

Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan TBK 12/07 numarası ile onay alındı. Bu onay çerçevesinde çalışmaya katılmayı kabul eden bireyler aydınlatılmış onam formu imzaladılar.

### **3.3. Periferik Kandan DNA Eldesi ve DNA Dizi Analizi**

DNA eldesi yapabilmek amacıyla çalışmaya katılacak hastalardan 10ml periferik venöz kan alınarak EDTA'lı tüp ile laboratuara ulaştırıldı. DNA izolasyonu için amonyum asetat ile çöktürme yöntemi kullanıldı. DNA eldesi yapılacak örnekler distile su eklenmesi ardından önce 500 x g'de 20 dakika daha sonra 600 x g'de 20 dakika santifrüj edildi. Her bir tüpeki çökelti üzerine 3ml nükleer lizis tamponu (10mM Tris, 400mM NaCl, 200µM, pH 8,2) eklenerek çalkalandı. Ardından tüplerin her birine 150µl 10mg/ml proteinaz K ve 200 µl %10'luk sodyum dodesil sülfat çözeltileri eklendi. Tüpler 16 saat boyunca 37°C etüvde bekletildi. Daha sonra, her bir örneğe 3ml 148g/100ml amonyum asetat çözeltisi eklenerek ve kuvvetlice çalkalanarak 3000 x g'de 20 dakika santifrüj edildi. Çökelti üzerine etil alkol eklenerek görünür hale gelen DNA pipet ucu yardımıyla toplanarak 400µl Tris-EDTA tamponu içeren tüpler içerisine yerleştirilerek DNA dizileme işlemine geçildi.

*FGFR2*'nin Apert Sendromu'ndan sorumlu mutasyonlarının bulunduğu 7. ekzonuna yönelik 1 çift primer tasarlandı. Primer dizilerinin tasarımı için *FGFR2*'nin Ensembl veritabanında (<http://www.ensembl.org>) bulunan ENST00000358487 isimli transkriptinin dizisi esas alınarak Primer3 (<http://primer3.wi.mit.edu>) programı kullanıldı. Tasarlanan primerler *FGFR2-Ex7F*: 5'-TGACAGCCCTCTGGACAAC-3' ve *FGFR2-Ex7R*: 5'-TCATCCTCTCTCAACTCCAACA-3' dizilerine sahiptirler. Daha sonra bu primerler ile PCR öncesi hastalardan izole edilen DNA'ların derişimleri *Nanodrop 2000c* kullanılarak belirlendi ve DNA'ların derişimleri 50ng/μl olacak şekilde seyreltildi. 14,8μl su, 2,5μl 10X tampon çözeltisi, 2μl 2,5M dNTP, 1,5μl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2μl Taq Polimeraz, 0,5μl 5' primer (10pmol/ml) ve 0,5μl 3' primer (10pmol/ml), son olarak 1μl ilgili bireyin DNA'sı karıştırıldı. PCR, 95°C'de 5 dakika ile denatürasyon ile başlanarak, 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye olacak şekilde 40 döngüde ve son ekstansiyon olarak 72°C'de 2 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde 120 Volt'ta 30 dakika yürütüldükten sonra *UVP BioSpectrum 500* görüntüleme sisteminde görüntülenerek 350-400bp uzunluk arasında tek bant elde edildiği görüldü. Ardından "*Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*" ile üreticinin önerdiği protokol kullanılarak pürifikasyon yapıldı.

Pürifiye edilmiş PCR ürünlerinin derişimleri *Nanodrop 2000c* kullanılarak belirlendi ve derişimleri 40ng/μl olacak şekilde seyreltildi. Sekans reaksiyonu için 6μl su, 2μl 5X *BigDye* Sekanslama tamponu, 1μl *BigDye Terminator v3.1* sekanslama çözeltisi, 0,5μl *FGFR2-Ex7R* primeri ve 0,5μl pürifiye PCR ürünü karıştırıldı. Sekans reaksiyonu, 95°C'de 5 dakika ile denatürasyon ile başlanarak, 95°C'de 15 saniye, 50°C'de 15 saniye, 60°C'de 4 dakika olacak şekilde 25 döngüde ve son ekstansiyon olarak 60°C'de 7 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. Sekans reaksiyonu ürünleri "*Zymo Research DNA Sequencing Clean-Up Kit*" ile üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak pürifiye edildi. Pürifikasyon sonrası 10μl formamid içinde elde edilen dizileme tepkimesi ürünleri 95°C'de 10 dakika boyunca denatüre edildikten sonra hızlıca buza batırılarak pürifiye dizileme ürünlerinin tek zincir halinde kalması

sağlandı. Ardından, pürifiye sekans reaksiyonu ürünlerinin “ABI 3130 – Genetic Analyzer” ile kapiller elektroforez yapılarak örneklerin dizileri saptandı.

DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi için *Chromas Lite v2.01* programı kullanıldı. Buna göre elde edilen diziler okunarak ensembl veri tabanındaki referans dizisi ile karşılaştırıldı ve sonuçlar daha önceden Apert Sendromu ile ilişkilendirilmiş mutasyonlarla karşılaştırıldı.

#### **3.4. Dermal Primer Fibroblast Kültürlerinin Kurulması ve Saklanması**

Çalışmaya katılacak bireylerden dermal fibroblast kültürü kurmak amacıyla *punch* biyopsi yapıldı. Bunun için povidin iyodür ile biyopsi alınacak bölgenin sterilizasyonu ve 2mg/ml lidokain enjeksiyonu ile lokal anestezi yapılmasının ardından 4mm *punch* biyopsi seti kullanılarak tam kat deri biyopsisi yapıldı. Yara yeri steril spanç ile kapatılarak hastaya ve ailesine yara bakımının nasıl yapılması ve ne kadar sürede iyileşmesi beklendiği bilgileri verilerek işlem sonlandırıldı. Biyopsi örneği DMEM besiyeri içerisine konularak steril koşullarda laboratuara ulaştırıldı.

Hastalardan ve kontrol gruplarından alınan deri örnekleri steril koşullarda ufak parçalara ayrılarak, bağ dokusu kısmı zeminle temasta olacak şekilde parçalar %1 L-Glutamin, %1 Penisilin/streptomisin, %0,2 Gentamisin ve %10 FBS içeren DMEM besi yeri (standart DMEM besi yeri) içerisine ekildi. Her 2 günde bir ışık mikroskobu ile takip edilen ve besi yeri değiştirilen doku parçacıklarından köken alan fibroblast hücrelerinin bölünerek zeminin %70 - %80'ini kapladıkları görülünce hücreler pasajlandı. Bunun için, kültür kabındaki hücreler üzerlerine 3ml Tripsin-EDTA uygulaması yapılarak hücreler toplandı ve 1000rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çökelti alınarak 2 farklı kültür kabına standart besi yeri içerisinde ekildi. Aynı işlem tekrar edilerek 4-5. pasaja kadar çoğaltılan fibroblastların zeminin %70 - %80 kaplandığı görüldüğünde Tripsin-EDTA ile zeminden kaldırılan hücreler %10 DMSO içeren standart DMEM besi yeri içerisinde 2ml'lik hücre dondurma tüpülerine aktarıldılar. Öncelikle, bir gece boyunca 1°C/dakika hızla isopropil alkol içinde -80°C'ye kadar soğutulan hücreler daha sonra sıvı azot içerisinde deney yapılacak güne kadar saklandılar.

Transkriptom deneyleri için sıvı azot içerisinde saklanan hücreleri içeren besi yeri oda sıcaklığında hızlıca eritilerek taze standart DMEM besi yeri içeren kaplarda kültüre edildiler. Bir gün sonra zemine tutunduğu gözlenen hücrelerin besi yeri taze standart DMEM besi yeri ile değiştirildi. Fibroblastların zeminin %80 - %90'ını kapladığı gözlemlendiğinde besi yeri transkriptom çalışması öncesi besi yeri ile değiştirilerek hücreler bu besi yerinde 1 gün inkübe edildikten sonra hücre kültürünün besi yeri tekrar değiştirildi. Bu aşamada her hastaya ait hücre kültürleri 0pM FGF2 ve 2000pM FGF2 grupları olarak ikiye ayrıldı ve her grupta her bireye ait ikişer kültür olmak üzere toplam 24 tane kültür kabı oluşturuldu. Apert Sendromlu bireylerden alınan fibroblastlar ile normal bireylerden alınan fibroblastlarda 2000pM FGF2'nin benzer miktarda MAPK yolağı fosforilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (69). Ayrıca, daha önceden yapılan benzer transkriptom çalışmalarında da fibroblastlara 2000pM FGF2 uygulandığı için bu deneyde 2000pM FGF2 uygulaması yapılmasına karar verilmiştir (68). 0pM FGF2 gruplarındaki hücre kültürlerine transkriptom çalışması öncesi besi yeri ve 25,6µM TRIS (pH=7,0) eklenirken 2000pM FGF2 gruplarındaki hücre kültürlerine ek olarak 2000pM FGF2 eklendi. Bir gün boyunca bu besiyerleri içerisinde inkübe edilen hücrelerden transkriptom çalışması için RNA eldesi işlemine geçildi.

### **3.5. Primer Fibroblast Kültürlerinde Transkriptom Çalışması için Uygun Koşulların Belirlenmesi**

Kültüre edilen fibroblastların besi yerlerinin içeriği transkriptomlarını etkilemektedir. Bu nedenle, transkriptom çalışması öncesi besi yerinin hücrelerin hayatta kalmasını destekleyecek minimum koşullarda oluşturulması gereklidir. Besi yerinin temel bileşenleri DMEM içerisinde yer almaktadır. Bunun dışında L-Glutamin, kültürde kontaminasyonu önlemek amacıyla antibiyotikler (penisilin, streptomisin, gentamisin) eklenmektedir ve protein kaynağı ile hücre sağkalımını ve bölünmesini tetikleyecek büyüme faktörlerini içeren FCS besi yerine eklenmektedir. Temel besin maddelerini içeren DMEM ile ilgili değişiklikler hücrelerin yetersiz beslenerek ölüme gitmelerine veya transkriptomlarını değiştirerek fizyolojilerini yeni besi yeri

koşullarına adapte etmelerini sağlayacağı için DMEM ile ilgili bir değişiklik yapılmamıştır. L-Glutamin fizyolojik pH'da kararsız olan esansiyel bir amino asittir ve besi yerine sonradan eklenmektedir. Bu nedenle L-glutamin derişiminde de bir değişikliğe gidilmemiştir. Antibiyotiklerin ise ökaryot hücrelerin fizyolojilerini de etkiledikleri ve özellikle mitokondriyal işlevlerde değişiklikler sonucu transkriptom düzeyinde değişikliklere neden olabileceği bilindiği için transkriptom deneyi öncesi antibiyotikler besi yerinden tamamen uzaklaştırıldı. FCS'nin içinde bulunan hücrelerin sağ kalımı için gerekli faktörler ortamdan uzaklaştırıldığında hücre ölümünün başlaması beklenebilir; ancak FCS hücrelerin çeşitli büyüme faktörlerine maruz kalarak hızla bölünmeye yatkın, transkriptom düzeyinde *in vivo* fizyolojik koşullara kıyasla oldukça farklı bir duruma girmelerine sebep olmaktadır. Bu nedenle, FCS düzeyinin deney öncesi hücrelerin sağ kalımını destekleyecek en düşük derişimine indirmek ve transkriptom deneylerini bu şekilde yapmak gerekmektedir.

FCS'nin en düşük derişimini belirlemek amacıyla %0, %0,10, %0,25, %0,50, %0,75, %1,00 derişimlerinde FCS içeren besi yerlerinde kontrol grubuna ait bir bireyden kültüre edilen fibroblastlar ışık mikroskobu altında 5 gün süreyle takip edilerek fotoğrafları çekildi. Farklı koşullarda elde edilmiş fotoğraflar apoptoza giden ve hücre bölünmesi geçiren hücreler açısından karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma ile transkriptom çalışması öncesi besi yerinin içeriği belirlendi.

### 3.6. RNA Eldesi ve Kalitesinin Saptanması

RNA eldesi yapılmak üzere transkriptom öncesi besi yerinde inkübe edilen hücreler üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak 1ml Trizol eklendi. Daha sonra, 200µl kloroform eklenen çözelti 4°C'de 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilerek üst faz steril 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı. Yeni tüpe aktarılan faza 750µl saf etanol eklenerek karıştırıldı ve -20°C'de 30 dakika bekletildi. Bunun ardından öncelikle 4°C' de 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek çökelti alındı. Sonra da üzerine 750µl %75'lik etanol eklenerek 4°C'de 7.500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve çökelti kalan etanolün uçması için oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, ortamdaki çözücülerini daha fazla uzaklaştırabilmek amacıyla repürifikasyona geçildi. Bunun için, öncelikle

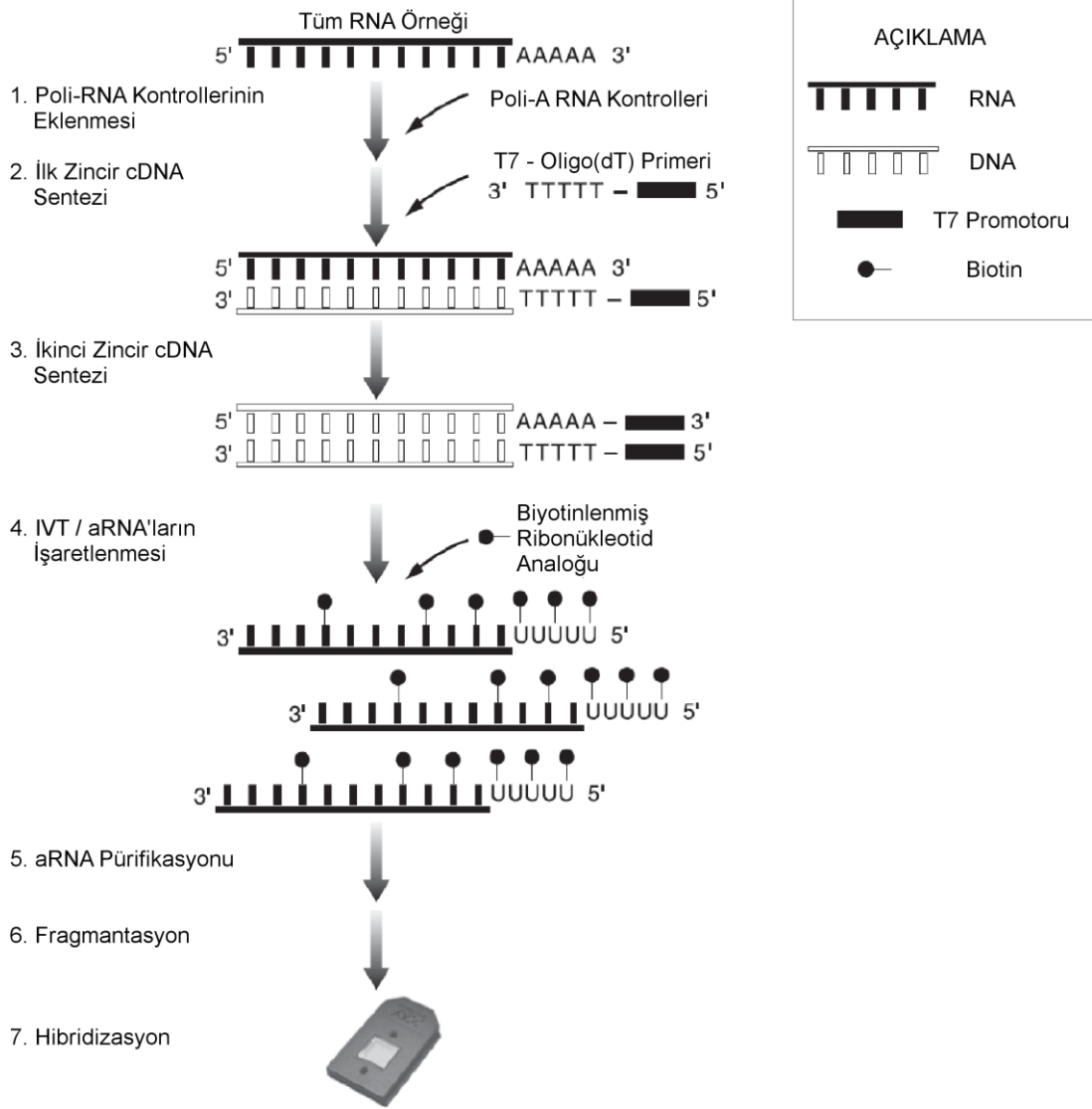
çökelti üzerine 3M sodyum asetat eklenen örnekler 4°C' de 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 750µl %99'luk etanol eklenerek 4°C'de 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek çökelti alındı ve aynı işlem %75 etanol ile tekrarlandı ve çökelti kalan etanolün uçması için oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak, örneklerin üzerine distile su eklenerek RNA'nın çözülmesi sağlandı.

İzole edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflığını ölçmek için *Nanodrop 2000c* ile 230nm, 260nm ve 280nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümler yapıldı. 260/230 oranı 1,5'in üzerinde, 260/280 oranı ise 1,8'in üzerinde olan örnekler transkriptom analizi için uygun koşullara sahip olarak kabul edildi. Daha sonra, RNA örneklerinden 2µg alınarak %60 formamid, 0,1mg/µl etidyum bromür ve 10X yükleme tamponu (*Orange G* ve gliserol içeren) ile karıştırılarak 65°C'de 10 dakika boyunca denatüre edildikten sonra hızlıca buza batırılarak RNA'ların tek zincir halinde kalması sağlandı. Ardından RNA örnekleri %1,5'lik agaroz jelde yürütülüp UVP BioSpectrum 500 ile görüntülenerek RNA'ların sağlamlığı test edildi. Bu şekilde bozulmamış olan RNA örnekleri transkriptom mikrodizininde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

### **3.7. RNA Mikrodizini**

RNA mikrodizini yapılması amacıyla elde edilen RNA örnekleri üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanarak *GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array* mikrodizin sistemi ile çalışıldı (Şekil 3.1). Bu mikrodizin sistemi ile 47.400 transkriptin ayrı ayrı miktarları ve her biri için 11 çift özgül oligonükleotit probu ile toplamda yaklaşık 1.300.000 bireysel oligonükleotit prob aracılığıyla transkriptom analizi yapılmaktadır.





Şekil 3.1. *GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array* için örneklerin hazırlanma protokolü. Şekildeki simgelerin anlamı yanda yer alan açıklamada yer almaktadır.

Önerilen protokole göre, örneklerdeki RNA kalitesinden bağımsız olarak mikrodizine dahil edilen Poli-A RNA kontrolleri Poli-A seyreltme tamponu ile seyreltilerek 2µl'si 100ng örnek RNA'sı ile karıştırıldı ve son hacim 5µl'ye tamamlandı. Daha sonra, öncelikle tek zincir cDNA sentezi için ilk zincir standart tampon karışımından 4µl ve ilk zincir enzim karışımından 1µl eklenerek örnekler

42<sup>0</sup>C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından her bir örneğe çift zincir cDNA sentezi için ikinci zincir standart tampon karışımından 5µl, ikinci zincir enzim karışımından 2µl ve 13µl distile su buz üzerinde eklenerek 16<sup>0</sup>C'de 1 saat ve ardından 65<sup>0</sup>C'de 10 dakika inkübe edildi. Bunun ardından elde edilen çift zincir cDNA örnekleri *in vitro* transkripsiyon (IVT) için kullanıldı. Bu amaçla, 4µl IVT biyotin işareti, 20µl IVT işaretleme tamponu, 6µl IVT enzim karışımı bir araya getirilerek hazırlanan 30µl'lik çözelti her bir çift zincir cDNA örneğine buz üzerinde eklendi ve karışım 40<sup>0</sup>C'de 16 saat inkübe edildi. Böylece, mikrodizin deneyinin sonraki aşamalarında kullanılacak biyotin işaretli aRNA'lar (amplifiye RNA) elde edilmiş oldu. Bu aşamada elde edilen aRNA'ların saflaştırılması için aRNA bağlayan manyetik boncuklar kullanıldı. Bu amaçla 10µl aRNA bağlayan boncuklar ile 50µl aRNA bağlama tamponu her bir örneğe 60µl eklenmesinin ardından her bir örneğe 120µl saf etanol eklendi. İyice karıştırılan örnekteki aRNA'lar RNA bağlayan boncuklara tutundu. Tüpler manyetik tutucuya yerleştirilip, 5 dakika boncukların mıknatıs tarafından tutularak çözeltinin şeffaf hale gelmesi için beklendi. Çözeltinin şeffaf kısmı atıldıktan sonra 100µl aRNA yıkama çözeltisi ile karıştırılarak önceki gibi 5 dakika inkübe edilen manyetik boncuklar çözeltiden ayrıldı. Bu işlem ardından 50µl aRNA elüsyon tamponu eklenip karıştırılan manyetik boncuklar yeniden önceki gibi çözeltiden ayrılarak her bir örnek için aRNA'lar saflaştırılmış oldu. Bu işlemin ardından aRNA'lar *Nanodrop 2000c* ile ölçüldü.

Her bir örneğe ait aRNA'dan 15µg alınarak 8µl 5 x fragmantasyon tamponu ve distile su ile karıştırılarak hacim 40µl'ye tamamlanarak aRNA örnekleri 94<sup>0</sup>C'de 35 dakika inkübe edilerek fragmente edildi ve %2'lik agaroz jelde yürütülerek fragman boyutu kontrol edildi. 12,5µg fragmente olmuş aRNA'lar, 4,2µl kontrol oligonükleotid B2, 12,5 µl 20 X hibridizasyon kontrolleri (bioB, bioC, bioD, cre), 125µl 2 X hibridizasyon karışımı, 25µl DMSO üzerine distile su eklenerek son hacim 250µl olacak şekilde karıştırıldıktan sonra 99<sup>0</sup>C'de 5 dakika ve 45<sup>0</sup>C'de 5 dakika inkübe edildi. Aynı anda çiplere pre-hibridizasyon karışımı yüklendi ve çipler 45<sup>0</sup>C'de 60rpm'e getirilmiş hibridizasyon fırınında 10 dakika inkübe edildi. Bunun ardından örnekler çiplere yüklendi ve 45<sup>0</sup>C'de 16 saat, 60rpm hızında çalkalama sağlayan

hibridizasyon fırınında inkübe edildi. Son olarak hibridizasyon sonrası çip boşaltıldı ve yerine çip yükleme tamponu dolduruldu. Yıkama ve boyama için kit içindeki boyama karışımı-1, boyama karışımı-2 ve çip yükleme tamponu sırasıyla 600µl-600µl-800µl hacimlerinde tüplere alındı ve *GeneChip® Fluidics* istasyonu 450'de gerekli yerlerine yerleştirilerek çiplerin yıkama ve boyaması tamamlandı. Okunmaya hazır hale gelen çipler, *GeneChip® 3000 Scanner* ile taranarak RNA mikrodizini ham verileri elde edildi.

### 3.8. RNA Mikrodizini Sonuçlarının Kalitesinin Değerlendirilmesi ve Analizi

RNA mikrodizini analizleri için *Affymetrix Expression Console* ve R x64 v3.1.0 programları ile beraber R için hazırlanmış *Bioconductor* paketleri kullanıldı. Transkriptom analizinde elde edilen verinin kalite kontrolü için *Affymetrix Expression Console*'da MAS 5.0 (*Microarray Suite 5.0*) protokolü kullanılarak analizde transkript saptanan ürünlerin yüzdesi ve RMA (*Robust Multichip Analysis*) protokolü kullanılarak GAPDH (Gliseraldehit-1-Fosfat Dehidrogenaz) transkriptinin 3':5' oranları belirlendi (70). Ayrıca, RMA protokolüne göre PCA (*Principal Component Analizi*) yapıldı.

Verilerin değerlendirilmesi için ise, R'nin *affy* paketi kullanılarak RMA protokolüne göre normalize edilen sonuçlardan *limma* paketi kullanılarak "*linear models for microarray data*" (mikrodiziner için lineer modeller) yöntemi ve çok katlı deney (*Multi-level experiment*) modeli ile her bir gruptaki gen ifadesi düzeyleri kıyaslandı (71). 4 deney grubu arasında "Apert Sendromu 0pM FGF2 - Kontrol 0pM FGF2", "Apert Sendromu 2000pM FGF2 - Kontrol 2000pM FGF2", "Apert Sendromu 2000pM FGF2 - Apert Sendromu 0pM FGF2" ve "Kontrol 2000pM FGF2 - Kontrol 0pM FGF2" olmak üzere 4 farklı karşılaştırma yapıldı. Karşılaştırmaların istatistiksel değerlendirilmesinde t-testi kullanılarak  $p < 0,05$  olan ve logaritmik gen ifadesi düzeyi 1,5 kat (ya da logaritmik olmayan gen ifadesi ~2,83 kat) gruplar arasında farklılık gösteren sonuçlar anlamlı kabul edildi.

Gruplar arasında farklılık gösteren gen listeleri ise birbiriyle iletişimi ve GO (Gen Ontolojisi) terimleri açısından STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) ile değerlendirildi (72). Hedef genlerin ifade düzeyleri ise CLADIST (*Clustering Algorithm And Distance Integratory Statistics Tool*) programı ile Öklid uzaklıkların kıyaslandığı ortalama bağlantı (*average linkage*) yöntemiyle hiyerarşik kümeleme yapılarak incelendi (73).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hastaların Değerlendirilmesi

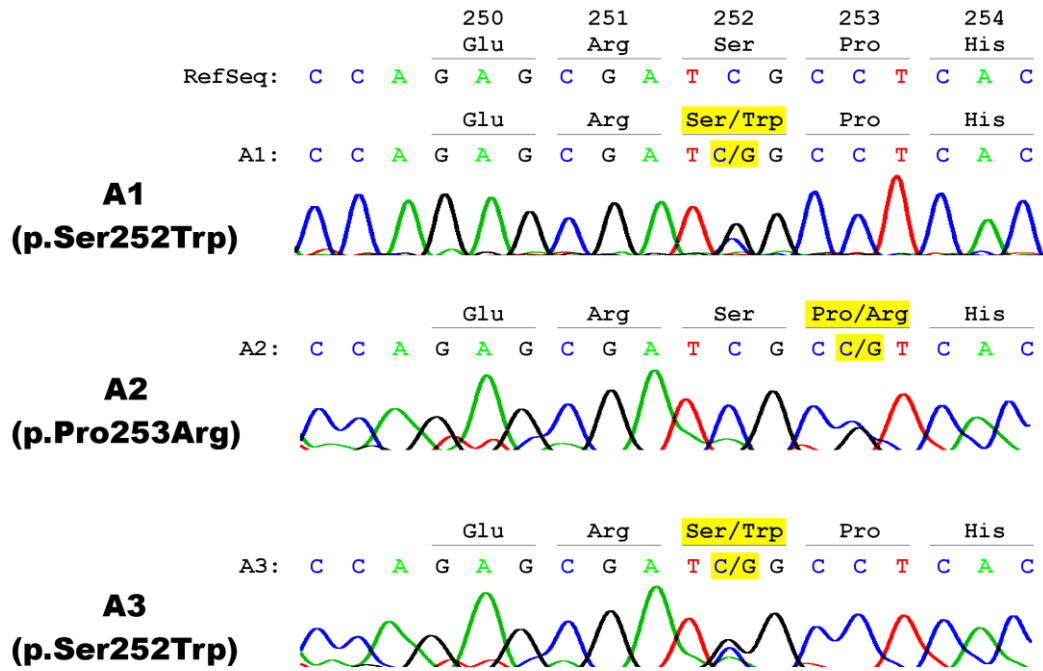
Çalışmaya dahil edilen 3 Apert Sendromlu (A1, A2, A3), 3 kontrol grubu (K1, K2, K3) bireyinin klinik bulgularının özeti Tablo 4.1’de yer almaktadır.

Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen bireylerin klinik özellikleri. A1, A2, A3 kodlu hastalar Apert Sendromlu bireyleri göstermekte iken K1, K2, K3 kodlu bireyler kontrol grubuna dahil olan bireyleri göstermektedir. K = Kız; E = Erkek; YU = Yaşla Uyumlu’yu temsil etmektedir.

Bireyler	A1	A2	A3	K1	K2	K3
Yaş	8	7	2,5	6	7	10
Cinsiyet	K	K	K	K	K	K
Kraniyosinostoz türü	Koronal	Koronal	Koronal	-	-	-
Biparyetal çap	YU	YU	YU	YU	YU	YU
Boy uzunluğu	YU	YU	YU	YU	YU	YU
Zihinsel gerilik	-	Hafif	-	-	-	-
Kafa içi basınç artışı öyküsü	-	-	-	-	-	-
Proptozis	+	+	+	-	-	-
Hipertelorizm	+	+	+	-	-	-
Görme kaybı	-	-	-	-	-	-
İşitme kaybı	-	-	-	-	-	-
Orta yüz hipoplazisi	+	+	+	-	-	-
Burun anomalisi	+	+	+	-	-	-
Yarık damak ve/vaya dudak	-	-/+	-	-	-	-
Konjenital kalp hastalığı	-	-	ASD	-	-	-
Haluks valgus	+	+	+	-	-	-
Geniş baş parmak	+	+	+	-	-	-
Brakisindaktili	+	+	+	-	-	-
Vertebral anomali	-	-	-	-	-	-
Uygulanan tedavi	Kraniyoplasti, Sindaktili açılması	Kraniyoplasti, Sindaktili açılması	Kraniyoplasti, Sindaktili açılması	-	-	-
Aile Öyküsü	-	-	-	-	-	-

#### 4.2. DNA Dizi Analizi ile Apert Sendromu Tanısının Konması

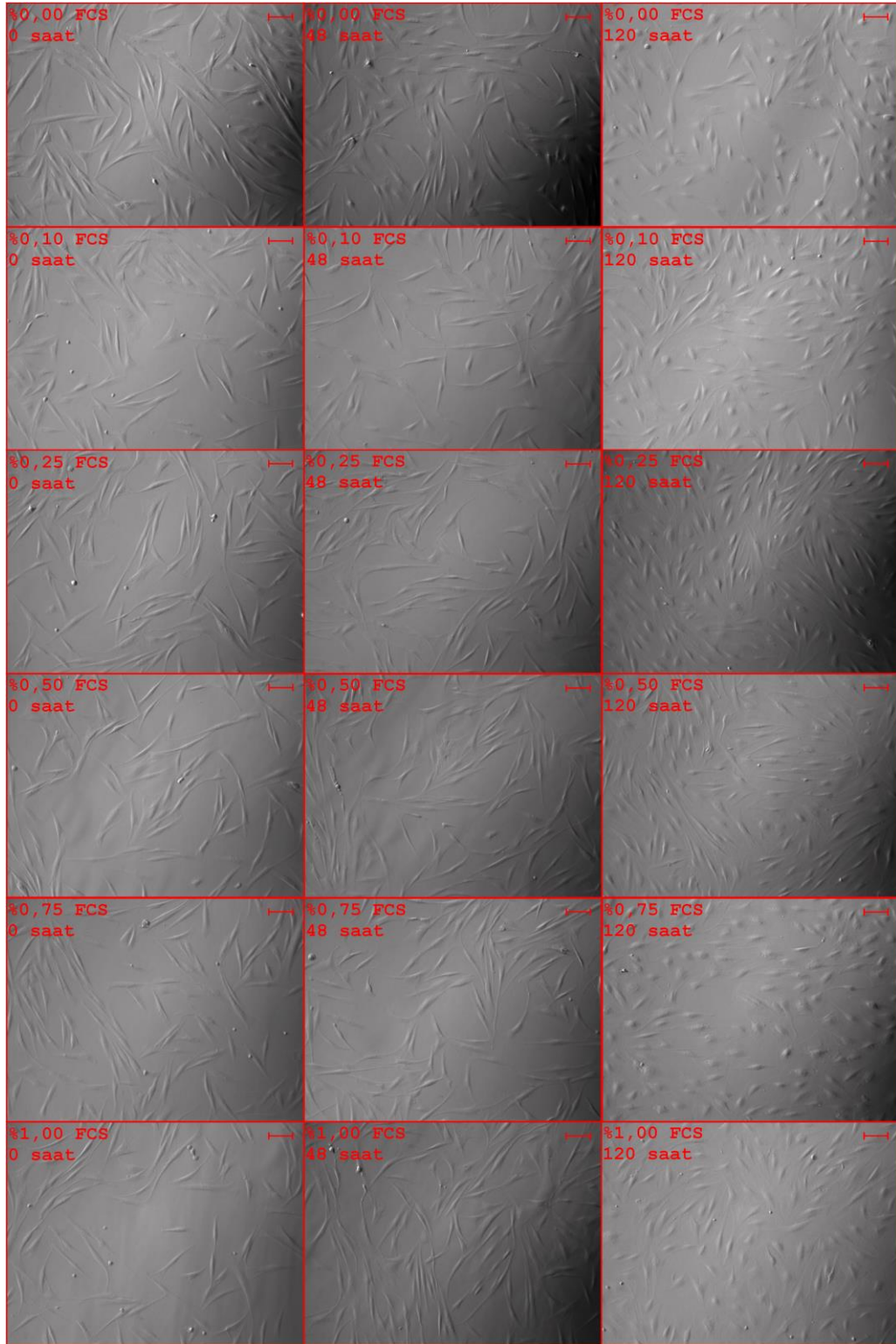
Çalışmaya dahil edilen hastaların *FGFR2* 7. ekzonuna yönelik yapılan DNA dizi analizlerine göre her 3 hastada da Apert Sendromu'nu gösteren mutasyonlar heterozigot olarak saptanmıştır (Şekil 4.1). Buna göre A1 ve A3 hastalarında p.Ser252Trp mutasyonu saptanırken A2 hastasında p.Pro253Arg mutasyonuna rastlanılmıştır.



Şekil 4.1. Çalışmaya dahil edilen Apert Sendromlu 3 bireyin Sanger dizilemesi sonuçları. Üst satırda referans *FGFR2* dizisi yer alırken her bir hastaya (A1, A2, A3) ait elektroferogramların üzerinde hastaya ait *FGFR2* dizisi yer almaktadır.

#### 4.3. Transkriptom Çalışması için Uygun Koşulların Belirlenmesi

Deney için mümkün olan en düşük FCS derişiminin belirlenmesi amacıyla yapılan FCS denemelerinde K2 örneğine ait fibroblastlarda ortamda hiç FCS bulunmadığında dahi artmış hücre ölümü gözlenmemiştir (Şekil 4.2). Bu nedenle, transkriptom mikrodizini deneyleri öncesi fibroblast kültürlerinde hiç FCS içermeyen besiyerleri kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı FCS derişimlerine sahip besi yerlerinde izlenen kontrol grubuna ait dermal fibroblastlar. (Açıklamanın devamı bir sonraki sayfadadır.)

Şekil 4.2. (Devamı) Her satırda, %0, %0,10, %0,25, %0,50, %0,75 ve %1,00 olmak üzere farklı FCS derişimlerinde besi yerleri ile beslenen K2 örneğine ait fibroblastlar yer alırken sütünlarda ise deneyin başlangıç anı (0. saat), 48. saat ve 120. saat karşılaştırılmaktadır. Artan FCS derişimi ile beraber 48. ve 120. saatlerde hücre yoğunluğunun arttığına dikkat ediniz. Her 5 deney grubunda da yüzen hücreler veya yuvarlaklaşmış hücreler şeklinde artan bir hücre ölümü gözlenmemiştir. Her fotoğrafın sol üst köşesinde o kültür kabındaki FCS derişimi ve deneyin zamanı görülmekte iken sağ üst köşesinde ölçek bulunmaktadır. Her ölçek 100µm'yi göstermektedir.

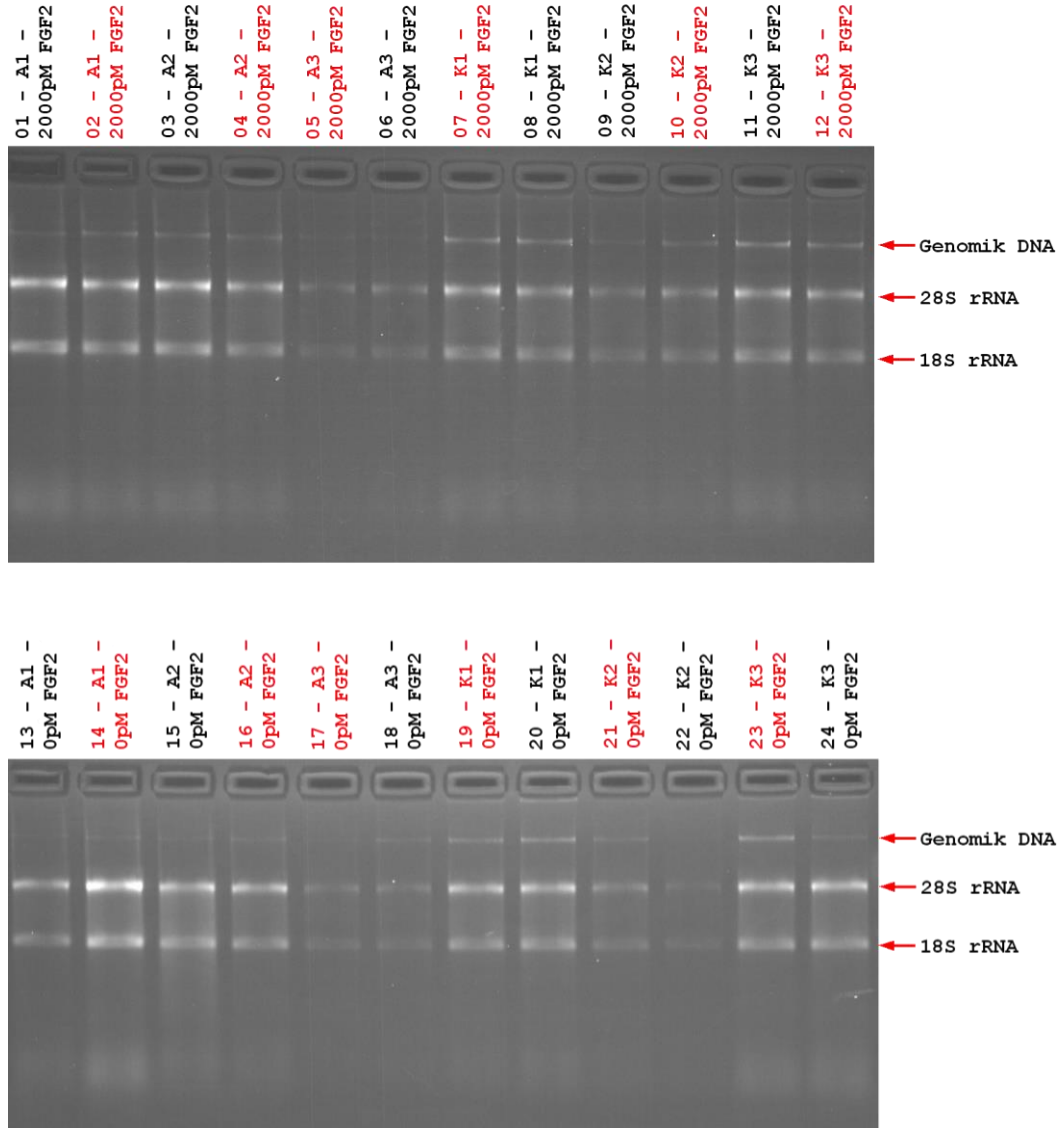
#### **4.4. RNA Eldesi ve Kalitesinin Saptanması**

Toplam 12 adet olan her bir deney grubuna ait ikişer adet kültür kuruldu. Bu kültürlerden deney sonunda RNA eldesi yapılarak her ikili gruptan bir adet örnek transkriptom mikrodizini yapılmak üzere seçildi. Elde edilen RNA'ların derişimi ve saflığı spektrofotometrik olarak saptanırken (Tablo 4.2) izolasyon işlemleri sırasında zarar görüp görmediği elektroforez ile kontrol edildi (Şekil 4.3). Yapılan analizde bütün örnekler transkriptom mikrodizini yapılmaya uygun bulundu. Bu nedenle her deney grubu için elde edilen ikişer adet RNA örneğinden birer tanesi seçildi.



Tablo 4.2. Spektrofotometrik ölçüm ile RNA kalitesinin saptanması. Trizol ile RNA izolasyonu yapılan 24 fibroblast kültürü örneğinin RNA derişimleri ile saflıklarını gösteren 260nm/230nm abzorbars ve 260nm/280nm abzorbars değerleri. Transkriptom mikrodizininde kullanılan örnekler kırmızı ile işaretlenmiştir.

Örnekler	Derişim (ng/µl)	260nm/230nm	260nm/280nm
01 - A1 – 2000pM FGF2	487	1,95	1,80
02 - A1 – 2000pM FGF2	440	2,25	1,91
03 - A2 – 2000pM FGF2	427	2,21	1,89
04 - A2 – 2000pM FGF2	305	2,24	1,83
05 - A3 – 2000pM FGF2	104	2,32	1,71
06 - A3 – 2000pM FGF2	147	2,34	1,77
07 - K1 – 2000pM FGF2	356	2,25	1,89
08 - K1 – 2000pM FGF2	283	2,27	1,85
09 - K2 – 2000pM FGF2	155	2,37	1,77
10 - K2 – 2000pM FGF2	185	2,32	1,79
11 - K3 – 2000pM FGF2	345	2,25	1,87
12 - K3 – 2000pM FGF2	314	2,29	1,85
13 - A1 – 0pM FGF2	313	2,27	1,87
14 - A1 – 0pM FGF2	480	2,23	1,90
15 - A2 – 0pM FGF2	441	2,17	1,91
16 - A2 – 0pM FGF2	320	2,25	1,89
17 - A3 – 0pM FGF2	90	2,18	1,74
18 - A3 – 0pM FGF2	114	2,30	1,72
19 - K1 – 0pM FGF2	288	2,25	1,87
20 - K1 – 0pM FGF2	351	2,22	1,88
21 - K2 – 0pM FGF2	152	2,32	1,76
22 - K2 – 0pM FGF2	64	2,29	1,76
23 - K3 – 0pM FGF2	366	2,26	1,88
24 - K3 – 0pM FGF2	406	2,15	1,87



Şekil 4.3. Jel elektroforezi ile RNA kalitesinin saptanması. Trizol ile RNA izolasyonu yapılan 24 fibroblast kültürü örneğinin denatüre edildikten sonra %1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Her bir örneğe ait kolonda RNA izolasyonunun başarılı şekilde gerçekleştiğini gösteren 28S ve 18S rRNA'lara ait bantlar görülmektedir. Bunun haricinde örneklerdeki az miktardaki genomik DNA kontaminasyonu da göze çarpmaktadır. Örneklerin hiçbirinde RNA degradasyonunu işaret edebilecek yaygın boyanma görünümü yoktur. Transkriptom mikrodizininde kullanılan örnekler kırmızı ile işaretlenmiştir.

#### 4.5. Transkriptom Mikrodizininin Kalitesinin Saptanması

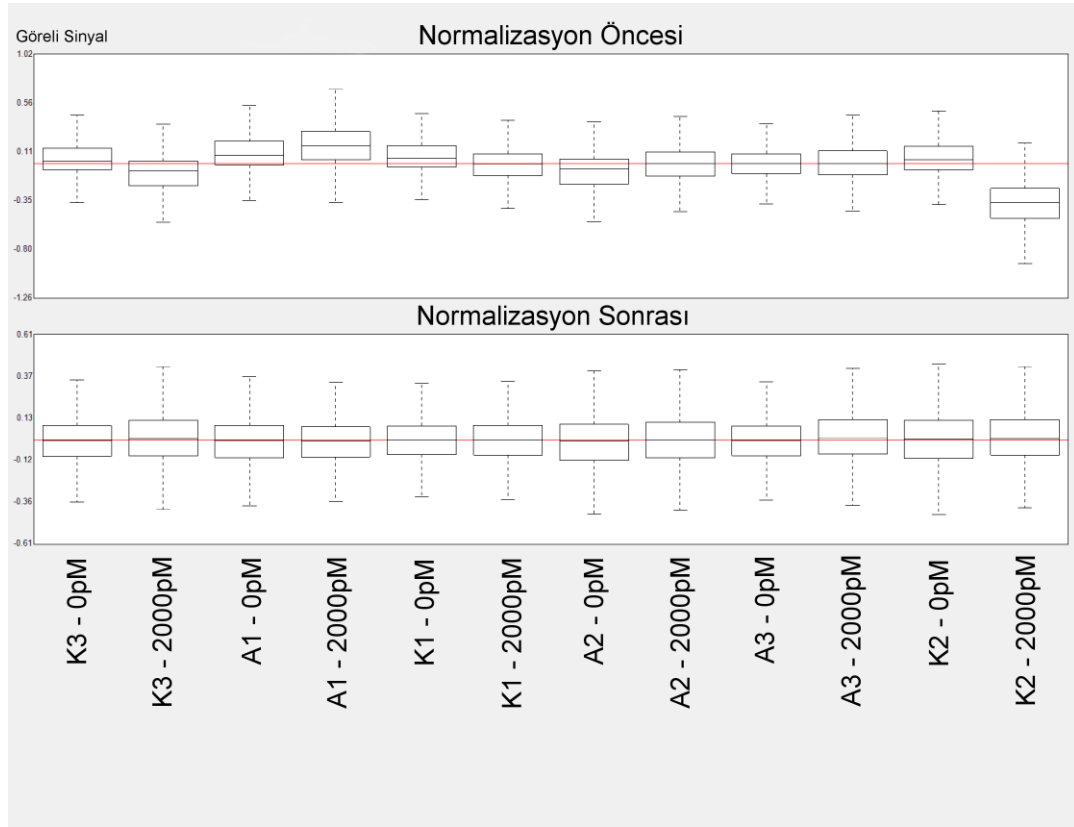
Mikrodizin yapılan örneklerde çipte bulunan tüm transkriptlerin kapsanma oranı (*call rate*) %47,18'i ile %50,71 arasındadır (Tablo 4.3). Her insan hücresinde tüm genlerin ancak bir kısmı ifade olurken bir kısmı da kapalı olduğu için bu beklenen bir orandır. Bu sonuç beklendiği üzere aynı hücreler ile çalışıldığı için deney grupları arasında belirgin farklılık göstermemektedir.

Transkriptom mikrodizininin kalitesini gösteren başka bir kriter de RNA yıkımı konusunda bilgi veren transkriptlerin 5' uçları ile 3' uçları arasındaki orandır. Bu oranın GAPDH için 3'ten küçük olması beklenmektedir. Her bir deney grubunda bu oran 3'ün altında bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Transkriptom mikrodizininde her bir deney grubunda genlerin kapsanma oranı (*call rate*) ve örneklerdeki RNA yıkımını gösteren GAPDH 3' ucu ile 5' ucu oranları.

Örnekler	Kapsanma oranı ( <i>Call rate</i> ) (%)	GAPDH Transkripti 3':5' Oranı
A1 – 2000pM FGF2	50,71	0.429
A2 – 2000pM FGF2	48,60	1.792
A3 – 2000pM FGF2	48,55	0.879
K1 – 2000pM FGF2	49,17	0.813
K2 – 2000pM FGF2	47,18	0.613
K3 – 2000pM FGF2	47,44	0.628
A1 – 0pM FGF2	50,14	0.620
A2 – 0pM FGF2	49,51	0.666
A3 – 0pM FGF2	49,33	0.542
K1 – 0pM FGF2	49,02	0.422
K2 – 0pM FGF2	48,28	0.603
K3 – 0pM FGF2	50,11	0.670

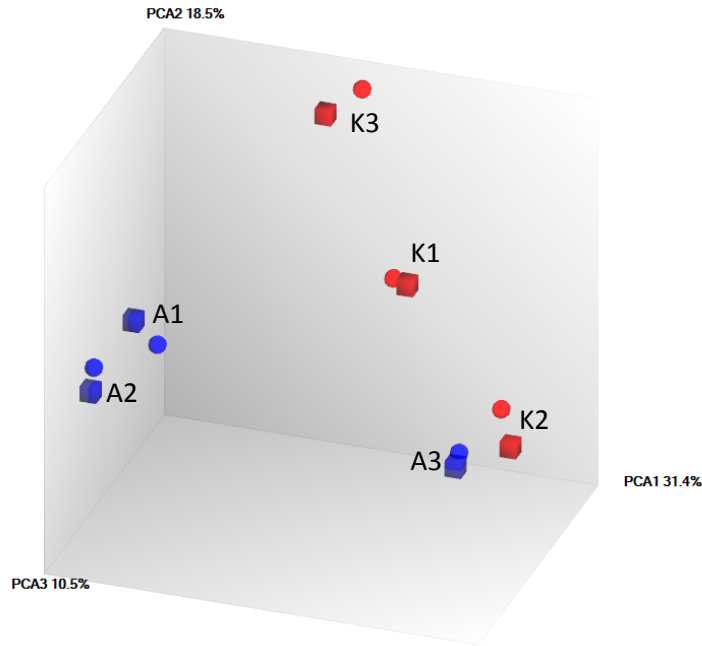
Her bir deney grubunu birbiriyle karşılaştırabilmek için deney gruplarını normalize etmek gerekmektedir. Normalizasyon için transkriptom mikrodizininde yaygın olarak kullanılmakta olan RMA protokolü kullanılmıştır. Normalizasyon sonucu deney grupları arasındaki ortalama sinyal şiddeti farklarının ortadan kalkıp deney gruplarının başarılı bir şekilde karşılaştırılabilir hale geldikleri Şekil 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.4. Deney gruplarında transkriptom mikrodizinindeki sinyal şiddetlerinin dağılımı. Üstte, RMA ile normalizasyon öncesi; altta ise RMA ile normalizasyon sonrası deney gruplarının ortalama sinyal şiddetlerini gösteren kutu grafikleri yer almaktadır. Kutu grafiklerinde orta çizgi medyanı, kutunun kenarları 1. ve 3. kuartilleri, kesikli çizgilerin uçları ise en düşük ve en yüksek değerleri göstermektedir. Medyan mikrodizin verilerine göre belirtilen görel sinyal şiddetleri deney grupları arasında karşılaştırıldığında normalizasyon öncesi farklılıklar görülürken bu farklılıklar normalizasyon sonrası ortadan kalkmıştır.

#### 4.6. Transkriptom Mikrodizininde Gruplar Arasında Bulunan Anlamlı Farklar ve Bu Farkların Değerlendirilmesi

Transkriptom mikrodizinerleri, hastalık durumları (Apert Sendromu, Kontrol) ve FGF2 uygulamasına göre 4 deney grubuna ilişkin veri sağlamıştır. Bu deney gruplarındaki üçer örnek genel gen ifadesi profillerindeki farklılıklara göre PCA ile incelendiğinde FGF2 uygulamasının her örnek için bir miktar farklılık yarattığı; ancak bu farklılığın örneğin alındığı bireyin genotipi ile kıyaslandığında oldukça az olduğu görülmüştür (Şekil 4.5). Bununla beraber, A1 ve A2 hastalarının genel gen profilleri diğer bireylere ait örneklerden belirgin olarak farklı şekilde kümelenirken A3 örneği genel gen profili itibarıyla kontrol grubundan belirgin şekilde ayrılmamaktadır (Şekil 4.5).



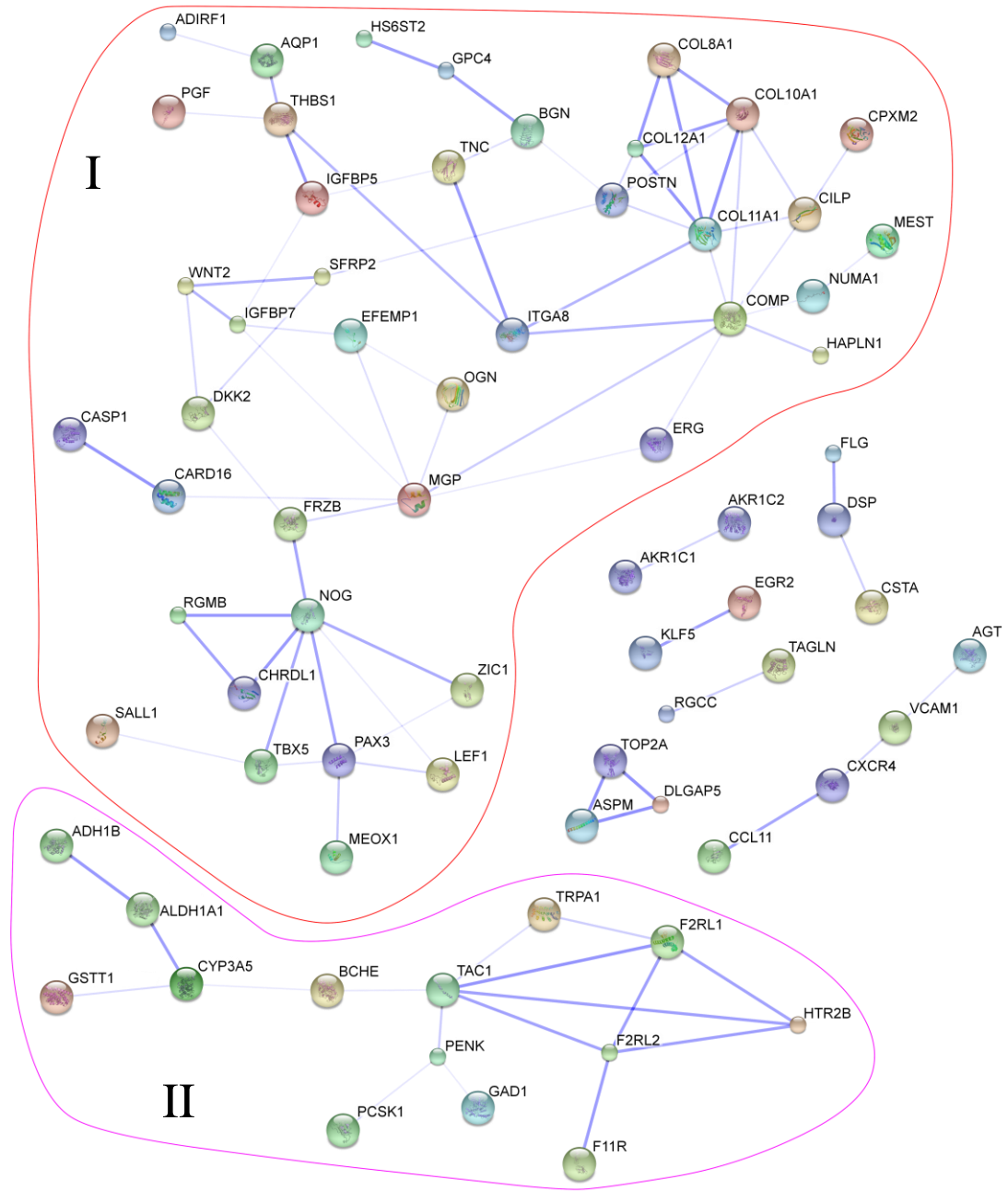
Şekil 4.5. Transkriptom mikrodizininin üçlü *Principal Component Analizi* (PCA). Mavi renkli belirteçler Apert Sendromlu bireylere, kırmızı renkli belirteçler kontrol grubu bireyelerine ait sonuçları; küreler 2000pM FGF2 uygulaması yapılmış fibroblastlara, küpler ise FGF2 uygulaması yapılmamış fibroblastlara ait sonuçları göstermektedir.

Transkriptom mikrodizini deney grupları arasında farklı eksprese olan genler açısından incelendiğinde pek çok gen göze çarpmaktadır. 4 deney grubu (Apert Sendromu 0pM FGF2, Apert Sendromu 2000pM FGF2, Kontrol 0pM FGF2, Kontrol 2000pM FGF2) arasında yapılan 4 farklı karşılaştırmaya göre log2 türünde ifade edildiğinde 1,5 kattan fazla değişen ve  $p < 0,05$  olan genler Tablo 4.4'te özetlenmiştir. Dört karşılaştırmada anlamlı farklılık gösteren genlerin listesi ve OMIM'de yer alan hastalık ilişkileri ise Ek-1'de yer almaktadır (Bkz. Ek-1, sayfa 85).

Tablo 4.4. Transkriptom mikrodizindeki 4 deney grubu için yapılan 4 karşılaştırmada anlamlı olarak farklı düzeyde ekspresyonu saptanan genler. Yapılan karşılaştırmada ekspresyondaki değişim, birinci deney grubunun ikinci deney grubuna göre değişimi şeklinde ifade edilmiştir.

Karşılaştırılan Gruplar	Ekspresyonu Artan	Ekspresyonu Azalan	Toplam
Apert Sendromu 0pM FGF2 – Kontrol 0pM FGF2	32	28	60
Apert Sendromu 2000pM FGF2 – Kontrol 2000pM FGF2	23	38	61
Apert Sendromu 2000pM FGF2 – Apert Sendromu 0pM FGF2	13	94	107
Kontrol 2000pM FGF2 – Kontrol 0pM FGF2	11	11	22

Her bir deney grubunda farklı düzeyde ifade edilen genler birlikte değerlendirildiğinde toplam 181 genin ifadesinde en az bir karşılaştırmada anlamlı farklılık gözlenmiştir. Bu genlerin hepsi birlikte kurdukları ilişkiler açısından STRING ile değerlendirildiğinde toplam 71 gen arasında 90 ilişki bulunmaktadır. Bu 181 gen arasında beklenebilecek rasgele bir ilişkiye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ( $p = 2,58 \times 10^{-11}$ ). Bu ilişkili genler, 41 genden ve 14 genden oluşan birbirinden bağımsız; ancak kendi aralarında ilişkili 2 kümede toplanmaktadırlar (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Karşılaştırmalarda farklı gen ifadesi saptanan genlerden birbiriyle biyolojik ilişki kuranlar. Farklı gen ifadesi saptanan genlerden STRING ile en az bir gen ile ilişki kuran genler ve kurdukları ilişkiler gösterilmiştir. Her bir küre genleri veya protein ürünlerini temsil ederken küreleri birbirine bağlayan mavi çizgiler ilişki kuran genleri göstermektedir. Mavi çizgilerin kalınlığı kurulan ilişkiye dair kanıtın gücünü göstermektedir. (Açıklamanın devamı bir sonraki sayfadadır.)

Şekil 4.6. (Devamı) İlişki kuran genlerin 2 büyük grupta kümelenmesine dikkat ediniz. Buna göre kırmızı ile işaretli Küme I'de 41 adet gen bulunurken mor ile işaretli Küme II'de 14 adet gen bulunmaktadır.

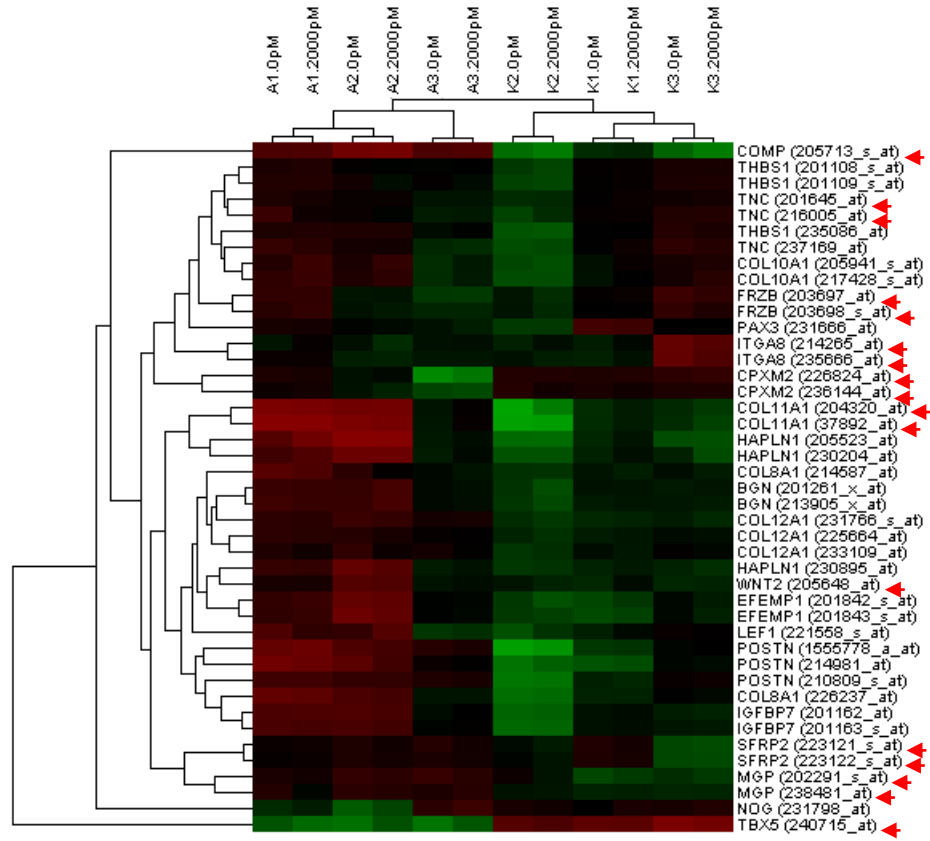
“GO biyolojik işlemler” (*Gene Ontology – Biological Processes*) terimleri açısından bu karşılaştırmalarda farklı gen ifadesi gösteren 181 gen incelendiğinde rasgele bir duruma göre çok sayıda terim için anlamlı fark gözlenmektedir. Kraniosinostozların oluşumunda esas işlevi bozulan bağ doku ile ilgili GO terimleri incelendiğinde özellikle 3 terimde anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir (Tablo 4.5). Bu terimler “Ekstraselüler Matriks Organizasyonu”, “Hücre Adezyonu” ve “Mezenşim Gelişimi”dir. Bu anlamlı farkları yaratan genler incelendiğinde bunların çoğunluğunun STRING ile saptanan birbiriyle ilişki kurduğu gösterilen genler arasında bulunduğu görülmektedir (Tablo 4.5).

STRING ile Küme I'de toplanan ve aynı zamanda zenginleşmiş GO terimleri arasında yer alan genlerin ifade düzeyi, ortalama bağlantı (*average linkage*) ile hiyerarşik kümeleme yapılarak incelenmiştir. Bu genlerden FGF2 uygulanmayan Apert Sendromlu ve Kontrol grubunda yapılan kıyaslamada anlamlı ifade değişimini koruyan 10 gen bulunmaktadır. Bunlardan *COL11A1*, *COMP*, *MGF*, *SFRP2*, *WNT2* genlerinin Apert Sendromlu hasta grubunda kontrole kıyasla daha fazla ifade edildiği; *CPXM2*, *FRZB*, *ITGA8*, *TBX5*, *TNC* genlerinin ise daha az ifade edildiği görülmüştür (Şekil 4.7). Bu 10 genden 6'sı ise (*COL11A1*, *COMP*, *CPXM2*, *ITGA8*, *MGF*, *TNC*) ekstraselüler matriks (*Extracellular Matrix*, ECM) organizasyonu ile ilişkili iken 4'ü (*FRZB*, *SFRP2*, *TBX5*, *WNT2*) mezenkimal farklılaşmayı ilgilendiren WNT (*Wingless-Type MMTV integration site family*) sinyal iletim yolağı ile ilişkili yollarda yer almaktadır.



Tablo 4.5. Karşılaştırmalarda farklı gen ifadesi saptanan genler için anlamlı ölçüde sık bulunan GO terimleri. Farklı gen ifadesi saptanan 181 gen arasında bağ dokusu ile ilişkili 3 başlıkta GO terimleri istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bu 3 başlıktaki genlerden siyah ile işaretli olanlar STRING’de tek başına bulunanlar; mor ile işaretli STRING’de Küme II’de olanlar; yeşil ile işaretli olanlar başka bir genle ilişkisi STRING’e göre gösterilmiş, ancak büyük 2 kümede yer almayan; kırmızı ile işaretli olanlar ise STRING’de Küme I’de olanlardır (Bkz. Şekil 4.6).

GO Terimleri	p değeri	Genler
Ekstraselüler Matris Organizasyonu	$5.15 \times 10^{-10}$	<i>A2M, ADAMTS5, EGFL6, FKBP1A, LOXL2, NTN4, PLOD2, TLL2, F11R, AGT, VCAM1, BGN, COL8A1, COL10A1, COL11A1, COL12A1, COMP, EFEMP1, HAPLN1, ITGA8, POSTN, SFRP2, THBS1, TNC</i>
Hücre Adezyonu	$1.06 \times 10^{-11}$	<i>AJAP1, EDIL3, EGFL6, EPHA3, LOXL2, MEGF10, NEDD9, NRXN3, OMG, PCDH10, PTPRD, SORBS2, WISP2, F11R, AGT, CSTA, DSP, CCL11, COL8A1, COL11A1, COL12A1, COMP, CPXM2, HAPLN1, IGFBP7, ITGA8, LEF1, MGP, POSTN, THBS1, TNC</i>
Mezenşim Gelişimi	$6.05 \times 10^{-4}$	<i>LOXL2, LOXL3, HTR2B, FRZB, LEF1, NOG, PAX3, THBS1, TBX5, WNT2</i>



Şekil 4.7. STRING'te Küme I'de yer alan ve sık bulunan GO terimlerini taşıyan genlerin ifade profillerinin karşılaştırılması. Genlerin ifade düzeyi, ortalama bağlantı (*average likange*) ile hiyerarşik kümeleme yapılarak incelenmiştir. Şekildeki renkler genlerin o gen için görel ifade düzeyini belirtmekte olup gen ifadesi kırmızıdan yeşile doğru azalmaktadır. Bu kümelemede Apert Sendromu grubu ile kontrol grubu arasında özellikle belirgin farklılıklar gözlenen genler arasında artış gösterenler *COL11A1*, *COMP*, *MGP*, *SFRP2*, *WNT2* iken azalış gösterenler *CPXM2*, *FRZB*, *ITGA8*, *TBX5*, *TNC* kırmızı ok ile işaretlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Kraniyosinostoz, kraniyal sütürlerin kemikleşmesinin zamanından önce gerçekleşmesi durumudur (3). Sendromik kraniyosinostozlar, kraniyosinostozla başka organ bulgularının eşlik ettiği durumlardır. Aralarında kromozom hastalıkları, kopya sayısı değişiklikleri ve tek gen mutasyonlarının da olduğu 200 civarında sendromda kraniyosinostoz tanımlanmıştır (18).

Apert Sendromu, sendromik kraniyosinostozların en bilinenleri arasındadır. Bu hastalıkta kafa kemikleri arasındaki sütürlerin erken kapanmasına bağlı sorunlarla birlikte sindaktililer oldukça sık görülmektedir. Apert Sendromu otozomal dominant olarak kalıtılmakta ve *FGFR2* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu gendeki pek çok mutasyon kraniyosinostozla neden olan hastalıklarla ilişkilendirilmiştir; ancak Apert Sendromu'na neden olan *FGFR2* mutasyonlarının özellikle ligand bağımlı işlev kazanımı sonucu olan mutasyonlar oldukları bilinmektedir. Apert Sendromu nadir bir hastalıktır. Bu nedenle uzun sredeir araştırılmakta olan genetik nedenli kraniyosinostozlar ile ilgili araştırmalar için sıkça model olarak kullanılmaktadır.

Bu alışma kapsamında 3 tane Apert Sendromlu hasta ve 3 tane kontrol grubuna ait birey çalışmaya dahil edilmiştir. Bireylerin klinik bulguları kaydedilmiş ve muayeneleri yapılmıştır. Bu bulgular işığında hastalar ile kontroller arasında demografik açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Apert Sendromlu hastalarda ise ortak bulgular cerrahi müdahale gerektiren kraniyosinostoz ve sindaktili ile dismorfik yüz bulguları olmuştur. Apert Sendromlu hastaların DNA dizi analizi sonuçlarına göre A2'de p.Pro253Arg mutasyonunu, A1 ve A3'de ise p.Ser252Trp mutasyonunu heterozigot olarak saptanmıştır. Her iki mutasyon da Apert Sendromu ile önceden ilişkilendirilmiş mutasyonlardır. PCA sonuçlarına göre A1 ve A2 örneklere gen ifadesi profilleri açısından birlikte kümelenmektedirler. Bu sonuç, çalışmada uygulanan yöntem koşullarında farklı iki genotipin tüm gen ifadesi düzeyinde belirgin bir fark yaratmadığı ve değerlendirmede birlikte gruplanabileceğini işaret etmektedir. Literatürde de bu iki farklı genotipe sahip örnekler arasında özellikle

FGF duyarlılıkları açısından bazı farklılıklar olabileceği bildirilmişse de bu farklılıklar çok belirgin değildir (28,29). Bu çalışma, Apert Sendromu'ndan sorumlu iki genotip arasında olabilecek ufak farklılıkları saptamak yerine ortak fenotipe yol açan bu genotiplerin transkriptom üzerindeki ortak etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır. Bu nedenle, her 3 bireyin de DNA dizi analizi sonucunda Apert Sendromu tanılarının doğrulanması çalışma için uygun olduklarını göstermektedir.

PCA ile deney gruplarının kümelenmesi incelendiğinde dikkat çeken bir diğer nokta da A1 ve A2'ye ait hem FGF2 ile uyarılmış hem de uyarılmamış örneklerin çok yakın kümelenmesidir. Benzer şekilde K1 ve K3 örneklerinin de birlikte kümelendiği görülmektedir. Bu kümelenmenin dışında kalan A3 ve K2 örnekleri ise varyasyonu artırarak çalışmanın istatistiksel değerini düşürmüşlerdir. Bunun kesin nedenini bilmek mümkün değildir; ancak A3 ve K2 örneklerinin RNA derişimlerinin de diğer örneklere kıyasla düşük olması dikkati çekmektedir. Bu durum RNA izolasyonundaki bir hata veya hücre kültüründe ışık mikroskopisi düzeyinde fark edilemeyen hücresel farklılıklar sonucu ortaya çıkmış olabilir.

PCA analizinde göze çarpan son bir durum da FGF2 uygulamasının gen ifadesi üzerine etkisinin bireylerin kendi genomik arkaplanlarının etkisine kıyasla oldukça az olmasıdır. Bu çalışmada Apert Sendromu'ndan sorumlu mutasyonların ligand bağlı işlev kazanımına neden olması sebebiyle deneyler sırasında hasta ve kontrol grupları için örnekler ikiye bölünerek birer gruba FGF2 uygulaması yapılmıştır. Böylece, FGF2'nin tüm transkriptom üzerine etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Ancak FGF2'nin etkisi PCA'da görüldüğü gibi zayıf kalmıştır. Bu nedenle, deney sonucunda FGF2'nin etkisini gözlemek güçleşmiştir. FGF2'nin fibroblastlar üzerindeki etkisini istatistiksel açıdan daha güçlü sonuçlar elde edebilecek şekilde inceleyebilmek için örnek sayısının daha yüksek olduğu daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Besiyerine eklenen maddelerin transkriptoma etkisi, literatürde de yer bulan önemli bir konudur. Bir çalışmada kurulan hücre kültürlerinde kullanılan FBS'nin markasının dahi kraniyosinostozlarda yapılan transkriptom mikrodizini çalışmalarında belirgin farklılıklara neden olabildiğine değinilmiştir (65). Bu nedenle, değişkenlerin etkilerini en iyi şekilde inceleyebilmek için FBS'nin değişken olan

etkisini mümkün olduğunca azaltmak gerekmektedir. Bu amaçla, FGF2'nin etkisini daha görülebilir kılmak için besiyerlerine deney öncesi 48 saat boyunca hiç FBS eklenmemiştir. Buna karşın, hem FGF2'nin etkisi zayıf kalmış hem de Apert Sendromlu hastalara ait fibroblastlar ve kontrol grubuna ait fibroblastların gen ifadeleri arasında FBS ve FGF2 içermeyen besi yerlerinde kültüre edilmelerine karşın belirgin anlamlı farklar gözlenmiştir. Her iki durumun da nedeni kültüre edilmiş hücreler tarafından salgılanan FGF'ler olabilir. Bu nedenle dışarıdan eklenen bir ligandın yokluğunda dahi FGF2 ve çok çeşitli başka FGF'ler tarafından uyarılan FGFR2'lerin bu farkları yaratmış olması mümkündür (29). Böyle bir etkiyi test etmek ve varsa ortadan kaldırmak için kültürde az miktarda bulunabilecek fibroblast dışı hücreleri kültür ortamından uzaklaştırmak ve deneylerde FGFR inhibitörlerinin etkileri incelenmek sonuçlar arasındaki varyasyonu azaltabilir.

Transkriptom mikrodizini yöntemi kullanılarak yapılan bu çalışmanın avatajı bir seferde pek çok genin ifade düzeyini ölçebildiği için yüksek miktarda veri sağlamasıdır. Buna karşın, transkriptom mikrodizinlerinin bazı kısıtlamaları da vardır. Bunlar arasında en önemlisi mikrodizin verilerinin bazen yanlış pozitif sonuçları işaret etmesidir. Yanlış pozitif sonuçların mikrodizin işlemi basamaklarında elenmesi için pek çok kontrol basamağı olsa da transkriptom mikrodizini verilerini bireysel olarak transkriptlerin düzeyini ölçen gerçek zamanlı RT-PCR gibi bazı yöntemlerle doğrulamak sonuçların doğruluğunu pekiştirmektedir.

Çalışma sonuçları incelenirken mikrodizin sonuçlarında gruplar arasındaki ayırım gücü en yüksek olan karşılaştırma üzerine odaklanılmıştır. Bu nedenle, FGF2 uygulanmayan Apert Sendromu ve Kontrol gruplarının karşılaştırmada anlamlı fark saptanan genler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu genler arasından belli bir ortak biyolojik iletişim ağında ve benzer işlevlere sahip olanlar tüm 4 deney grubunun (Apert Sendromu 0pM FGF2, Apert Sendromu 2000pM FGF2, Kontrol 0pM FGF2, Kontrol 2000pM FGF2) birbiriyle karşılaştırmasından elde edilen bilgiler ışığında değerlendirilmiştir. Yapılan elemeler sonucunda özellikle 2 yolağın ön plana çıktığı görülmüştür. Bu yolaklar, ekstrasellüler matriks organizasyonu ve bazı sinyal iletim

yolaklarıdır. Kraniosinostoz patogeneğinde bu genlerin nasıl bir görevi olabileceğini anlamak için bu genlerin işlevleri yakından incelenmiştir.

ECM ile ilgili değişikliklerden özellikle kollajen genlerinin ifadesi ile ilgili değişiklikler dikkati çekmektedir. Çalışmada özellikle *COL11A1*'in (Kollajen XI alfa 1), daha az olmakla beraber *COL8A1*, *COL10A1* ve *COL12A1*'in (Kollajen VIII alfa 1, Kollajen X alfa 1 ve Kollajen XII alfa 1) gen ifadelerinin Apert Sendromlu hasta grubunda arttığına ilişkin kanıt vardır. Bu kollajenler ECM'nin önemli yapı taşlarıdır ve *COL10A1* ile *COL11A1*'in mutasyonları insan iskelet displazileri ile ilişkilendirilmiştir. Bu kollajenlerin her ikisi de kırıldak dokusunda çok miktarda bulunan kollajenler olup farklılaşmakta olan kondroblast ve osteoblast öncüllerinde gen ifadelerinin arttığı bildirilmiştir (74,75). Tip XI kollajenin, tip V kollajen ile beraber ECM'de bulunan büyük kollajen fibrillerinin çekirdeğini oluşturduğu ve doku içi kollajen fibrili oluşumu için yol gösterici oldukları da gösterilmiştir (76).

ECM ile ilgili gen ifadesi artan diğer genler arasında ise *COMP* (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*, Kırıldak Oligomerik Matriks Proteini) dikkati çekmektedir. Bu genin mutasyonları sonucu çoklu epifizyal displazi tip 1 ve psödoakondroplazi oluşabildiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda COMP proteininin sadece yapısal bir ECM proteini olmadığı hücreler arası sinyal iletiminde de aktif rol oynadığı gösterilmiştir (77). COMP'un bu işlevleri arasında özellikle BMP2'nin (*Bone Morphogenic Protein 2*, Kemik Morfojenik Proteini 2) bağlanması ve bu şekilde BMP2'nin difüzyonunu kısıtlayarak matriks içerisindeki hücrelerin lokal olarak yüksek miktarda BMP2'ye maruz kalabilmesini sağlaması kemik dokusunun gelişimi açısından önemlidir. COMP'un bu işlevinin aktif bir "yönlendirici matriks" işlevi görmesini sağladığı öne sürülmüştür. Bunu destekleyecek şekilde bir sıçan modelinde COMP enjeksiyonu BMP2 sinyal artışını ve ektopik kemik gelişimini uyarmıştır (77).

Çalışmamızdaki bulgulara göre ECM organizasyonu ile ilişkili Apert Sendromu'nda ifadesi artan genlerin, literatürdeki bilgiler ile uyumlu şekilde daha çok kemik gelişimini uyaran ve destekleyen genler olduğu görülmektedir (65,68). Bunun istisnası *MGP*'dir (Matriks Gama-karboksi glutamik asit Proteini). *MGP*'nin

işlev kaybı mutasyonları, anormal kıkırdak kalsifikasyonu, pulmoner stenoz ve orta yüz hipoplazisi ile ilişkili bir otozomal resesif sendrom olan Keutel Sendromu'ndan sorumludur (78). *MGP*'den yoksun fare modellerinde ise kıkırdak ve damar dokularında anormal kalsifikasyonlar izlenmiştir (79). Çalışmamızda saptanan *MGP*'deki ifade artışının kemikleşmeye yatkın olan Apert Sendromu mutasyonu taşıyan bağ dokunun kemikleşmesini önlemek amacıyla olduğu öne sürülebilir. FGF2'nin osteoblast hücre hatlarında ve kondrositlerde *MGP* ifadesini artırarak kalsifikasyonu inhibe ettiği bilinmektedir (80,81). Ancak bu etki FGFR inhibitörleri tarafından inhibe edilmeyen FGF2'nin dolaylı bir etkisidir (80). Bu durum, *MGP*'deki ifade artışının çalışmamızdaki Apert Sendromlu hücre kültürlerinde artmış kemikleşme eğilimini kompanse etmek için olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda gen ifadesinin azaldığı gözlenen *CPXM2* (Carboxypeptidase X M14 family member 2, Karboksipeptidaz X M14 ailesi üyesi 2) işlevi tam olarak bilinmeyen, karboksipeptidaz aktivitesi olmadığı gösterilen bir proteini kodlamaktadır (82).

TNC (*Tenascin C*) çalışmada gen ifadesi azaldığı gösterilen bir ECM glikoproteinini kodlamaktadır. TNC proteininin görevine ilişkin az bilgi vardır; ancak ECM'nin düzenlenmesinde önemli olduğu bildirilmektedir. TNC'nin ifade edildiği yerler arasında gelişmekte olan kıkırdak ve kemik dokuları ile gelişimini tamamlamış kıkırdak ve kemik dokunun perikondriyumunu ve periosteumunu vardır (83). Olgun kemik dokusu ve kıkırdakta TNC proteini azalmıştır (83). *TNC*'nin nokta mutasyonları insanlarda otozomal dominant sağırılık ile ilişkilendirilirken *TNC*'den yoksun farelerde belirgin bir sorun gözlenmemektedir (84,85). İlginç bir şekilde, bu çalışmada Apert Sendromlu fibroblastlarda TNC ile beraber ifadesi azalan bir başka protein olan ITGA8 (İntegrin alfa 8) parçalanmış TNC ürünleri ile iletişime girmektedir (86). Hücre-ECM iletişimini sağlayan bir integrin olan ITGA8 ise renal displazi ve aplazi ile ilişkilendirilmiştir. ITGA8'in böbrekte ECM üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada ITGA8'in ifadesindeki değişikliklerin ECM içeriğini ve yıkımını etkilediği ancak bu etkinin hücre türüne göre değiştiği gösterilmiştir (87). ITGA8 ve TNC'nin ECM üzerine etkisi Apert Sendromu ile tam olarak ilişkilendirilemese de her

ikisinin doğrudan protein-protein ilişkisi aynı şekilde regüle edilmesi Apert Sendromlu fibroblastlarda önemli görevleri olabileceğini göstermektedir.

ECM organizasyonu dışında kalan diğer 4 gen mezenkimal farklılaşma ile ilişkili sinyal iletim yollarında bulunan proteinleri kodlamaktadırlar. Bu genlerden 3'ü WNT sinyal yolağı olarak bilinen parakrin ligandlar, WNT'ler, ve hücre yüzeyi reseptörleri, *Frizzled* proteinleri, aracılığıyla sürdürülen yolak üzerindedirler. WNT sinyal iletim yolağını regüle eden WNT ve *Frizzled* proteinleri dışında pek çok başka protein de bulunmaktadır. Bunlardan SFRP'ler (*Secreted Frizzled Related Protein*, Salgılanan Frizzled ilişkili Protein) hücre yüzeyinde bulunmayan ve bu nedenle reseptör görevi görmeyen; ancak WNT'lere bağlanmak için *Frizzled* proteinleri ile yarışan ve bu şekilde WNT sinyal iletim yolağını inhibe eden proteinlerdir. Ancak WNT yolağının SFRP'ler tarafından kontrolü basitçe bir inhibisyonla açıklanamayacak kadar karmaşık bir süreçtir. Bazı SFRP'lerin WNT ligandlarını uzak mesafeler boyunca taşımak ve WNT sinyalinin dağıldığı alanı genişletmek gibi görevleri olduğu da gösterilmiştir (88). Bu nedenle, SFRP'lerin WNT yolağı üzerindeki etkileri karmaşıktır. Çalışmamızda anlamlı fark saptanan *WNT2*, bu yolakta görevli bir parankrin ligandı; *FRZB* (*Frizzled related protein*, Frizzled ilişkili Protein) (eski adı *SFRP3*) ve *SFRP2* ise bu ligandın düzenleyici proteinlerini kodlamaktadır.

WNT ve FGF sinyal iletim yolları arasındaki ilişki ve dengenin mezenkimal hücre farklılaşmasında çok önemli olduğu belirtilmektedir. Bu dengede, farelerde WNT yolağının aşırı aktivasyonu da FGF yolağına benzer şekilde kraniyosinostoza neden olmaktadır (89). Buna ek olarak, WNT ve FGF yolları arasındaki dengenin encondral kemikleşme – intramembranöz kemikleşme arasındaki önemli bir anahtar olduğu gösterilmiştir (90). Ayrıca, ekstremitte gelişiminde de FGF – WNT sinyal iletim yolağlarındaki dengenin bağ dokusunun proliferasyonu ve farklılaşması belirlediği gösterilmiştir (91). Bu nedenle, çalışmamızdaki sonuçlarda da gözlemlendiği gibi FGF – WNT sinyal iletim yollarındaki dengesizlik, Apert Sendromu'nda görülen ekstremitte bulguları için de açıklayıcı olabilir.



Nonsendromik tek sütürü ilgilendiren kraniyosinostozlar üzerine 199 hasta ve 50 kontrol grubunda yapılan bir çalışmadaki sonuçlar, çalışmamız ile oldukça örtüşmektedir. Bu yazıdaki sonuçlara göre *WNT2* ve *SFRP4* ifadesi koronal ve metopik sütürleri etkileyen nonsendromik kraniyosinostozu sahip hastaların kraniyal osteoblast kültürlerinde artmış olarak bulunmuştur (92). Bu da WNT yolağında bu çalışmada da görülen aktivasyonun sadece Apert Sendromu'na özgü değil genel olarak tüm kraniyosinostozlarda bulunan bir sorun olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, ilginç bir şekilde Apert Sendromlu hastalarda yapılan transkriptom mikrodizini çalışmalarında daha önceden WNT sinyal iletim yolağına ilişkin belirgin değişiklikler üzerine durulmamıştır (2,65-68). Bu durumun deneyler arasındaki metodolojik farklılıklar sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Mezenkimal farklılaşma ile ilgili ifadesinde Apert Sendromu mutasyonuna sahip fibroblastlarda anlamlı düşüş görülen başka bir gen ise bir *homeobox* transkripsiyon faktörü olan *TBX5*'tir (*T-Box 5*, T-kutusu 5). *TBX5* genindeki mutasyonlar, şiddetli veya hafif üst ekstremitte anomalileri ve konjenital kalp hastalıkları ile karakterize Holt-Oram Sendromu'ndan sorumludur (93). Bu hastalık haployetmezlik sonucu ortaya çıkması nedeniyle otozomal dominant kalıtılmaktadır. Apert Sendromu'nda da benzer üst ekstremitte anomalileri ve konjenital kalp hastalıkları görülebilmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda da ifadesi azalan *TBX5*'in Apert Sendromu'ndaki bu anomalilerle olası bir ilişkisi ortaya konmuştur. Bu ilişki *TBX5*'in işlevinin dolaylı olsa da WNT sinyal iletim yolağına bağlı olması ile açıklanabilir.

Bugüne kadar Apert Sendromu ile ilgili yapılan hücre kültürü çalışmalarında çeşitli dokular hücre kaynağı olarak kullanılmıştır. Bunlar arasında sütür dokusu, kraniyal periosteum, kafa derisi fibroblastları ve sindaktili dokusu fibroblastları vardır. Bilinen kadarı ile ilk kez bu çalışmada Apert Sendromlu hastaların hastalıkla ilişkisi olmayan bir bölgeden alınan dermal fibroblastlarında gen ifadesi düzeyinde kontrol grubundan farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur. Bu sonuç iki açıdan önemlidir.

Bunlardan biri, bu sonuç ile Apert Sendromulu hastalara ait dermal fibroblastların Apert Sendromu ile ilgili araştırmalarda model olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur. Bu şekilde elde edilmesi göreli olarak kolay olan dermal fibroblastlar ile insan araştırmalarındaki bilgi edinme hızının artması mümkündür. Bir diğer i se, dermal fibroblastlarda bazı işlev farklılıkları olan Apert Sendromu hastalarının deri veya yaygın bağ dokusu sorunları gibi klinik bulgularının olmadığı görülmesidir. Dermal fibroblastlardaki bu işlev farklılığının Apert Sendromu'nda nasıl bir mekanizma sonucu bir fenotipik karşılığı olmadığı Apert Sendromu patogenezi anlamak için önemi olan ve araştırılması gereken bir konudur. Bu konunun araştırılması için in vivo embriyonik gelişimi inceleyen hayvan deneyleri fayda sağlayabilir.

Literatürde, Apert Sendromlu hastalardan alınan örneklerden kurulan hücre kültürleriyle yapılan başka transkriptom mikrodizini çalışmaları da bulunmaktadır. Bu çalışmada saptanan transkriptom profilleri ile literatürde saptanan profiller arasında az bir örtüşme olduğu görülmektedir (2,65-68). Buna karşın, literatürde saptanan genlerin ait olduğu işlevlerine bakıldığında tenaskinler, integrinler, kemik farklılaşma sürecine katılan proteinlere ait transkriptlerin artmış ifadeye sahip oldukları görülmektedir. Transkriptom mikrodizini yapılan bir çalışmadaki ek deneylerde osteojenik indüksiyon ortamında kraniyal periosteal fibroblast kltrnde kontrol grubuna göre belirgin şekilde fenotipik olarak osteoblast hücresine farklılaşma ve matriks kalsifikasyonu gözlenmiştir (67). Bu sonuçlar, çalışmamızda ifadesinde farklılık saptanan genlerin diğer çalışmalarda saptananlarla birebir aynı genler olmasa da aynı yolaklar üzerinde yer alan genler olduğunu desteklemektedir. Yapılan alışmalar arasında deney sistemi ve hücre kaynağı farklılıklarına bağlı olarak az örtüşme gözlenebildiği Apert Sendromu ile yapılan diğer çalışmalarda da belirtilmiştir (65,67). Bu çalışmada hücre kaynağı olarak dermal fibroblastların kullanılması ve deneylerin FBS bulunmayan besi yerinde gerçekleştirilmesi bu farklılıkları açıklayabilir.

Bu alışmada Apert Sendromu'nun patogenezinde önemli olabilecek çeşitli yollara ilişkin önemli hedef genler saptanmıştır. Bu genler incelendiğinde özellikle iki tür biyolojik aktiviteye sahip olanlar ne çıkmaktadır. Bunlar, WNT sinyal iletim yolağını ve ECM organizasyonunu düzenleyen genlerdir. Bu genlerin işlevindeki değişim Apert Sendromu primer fibroblast kültüründe kemik dokusuna farklılaşma yönündeki sinyallerin arttığını göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları Apert Sendromu'ndaki kraniyosinostozun, sütürlerdeki bağ dokunun hızlıca kemikleşerek kapandığı görüşünü desteklemiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Apert Sendromu'na yol açan *FGFR2* mutasyonlarına sahip hastalığın klinik bulguları ile doğrudan ilişkisi olmayan dermal fibroblastlarda da hastalığın fenotipi ile ilişkili hücre grupları gibi gen ifadesi profillerinde kontrol grubuna göre farklılıklar olduğu görülmüştür.
- Apert Sendromu ile ilgili araştırmalarda model olarak dermal fibroblast kültürlerinin kullanılabilmesine yönelik kanıt oluşmuştur.
- Bu çalışma sonucunda Apert Sendromu'nun patogenezinde önemli iki biyolojik yolak ortaya konmuştur. Bunlardan biri ECM organizasyonu diğeri ise WNT sinyal iletim yolağıdır. Her iki yolağın da bağ dokudan kemik dokuya farklılaşma ile ilişkili olduğuna yönelik kanıtlar vardır.
- ECM organizasyonu yolağında özellikle *COL11A1*, *COMP*, *CPXM2*, *ITGA8*, *MGF*, *TNC* genlerinin; mezeşimal farklılaşma ile ilgili sinyal iletim yolaklarında özellikle *FRZB*, *SFRP2*, *TBX5*, *WNT2* genlerinin önemli olduğu gösterilmiştir.
- Bu çalışmanın sonuçları Apert Sendromu'ndaki kraniyosinostozun, sütürlerdeki bağ dokunun hızlıca kemikleşerek kapanması sonucu ortaya çıktığı görüşünü desteklemiştir.
- Bu çalışmada saptanan Apert Sendromu patogenezinde önemi olabileceği düşünülen yolakların ve hedef moleküllerin gerçek zamanlı RT-PCR gibi ikinci bir deney sistemi ile pekiştirilmesi önerilir.
- Özellikle FGF2'nin etkisinin daha iyi incelenebilmesi için daha fazla bireyin incelendiği hasta grupları ile geniş transkriptom çalışmaları yapılması önerilir.
- Çalışma sonucunda Apert Sendromu'nun patogenezinde önemi ortaya çıkan hedef moleküller hastalığın prenatal tedavisi konusundaki insan araştırmaları için ön veri oluşturabilir. Bu çalışmanın sonuçlarındaki veriler ışığında aşırı çalışan *FGFR2*'nin aktivitesini hücrelerde baskılayan farmakolojik tedavi adayı maddeler ile transkriptomun ve önemi ortaya çıkan yolakların nasıl etkilendiği incelenmesi önerilir.

## KAYNAKLAR

1. Levi, B., Wan, D.C., Wong, V.W., Nelson, E., Hyun, J., Longaker, M.T. (2012) Cranial suture biology: from pathways to patient care. *The Journal of craniofacial surgery*, 23 (1), 13-19.
2. Coussens, A.K., Wilkinson, C.R., Hughes, I.P., Morris, C.P., van Daal, A., Anderson, P.J. ve diğeri. (2007) Unravelling the molecular control of calvarial suture fusion in children with craniosynostosis. *BMC genomics*, 8, 458.
3. Kimonis, V., Gold, J.A., Hoffman, T.L., Panchal, J., Boyadjiev, S.A. (2007) Genetics of craniosynostosis. *Seminars in pediatric neurology*, 14 (3), 150-161.
4. Lajeunie, E., Le Merrer, M., Bonaiti-Pellie, C., Marchac, D., Renier, D. (1995) Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *American journal of medical genetics*, 55 (4), 500-504.
5. Lanner, F., Rossant, J. (2010) The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development*, 137 (20), 3351-3360.
6. Opperman, L.A. (2000) Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 219 (4), 472-485.
7. Sharma, R.K. (2013) Craniosynostosis. *Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 46 (1), 18-27.
8. Johnson, D., Wilkie, A.O. (2011) Craniosynostosis. *European journal of human genetics : EJHG*, 19 (4), 369-376.
9. Nagaraja, S., Anslow, P., Winter, B. (2013) Craniosynostosis. *Clinical radiology*, 68 (3), 284-292.
10. Gracia, A., Martinez-Lage, J.F., Arsuaga, J.L., Martinez, I., Lorenzo, C., Perez-Espejo, M.A. (2010) The earliest evidence of true lambdoid craniosynostosis: the case of "Benjamina", a Homo heidelbergensis child. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 26 (6), 723-727.
11. Dimopoulos, V.G., Kapsalakis, I.Z., Fountas, K.N. (2007) Skull morphology and its neurosurgical implications in the Hippocratic era. *Neurosurgical focus*, 23 (1), E10.
12. Delashaw, J.B., Persing, J.A., Jane, J.A. (1991) Cranial deformation in craniosynostosis. A new explanation. *Neurosurgery clinics of North America*, 2 (3), 611-620.
13. Massimi, L., Caldarelli, M., Tamburrini, G., Paternoster, G., Di Rocco, C. (2012) Isolated sagittal craniosynostosis: definition, classification, and surgical indications. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 28 (9), 1311-1317.
14. Cunningham, M.L., Heike, C.L. (2007) Evaluation of the infant with an abnormal skull shape. *Current opinion in pediatrics*, 19 (6), 645-651.

15. Martinez-Lage, J.F., Ruiz-Espejo, A.M., Gilabert, A., Perez-Espejo, M.A., Guillen-Navarro, E. (2006) Positional skull deformities in children: skull deformation without synostosis. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 22 (4), 368-374.
16. Kirmi, O., Lo, S.J., Johnson, D., Anslow, P. (2009) Craniosynostosis: a radiological and surgical perspective. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*, 30 (6), 492-512.
17. Tonni, G., Panteghini, M., Rossi, A., Baldi, M., Magnani, C., Ferrari, B. ve diğerleri. (2011) Craniosynostosis: prenatal diagnosis by means of ultrasound and SSSE-MRI. Family series with report of neurodevelopmental outcome and review of the literature. *Archives of gynecology and obstetrics*, 283 (4), 909-916.
18. Cunningham, M.L., Seto, M.L., Ratisoontorn, C., Heike, C.L., Hing, A.V. (2007) Syndromic craniosynostosis: from history to hydrogen bonds. *Orthodontics & craniofacial research*, 10 (2), 67-81.
19. Wilkie, A.O., Byren, J.C., Hurst, J.A., Jayamohan, J., Johnson, D., Knight, S.J. ve diğerleri. (2010) Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics*, 126 (2), e391-400.
20. Mefford, H.C., Shafer, N., Antonacci, F., Tsai, J.M., Park, S.S., Hing, A.V. ve diğerleri. (2010) Copy number variation analysis in single-suture craniosynostosis: multiple rare variants including RUNX2 duplication in two cousins with metopic craniosynostosis. *American journal of medical genetics. Part A*, 152A (9), 2203-2210.
21. Vissers, L.E., Cox, T.C., Maga, A.M., Short, K.M., Wiradjaja, F., Janssen, I.M. ve diğerleri. (2011) Heterozygous mutations of FREM1 are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. *PLoS genetics*, 7 (9), e1002278.
22. Swinkels, M.E., Simons, A., Smeets, D.F., Vissers, L.E., Veltman, J.A., Pfundt, R. ve diğerleri. (2008) Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype. *American journal of medical genetics. Part A*, 146A (11), 1430-1438.
23. Spaggiari, E., Aboura, A., Sinico, M., Mabboux, P., Dupont, C., Delezoide, A.L. ve diğerleri. (2012) Prenatal diagnosis of a 7p15-p21 deletion encompassing the TWIST1 gene involved in Saethre-Chotzen syndrome. *European journal of medical genetics*, 55 (8-9), 498-501.
24. Khong, J.J., Anderson, P.J., Hammerton, M., Roscioli, T., Selva, D., David, D.J. (2007) Differential effects of FGFR2 mutation in ophthalmic findings in Apert syndrome. *The Journal of craniofacial surgery*, 18 (1), 39-42.
25. Goriely, A., Wilkie, A.O. (2012) Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. *American journal of human genetics*, 90 (2), 175-200.
26. Bochukova, E.G., Roscioli, T., Hedges, D.J., Taylor, I.B., Johnson, D., David, D.J. ve diğerleri. (2009) Rare mutations of FGFR2 causing apert syndrome:

- identification of the first partial gene deletion, and an Alu element insertion from a new subfamily. *Human mutation*, 30 (2), 204-211.
27. Oldridge, M., Zackai, E.H., McDonald-McGinn, D.M., Iseki, S., Morriss-Kay, G.M., Twigg, S.R. ve diğerleri. (1999) De novo alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *American journal of human genetics*, 64 (2), 446-461.
  28. Ibrahimi, O.A., Chiu, E.S., McCarthy, J.G., Mohammadi, M. (2005) Understanding the molecular basis of Apert syndrome. *Plastic and reconstructive surgery*, 115 (1), 264-270.
  29. Ibrahimi, O.A., Zhang, F., Eliseenkova, A.V., Itoh, N., Linhardt, R.J., Mohammadi, M. (2004) Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Human molecular genetics*, 13 (19), 2313-2324.
  30. Jabs, E.W., Li, X., Scott, A.F., Meyers, G., Chen, W., Eccles, M. ve diğerleri. (1994) Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nature genetics*, 8 (3), 275-279.
  31. Slavotinek, A., Crawford, H., Golabi, M., Tao, C., Perry, H., Oberoi, S. ve diğerleri. (2009) Novel FGFR2 deletion in a patient with Beare-Stevenson-like syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 149A (8), 1814-1817.
  32. McGillivray, G., Savarirayan, R., Cox, T.C., Stojkoski, C., McNeil, R., Bankier, A. ve diğerleri. (2005) Familial scaphocephaly syndrome caused by a novel mutation in the FGFR2 tyrosine kinase domain. *Journal of medical genetics*, 42 (8), 656-662.
  33. Merrill, A.E., Sarukhanov, A., Krejci, P., Idoni, B., Camacho, N., Estrada, K.D. ve diğerleri. (2012) Bent bone dysplasia-FGFR2 type, a distinct skeletal disorder, has deficient canonical FGF signaling. *American journal of human genetics*, 90 (3), 550-557.
  34. Sharma, V.P., Fenwick, A.L., Brockop, M.S., McGowan, S.J., Goos, J.A., Hoogeboom, A.J. ve diğerleri. (2013) Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nature genetics*, 45 (3), 304-307.
  35. Janssen, A., Hosen, M.J., Jeannin, P., Coucke, P.J., De Paepe, A., Vanakker, O.M. (2013) Second family with the Boston-type craniosynostosis syndrome: novel mutation and expansion of the clinical spectrum. *American journal of medical genetics. Part A*, 161 (9), 2352-2357.
  36. Wieland, I., Makarov, R., Reardon, W., Tinschert, S., Goldenberg, A., Thierry, P. ve diğerleri. (2008) Dissecting the molecular mechanisms in craniofrontonasal syndrome: differential mRNA expression of mutant EFNB1 and the cellular mosaic. *European journal of human genetics : EJHG*, 16 (2), 184-191.
  37. Van Maldergem, L., Siitonen, H.A., Jalkh, N., Chouery, E., De Roy, M., Delague, V. ve diğerleri. (2006) Revisiting the craniosynostosis-radial ray

- hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *Journal of medical genetics*, 43 (2), 148-152.
38. Huang, N., Pandey, A.V., Agrawal, V., Reardon, W., Lapunzina, P.D., Mowat, D. ve diğerleri. (2005) Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *American journal of human genetics*, 76 (5), 729-749.
  39. Laue, K., Pogoda, H.M., Daniel, P.B., van Haeringen, A., Alanay, Y., von Ameln, S. ve diğerleri. (2011) Craniosynostosis and multiple skeletal anomalies in humans and zebrafish result from a defect in the localized degradation of retinoic acid. *American journal of human genetics*, 89 (5), 595-606.
  40. Jenkins, D., Seelow, D., Jehee, F.S., Perlyn, C.A., Alonso, L.G., Bueno, D.F. ve diğerleri. (2007) RAB23 mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. *American journal of human genetics*, 80 (6), 1162-1170.
  41. Twigg, S.R., Lloyd, D., Jenkins, D., Elcioglu, N.E., Cooper, C.D., Al-Sanna, N. ve diğerleri. (2012) Mutations in multidomain protein MEGF8 identify a Carpenter syndrome subtype associated with defective lateralization. *American journal of human genetics*, 91 (5), 897-905.
  42. Lin, A.E., Traum, A.Z., Sahai, I., Keppler-Noreuil, K., Kukulich, M.K., Adam, M.P. ve diğerleri. (2013) Sensenbrenner syndrome (Cranioectodermal dysplasia): clinical and molecular analyses of 39 patients including two new patients. *American journal of medical genetics. Part A*, 161A (11), 2762-2776.
  43. Klopocki, E., Lohan, S., Brancati, F., Koll, R., Brehm, A., Seemann, P. ve diğerleri. (2011) Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis. *American journal of human genetics*, 88 (1), 70-75.
  44. Jan, A. (2013) Aberrant TGF-beta signaling underlies the pathogenesis of aortic aneurysm in Shprintzen-Goldberg syndrome. *Clinical genetics*, 83 (4), 318-319.
  45. Nieminen, P., Morgan, N.V., Fenwick, A.L., Parmanen, S., Veistinen, L., Mikkola, M.L. ve diğerleri. (2011) Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth. *American journal of human genetics*, 89 (1), 67-81.
  46. <http://www.omim.org>. (Erişim Tarihi: 04/04/2014)
  47. Lakin, G.E., Sinkin, J.C., Chen, R., Koltz, P.F., Giroto, J.A. (2012) Genetic and epigenetic influences of twins on the pathogenesis of craniosynostosis: a meta-analysis. *Plastic and reconstructive surgery*, 129 (4), 945-954.
  48. Gardner, J.S., Guyard-Boileau, B., Alderman, B.W., Fernbach, S.K., Greene, C., Mangione, E.J. (1998) Maternal exposure to prescription and non-prescription pharmaceuticals or drugs of abuse and risk of craniosynostosis. *International journal of epidemiology*, 27 (1), 64-67.
  49. Twigg, S.R., Vorgia, E., McGowan, S.J., Peraki, I., Fenwick, A.L., Sharma, V.P. ve diğerleri. (2013) Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis



- in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis. *Nature genetics*, 45 (3), 308-313.
50. Yagnik, G., Ghuman, A., Kim, S., Stevens, C.G., Kimonis, V., Stoler, J. ve diğerleri. (2012) ALX4 gain-of-function mutations in nonsyndromic craniosynostosis. *Human mutation*, 33 (12), 1626-1629.
  51. Tagariello, A., Heller, R., Greven, A., Kalscheuer, V.M., Molter, T., Rauch, A. ve diğerleri. (2006) Balanced translocation in a patient with craniosynostosis disrupts the SOX6 gene and an evolutionarily conserved non-transcribed region. *Journal of medical genetics*, 43 (6), 534-540.
  52. Ting, M.C., Wu, N.L., Roybal, P.G., Sun, J., Liu, L., Yen, Y. ve diğerleri. (2009) EphA4 as an effector of Twist1 in the guidance of osteogenic precursor cells during calvarial bone growth and in craniosynostosis. *Development*, 136 (5), 855-864.
  53. Wan, D.C., Kwan, M.D., Lorenz, H.P., Longaker, M.T. (2008) Current treatment of craniosynostosis and future therapeutic directions. *Frontiers of oral biology*, 12, 209-230.
  54. Forrest, C.R., Hopper, R.A. (2013) Craniofacial syndromes and surgery. *Plastic and reconstructive surgery*, 131 (1), 86e-109e.
  55. Perlyn, C.A., Morriss-Kay, G., Darvann, T., Tenenbaum, M., Ornitz, D.M. (2006) A model for the pharmacological treatment of crouzon syndrome. *Neurosurgery*, 59 (1), 210-215; discussion 210-215.
  56. Shukla, V., Coumoul, X., Wang, R.H., Kim, H.S., Deng, C.X. (2007) RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. *Nature genetics*, 39 (9), 1145-1150.
  57. Ibrahim, O.A., Eliseenkova, A.V., Plotnikov, A.N., Yu, K., Ornitz, D.M., Mohammadi, M. (2001) Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (13), 7182-7187.
  58. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>. (Erişim Tarihi: 01/02/2014)
  59. Chim, H., Manjila, S., Cohen, A.R., Gosain, A.K. (2011) Molecular signaling in pathogenesis of craniosynostosis: the role of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Neurosurgical focus*, 31 (2), E7.
  60. Ang, B.U., Spivak, R.M., Nah, H.D., Kirschner, R.E. (2010) Dura in the pathogenesis of syndromic craniosynostosis: fibroblast growth factor receptor 2 mutations in dural cells promote osteogenic proliferation and differentiation of osteoblasts. *The Journal of craniofacial surgery*, 21 (2), 462-467.
  61. Carinci, F., Pezzetti, F., Locci, P., Becchetti, E., Carls, F., Avantaggiato, A. ve diğerleri. (2005) Apert and Crouzon syndromes: clinical findings, genes and extracellular matrix. *The Journal of craniofacial surgery*, 16 (3), 361-368.
  62. Yang, F., Wang, Y., Zhang, Z., Hsu, B., Jabs, E.W., Elisseff, J.H. (2008) The study of abnormal bone development in the Apert syndrome Fgfr2+/S252W mouse using a 3D hydrogel culture model. *Bone*, 43 (1), 55-63.

63. Bodo, M., Lilli, C., Aisa, M.C., Scapoli, L., Bellucci, C., Rinaldi, E. ve diğerleri. (2002) Basic fibroblast growth factor: effects on matrix remodeling, receptor expression, and transduction pathway in human periosteal fibroblasts with FGFR2 gene mutation. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 22 (6), 621-630.
64. Shams, I., Rohmann, E., Eswarakumar, V.P., Lew, E.D., Yuzawa, S., Wollnik, B. ve diğerleri. (2007) Lacrimo-auriculo-dento-digital syndrome is caused by reduced activity of the fibroblast growth factor 10 (FGF10)-FGF receptor 2 signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 27 (19), 6903-6912.
65. Bochukova, E.G., Soneji, S., Wall, S.A., Wilkie, A.O. (2010) Scalp fibroblasts have a shared expression profile in monogenic craniosynostosis. *Journal of medical genetics*, 47 (12), 803-808.
66. Carinci, F., Bodo, M., Tosi, L., Francioso, F., Evangelisti, R., Pezzetti, F. ve diğerleri. (2002) Expression profiles of craniosynostosis-derived fibroblasts. *Molecular medicine*, 8 (10), 638-644.
67. Fanganiello, R.D., Sertie, A.L., Reis, E.M., Yeh, E., Oliveira, N.A., Bueno, D.F. ve diğerleri. (2007) Apert p.Ser252Trp mutation in FGFR2 alters osteogenic potential and gene expression of cranial periosteal cells. *Molecular medicine*, 13 (7-8), 422-442.
68. Yeh, E., Fanganiello, R.D., Sunaga, D.Y., Zhou, X., Holmes, G., Rocha, K.M. ve diğerleri. (2013) Novel molecular pathways elicited by mutant FGFR2 may account for brain abnormalities in Apert syndrome. *PLoS one*, 8 (4), e60439.
69. Yu, K., Herr, A.B., Waksman, G., Ornitz, D.M. (2000) Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (26), 14536-14541.
70. Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. ve diğerleri. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4 (2), 249-264.
71. Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 3, Article3.
72. Jensen, L.J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J. ve diğerleri. (2009) STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*, 37 (Database issue), D412-416.
73. Ng, A., Bursteinas, B., Gao, Q., Mollison, E., Zvelebil, M. (2006) pSTING: a 'systems' approach towards integrating signalling pathways, interaction and transcriptional regulatory networks in inflammation and cancer. *Nucleic acids research*, 34 (Database issue), D527-534.
74. Felimban, R., Ye, K., Traianedes, K., Di Bella, C., Crook, J., Wallace, G.G. ve diğerleri. (2014) Differentiation of Stem Cells from Human Infrapatellar Fat

- Pad: Characterization of Cells Undergoing Chondrogenesis. *Tissue engineering. Part A*.
75. Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., Lee, B. (2003) Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *The Journal of cell biology*, 162 (5), 833-842.
  76. Wenstrup, R.J., Smith, S.M., Florer, J.B., Zhang, G., Beason, D.P., Seegmiller, R.E. ve diğ erleri. (2011) Regulation of collagen fibril nucleation and initial fibril assembly involves coordinate interactions with collagens V and XI in developing tendon. *The Journal of biological chemistry*, 286 (23), 20455-20465.
  77. Ishida, K., Acharya, C., Christiansen, B.A., Yik, J.H., DiCesare, P.E., Haudenschild, D.R. (2013) Cartilage oligomeric matrix protein enhances osteogenesis by directly binding and activating bone morphogenetic protein-2. *Bone*, 55 (1), 23-35.
  78. Munroe, P.B., Olgunturk, R.O., Fryns, J.P., Van Maldergem, L., Ziereisen, F., Yuksel, B. ve diğ erleri. (1999) Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nature genetics*, 21 (1), 142-144.
  79. Speer, M.Y., McKee, M.D., Guldborg, R.E., Liaw, L., Yang, H.Y., Tung, E. ve diğ erleri. (2002) Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 196 (8), 1047-1055.
  80. Kyono, A., Avishai, N., Ouyang, Z., Landreth, G.E., Murakami, S. (2012) FGF and ERK signaling coordinately regulate mineralization-related genes and play essential roles in osteocyte differentiation. *Journal of bone and mineral metabolism*, 30 (1), 19-30.
  81. Stheneur, C., Dumontier, M.F., Guedes, C., Fulchignoni-Lataud, M.C., Tahiri, K., Karsenty, G. ve diğ erleri. (2003) Basic fibroblast growth factor as a selective inducer of matrix Gla protein gene expression in proliferative chondrocytes. *The Biochemical journal*, 369 (Pt 1), 63-70.
  82. Xin, X., Day, R., Dong, W., Lei, Y., Fricker, L.D. (1998) Identification of mouse CPX-2, a novel member of the metalloproteinase gene family: cDNA cloning, mRNA distribution, and protein expression and characterization. *DNA and cell biology*, 17 (10), 897-909.
  83. Vakeva, L., Mackie, E., Kantomaa, T., Thesleff, I. (1990) Comparison of the distribution patterns of tenascin and alkaline phosphatase in developing teeth, cartilage, and bone of rats and mice. *The Anatomical record*, 228 (1), 69-76.
  84. Zhao, Y., Zhao, F., Zong, L., Zhang, P., Guan, L., Zhang, J. ve diğ erleri. (2013) Exome sequencing and linkage analysis identified tenascin-C (TNC) as a novel causative gene in nonsyndromic hearing loss. *PLoS one*, 8 (7), e69549.
  85. Forsberg, E., Hirsch, E., Frohlich, L., Meyer, M., Ekblom, P., Aszodi, A. ve diğ erleri. (1996) Skin wounds and severed nerves heal normally in mice

- lacking tenascin-C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (13), 6594-6599.
86. Denda, S., Muller, U., Crossin, K.L., Erickson, H.P., Reichardt, L.F. (1998) Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin alpha 8 beta 1 receptor interactions with tenascin: murine alpha 8 beta 1 binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C. *Biochemistry*, 37 (16), 5464-5474.
  87. Volkert, G., Jahn, A., Dinkel, C., Fahlbusch, F., Zurn, C., Hilgers, K.F. ve diğeri. (2014) Contribution of the alpha8 integrin chain to the expression of extracellular matrix components. *Cell communication & adhesion*, 21 (2), 89-98.
  88. Mii, Y., Taira, M. (2011) Secreted Wnt "inhibitors" are not just inhibitors: regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Development, growth & differentiation*, 53 (8), 911-923.
  89. Yu, H.M., Jerchow, B., Sheu, T.J., Liu, B., Costantini, F., Puzas, J.E. ve diğeri. (2005) The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development*, 132 (8), 1995-2005.
  90. Maruyama, T., Mirando, A.J., Deng, C.X., Hsu, W. (2010) The balance of WNT and FGF signaling influences mesenchymal stem cell fate during skeletal development. *Science signaling*, 3 (123), ra40.
  91. ten Berge, D., Brugmann, S.A., Helms, J.A., Nusse, R. (2008) Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*, 135 (19), 3247-3257.
  92. Stamper, B.D., Park, S.S., Beyer, R.P., Bammler, T.K., Farin, F.M., Mechem, B. ve diğeri. (2011) Differential expression of extracellular matrix-mediated pathways in single-suture craniosynostosis. *PloS one*, 6 (10), e26557.
  93. Li, Q.Y., Newbury-Ecob, R.A., Terrett, J.A., Wilson, D.I., Curtis, A.R., Yi, C.H. ve diğeri. (1997) Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature genetics*, 15 (1), 21-29.

## EKLER

### EK-1. Transkriptom Çalışması Sonucu Gruplar Arasında Anlamlı Fark Gözlenen Genler

Tablo Ek1. Dört deney grubu arasında yeşil ile belirtilen 4 karşılaştırmanın sonuçları. Mor ile işaretlenen genler, ilgili karşılaştırma tablosu içerisinde birden fazla kez temsil edilmektedir. Tabloda logFC, log<sub>2</sub> şeklinde ifade edilen karşılaştırmadaki ilk deney grubu ile ikinci deney grubu arasındaki kat farkını; *P.value* yapılan t-testinin sonucunu; *Ensembl Gene ID* genin Ensembl veritabanındaki kodunu; OMIM ise o gene ait OMIM veritabanında kayıtlı bir hastalık olup olmadığını belirtmektedir.

Apert Sendromu OpM FGF2 - Kontrol OpM FGF2				
Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
FLG	3,437003	0,0031611	ENSG00000143631	<i>Ichthyosis vulgaris</i>
COMP	3,381607	0,0244214	ENSG00000105664	<i>Epiphyseal dysplasia, multiple 1; Pseudoachondroplasia</i>
LOC389831	3,259884	0,0002373	ENSG00000215781	-
PENK	2,7972	0,0018761	ENSG00000181195	-
ZIC1	2,748324	0,0018359	ENSG00000152977	<i>may be related to Dandy-Walker Malformation</i>
LOC389831	2,621807	0,000245	ENSG00000215781	-
LOC389831	2,566293	0,0003694	ENSG00000215781	-
CRISPLD1	2,492805	0,003887	ENSG00000121005	-
LOC389831	2,416133	8,73E-05	ENSG00000215781	-
FLG-AS1	2,401035	5,44E-05	ENSG00000237975	-
SCUBE3	2,373678	0,0017622	ENSG00000146197	-
GFRA1	2,348802	0,0004621	ENSG00000151892	-
SIM1	2,342807	0,0202614	ENSG00000112246	<i>Severe Obesity</i>
GSTT2	2,33075	2,43E-05	ENSG00000099984	-
PCOLCE2	2,276865	0,0001122	ENSG00000163710	-
PCDH10	2,267955	2,53E-05	ENSG00000138650	-
GFRA1	2,263084	0,0015799	ENSG00000151892	-
GFRA1	2,164128	0,0086439	ENSG00000151892	-
DIRAS2	2,106297	0,0008542	ENSG00000165023	-
ERAP2	2,073894	0,0442431	ENSG00000164308	-
TAC1	2,047957	0,0012905	ENSG00000006128	-
LINC01133	2,023873	0,0002251	ENSG00000224259	-
HTATSF1P2	1,946999	0,0026228	ENSG00000271361	-

Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
ADTRP	1,908478	0,0205576	ENSG00000111863	-
HRASLS	1,84897	2,35E-06	ENSG00000127252	-
CPVL	1,758808	0,0107075	ENSG00000106066	-
ERG	1,754047	0,0002492	ENSG00000157554	-
C3orf80	1,683702	0,0389232	ENSG00000180044	-
JPH1	1,666563	0,0002495	ENSG00000104369	-
MGP	1,660097	0,0105907	ENSG00000111341	<i>Keutel Syndrome, Natural Teeth remaining intact</i>
ALDH1A1	1,659766	0,0482675	ENSG00000165092	-
CXCR4	1,628016	0,012015	ENSG00000121966	<i>WHIM Syndrome</i>
SFRP2	1,610603	0,0026461	ENSG00000145423	-
GDF10	1,604511	0,0049672	ENSG00000107623	-
LOC100506922	1,601455	0,0014465	-	-
SFRP2	1,578474	0,0018114	ENSG00000145423	-
ST6GAL2	1,577475	0,0009399	ENSG00000144057	-
FIBIN	1,553614	0,0129565	ENSG00000176971	-
SIM1	1,505811	0,0109112	ENSG00000112246	<i>Severe Obesity</i>
CLEC2B	-1,581	0,0008348	ENSG00000110852	-
CCDC102B	-1,59415	0,0001615	ENSG00000150636	-
LINC01116	-1,599	0,0366395	ENSG00000163364	-
SYT1	-1,6054	2,82E-05	ENSG00000067715	-
TRPA1	-1,61365	0,0002775	ENSG00000104321	<i>Familial Episodic Pain Syndrome</i>
SERPINB9P1	-1,62176	0,000702	-	-
SLC16A3	-1,69133	4,92E-06	ENSG00000141526	-
SHROOM2	-1,714	0,0008142	ENSG00000146950	-
SYT1	-1,72008	0,000136	ENSG00000067715	-
HTR2B	-1,73651	0,0015946	ENSG00000135914	-
THSD7A	-1,7593	0,0007705	ENSG00000005108	-
ITGA8	-1,76991	0,0067053	ENSG00000077943	<i>Renal Hypodysplasia/Aplasia 1</i>
LDB2	-1,8168	0,0180766	ENSG00000169744	-
FRZB	-1,84514	4,90E-05	ENSG00000162998	<i>Susceptibility to Osteoarthritis</i>
GRTP1	-1,90004	0,0023297	ENSG00000139835	-
TNFRSF21	-1,92637	0,0045733	ENSG00000146072	-
CASP1	-2,00107	0,0022978	ENSG00000137752	-
GAD1	-2,00309	0,0022222	ENSG00000128683	<i>Spastic Quadriplegic Cerebral Palsy I</i>
PGF	-2,03322	0,0013282	ENSG00000119630	-
ITGA8	-2,03398	0,0002627	ENSG00000077943	<i>Renal Hypodysplasia/Aplasia 1</i>
TNFRSF21	-2,04838	0,0071245	ENSG00000146072	-

Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
HSPB3	-2,10864	0,009626	ENSG00000169271	<i>Distal Hereditary Motor Neuronopathy type IIC</i>
CPXM2	-2,13472	0,0278651	ENSG00000121898	-
GSTT1	-2,17559	0,0057553	ENSG00000184674	-
IFI27	-2,19207	0,0078556	ENSG00000165949	-
SALL1	-2,2293	0,0011783	ENSG00000103449	<i>Townes-Brocks Branchiootorenal-like Syndrome 1</i>
SALL1	-2,33881	0,0014287	ENSG00000103449	<i>Townes-Brocks Branchiootorenal-like Syndrome 1</i>
TBX5-AS1	-2,46294	0,0499259	ENSG00000255399	-
A2M	-2,61944	0,004553	ENSG00000175899	<i>Alzheimer susceptibility</i>
APCDD1	-2,86604	0,0013802	ENSG00000154856	<i>Hypotrichosis simplex</i>
CARD16	-3,23442	0,0014029	ENSG00000204397	-
GAD1	-3,2643	8,75E-06	ENSG00000128683	<i>Spastic Quadriplegic Cerebral Palsy I</i>
TBX5	-3,45333	0,0318901	ENSG00000089225	<i>Holt-Oram Syndrome</i>

Apert Sendromu 2000pM FGF2 - Kontrol 2000pM FGF2				
Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
HTATSF1P2	3,667633	1,32E-05	ENSG00000271361	-
HTATIP2	2,780028	0,005715	ENSG00000109854	-
F11R	2,589886	0,0003436	ENSG00000158769	-
TSTD1	2,577503	0,0108645	ENSG00000215845	-
EMCN	2,453782	0,0397421	ENSG00000164035	-
EMCN	2,407647	0,0189075	ENSG00000164035	-
PCOLCE2	2,360208	8,16E-05	ENSG00000163710	-
EMCN	2,029741	0,0099063	ENSG00000164035	-
PENK	2,002392	0,014711	ENSG00000181195	-
MYOZ2	1,920341	0,0015316	ENSG00000172399	<i>Familial Hypertrophic Cardiomyopathy 16</i>
ADAMTS5	1,891216	0,0039325	ENSG00000154736	-
SCARA5	1,832627	0,0236911	ENSG00000168079	-
CDH10	1,816929	0,0004713	ENSG00000040731	-
OMG	1,802783	0,0181588	ENSG00000126861	-
PAQR5	1,757914	0,0037585	ENSG00000137819	-
LOC389831	1,6823	0,0016277	ENSG00000215781	-
FKBP1A	1,679751	0,0006544	ENSG00000088832	-
FKBP1A	1,674585	0,0004874	ENSG00000088832	-
FOLR3	1,664892	0,0043923	ENSG00000110203	-
CHRDL1	1,662521	0,0043708	ENSG00000101938	<i>X-linked Megalocornea 1</i>
MYOZ2	1,619612	0,002981	ENSG00000172399	<i>Familial Hypertrophic Cardiomyopathy 16</i>
LHFPL3	1,618112	0,0001329	ENSG00000187416	-
PTPRR	1,602406	0,0008921	ENSG00000153233	-
IL13RA2	1,550771	0,015299	ENSG00000123496	-
NTN4	1,538918	0,0021803	ENSG00000074527	-
NUMA1	1,533905	0,0011817	ENSG00000137497	<i>AML (Promyelocytic)</i>
AJAP1	1,520179	0,0188265	ENSG00000196581	-
MIAT	-1,50993	0,0020101	ENSG00000225783	<i>Susceptibility to MI</i>
DKK2	-1,51173	0,0090504	ENSG00000155011	-
IL15	-1,51414	2,87E-05	ENSG00000164136	-
THBS1	-1,52847	0,0050033	ENSG00000137801	-
SERTAD4	-1,55942	0,0133976	ENSG00000082497	-
GIMAP2	-1,56072	0,0017694	ENSG00000106560	-
AHSA2	-1,5707	0,0065013	ENSG00000173209	-
CHST15	-1,58396	0,004503	ENSG0000018202	-
SERTAD4	-1,58586	0,0144283	ENSG00000082497	-
FAM20A	-1,59329	0,0252971	ENSG00000108950	<i>Amelogenesis imperfecta and gingival fibromatosis syndrome, Enamel Renal Syndrome</i>
CHN1	-1,60006	0,0033734	ENSG00000128656	<i>Duane Retraction Syndrome 2</i>



Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
HERC2P3	-1,62386	0,0002531	ENSG00000180229	-
MEOX1	-1,62799	0,0284135	ENSG00000005102	<i>Klippel Feil Syndrome 2</i>
SAMD5	-1,62962	0,0049491	ENSG00000203727	-
COL10A1	-1,63405	0,0093177	ENSG00000123500	<i>Metaphyseal Chondrodysplasia, Schmid type</i>
COL10A1	-1,67899	0,008068	ENSG00000123500	<i>Metaphyseal Chondrodysplasia, Schmid type</i>
PTPRD	-1,6797	0,0173681	ENSG00000153707	-
EGLN3	-1,69575	0,0012499	ENSG00000129521	-
CCL11	-1,6999	0,0484349	ENSG00000172156	<i>Susceptibility to asthma</i>
GAD1	-1,7438	0,00187	ENSG00000128683	<i>Spastic Quadriplegic Cerebral Palsy I</i>
EGR2	-1,77426	0,0113843	ENSG00000122877	<i>Charcot-Marie-Tooth Disease type 1D, Dejerine-Sottas Disease, Congenital Hypomyelinating Neuropathy 1</i>
CADPS	-1,77507	0,0012661	ENSG00000163618	-
CADPS	-1,78471	0,0020363	ENSG00000163618	-
MEGF10	-1,79003	0,0176606	ENSG00000145794	<i>Myopathy-Areflexia-Respiratory Distress-Dysphagia</i>
IGFBP7	-1,79291	0,0436089	ENSG00000163453	<i>Retinal arterial macroaneurysm with supra-avalvular pulmonic stenosis</i>
EGLN3	-1,80385	0,0021174	ENSG00000129521	-
MXRA5	-1,81368	0,0101667	ENSG00000101825	-
TNC	-1,82552	0,000203	ENSG00000041982	<i>Autosomal Dominant deafness 56</i>
CTAG2	-1,84045	0,005747	ENSG00000126890	-
TNFSF4	-1,84287	0,0338319	ENSG00000117586	<i>Susceptibility to myocardial infarction</i>
LONRF2	-1,8814	0,0102065	ENSG00000170500	-
A2M	-1,8871	0,0272773	ENSG00000175899	<i>Alzheimer susceptibility</i>
SHROOM3	-1,88898	0,0004884	ENSG00000138771	-
CYP3A5	-1,94662	0,0321793	ENSG00000106258	<i>Susceptibility to hypertension</i>
APCDD1	-1,94952	0,0153671	ENSG00000154856	<i>Hypotrichosis simplex</i>
F2RL2	-2,00794	0,0020853	ENSG00000164220	-
SHROOM3	-2,00852	0,0017945	ENSG00000138771	-
MIR503HG	-2,01818	0,0206343	ENSG00000223749	-

Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
HLA-DPA1	-2,07066	2,59E-06	ENSG00000231389	-
PAX3	-2,16841	3,30E-06	ENSG00000135903	<i>Craniofacial-deafness-hand syndrome, Waardenburg Syndrome type 1&amp;3</i>
FAM20A	-2,17946	0,0237877	ENSG00000108950	<i>Amelogenesis imperfecta and gingival fibromatosis syndrome, Enamel Renal Syndrome</i>
CADPS	-2,21159	0,0001113	ENSG00000163618	-
DPYSL4	-2,39929	0,0001891	ENSG00000151640	-
RARRES2	-2,66679	0,0041157	ENSG00000106538	-
RGMB	-2,79608	0,0002161	ENSG00000174136	-
RGMB	-3,42314	6,81E-05	ENSG00000174136	-

Apert Sendromu 2000pM FGF2 - Apert Sendromu 0pM FGF2				
Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
EMCN	3,408405	0,0092191	ENSG00000164035	-
CNGA3	3,01389	0,0226209	ENSG00000144191	<i>Achromatopsia 2</i>
HTATIP2	2,962671	0,004676	ENSG00000109854	-
ADH1B	2,915542	0,0274295	ENSG00000196616	<i>Alcohol dependence</i>
TSTD1	2,888109	0,0067539	ENSG00000215845	-
ADH1B	2,706491	0,0301593	ENSG00000196616	<i>Alcohol dependence</i>
EMCN	2,57723	0,0157004	ENSG00000164035	-
GSTT1	2,528287	0,0026678	ENSG00000184674	-
EMCN	2,261528	0,006326	ENSG00000164035	-
F11R	2,15454	0,0017921	ENSG00000158769	-
SCARA5	2,104387	0,0138564	ENSG00000168079	-
AGT	1,95116	0,0462087	ENSG00000135744	<i>Renal tubular dysgenesis, susceptibility to hypertension</i>
GRTP1	1,946931	0,0024466	ENSG00000139835	-
CARD16	1,935986	0,0332558	ENSG00000204397	-
PLA2G4C	1,911585	0,0209924	ENST00000354276	-
IFI27	1,889975	0,0206394	ENSG00000165949	-
OMG	1,829186	0,0197592	ENSG00000126861	-
SERPINB2	1,820312	0,0407474	ENSG00000197632	-
RASSF2	1,746621	0,0197143	ENSG00000101265	-
HTATSF1P2	1,657115	0,0088052	ENSG00000271361	-
ADAMTS5	1,621546	0,0118908	ENSG00000154736	-
NOG	1,606733	0,0381649	ENSG00000183691	<i>Brachydactyly type B2, Multiple synostosis syndrome 1, Stapes ankylosis with broad thumb and toes, Symphalangism, proximal, Tarsal-carpal coalition syndrome</i>
GOS2	1,60321	0,0125023	ENSG00000123689	-
PAQR5	1,5957	0,0082903	ENSG00000137819	-
ADIRF	1,581147	0,0116047	ENSG00000148671	-
AKR1C1	1,564372	0,0088926	ENSG00000187134	-
RABEP1	1,540381	0,0183272	ENSG00000029725	-
AKR1C2	1,528644	0,0136497	ENSG00000151632	<i>46XY sex reversal 8, Obesity, hyperphagia, and developmental delay</i>
SCARA5	1,526441	0,0044872	ENSG00000168079	-
WISP2	1,500224	0,047485	ENSG00000064205	-
PRICKLE1	-1,50604	0,0338571	ENSG00000139174	<i>Progressive myoclonic epilepsy 1B</i>
RNF150	-1,52603	0,0098324	ENSG00000170153	-

Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
MXRA5	-1,53263	0,0280569	ENSG00000101825	-
COL12A1	-1,53784	0,0299458	ENSG00000111799	<i>Bethlem Myopathy</i>
OGN	-1,53873	0,0200722	ENSG00000106809	-
PLOD2	-1,53891	0,0066078	ENSG00000152952	<i>Bruck syndrome 2</i>
COL10A1	-1,54269	0,0153191	ENSG00000123500	<i>Metaphyseal Chondrodysplasia, Schmid type</i>
GPC4	-1,54901	0,0033382	ENSG00000076716	-
F2RL2	-1,55834	0,0122516	ENSG00000164220	-
KCND3	-1,56281	0,0461698	ENSG00000171385	<i>Spinocerebellar ataxia 19</i>
WNT2	-1,56372	0,0233776	ENSG00000105989	-
COL10A1	-1,56832	0,0138892	ENSG00000123500	<i>Metaphyseal Chondrodysplasia, Schmid type</i>
PCDH10	-1,5805	0,0007475	ENSG00000138650	-
CILP	-1,60696	0,0191425	ENSG00000138615	<i>Susceptibility to Lumbar disc disease</i>
IQCA1	-1,60875	0,0056991	ENSG00000132321	-
DKK2	-1,6383	0,0067941	ENSG00000155011	-
KLF5	-1,63899	0,0188711	ENSG00000102554	-
ASPM	-1,64452	0,0416313	ENSG00000066279	<i>Primary autosomal recessive microcephaly</i>
EGR2	-1,6459	0,019853	ENSG00000122877	<i>Charcot-Marie-Tooth Disease type 1D, Dejerine-Sottas Disease, Congenital Hypomyelinating Neuropathy 1</i>
SORBS2	-1,64977	0,0121653	ENSG00000154556	-
THBS1	-1,65017	0,0037489	ENSG00000137801	-
PRICKLE1	-1,6551	0,0209924	ENSG00000139174	<i>Progressive myoclonic epilepsy 1B</i>
LOXL2	-1,66652	0,0181812	ENSG00000134013	-
TOP2A	-1,67169	0,0450502	ENSG00000131747	-
IGJ	-1,67859	0,0094418	ENSG00000132465	-
MICAL2	-1,68693	0,0192129	ENSG00000133816	-
GPR126	-1,69615	0,0179334	ENSG00000112414	-
EDIL3	-1,69989	0,0309994	ENSG00000164176	-
EGFL6	-1,70149	0,0060608	ENSG00000198759	-
CCDC85A	-1,70234	0,0168146	ENSG00000055813	-
ST6GAL2	-1,70245	0,0006664	ENSG00000144057	-
RGCC	-1,71417	0,0476152	ENSG00000102760	-
KRT7	-1,71832	0,0160459	ENSG00000135480	-
GSTT2	-1,72064	0,0004592	ENSG00000099984	-
DLGAP5	-1,72506	0,0473622	ENSG00000126787	-

Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
TLL2	-1,73317	0,0499914	ENSG00000095587	-
PNMAL1	-1,73377	0,0117517	ENSG00000182013	-
PTPRD	-1,76295	0,0159299	ENSG00000153707	-
DSP	-1,77292	0,0066396	ENSG00000096696	<i>Arrhythmogenic right ventricular dysplasia 8, Dilated cardiomyopathy with woolly hair and keratoderma, Epidermolysis bullosa, lethal acantholytic, Keratosis palmoplantaris striata II, Skin fragility-woolly hair syndrome</i>
LDLRAD4	-1,78508	0,0440851	ENSG00000168675	-
LPPR4	-1,78723	0,0404739	ENSG00000117600	-
LOXL3	-1,79402	0,0034542	ENSG00000115318	-
BCHE	-1,79546	0,031209	ENSG00000114200	<i>Postanesthetic apnea</i>
HS6ST2	-1,79828	0,0052655	ENSG00000171004	-
NRXN3	-1,80565	0,0368708	ENSG00000021645	-
SERTAD4	-1,81235	0,0031676	ENSG00000082497	-
DPYSL4	-1,81642	0,0021057	ENSG00000151640	-
MEGF10	-1,81706	0,0191842	ENSG00000145794	<i>Myopathy-Areflexia-Respiratory Distress-Dysphagia</i>
ERAP1	-1,84372	0,0227484	ENSG00000164307	-
MICAL2	-1,84402	0,0122392	ENSG00000133816	-
NOX4	-1,86292	0,0149734	ENSG00000086991	-
AQP1	-1,87445	0,0078476	ENSG00000240583	<i>Aquaporin 1 deficiency</i>
KIAA1211	-1,87686	0,001289	ENSG00000109265	-
BGN	-1,90466	0,0116204	ENSG00000182492	-
BGN	-1,90992	0,0148951	ENSG00000182492	-
TSPAN2	-1,91795	0,0148241	ENSG00000134198	-
MEST	-1,9205	0,001369	ENSG00000106484	-
SERTAD4	-1,92153	0,0048454	ENSG00000082497	-
LEF1	-1,9225	0,0218608	ENSG00000138795	<i>Somatic sebaceous tumors</i>
PRICKLE1	-1,92768	0,0326213	ENSG00000139174	<i>Progressive myoclonic epilepsy 1B</i>
F2RL1	-1,9295	0,0182024	ENSG00000164251	-
PRR15	-1,96168	0,0469544	ENSG00000176532	-
TEK	-1,98396	0,0019289	ENSG00000120156	<i>Multiple cutaneous and mucosal venous malformations</i>
ADTRP	-1,98506	0,0197791	ENSG00000111863	-
KIAA1211	-2,00034	0,0005468	ENSG00000109265	-

Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
SERTAD4	-2,02261	0,0041843	ENSG00000082497	-
ZIC1	-2,03399	0,0143401	ENSG00000152977	<i>may be related to Dandy-Walker Malformation</i>
SERTAD4	-2,04097	0,0032253	ENSG00000082497	-
HAPLN1	-2,06198	0,0237342	ENSG00000145681	-
VCAM1	-2,07251	0,0339072	ENSG00000162692	-
TNFSF4	-2,11285	0,0208305	ENSG00000117586	<i>Susceptibility to myocardial infarction</i>
EPHA3	-2,14052	0,0220737	ENSG00000044524	-
FILIP1	-2,14217	0,0302221	ENSG00000118407	-
LONRF2	-2,15051	0,0055888	ENSG00000170500	-
CRISPLD1	-2,16042	0,0110996	ENSG00000121005	-
MIR503HG	-2,19684	0,0157771	ENSG00000223749	-
TAGLN	-2,19707	0,0067232	ENSG00000149591	-
MPPED2	-2,30132	0,0023869	ENSG00000066382	-
TSPAN2	-2,34065	0,0460063	ENSG00000134198	-
PHACTR3	-2,34248	0,007484	ENSG00000087495	-
NEDD9	-2,35481	0,0114732	ENSG00000111859	-
EFEMP1	-2,44268	0,0131553	ENSG00000115380	<i>Doyne honeycomb degeneration of retina</i>
EFEMP1	-2,47676	0,0116549	ENSG00000115380	<i>Doyne honeycomb degeneration of retina</i>
IGFBP7	-2,49621	0,0141303	ENSG00000163453	<i>Retinal arterial macroaneurysm with supravalvular pulmonic stenosis</i>
IGFBP7	-2,5068	0,0100992	ENSG00000163453	<i>Retinal arterial macroaneurysm with supravalvular pulmonic stenosis</i>
POSTN	-2,53724	0,0089028	ENSG00000133110	-
RARRES2	-2,63803	0,0053795	ENSG00000106538	-
COL8A1	-2,65295	0,0150061	ENSG00000144810	-
HAPLN1	-2,67514	0,0213029	ENSG00000145681	-
PCSK1	-2,67629	0,043917	ENSG00000175426	<i>Obesity with impaired prohormone processing</i>
AFF3	-2,70746	0,009944	ENSG00000144218	-
POSTN	-2,79873	0,0315575	ENSG00000133110	-
EPYC	-3,15166	0,0136296	ENSG00000083782	-
FLG	-3,32757	0,0047832	ENSG00000143631	<i>Ichthyosis vulgaris</i>
COMP	-3,41166	0,0271327	ENSG00000105664	<i>Epiphyseal dysplasia, multiple 1; Pseudoachondroplasia</i>
POSTN	-3,43447	0,0137756	ENSG00000133110	-

Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
HAPLN1	-3,48753	0,018312	ENSG00000145681	-
COL11A1	-3,65324	0,0227064	ENSG00000060718	<i>Fibrochondrogenesis, Marshall syndrome, Stickler syndrome, type II</i>
COL11A1	-3,95464	0,0235739	ENSG00000060718	<i>Fibrochondrogenesis, Marshall syndrome, Stickler syndrome, type II</i>

Kontrol 2000pM FGF2 - Kontrol OpM FGF2				
Symbol	logFC	P.Value	Ensembl Gene ID	OMIM
CYP3A5	2,63302	0,0080829	ENSG00000106258	<i>Susceptibility to hypertension</i>
ERAP2	2,541981	0,020559	ENSG00000164308	-
ERAP2	2,397458	0,0266755	ENSG00000164308	-
LOC389831	2,125317	0,0066276	ENSG00000215781	-
ERAP2	2,068791	0,0197314	ENSG00000164308	-
CTAG2	1,816083	0,0075289	ENSG00000126890	-
CLIC3	1,684717	0,0032201	ENSG00000169583	-
IGFBP5	1,656154	0,0011987	ENSG00000115461	-
TMTC1	1,581444	0,0411252	ENSG00000133687	-
CSTA	1,580778	0,0048146	ENSG00000121552	<i>Autosomal recessive exfoliative ichthyosis</i>
IGFBP5	1,576698	0,0062716	ENSG00000115461	-
RP11-696N14.1	1,56734	0,0358198	ENSG00000246090	-
SCUBE3	1,566715	0,0246496	ENSG00000146197	-
CPVL	1,512554	0,0270152	ENSG00000106066	-
SHROOM2	-1,54369	0,0022028	ENSG00000146950	-
THSD7A	-1,56048	0,0023299	ENSG00000005108	-
HTR2B	-1,57118	0,0039211	ENSG00000135914	-
ITGA8	-1,6958	0,0013967	ENSG00000077943	<i>Renal Hypodysplasia/Aplasia 1</i>
NEDD9	-1,73595	0,0480222	ENSG00000111859	-
ITM2A	-1,7445	0,0031154	ENSG00000078596	-
A2M	-1,74856	0,0434235	ENSG00000175899	<i>Alzheimer susceptibility</i>
CARD16	-1,7586	0,0494417	ENSG00000204397	-
LPPR4	-1,7889	0,0403178	ENSG00000117600	-
ZNF880	-1,84346	0,0326898	ENSG00000221923	-
AFF3	-2,03754	0,0398216	ENSG00000144218	-