

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

**OKULOARİKULOVERTEBRAL  
SPEKTRUM ETYOLOJİSİNDE  
GENETİK NEDENLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Naz GÜLERAY**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA  
2018**



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

**OKULOARİKULOVERTEBRAL  
SPEKTRUM ETYOLOJİSİNDE  
GENETİK NEDENLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Naz GÜLERAY**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mehmet ALİKAŞİFOĞLU**

**ANKARA  
2018**

## ONAY SAYFASI



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
 Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

18.10.2018

## TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Dr. Naz Güleray'ın 18.10.2018 tarihinde jürimiz onurunda savunmasını yaptığı " Okuloaurikulovertebral Spektrum Etiyolojisinde Genetik Nedenlerin Araştırılması" başlıklı tez çalışması jürimiz tarafından Tıbbi Genetik programında uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla arz ederim.

Jüri Başkanı:  
(Danışman)

Prof. Dr. Mehmet ALIKAŞIHOĞLU  
 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
 Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye:

Prof. Dr. Ayşe Nurten AKARSU  
 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
 Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye:

Prof. Dr. Sevilhan ARTAN  
 Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
 Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

## ONAY:

Bu tez, Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Dekanlığı tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent ALTUN  
 Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecinde bilgi, birikim ve deneyimleri ile bana yol gösteren Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Alikashiöglu'na,

Çalışmamıza değerli görüşleri ile katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Nurten Akarsu'ya,

Hastaların klinik tanı, takip ve değerlendirmelerinde bana yol gösteren, klinik genetik bilgimi borçlu olduğum Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. G. Eda Utine'ye ve Öğretim Üyesi Doç. Dr. Pelin Özlem Şimşek Kiper'e,

Tez çalışmasının ekzom analizleri ve veri değerlendirilmesi aşamalarında çözüm önerileriyle yol gösteren ve ilk başladığım günden itibaren laboratuvar yöntemleri ile bilgilerini benden esirgemeyen Dr. Öğr. Gör. Z. Ekim Taşkiran'a ve Can Koşukcu'ya,

Tez çalışmasının laboratuvar uygulamalarında desteğini esirgemeyen Bio. Serkan Kabaçam başta olmak üzere bir parçası olmaktan gurur duyduğum Genetik ailesine,

Tez çalışmasının yapılmasını sağlayan projemize destek olan HÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne

Üniversiteden sonra yakın can arkadaş bulunması zor tabusunu yıktıran, tesadüfi karşılaşmaların dostlukla sonuçlandığını bana gösteren birlikte çok başarılı olacağımız Uzm. Dr. Işık Ünal'a ve Dr. Zeynep Bengisu Kaya'ya

Son olarak; günlere gelmemi sağlayan, benim için her fedakarlığı yapan, her zaman yanımda olan, hayata karşı güçlü duruşlarıyla bana örnek olan anneme, babama, kedi oğluma, ve eşime

Teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Guleray, N. Okuloaurikulovertebral Spektrum Etyolojisinde Genetik Nedenlerin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018** Okulo-aurikulo-vertebral spektrum (OAVS) birinci ve ikinci farengal arkların gelişimsel defektleri sonucunda oluşan genetik ve fenotipik heterojenite gösteren nadir bir hastalıktır. Bu çalışmada çeşitli klinik bulgulara sahip 23 OAVS hastasında genetik etyoloji araştırılmıştır. İlk basamakta kopya sayısı değişikliklerini saptamaya yönelik *Affymetrix CytoScan Optima* platformunda mikrodizin analizleri yapılmıştır. Sonra *ABI Prism 3500* cihazında *Sanger* dizileme yöntemi ile *MYT1* geni dizi analizleri tamamlanmıştır. Ek olarak; iki hastada tüm ekzom dizileme gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşımlar sonucunda; üç hastada 8., 15., ve 16. kromozomlarda kopya sayısı değişiklikleri gösterilmiştir. İlgili değişikliklerin klinik ilişkisi inkomplet penetrans ve monoalelik ekspresyon çerçevesinde tartışılmıştır. Ayrıca 8. kromozomdaki delesyonun genom mimarisini değiştirerek klinik ile ilişkili olacağı düşünülmüştür. Ek olarak; hastaların bir tanesinde periferik kandan yapılan kromozom analizi sonucunda X ve 4. kromozomlar arasında *de novo* dengesiz translokasyon gösterilmiş ve patojenik olarak değerlendirilmiştir. *MYT1* geni dizi analizi sonucunda klinik anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Tüm ekzom dizileme analizi sonucunda ise; hastaların birinde OAVS ile örtüşen klinik bulgular görülen Mandibulofasiyal Dizostozis ve Mikrosefali birlikteliğinden sorumlu *EFTUD2* geninde *novel* heterozigot mutasyon saptanmıştır. Tüm ekzom dizileme yapılan diğer hastada; OAVS aday geni olarak nitelendirilen *RNF213* geninde *novel missense* bir mutasyon gözlenmiştir. 16p13.11 bölgesi duplikasyonu, X kromozomu anöploidileri ve *EFTUD2* genindeki değişiklikler önceki çalışmalarda da OAVS moleküler etyolojisinde tanımlanmış durumdadır. Hastalarda farklı kromozomlarda kopya sayısı değişikliklerinin yanı sıra tek gen değişikliklerinin gösterilmesi spektrumdaki geniş genetik heterojeniteyi desteklemektedir. Bu çalışma; OAVS benzeri kompleks fenotipik bulgulara sahip hastalıklarda genetik etyolojinin tanımlanmasında mikrodizin analizi ve tüm ekzom dizileme gibi genom boyu ölçeğinde gerçekleştirilen yöntemlerin önemini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** OAVS, mikrodizin analizi, 16p13.11, *EFTUD2*, *RNF213*

**Destekleyen Kuruluş:** Bu çalışma HÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (TTU-2018-16935).

## ABSTRACT

**Guleray, N. Investigation of Genetic Causes in Oculoauriculovertebral Spectrum Etiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Medical Genetics Specialty Thesis, Ankara, 2018** Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum (OAVS) is a genetically and phenotypically heterogeneous disorder which occurs due to a developmental defect in the first and second pharyngeal arches. In this study, 23 OAVS patients with diverse clinical findings were studied to identify the genetic etiology of this disorder. Patients were screened for copy number variations using the *Affymetrix* CytoScan Optima array Kit and also screened for *MYT1* mutations using BigDye terminator on an ABI Prism 3500 genetic analyzer. Furthermore, two patients underwent WES analysis. Using these approaches, three CNVs (one deletion, two duplications) were found in chromosomes 8, 15, 16. The clinical relevance of the copy number variations is discussed within the framework of incomplete penetrance and monoallelic expression. In addition, the deletion on the 8th chromosome was thought to be associated with clinical findings by altering the genome architecture. In addition, a *de novo* unbalanced translocation; between X and 4th chromosomes was found in one of the patients and was considered pathogenic. No causative mutation was found in *MYT1* gene. WES analysis revealed a novel heterozygous *nonsense* mutation in *EFTUD2*; responsible for Mandibulofacial Dysostosis with Microcephaly that has common clinical findings with OAVS. In the other patient who underwent WES analysis a novel heterozygous *missense* mutation was identified in *RNF213*, which was previously suspected as a candidate gene for OAVS. Duplication of 16p13.11 region, aneuploidies of X chromosome and *EFTUD2* mutations were previously implicated in OAVS molecular etiology. This study provides further genetic heterogeneity to this disorder, confirming the importance of microarray-based studies and whole exome sequencing analysis in patients with a complex phenotypic disorder such as OAVS.

**Keywords:** OAVS, microarray, 16p13.11, *EFTUD2*, *RNF213*

**Supported by:** This study was supported by Hacettepe University Faculty of Medicine Scientific Research Projects Coordination Unit (TTU-2018-16935).

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kulak Anatomisi ve Fizyolojisi	3
2.1.1. Dış Kulak Anatomisi	4
2.2. Kulak Embriyolojisi	5
2.2.1. Dış Kulak Gelişimi	7
2.2.2. Orta Kulak ve İç Kulak Gelişimi	9
2.3. Kulak Gelişiminin Genetik Kontrol Mekanizmaları	9
2.4. Kulak Anomalileri	13
2.4.1. Mikrotia	14
2.5. Okuloaurikulovertebral Spektrum (OMIM 164210)	21
2.5.1. OAVS Tarihçe	21
2.5.2. OAVS Minimal Tanı Kriterleri	22
2.5.3. OAVS Klinik Bulgular	23
2.5.4. OAVS Etiyoloji	27
2.5.5. OAVS Ayırıcı Tanı	32
3. BİREYLER VE YÖNTEM	34
3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme, Çözelti ve Cihazlar	34
3.1.1. Periferik Kandan DNA Eldesi ve Kantitasyon	34
3.1.2. Genom Boyu Kopya Sayısı Değişikliklerinin Belirlenmesi	34
3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve DNA Dizi Analizi	34
3.1.4. Tüm Ekzom Dizi Analizi	35



3.2. Hastaların Değerlendirilmesi	36
3.2.1. Hastaların Farklı Açılardan Fotoğraflarının Çekilmesi ve Sınıflandırması	36
3.3. Periferik Kandan Genomik DNA Eldesi ve Kantitasyon	37
3.4. Genom Boyu Kopya Sayısı Değişikliği Taraması	38
3.4.1. Mikrodizin Sonuçlarının Analizi	44
3.5. <i>MYT1</i> Geni Dizi Analizi	44
3.5.1. <i>MYT1</i> Geni Primerlerinin Tasarlanması	44
3.5.2. <i>MYT1</i> Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu	45
3.5.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	47
3.5.4. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu	47
3.5.5. <i>MYT1</i> Geni Dizi Analizi	47
3.5.6. DNA Dizileme Ürünlerinin Pürifikasyonu	48
3.5.7. <i>MYT1</i> Geni Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	48
3.6. Ekzom Analizi Öncesinde Aday Genlerin Belirlenmesi	48
3.7. Tüm Ekzom Dizileme	49
3.7.1. Kütüphane Oluşturulması	50
3.7.2. Kütüphane Amplifikasyonu ve Dizileme	51
3.7.3. Tüm Ekzom Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi	54
4. BULGULAR	56
4.1. Klinik Bulgular	56
4.2. Laboratuvar Bulguları	61
4.2.1. Mikrodizin Analizi Sonuçları	61
4.2.2. <i>MYT1</i> Geni <i>Sanger</i> Dizileme Sonuçları	64
4.2.3. Tüm Ekzom Dizileme Sonuçları	68
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
7. KAYNAKLAR	88
8. EKLER	95
EK-1. Literatürde kulak fenotipleri ile ilişkilendirilmiş genler	95
EK-2. Hastaların pedigrileri ve detaylı klinik bulguları	97

## SİMGELER VE KISALTMALAR

μL	Mikrolitre
AK	Aort Koarktasyonu
AP-2	Activating Protein 2
ASD	Atrial Septal Defekt
bam	Binary Alignment File
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMP	Bone morphogenetic protein
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
BMP5	Bone morphogenetic protein 5
bp	Base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
BT	Bilgisayarlı Tomografi
C2HC	CysCysHisCys
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CNV	Copy number variation
<i>DGV</i>	Database of Genomic variants
dk	dakika
DKY	Dış Kulak yolu
DLX	Drosophila distal-less
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleik trifosfat
EDN1	Endotelin-1
EDNRA	Endothelin Receptor Type A
EDTA	Etilen-Diamin-Tetra_Asetik asit
ET-1	Endotelin-1
<i>EXAC</i>	The Exome Aggregation Consortium
EYA1	Eyes absent homolog 1
F	Forward
FGF	Fibroblast growth factor
FGF10	Fibroblast growth factor 10
FGF8	Fibroblast growth factor 8
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
g	Gravity
GB	Gigabit
GHZ	Gigahertz
GRCh37	Genome Reference Consortium Human Build 37
Gsc	Gooseoid
GÜS	Genitoüriner sistem
hg19	Human genome 19
HMX1	H6 Family <i>Homeobox</i> 1
HomSI	Homozygous Stretch Identifier
<i>HOXA1</i>	<i>Homeobox</i> A1
<i>HOXA2</i>	<i>Homeobox</i> A2
HOXB1	<i>Homeobox</i> B1

IGV	Integrative genomics viewer
ISP	Ion sphere particles
kb	kilobaz
KEGG	Kyoto Encyclopedia of genes and genomes
LOD	Logarithm of the odds
MAF	Minör alel frekansı
MAPD	Median absolute pairwise difference
Mb	Milyon baz
mg	miligram
miRNA	MikroRNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmu	Mus musculus
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mesajcı RNA
Msx	Msh <i>homeobox</i> 1
MY	Mitral yetmezlik
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCC	Neural crest cell
ng	Nanogram
NIH	National Institutes of Health
NSAI	Non-steroid anti inflamatuvar
OAFNS	Okulo-aurikulo-frontonazal sendrom
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
<i>OTX2</i>	Orthodenticle <i>Homeobox</i> 2
PAT	Phenotypic assessment tool
PAX8	Paired Box 8
Pbx	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Patent ductus arteriozus
PFO	Patent foramen ovale
Prx	Periaxin
PS	Pulmoner stenoz
Ptx	pentraxin
R	Reverse
RAM	Random access memory
RAR	Retinoic acid receptor alpha
rpm	Revolutions per minute
rs	Reference snp
SALL1	Spalt Like Transcription Factor 1
SCC	Semisirkuler kanal
SD	Standart deviasyon
SHH	Sonic hedgehog
<i>SIX1</i>	Sineoculis <i>homeobox</i> homolog 1
<i>SIX6</i>	Sineoculis <i>homeobox</i> homolog 6
sn	saniye
SNP	Single nucleotide polymorphism
snpQC	SNP quality control

SSS	Santral sinir sistemi
TB	Terabit
TBE	Tris-borate-EDTA
TBX1	T-box transcription factor
TCOF1	Treacle Ribosome Biogenesis Factor 1
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TE	Tris-EDTA
TGA	Transposition of the great arteries
T <sub>m</sub>	Melting Temperature
tsv	Tab-separated values
UCSC	University of California, Santa Cruz
UV	Ultraviyole
V	Volt
vcf	Variant call format
VSD	Ventrikuler septal defekt
WNT	Wingless
WNT5a	wingless-type MMTV integration site family, member 5A

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kulağın anatomik yapısı	3
2.2. Dış kulağın anatomik yapısı	5
2.3. Embriyolojik dönemde farengial apparatusun gelişimi	6
2.4. Embriyolojik dönemde dış kulak yapısını oluşturan tomurcuklar	8
2.5. Farengial arklardaki paternler	11
2.6. Farengial ark yapılarında karşılıklı moleküler etkileşim	12
2.7. Tomurcuk defektlerine göre mikrotia sınıflaması	16
2.8. Sendromlarda gözlenen dış kulak anomalileri	20
2.9. OAVS hastalarının kraniyofasiyal bulguları	25
2.10. <i>MYT1</i> protein yapısı ve domainleri	29
3.1. <i>Affymetrix</i> mikrodizin yöntemi basamakları akış şeması	38
3.2. <i>Affymetrix</i> çiplerine hibridizasyon solüsyonlarının yüklenmesi	42
3.3. Mikrodizin sonuçlarının Cyhp görüntüsü	43
3.4. Primer dizilerinin <i>Blast</i> programı ile değerlendirilmesi	45
3.5. Kütüphane oluşturma basamaklarının akış şeması	51
3.6. Tüm ekzom dizileme sonucu filtreleme basamakları	55
4.1. Hasta 10'un periferik kandan yapılan kromozom analizi	62
4.2. <i>GeneMANIA</i> veri tabanı kullanımı	64
4.3. Hastalarda saptanan değişikliklerin elektroferogram görüntüleri	67
4.4. rs78568430 değişikliğinin <i>Consurf</i> veri tabanında değerlendirilmesi	68
4.5. Hasta 16'da gerçekleştirilen filtreleme basamakları	69
4.6. <i>RNF213</i> değişikliğinin <i>PredictSNP</i> veri tabanında gösterimi	70
4.7. Hasta 16'nın <i>RNF213</i> genindeki mutasyonun IGV görüntüsü	70
4.8. Hasta 18'de gerçekleştirilen filtreleme basamakları	71
4.9. Hasta 18'in <i>EFTUD2</i> genindeki mutasyonun IGV görüntüsü	71
5.1. 8. Kromozom <i>Hi-C</i> görüntüsü	78
5.2. Kulak bulgusu olan 16p13.11 bölgesi duplikasyonlarının görünümü	80
5.3. <i>EFTUD2</i> geni ve <i>domainleri</i>	84

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Farengial arkların oluşturduğu iskelet, kas, sinir ve damar yapıları	7
2.2. Dış kulak anomalileri	13
2.3. Mikrotia sınıflaması	15
2.4. Dış ve orta kulak gelişiminde görevli gen defektleri	20
2.5. OAVS yıllar içerisinde değişen nomenklatür	22
2.6. Literatürde bulunan minimal tanı kriterleri	23
2.7. OAVS’de görülen dış-orta-iç kulak anomalileri	25
2.8. Literatürde OAVS ile ilişkilendirilmiş kopya sayısı değişiklikleri	30
2.9. Literatürde tanımlanmış <i>MYT1</i> mutasyonları	31
2.10. OAVS ayırıcı tanıda yer alan sendromlar ve sorumlu genler	32
2.11. OAVS ayırıcı tanısında yer alan sendromların karşılaştırılması	33
3.1. Çalışmada kullanılan sınıflandırma kriterleri	37
3.2. Mikrodizin PCR master miksinin içeriği	40
3.3. Hibridizasyon master miks içeriği	42
3.4. <i>MYT1</i> geni primerleri listesi	46
3.5. <i>MYT1</i> geni PCR Koşulları	46
4.1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri	58
4.2. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin istatistiksel tablosu	59
4.3. Hastaların revize edilmiş Tasse kriterlerine göre sınıflaması	60
4.4. Sınıflama sonucunda alt gruplarda klinik bulgu görülme oranları	60
4.5. Hastaların mikrodizin analizi sonuçları	63
4.6. Hastaların <i>MYT1</i> geni dizi analizi sonucunda saptanan değişiklikler	65
5.1. Mozaik trizomi 4 ile 10 nolu hastanın bulgularının karşılaştırılması	75
5.2. 16p13.11 duplikasyonu saptanan OAVS hastası ile 23 nolu hastanın bulgularının karşılaştırılması	79
5.3. <i>EFTUD2</i> mutasyonu saptanan hastalar ile 18 nolu hastanın bulgularının karşılaştırılması	83

## 1. GİRİŞ

Konjenital anomaliler embriyogenezi etkileyen malformasyonlar, embriyonik ve fetal büyümeyi etkileyen intrauterin deformasyonlar ya da disrupsiyonlar sonucunda görülür. Konjenital anomalilerin yaklaşık üçte birini oluşturan kraniyofasiyal anomaliler geniş ve heterojen bir klinik spektrumda karşımıza çıkar (1). Klinik bulgular kraniyum, maksilla, mandibula, zigomatik ark, burun, gözler, kulak, damak/dudak ve dişlerin etkilenmesine bağlı olarak çok değişken olabilir. Kraniyofasiyal yapıların normal embriyolojik gelişimi ve farklılaşmasındaki bozukluklar sonucunda görülen kraniyofasiyal anomaliler infant mortalite ve morbiditesinin ana nedenlerindedir. Kraniyofasiyal anomalilerin eşlik ettiği 500'den fazla sendrom bulunur. Kraniyofasiyal anomaliler içerisinde kulak anomalileri yarık damak/dudaktan sonra en sık görülen konjenital kraniyofasiyal anomalidir (2, 3). Yenidoğanlarda kulak anomalileri 3800 canlı doğumda 1 olarak görülür. Dış kulak anomalileri de 6000 canlı doğumda 1 olarak karşımıza çıkar. Kulak anomalileri bireyler ve aileleri için sosyal ve psikolojik bir sağlık sorunudur.

Kulak anomalileri kulağın etkilenen bölümlerine göre dış kulak, orta kulak ve iç kulak anomalileri olarak üçe ayrılır. Dış kulak; aurikula ve dış kulak yolundan oluşur. Dış kulak anomalileri dış kulak yapısı ve dış kulak yolunun etkilendiği gelişimsel bozukluklardır. Mikrotia; aurikulanın yetersiz ve az gelişimi olarak tanımlanır ve ortalamanın 2 SD altında dış kulak boyutu ile karakterizedir. Mikrotia; anotiaya (dış kulak yokluğu) kadar geniş bir klinik yelpazede görülen dış kulağın yapısal konjenital malformasyonudur. Mikrotia ya da anotia izole olarak ya da yarık damak, kardiyak anomaliler başta olmak üzere diğer sistem bulguları ile beraber bir genetik sendromun parçası olarak karşımıza çıkar. Bu sendromlardan Okulo-aurikulo-vertebral spektrum (OAVS) klinikte mikrotia, hemifasiyal mikrozomi ve *preauriküler skin tag* birlikteliğinden anotia, vertebra, böbrek, göz, kalp anomalileri gibi geniş bir spektrumda görülür. Bu spektrumun minimal tanı kriteri izole mikrotia olarak kabul edilir (4).

OAVS'ye neden olan genetik etyoloji tam olarak aydınlatılmamıştır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda otozomal dominant ve resesif kalıtım gösteren ailesel formlar tanımlanmıştır. Ayrıca sporadik ve multifaktöriyel

kalıtım gösterilmiştir. Hastalarda birden fazla kromozomal bölgede kopya sayısı değişiklikleri (CNV) de tanımlanmış durumdadır. Tüm ekzom dizileme yöntemi kullanılarak 2016 yılında yapılan bir çalışmada OAVS spektrumuna *MYT1* genindeki değişikliklerin yol açtığı öne sürülmüş, 2017 yılında benzer kliniğe sahip hastalarda da *MYT1* geninde varyantların saptanması sonucu ilgili genin nedenselliği güçlenmiştir (3, 5). Ancak çoğu hastada bu gendeki mutasyonların gösterilememesi spektrumda genetik heterojenite oranının yüksek olduğunu gösterir.

Bu tez çalışması kapsamında klinik bulguları OAVS ile uyumlu 23 hastada, sistematik klinik değerlendirme yapılmıştır. Hastalıktan sorumlu moleküler temel mikrodizin, aday gen dizileme ve tüm ekzom dizileme yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle; literatürde bildirilen çeşitli kopya sayısı değişikliklerinden yola çıkılarak genom boyu kopya sayısı değişiklikleri araştırılmıştır. Kopya sayısı değişikliği saptanmayan hastalarda *MYT1* geni dizi analizi yapılmış, son olarak da herhangi bir değişiklik saptanmayan iki hastada tüm ekzom dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda yeni aday genler belirlenmiş, laboratuvar verileri sistematik klinik değerlendirme ile tartışılmıştır. Yeni aday genlerin belirlenmesi, uygun genetik testlerin planlanması, klinik yönetim, genetik danışma, risk değerlendirmesi ve prognoz için yol göstericidir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kulak Anatomisi ve Fizyolojisi

Kulak anatomik olarak dış, orta ve iç kulak olmak üzere üç farklı bölümden (Şekil 2.1.) oluşur. Dış kulak aurikula ve dış kulak yolunu içerir. Aurikula sesleri toplayan kulak kısmıdır ve çoğunlukla elastik kıkırdaktan oluşur. Aurikula ayrıca, sesin gelme yönünü anlamamızı sağlar. Dış kulak yolu ise çevreden toplanan ses dalgalarının eksternal akustik membrandan geçerek kulak kanalı içindeki timpanik membrana doğru yönlendirilmesinde görevlidir (6, 7).

Ses iç kulağa hava yolu iletimi ve kemik yolu iletimi olmak üzere iki tür iletim şekli ile ulaşır. Hava yolu ile iletiminde ses; dış kulak yolu, kulak zarı, kemikçikler, oval pencere aracılığı ile iç kulağa iletilir. Kemik yolunda ise kafatasını oluşturan kemiklerin titreşimi ile sesin iletimi söz konusudur.



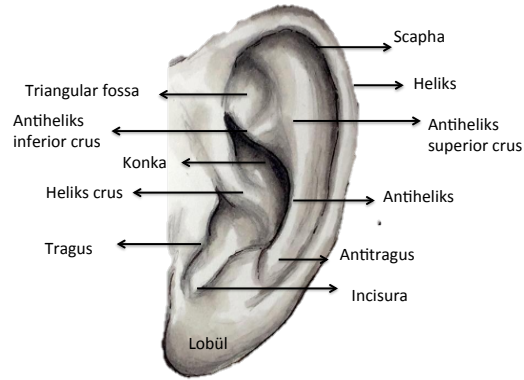
**Şekil 2.1.** Kulağın anatomik yapısı: aurikula ve dış kulak yolu ok ile gösterilmiştir. (Çizim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

Orta kulak; ses dalgalarını timpanik membran aracılığıyla mekanik harekete dönüştüren kısımdır ve inkus, stapes ve malleus olarak isimlendiren kemikçikleri içerir. Orta kulağın görevi ses titreşimlerinin iç kulağa iletilmesi ve şiddetli ses titreşimlerinden iç kulağı korunmasıdır. Kemikçik zincirinin birlikte hareketi ve stapes ile oval pencere arasındaki yüzey farkı sayesinde ses şiddeti artarak iç kulağa iletilir.

İç kulakta ise, işitme ve denge organları yer alır. Korti organına ulaşan mekanik enerji, iç saç hücrelerinde elektrik potansiyelleri şeklinde sinirsel uyarıya dönüşür. Sinir lifleri bu elektrik potansiyellerini daha yukarı merkezlere taşır. Koklear çekirdeklerden, temporal lobdaki işitme merkezine gelen uyarılar birleştirilir ve sesin algılanıp yorumlanması gerçekleşir (6). Bu çalışmada ağırlıklı olarak dış kulak anomalileri yer almaktadır, bu nedenle dış kulak anatomisi bölüm 2.1.1.'de detaylandırılmış, embriyolojik gelişim bölüm 2.2.'de orta ve iç kulak embriyolojik gelişimi ile birlikte sunulmuştur.

### **2.1.1. Dış Kulak Anatomisi**

Dış kulak cilt, kıkırdak ve altı tane intrinsik kastan oluşur. Dış kulak temel olarak tragus, antitragus, heliks ve antiheliks yapılarını içerir. Antiheliks; antitragustan başlayan, konka, *triangular fossa* ve *scapha* yapılarını birbirinden ayıran Y şeklinde kıvrık bir kıkırdak oluşumdur. Dış kulağın üst kısmına doğru aralarında *triangular fossa* kalacak şekilde *inferior crus* ve *superior crus* olmak üzere ikiye ayrılır. Antiheliks *inferior crus*'u antiheliks kıvrımı ikiye ayrıldıktan sonra kulağın önüne doğru uzanan ve konka ile *triangular fossa*'yı birbirinden ayıran kıkırdak yapısıdır. Antiheliks; *superior crus* antiheliks kıvrımı ikiye ayrıldıktan sonra kulağın arka kısmına doğru uzanan ve *scapha* ile *triangular fossayı* birbirinden ayıran kıkırdak oluşumdur. Belirtilen dış kulak yapıları Şekil 2.2. üzerinde gösterilmiştir.



**Şekil 2.2.** Dış kulağın anatomik yapısı (Çizim: Christy Tortland, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

Antitragus ise antiheliks kıvrımının başlangıcı ile *incisura* arasında yer alan kıkırdak çıkıntısıdır. Konka, tragus, *incisura*, antitragus ve antiheliks *inferior crus* tarafından sınırlandırılan ve dış kulak yolunun açıldığı kulak kısmıdır. Heliks ise kulağın en dıştaki kıvrımıdır. Kulağın temporal kemiğe komşu en üst kısmından başlayarak lob seviyesine kadar uzanır. Heliks *crus* yükselen heliks yapısının *anteroinferior* devamıdır. Dış kulak yolunun hemen üzerinde yer alır. Lob aurikulanın en alttaki yumuşak kısmıdır. *Scapha* yapısı ise heliks ve antiheliks arasındaki çukurdur. Tragus dış kulak meatusunun önünde yer alan kıkırdak kısmıdır ve hemen altında yer alan *incisura* yapısı ile devam etmektedir.

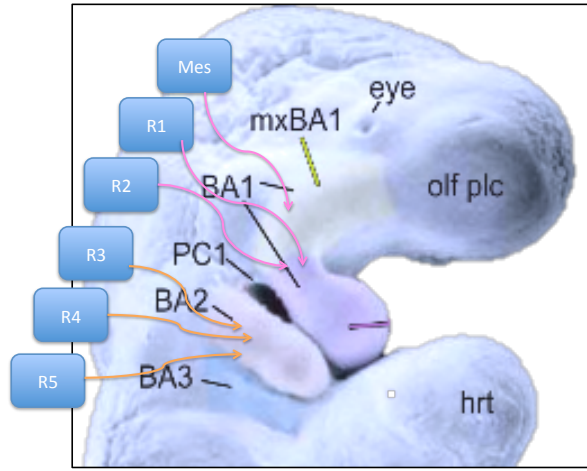
## 2.2. Kulak Embriyolojisi

Kulağın embriyolojik gelişimi insanlarda ve hayvanlarda 19. yüzyıldan itibaren araştırılmaktadır (8). Kulak her üç germ yaprağından köken alan dokulardan oluşur (9). Kulak gelişimi tüm vertebralarda evrimsel korunmuşluğa sahip farengal aparat ve farengal arkları oluşturan nöral krest hücre göçü ile yakından ilişkilidir.

### Nöral Krest Hücre Göçü

Nöral krest hücreleri, gelişmekte olan nöral tüpün dorsal bölümünden köken alarak göç eden mezenkimal bir hücre grubudur. Orta ve arka beyinde ilgili seviyelerden kaynaklanan nöral krest hücre göçü sonrası birinci (*Meckel*) ve ikinci (*Reichert*) farengal arklar dış kulak ve dış kulak yolunu oluşturur. Hayvan çalışmalarında birinci farengal ark yapısına katılan mezenşimin orta beyin ve arka

beyin birinci ve ikinci rombomer seviyesinden kaynaklanan nöral krest hücre göçü ile oluştuğu gösterilmiştir. İkinci farengeal ark ise çoğunlukla nöral tüp dördüncü rombomer seviyesi ve daha az oranda üçüncü ve beşinci rombomer seviyelerinden kaynaklanan nöral krest hücre göçü ile meydana gelir (Şekil 2.3.). Transgenik soy araştırmaları (*lineage tracing*) çalışmalarında gelişmekte olan aurikulada nöral krest hücrelerinin varlığı gösterilmiştir (10). Bu nedenle mikrotia ve konjenital dış kulak yolu atrezisi; nörokristopati grubu hastalıklar olarak kabul edilir, birinci ve ikinci farengeal arkların gelişimsel alan defekti olarak isimlendirilir (11).



**Şekil 2.3.** Embriyolojik dönemde farengeal aparatın gelişimi (BA1: Birinci farengeal ark, BA2: İkinci farengeal ark, R: rombomer) (Çizim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

### Farengeal Arkların Gelişimi

Farengeal arklar embriyolojik hayatta 28. ve 32. günler arasında ilk kez görülür. Her bir ark üç germ yaprağından (ektodermal ve endodermal epitel ve nöral krest mezenşimin kapladığı mezodermal merkez) köken alan oluşumları içerir (12). Farengeal arklar baş ve boyun bölgesinin anatomik yapısını belirlemede önemli bir role sahiptirler. İnsanlarda embriyolojik hayatta altı tane farengeal ark, beş tane farengeal kese ve dört tane farengeal yarık yapısı gözlenir (13). Birinci ve ikinci farengeal arklar kulak yapısını oluşturur. Farengeal yarıklardan postnatal dönemde izlenen tek yapı dış kulak yolunu oluşturan birinci farengeal yarıktır (14). Farengeal arkların dış kısmını ektoderm, iç kısmını endoderm ve aralardaki yapıları da

paraksiyal mezoderm ve nöral krest kökenli mezenşim oluşturur. Farengeal ark gelişim bozukluklarında ilgili arkın oluşturduğu kemik, kas, sinir ve glandüler dokular etkilenir. Birinci ve ikinci farengeal arkların oluşturduğu yapılar Tablo 2.1.'de detaylandırılmıştır.

**Tablo 2.1.** Farengeal arkların oluşturduğu iskelet, kas, sinir ve damar yapıları

Embyolojik Köken	İskelet	Kas	Sinir	Damar
<b>Birinci farengeal ark</b>	Mandibula, maksilla, Zygoma, Dış kulak yolunun bir kısmı, inkus, malleus, aurikula, temporal kemik skuamoz kısım	Çiğneme kasları, m. digastricus ön bölümü, m. tensortympani, m. tensor veli palatini	Trigeminal sinir	Maksiller arter, karotis eksterna
<b>İkinci farengeal ark</b>	Stapes, stiloid uzantı, hyoid, dış kulak yolunun büyük bir kısmı, aurikula	Yüz kasları, m. digastricus arka bölümü, m. stylohyoideus, m. stapedius	Fasiyal sinir	Stapedial arter, hyoid arter
<b>Birinci farengeal kese</b>	Orta kulak boşluğu, östaki borusu, mastoid hava hücreleri, timpanik membranın iç kısmı			
<b>Birinci farengeal yarığ</b>	Timpanik membranın dış kısmı, dış kulak yolu			

### 2.2.1. Dış Kulak Gelişimi

Dış kulak gelişimi embriyolojik hayatın 21. gününde başlar. Dördüncü haftada birinci farengeal yarığın arka kısmında ektoderm çökmesi sonrası dış kulak yolu primitif şekilde ayırt edilir. Aynı süreçte endodermal kısımda yer alan birinci kese derinleşerek tubotimpanik kanalın ilk şeklini oluşturur. Sekizinci haftada dış kulak oluşumu belirginleşir, *cavum konkadan* başlayarak derin bir tünel şeklinde gerçekleşen ektodermal invajinasyon sonrası dış kulak yolu gelişir (13). Dış kulak yolu tabanındaki epitelyal hücreler üçüncü ayda bir tıkaç geliştirir ve yedinci ayda gerileyerek dış kulak yolunu ve timpanik zarı oluşturur. Bu ektodermal tıkaçın gerilememesi sonucu dış kulak yolu atrezisi meydana gelir.

Aurikula yapısının oluşumu dördüncü haftada başlar. Bu primitif yapı birinci farengeal yarığın yukarısında yer alan mandibular ark ve altında yer alan hyoid arktan kaynaklanan dokunun kalınlaşması şeklinde karşımıza çıkar. Süregelen iki hafta içerisinde yaklaşık altıncı haftada bu bölgede altı tane tomurcuk oluşumu gerçekleşir (8, 15).

Her bir tomurcuğun dış kulak yapısının hangi bölümünü oluşturduğu Şekil 2.4.'de özetlenmiştir. Birinci farengeal ark *anterior* yerleşimli tomurcukların oluşumundan sorumlu iken, ikinci farengeal ark *posterior* yerleşimli olanların gelişimine katkıda bulunur (14). Yedinci haftada ön tarafta mandibular arktan köken alan ve arka tarafta hyoid arktan köken alan tomurcuklar birleşir. Başlangıçta bu yapılar embriyonik boyun seviyesinde *ventrolateral* yerleşimlidir. İlerleyen haftalarda kulak yapısı yukarı ve geriye doğru yer değiştirerek doğum sonrası *dorsolateral* pozisyonuna ulaşır. Bu işlem kompleks olup bu süreçteki sorunlar sonucunda aurikula anomalileri, *preauriküler* sinus ve auriküler ekler (*appendage*) görülür. Hayat boyunca dış kulak yapısının büyüklüğü artmakla birlikte üç yaşında toplam boyutunun %85-90'una ulaşır ve ilk dekattan sonra da az bir değişim gösterir (16). Aurikula yapısının %85'ini ikinci farengeal ark oluşturur (13).



**Şekil 2.4.** Embriyolojik dönemde dış kulak yapısını oluşturan tomurcuklar (Çizim: Christy Tortland, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

Dış kulak ve dış kulak yolu aynı dokulardan köken alır. Dış ve orta kulak embriyolojik gelişimleri de aynı bölgeden kaynaklanır. Mikrotiaya genellikle dış kulak yolu agenezisi ya da stenozu ve orta kulak yapılarının yetersiz gelişimi eşlik eder. Bu nedenle hastaların büyük bir kısmında (%74) mikrotia ve dış kulak yolu agenezisi bir arada görülür. İç kulak embriyolojik gelişiminin tamamen farklı olması sonucunda dış kulak anomalilerinin iç kulak anomalileri ile birlikte görülmesi (%11-30) oldukça nadirdir (17).

### 2.2.2. Orta Kulak ve İç Kulak Gelişimi

Orta kulak nöral krista, mezoderm ve endoderm hücrelerden farklılaşan hücrelerin proliferasyonu sonucu oluşur. Stapes dördüncü rombomerden göç eden hücre grubu, inkus, malleus ve timpanik halka ise kaudal mezensefalonda ve birinci ve ikinci rombomerlerden göç eden nöral krest hücre grupları tarafından oluşturulur. Orta kulakta yer alan kemikçiklerde endokondral kemikleşme gözlenir. Orta kulak boşluğu ise birinci farengeal kese endoderminden köken alır. İç kulak embryolojisi 23. günde otik plakod oluşumuyla başlar (8). Arka beyin hizasında beşinci ve altıncı rombomerler tarafından salgılanan büyüme faktörleri etkisi ile ektodermal katlantının dış yüzeyden içeriye doğru invajine olarak otik vezikül ve otik kisti oluşturur. Somatik ektodermden kaynaklanan otik vezikül membranöz labirenti, mezenşimden kaynaklanan otik kapsül ise kemik labirenti oluşturur.

### 2.3. Kulak Gelişiminin Genetik Kontrol Mekanizmaları

Kraniyofasiyal yapıların gelişimi moleküler ve doku etkileşimi, hücre göçü, proliferasyon, apoptoz ve farklılaşma basamaklarının her birinin belirli bir zamanda koordineli bir şekilde gerçekleşmesi ile sağlanır (18). Kraniofasiyal iskeletin farklılaşması nöral krest hücre göçü öncesi başlayan ve devam eden zaman ve konsantrasyon bağımlı birtakım genlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve sinyal yollarının kontrolü altında belirli bir sıra ile kurallar çerçevesinde gerçekleşir. Göç sonrasında her bir nöral krest hücre alt topluluğunun pozisyonel kimliği kraniyofasiyal iskeletin gelişimi için önem taşır. Bu aks ve düzen ilk aşamalarda *anteroposterior* kimliği belirleyen *HOX* genlerinin sıralı şekilde ekspresyonu ile sağlanır (19). *HOX* genleri evrimsel süreç içerisinde tüm canlı türlerinde ileri derecede korunmuş vücut formasyonu ve segmentasyonundan sorumlu olan genlerdir (20). Hayvan çalışmalarında *HOXA1*, *HOXA2* ve *HOXB1* genlerinin kraniyofasiyal yapıların gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu genlerin mutasyonları sonucu ikinci farengeal ark gelişiminde gerekli olan nöral krest hücrelerinde defektler görülür (21). Nöral tüpte *HOX* ekspresyonu; bölgesel fibroblast büyüme faktörleri ve *WNT* molekülleri ve retinoik asit aracılı düzenlenir (22).

*HOXA2* özellikle ikinci farengeal ark oluşumu için önemlidir ve mutasyonları sonucunda ikinci farengeal ark kimliğini kaybederek dış kulak yolu duplikasyonu ve aurikula yokluğu ile karakterize birinci farengeal ark yapılarını oluşturur (9, 23). Birinci farengeal ark ise *HOX* ekspresyonundan bağımsız gelişim gösterir ve *OTX2* başta olmak üzere birtakım transkripsiyon faktörleri aracılı özelleşir.

Kraniyofasiyal dokuların köken aldıkları arka özgü yapıları oluşturması *anteroposterior* kimliğin yanı sıra *dorsoventral* ve *mediolateral pattern* (Şekil 2.5.) tarafından da belirlenir (21). *Anteroposterior* pozisyon (inter-farengeal) *HOX* genleri dışında *FGF8* aracılı da sağlanırken *dorsoventral* (intra-farengeal) pozisyonel kimlik *DLX* genleri, endotelin ve *jagged-notch* sinyal yolağı ve *SIX1* geni aracılı gerçekleşir. *Dorsoventral pattern* içerisinde *ventral* kimliği sağlayan *ET-1* sinyali defektlerinde mandibular kökenli yapılar maksiller yapılara farklılaşır (24).

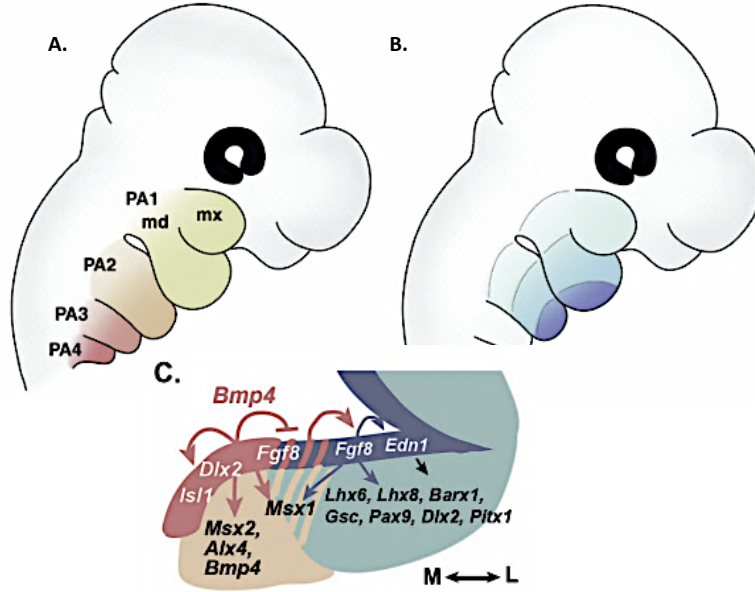
Kraniyofasiyal iskelet oluşumunda epitelyal-mezenkimal etkileşim de rol oynar. Epitelyum kaynaklı sinyaller mezenşimde lokal bir etki yaratarak farklılaşmanın başlamasına katkı sağlar (21). Başta *homeobox* genleri, büyüme faktörleri ve transkripsiyon faktörleri olmak üzere birçok sinyal molekülü ve reseptörleri kulak gelişinde epitel ve mezenkim arasında karşılıklı fonksiyon görür. Bunlar *BMP*, *FGF*, *WNT* aileleridir. Bu sinyallere ek olarak uyarılan dokularda birçok gen ekspresyonu gerçekleşir. Fare deneylerinde *Msx*, *Dlx*, *Gsc* ve *Prx* *homeobox* genlerinin ve *Hand2* transkripsiyon faktörünün birinci farengeal ark mezenkiminde eksprese olduğu ve bu arkın embriyolojik gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir.

Epitelyal-mezenkimal etkileşimin yanı sıra nöral krest hücre göçü sonrasında göç eden hücrelerin farengeal arklara yerleşiminde epitelyal hücrelerin birbiri arasındaki etkileşiminde önemli olduğu gösterilmiştir. (25)

Farengeal arkların gelişiminde endotelin-1, *SHH* ve retinoik asit sinyal yolları da etkilidir. Farengeal ark epiteli ve mezodermden lokal olarak kaynaklanan endotelin-1 sinyali nöral krest derive hücrelerin farklılaşması için genel bir yönlendirici olarak davranır ve farklılaşma endotelin-1 konsantrasyonuna bağlı gerçekleşir (21). Endotelin-1 sinyali etkisini transkripsiyon faktörü *hand2* aracılı *msx1* ekspresyonunu düzenleyerek gösterir. Bu yolaktaki defektler sonucunda farengeal arklarda apoptoz gözlenir. Endotelin-1 sinyal yolağının alt basamaklarında



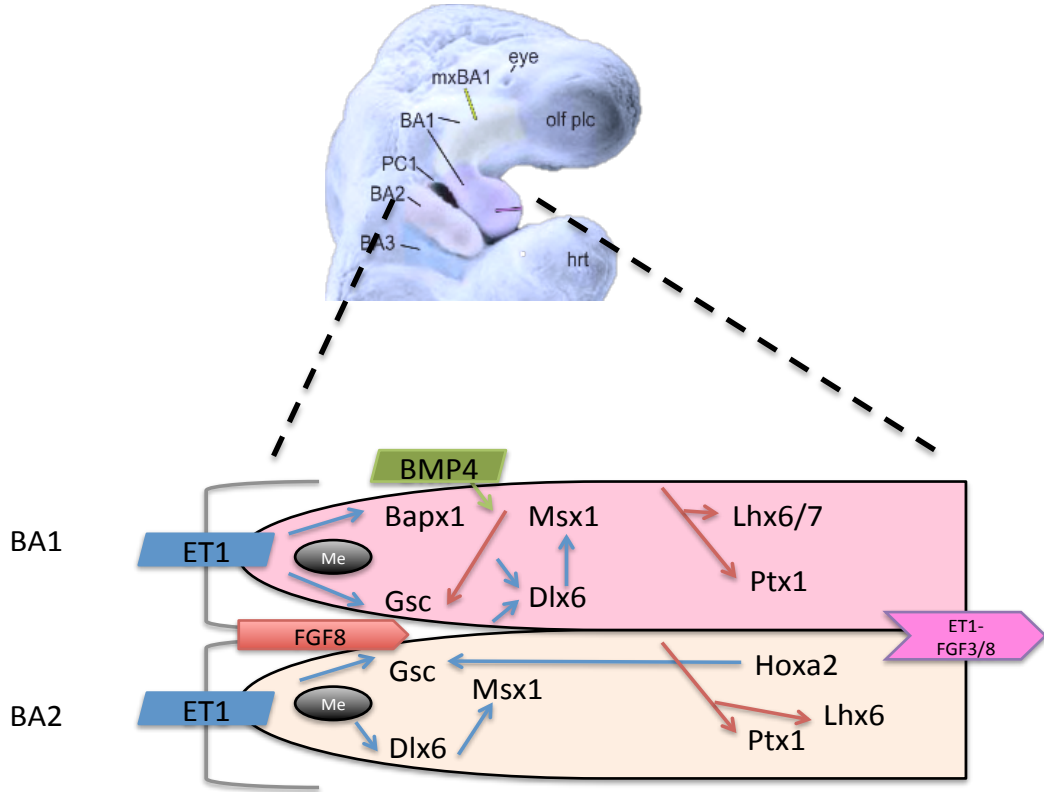
yer alan *GSC* birinci farengial arkta eksprese olan bir moleküldür. Dış kulak yolu gelişiminde de etkilidir. *GSC* mutasyonlarında hem timpanik halka oluşumu hem de dış kulak yolu oluşumu bozulur. Bu da her iki bölge arasındaki karşılıklı etkileşimi gösterir.



**Şekil 2.5.** Farengial arklardaki *paternler*: (A) anteroposterior, (B) dorsoventral ve (C) mediolateral patern (Resim 19. kaynaktan değiştirilerek kullanılmıştır.)

Fasiyal ve farengial ektodermin belirli bölgelerinde ve farengial yarık endoderminde eksprese olan *FGF8* NCC sağ kalımı için anahtar bir moleküldür. *FGF8* ayrıca doku spesifik NCC farklılaşmasını sağlayacak olan genlerin ekspresyonlarını da indükler. *FGF8* aktivitesi başka bir sinyal faktörü olan *mediolateral* kimlik ilişkili *BMP4* ile sınırlandırılır. *FGF* ailesinin diğer üyeleri de farengial endoderm sinyal yolağında görev alır. Örneğin *FGFR1* mutasyonlarında ikinci farengial arka nöral krest göçü sekteye uğrar ve hücreler ark yerine ark yakınında başka bir bölgede gözlenir. *FGF* ve *FGFR* moleküllerinin spesifik kombinasyonları nöral krest hücrelerinin belirli bir farengial arka uygun pozisyonda göç etmesinde etkilidir.

Kulak gelişimi büyüme faktörleri ve transkripsiyon faktörleri olmak üzere birçok sinyal molekülünün ve reseptörlerin kompleks etkileşimleri ile sağlanır. (Şekil 2.6.) Bu nedenle özetlenen moleküllerin döneme özgü ekspresyonu bilinmemektedir.



**Şekil 2.6.** Farengeal ark yapılarında karşılıklı moleküler etkileşim (Me: mezoderm, BA1: Birinci farengeal ark, BA2: İkinci farengeal ark) (Çizim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

## 2.4. Kulak Anomalileri

Kulak anomalileri yarık damak/dudaktan sonra en sık görülen konjenital kraniyofasiyal anomalidir (2, 3, 26). Kulak bölümlerine göre sık görülen anomalilere baktığımızda; dış kulak anomalileri çok geniş bir spektrum şeklinde karşımıza çıkar. Bu anomaliler Tablo 2.2.'de; aurikula büyüklüğü, şekline, yerleşimine ve eşlik eden sinus/fistül ya da *skin tag* oluşumlarına göre sınıflandırılmaktadır.

**Tablo 2.2.** Dış kulak anomalileri

Aurikula Büyüklüğü	Aurikula Şekli	Yerleşimi	Eşlik Eden Diğer Kulak Bulguları
Mikrotia	Displastik	Düşük yerleşimli	Dış Kulak Yolu atrezisi
Anotia	Cup-shaped	Melotia (Dış kulağın farklı bir yerde yerleşimi)	Dış Kulak Yolu duplikasyonu
Makrotia	Lop ear		Auriküler Fistul <i>Skin tag/ Deri ekleri</i>

Dış kulak anomalilerinin isimlendirmesi ile ilgili kesin bir görüş birliği bulunmamaktadır. Kimi çalışmalarda genel olarak mikrotia terimi kullanılmakta iken kimi çalışmalarda dış kulak malformasyonları mikrotia-anotia olarak tanımlanır (27, 28). Dış kulak yolu malformasyonlarının insidansı çeşitli yayınlarda değişmekle birlikte yenidoğanlarda 1/6000 ile 1/6830 oranında görülür (17). Prevalans Schloss tarafından 3:10.000 olarak bildirilmiştir (29).

-Orta kulak anomalileri genellikle kemikçik defektleri ile karakterizedir ve en sık görülenler malleus ve/veya inkus fiksasyonu, incudostapedial devamsızlık ve stapes fiksasyonudur. Orta kulak anomalilerine genellikle iletim tipi işitme kaybı eşlik eder.

-İç kulak anomalileri *Mondini* (kohlea ilişkili), *Michel* (labirent hipoplazisi) anomalileri, *Scheibe* aplazisi, *Alexander* aplazisi ve genişlemiş vestibuler *akuadukt* olmak üzere beş temel gruba ayrılır ve sensörinöral tip işitme kaybı ile sonuçlanır. Genişlemiş vestibuler *akuadukt* sendromu en sık görülen iç kulak anomalisidir (30).

### 2.4.1. Mikrotia

Dış kulak anomalileri; aurikula ve dış kulak yolu anomalilerini içerir. En sık görülen dış kulak anomalileri mikrotia ve dış kulak yolu atrezisi/stenozudur. Mikrotia aurikulanın yetersiz ve az gelişimi olarak tanımlanır. Mikrotia; anotiaya kadar geniş bir klinik yelpazede görülen dış kulağın yapısal konjenital anomalisidir. Mikrotia genellikle sağ yüz yarısında (%58-61) ve tek taraflı (%70-90) görülür. Mikrotia izole olarak görülebileceği gibi %20-60 oranında bir spektrum ya da bir sendromun parçası olarak da karşımıza çıkar (31). Mikrotiaya sahip bireylere en sık eşlik eden anomaliler sırasıyla %12,8 oranıyla yarık damak, %11,5 mikroftalmi/anoftalmi, %10,6 fasiyal asimetri, %6,4 makrostomi, %2,2 preaksiyel polidaktili, %2,2 holoprosensefali ve %1,7 epibulbar dermoiddir (32, 33).

İzole mikrotia bütün mikrotia hastalarının %40 ile %80'ini oluşturur. İzole mikrotia ve anotia birlikteliği ise mikrotiaların %65'ini oluşturur (34). Bildirilen prevalans 0.83-17.4/10.000 arasında değişir (8). Hispanik, Asyalı ve Yerli Amerikalılarda daha yüksek sıklıkta gözlenir. Mikrotia da diğer dış kulak anomalilerine benzer şekilde %80 tek taraflı görülür ve genellikle etkilenme %60 sağ tarafta olur (31). Bireylerin %90'ından fazlasına etkilenen tarafta iletim tipi işitme kaybı eşlik eder. Erkekler kızlardan daha fazla etkilenir ve erkekler için yaklaşık %20-40 arasında artmış bir risk söz konusudur.

Mikrotia dışında görülen dış kulak anomalilerine bakıldığında; dış kulak yolu atrezisi ya da stenozu, *preauriküler tag* ve *pitler* sıkça görülür. Dış kulak yolu atrezisi ya da stenozu ise dış kulak yolu yokluğu ya da darlığı ile karakterizedir. Embriyolojik dönemde malleus ve inkus oluşumu dış kulak yolu invajinasyonu ile eş zamanlı olarak gerçekleşir. Bu nedenle dış kulak yolu atrezisi ya da darlığı olan bireylere orta kulak kemikçik anomalileri de eşlik eder (35). *Preauriküler pitler* heliks *anteriorunda* ya da *tragusun superiorunda* yer alan küçük çentiklerdir ve %25 ile %50 bilateral olarak görülür. Genel popülasyona göre işitme kaybı olan bireylerde beş kat daha fazla karşılaşırlar. *Preauriküler skin tag* ise kulak önünden *sternocleidomastoid* kasın önüne kadar her yerde görülebilen cilt, subkutan yağ doku ve/veya kıkırdak içeren oluşumlardır. *Skin tag* yapıları birinci farengeal ark çevresinde görülür ve mandibular dokudan kaynaklanır. Altıncı haftada birinci

farengeal yarığın kapanması ile devam eden kraniofasiyal gelişimde mandibular ve hyoid arkın sınırı yanağa doğru yer değiştirir. Bu nedenle *skin tag* yapıları da ağız köşesi ile kulak hattı hizasında görülür (17). Auriküler *tag* ve *pitler* minor malformasyonlar olarak kabul edilir ve farengeal arkların füzyon defektleri sonucunda meydana gelir (11).

#### 2.4.1.1. Mikrotia Sınıflaması




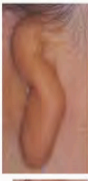



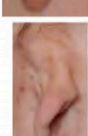
Mikrotia sınıflaması ilk kez 1926 yılında Herrman Marx tarafından gerçekleştirilmiştir. Günümüze kadar çok çeşitli ve değişken sınıflandırmalar kullanılmıştır. Weerda kullanılan sınıflamaları birleştirmiş ve kategorizasyona embriyolojik kökenleri de dahil etmiştir (32, 36). Hunter 2009 yılında Weerda sınıflamasını temel alarak ve standart deviasyonu da sınıflamaya dahil ederek ‘‘American Journal of Genetics’’ te standart bir terminoloji (Tablo 2.3.) yayınlamıştır (32). Mikrotia sınıflaması hastaların tanı, izlem, prognoz, tedavi ve standart bilgi toplama süreçlerini kolaylaştırır.

**Tablo 2.3.** Mikrotia sınıflaması

<b>Hunter Sınıflaması 2009</b>
<b>Mikrotia, 1. Derece</b>
Normal kulak yapısının olması ve ortalama kulak uzunluğunun 2 SD altında bulunması
<b>Mikrotia, 2. Derece</b>
Kulak yapısının ortalama uzunluğu 2 SD altındadır, normal kulak yapısının olmaması
<b>Mikrotia, 3. Derece</b>
Bazı aurikula yapıların bulunmasıdır ancak bu yapılar herhangi spesifik bir kısma ayırlanamakta
<b>Anotia</b>
Kulak yapısının hiç olmaması

Lobül tip mikrotia %60 oranla en sık olarak görülen mikrotia formudur. İkinci sıklıkta konka tip ve küçük konka tip görülür ve ikisinin görülme sıklıkları toplamı yaklaşık %15'tir. Anotia daha nadir olarak görülür(37).

Ayrıca dış kulak malformasyonları embriyolojik hayatta hangi tomurcuk ile ilgili bir defekt olduğuna göre de sınıflandırılır (Şekil 2.7.). Örneğin lobül tip mikrotia da 2, 3, 4 ve 5 nolu tomurcukların gelişiminde sorun bulunurken anotiada tüm tomurcukların gelişiminde defekt görülür (17).

5. ve 6. tomurcuk	Kolobom/ Transvers yarık			2. 3. 4. ve 5. tomurcuk	3. Derece mikrotia, Lobul tip mikrotia		
2. 3. ve 4. tomurcuk	Aurikula üst yarısı deforme, dış kulak yolu atrezisi/ stenozu						

**Şekil 2.7.** Tomurcuk defektlerine göre mikrotia sınıflaması (Çizim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

#### 2.4.1.2. Mikrotia Etiyolojisi

Mikrotia etiyojisine yönelik birçok araştırma yapılmasına rağmen etioloji tam olarak aydınlatılamamıştır. Mikrotia etiyojisinde çevresel ve genetik faktörler rol oynar. Son bulgular; mikrotianın genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen multifaktöriyel bir durum olduğunu gösterir.

#### Çevresel Faktörler

Çeşitli popülasyon çalışmalarında mikrotiaya neden olan birçok farklı çevresel risk faktörü tanımlanmıştır (38). Dış kulak anomalilerine çevresel faktörlerin katkısı yaklaşık %10'dur (17). Bu faktörler düşük doğum ağırlığı, yükseklik (39), anemi, parental yaş, gestasyonel diyabet, çoğul gebelik, yüksek parite, maternal hastalık, prenatal sigara içimi, alkol alımı ve hamilelikte kullanılan ilaçlardır (trimetadion, hidantoin, talidomid, isotretinoin, estriol, klomifen sitrat, NSAİ, Vitamin A ve türevleri, folat antagonistleri, rubella enfeksiyonu)(8, 38).

Ayrıca etiolojide prenatal dönemde gerçekleşen bir vasküler yapılanmada bozukluk hipotezi de bulunur (40). Prenatal dönemde gelişen lokal iskemi ve doku nekrozu sonrası auriküler yapıların gelişiminde bozukluk meydana gelebilir. Vasküler

sistemin tam olarak gelişmemesi ya da geliştikten sonra kompresyon veya hemoraji sonucu stenozuna bağlı olarak vasküler yapılanmada bozukluk görülebilir.

Ek olarak teratojenik ya da genetik nedenlerle de vasküler yapılanmada bozukluk olabilir. Ancak bu hipotezin geçerliliği hakkında bir görüş birliğine varılamamış durumdadır (32).

### **Genetik Faktörler**

Mikrotia genetik etyolojisinde otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtım kalıpları bildirilmiştir. Ek olarak; yapılan çalışmalarda *HOXA2* başta olmak üzere bazı genlerin hem heterozigot hem de homozigot mutasyonları mikrotia ile ilişkilendirilmiştir (27, 41). Monozigotik ikizlerde mikrotia için konkordans %38,5, dizigotik ikizlerde %4,5 olarak bildirilmiştir. Çoğu hastada sporadik kalıtım bildirilmekle birlikte literatürde %3-34 arasında bir ailesel kalıtım da söz konusudur (42). Mikrotianın multifaktöryel kalıtıldığı düşünülmeyle birlikte ikiz çalışmaları ve ailesel formlar etyolojide genetik faktörlerin önemli olduğunu gösterir (43).

Mikrotia genetik etyolojisinin aydınlatılması için bağlantı analizleri, genom boyu asosiasyon çalışmaları, kopya sayısı değişiklikleri analizi ve aday gen *Sanger* dizileme başta olmak üzere çok çeşitli genetik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların büyük bir kısmı sendromik mikrotia hastalarında gerçekleştirilmiştir. İzole mikrotia oldukça heterojen olması, büyük aile ve pedigrilere ulaşım zorluğu nedeniyle daha az araştırılmış durumdadır. Bu nedenle dış kulak gelişiminin moleküler etyopatogenezi tam olarak anlaşılamamıştır.

Transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri ve ekstraselüler matriks proteinlerini kodlayan birçok gen ailesinin mikrotia ile ilişkisi gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda *homeobox* genlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan *HOX* genleri mikrotia ile ilişkilendirilmiştir. *HOXA2 knock-out* yapılan farelerde mikrotia gözlenmiştir. *HOX* genlerinden *HOXA1* inaktivasyonu ve *HOXA1/HOXB1*'in birlikte inaktivasyonu sonucunda sırasıyla hipoplastik dış kulak ve anotia görülmüştür (21). *HOXA2* aurikula yapısının oluşumunu; *EYA1* transkripsiyon faktörü, *BMP* ve *WNT* sinyal yolağı aracılı düzenler (23). *HOXA2* ile *BMP4* ve *BMP5* arasında fonksiyonel bir ilişki bulunması sonucunda *BMP4* ve *BMP5* ekspresyon kayıplarında dış kulak fenotipleri izlenir (23). Ayrıca yapılan

çalışmalarda *HOXA2*'nin ikinci farengeal ark mezenşiminde *Wnt5a* ekspresyonu üzerinden *Wnt-B katenin* sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (44).

*FGF*, endotelin ve retinoik asit sinyal yolakları dış kulak gelişiminde önemli rollere sahiptir (42). *FGF* yolağında yer alan *FGF8* ve *FGF10* mutasyonlarında farelerde küçük kulak yapısı gözlenirken *FGFR1* homozigot mutasyonlarında küçük kulak yapısının yanı sıra anormal dış kulak yolu görülür (32). Endotel sinyal yolağı *HOX* ekspresyonunun düzenler. *EDNI* arkların kanlanması sağlayan damarların endotelinde bulunması nedeniyle epitelyal-mezenkimal etkileşimde etkili bir role sahiptir. Endotelin sinyal yolağının alt basamaklarında görevli *GSC* geni bir transkripsiyon faktörüdür *GSC* homozigot mutasyonları kulak anomalilerin de görüldüğü farklı gelişimsel defektlere yol açar. *GCS* ayrıca kraniyofasiyal yapıların gelişimi sırasında kondrogenezde önemlidir (32). İskelet gelişiminde önemli bir molekül olan *BAPX1* (*NKX3-2*) geni mutasyonlarında da *GSC* mutant benzeri klinik gözlenir (45). Diğer önemli bir düzenleyici olan retinoik asit sinyal yolağı; nöral krest hücrelerinin farengeal arklara göçü için gereklidir ve retinoid embriyopatisi nöral krest hücre apoptozuna yol açarak mikrotia ile sonuçlanır (26).

*SIX homeobox* gen ailesi üyeleri (*SIX1-6*) de dış kulak gelişiminde görevlidir. *SIX1 knock out* yapıldığında fare, tavuk ve kurbağada kraniyofasiyal anomaliler gözlenmiştir. Farklı türlerde benzer bulguların görülmesi *SIX1* fonksiyonunun kulak gelişiminde evrimsel olarak korunmuşluğunu gösterir. *SIX1* ve *SIX3* mutasyonlarında kulak anomalileri ve kosta anomalileri gözlenir. *SIX* genlerinin diğer genlerle etkileşimine bakıldığında; *SIX1* ve *SIX4* etkilerini bir transkripsiyon faktörü olan *TBX1* aracılı gösterir. Diğer bir yandan; *SIX* genleri ile birlikte *EYA* geni bir kompleks oluşturur ve bu kompleks etkisini hedef genler *SIX2* ve *SALL1* üzerinden gerçekleştirir. Kompleks oluşumunda görevli *EYA1* aurikulanın kıkırdak kısmının gelişiminde etkili bir role sahiptir. *EYA1* defektleri anotia ile sonuçlanır.

Kraniyofasiyal yapıların gelişiminde ayrıca *treacle* proteinini kodlayan *TCOF1* geni de rol oynar ve mutasyonlarında dış kulak anomalileri ve zigomatik kemik anomalileri birlikte gözlenir. Ayrıca *PRX1/PRX2 homeobox* genleri ve *AP-2* transkripsiyon faktörü defektlerinde de dış ve orta kulak anomalileri gözlenir. *PRX1/PRX2* birinci farengeal arkta eksprese olur ve mutasyonlarında dış, orta ve iç kulak anomalileri ile birlikte polidaktili gözlenir. *AP-2* göç öncesi ve göç sonrası



nöral krest hücrelerinde eksprese olan bir diğer transkripsiyon faktörüdür ve *AP-2* defektlerinde orta kulak kemikçiklerinde anomaliler gözlenir.

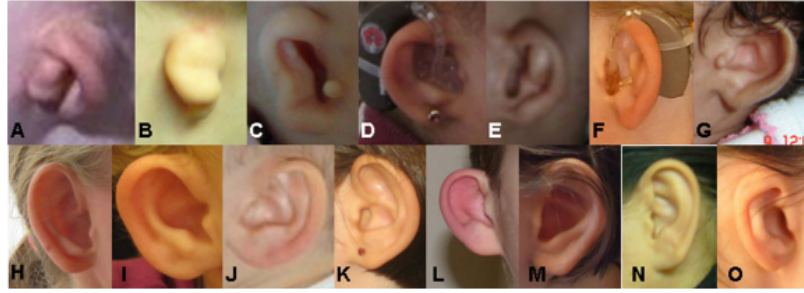
Kromozomal anomaliler değerlendirildiğinde; Trizomi 13, 18, 21, 22 ve 4p, 5p, 18p, 18q ve 22q11.2 bölgesi delesyonlarında da klinik bulgu olarak mikrotia gözlenir (32). Son yıllarda mikrodizin platformlarında yapılan gen ekspresyon analizlerinde; mmu-miR-200c ve mmu-miR-205 başta olmak üzere çeşitli miRNA'ların da mikrotia ile ilişkisi hayvan modellerinde belirlenmiştir (46).

Ayrıca yapılan çalışmalarda genomun kodlamayan kısımlarında düzenleyici olarak görev yapan evrimsel olarak korunmuş diziler de dış kulak anomalileri ile ilişkilendirilmiştir. Evrimsel olarak korunmuş kodlamayan bölgeler, genellikle transkripsiyon faktörleri gibi gelişimsel genlerin komşuluğunda yer alan dizilerdir (47). Örnek olarak; farengial arklarda eksprese olan bir transkripsiyon faktörü olan *HMX1* geni kodlamayan bölge değişiklikleri sonucu izole aurikula anomalileri oluşur (32, 48). Dış kulak ve orta kulak gelişiminde görev alan genlerin hayvan kulak fenotipleri üzerine etkileri Tablo 2.4.'te gösterilmiştir (42, 49).

Dış kulak ve orta kulak gelişiminin moleküler analizleri oldukça sınırlıdır. Bu nedenle orta kulak ve özellikle dış kulak yapılarının gelişiminin moleküler temellerinin aydınlatılması, bu genlerin fonksiyonları, hedefleri ve eş zamanlı nasıl çalıştıklarının gösterilmesi kulak anomalilerinin nedenlerinin ortaya konması açısından önemlidir (9).

### **Genotip-Fenotip İlişkisi:**

Dış kulak gelişiminde tanımlanan genlerin kulak yapısının birden fazla bölümünü etkilemesi ve mikrotia ya da anotia ile sonuçlanması nedeniyle belirli bir gen için herhangi bir genotip-fenotip ilişkisi gösterilmemiştir (Şekil 2.8.). Sonuç olarak; sadece dış kulak anomalisine dayanarak klinik hastalık ayırıcı tanısı yapmak olanaklı değildir.



Şekil 2.8. Sendromlarda gözlenen dış kulak anomalileri

Tablo 2.4. Dış ve orta kulak gelişiminde görevli gen defektleri: Mus musculus kulak bulguları

Gen	Dış Kulak	Orta Kulak
<i>AP2</i>		Kemikçik Yokluğu
<i>BMP5</i>	Küçük aurikula	Normal
<i>DLX1</i>	Normal	Hafif etkilenmiş stapes
<i>DLX2</i>	Normal	Stapes boyutu azalmış, inkus kemik duvara yapışmış
<i>DLX5/DLX6</i>	Aurikula yokluğu	Ciddi olarak etkilenmiş kemikçik yapıları
<i>EDN1</i>	Küçük aurikula	Ciddi olarak etkilenmiş kemikçik yapıları Kemikçik yapıların yokluğu
<i>EDNRA</i>	Küçük aurikula	Ciddi olarak etkilenmiş kemikçik yapıları Kemikçik yapıların yokluğu
<i>Eya1</i>	Küçük aurikula/ Aurikula yokluğu	Stapes yokluğu, Normalden küçük ve birleşmiş malleus ve inkus
<i>SIX1/SIX4</i>	Aurikula yokluğu	
<i>Fgf8</i>		İnkus yokluğu, işlevsiz malleus
<i>FGF10</i>	Küçük aurikula	
<i>FGFR1</i>	Küçük ve düşük yerleşimli kulak	
<i>Gsc</i>	Normal aurikula, dış kulak yolu yokluğu	Manibriumu olmayan malleus
<i>HOXA1</i>	Normal	Hafif etkilenmiş stapes
<i>HOXA1/Hoxb1</i>	Aurikula yokluğu/Etkilenmiş dış kulak yolu	Stapes yokluğu, hipomorfik malleus
<i>HOXA2</i>	Küçük aurikula/ Duplike dış kulak yolu	Duplike malleus ve inkus, stapes yokluğu
<i>HMX1</i>	Aurikula anomalisi	
<i>Msx1</i>	Normal	<i>Processus brevisi</i> olmayan malleus
<i>Pbx1</i>	Küçük aurikula	Stapes yokluğu
<i>Prx1</i>	Normal aurikula, dış kulak yolu yokluğu	<i>Manibriumu</i> olmayan malleus, inkusun ve normalden küçük stapesin ekstra kıkırdak ile birleşimi
<i>Ptx1</i>		Gonial kemik yokluğu
<i>PAX8</i>	Küçük aurikula, Aurikula yokluğu, Dış kulak yolu stenozu ya da atrezisi	Orta kulak anomalileri
<i>RAR</i>	Aurikula yokluğu/ küçüklüğü	Stapes yokluğu, malforme inkus
<i>Wnt1/Wnt3a</i>		Stapes yokluğu

## 2.5. Okuloaurikulovertebral Spektrum (OMIM 164210)

Hemifasiyal mikrozomi ya da *Goldenhar* sendromu olarak da bilinen OAVS, birinci ve ikinci farengeal arkların oluşumundaki bozukluklar sonucu görülen klinik ve genetik heterojenitesi bulunan gelişimsel bir anomalidir. Klinik bulgular temel olarak dış kulak anomalileri, göz bulguları, mandibula hipoplazisi ve vertebral anomaliler ile karakterizedir. Bu bulguların yanı sıra kardiyak, genitoüriner, iskelet ve santral sinir sistemi anomalileri bu spektruma eşlik edebilir. Etyolojide genetik ve çevresel faktörleri suçlayan çeşitli hipotezler bulunmakla birlikte bu spektrumun etyolojisi halen net olarak aydınlatılamamıştır. Olguların çoğu sporadik olarak görülmekle birlikte otozomal dominant ve resesif kalıtımın görüldüğü ailesel olguların bulunması ve çeşitli kromozomlarda sayısal ve yapısal anomalilerin bildirilmesi etyolojide genetik faktörleri rol oynadığını gösterir.

### 2.5.1. OAVS Tarihçe

Bu spektrum ilk kez 1952 yılında Prof. Maurice Goldenhar tarafından epibulbar dermoid, *preauriküler skin tag*, kulak ve servikal vertebra anomalileri olan hastalarda “*Goldenhar* sendromu” olarak tanımlanmıştır. Ancak literatüre bakıldığında 1861 yılında Canton ve 1881 yılında da Von Arlt tarafından benzer klinik bulgulara sahip bireylerin bildirildiği görülür (36). 1963 yılında epibulbar dermoid, kulak ve vertebral anomalilerle karakterize bu sendrom için Gorlin tarafından okulo-aurikulovertebral displazi terimi önerilmiştir. 1989 yılında Cohen ve arkadaşları tarafından tüm isimlendirmeler okulo-aurikulo-vertebral spektrum adı altında birleştirilmiştir ve günümüzde bu spektrum için OAVS terimi yaygın olarak kullanılmaktadır (50, 51). Cerrahi literatüre bakıldığında bu spektrum kraniyofasiyal mikrozomi/hemifasiyal mikrozomi olarak tanımlanır. Yıllar içerisinde spektrum için önerilen isimler Tablo 2.5.’te sunulmuştur.

**Tablo 2.5.** OAVS yıllar içerisinde değişen nomenklatur(50)

İsim	Yazarlar	Tarih
Goldenhar sendromu	Goldenhar/ Sugar	1952/1966
Otomandibular dizostozis	Francois&Huastrate	1954
1.ark sendromu	McKenzie	1958
Unilateral mandibulofasiyal dizostozis	Wilson	1958
Unilateral intrauterin fasiyal nekrozis	Walker	1961
Okuloaurikulovertebral displazi	Gorlin ve ark	1963
Hemifasiyal Mikrozomi	Gorlin ve Pindborg	1964
1.ve 2. Brankiyal ark sendromu	Grabb	1965
Oral-mandibular-aurikular sendrom	Stark ve Saunders	1967
Aurikulo-brankiyojenik displazi	Caronni	1967
Familyal fasiyal displazi	Ide ve ark	1970
Goldenhar-Gorlin sendromu	Aleksie ve ark	1975
Lateral fasiyal displazi	Ross	1975
Fasiyo-aurikulo-vertebral malformasyon spektrum	Smith	1982
Unilateral kraniofasiyal mikrozomi	Grayson ve ark.	1983
Okuloaurikulovertebral spektrum	Cohen	1989-

Karışık terminoloji nedeniyle insidans ve prevalans çeşitli kaynaklarda birbirinden farklı olarak bildirilir. Görülme sıklığı bölgesel olarak etkilenir ve farklı kaynaklarda 1/5600- 1/20.000 arasında değişir (52). Avrupa’da son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmada 3.8/100000 prevalans bildirilmiştir (53). Erkek cinsiyette daha fazla etkilenme görülür. (E/K:3/2). Hastalarda genellikle tek taraflı etkilenme olur ve tek taraflı olduğunda da etkilenme sıklıkla sağ tarafta gözlenir (50).

### 2.5.2. OAVS Minimal Tanı Kriterleri

OAVS spektrumunda görülen klinik heterojenite ve değişken ekspresivite nedeniyle minimal tanı kriteri hakkında kesin bir ortak görüş bulunmamaktadır. İzole mikrotia ya da *preauriküler skin tag* varlığı tek başına bu spektrumun en hafif formu olduğu düşünülmeyle birlikte bazı araştırmacılar aurikula anomalisi ve *skin tag* birlikteliğini OAVS için tanı kriteri olarak kabul ederler. OAVS’de eşlik eden ekstrakraniyal bölgedeki anomaliler izole mikrotiada da görülen anomalilerdir. Her iki fenotipe yol açan etyolojiler benzerdir. OAVS ile izlenen bireylerin ailelerinde izole mikrotia görülme sıklığı normal popülasyondan yüksektir. İzole mikrotia ve OAVS’nin ortak özellikleri; hemifasiyal asimetri, sağ ağırlıklı tutulum görülmesi ve erkeklerde sıklığın daha fazla olmasıdır. İzole mikrotia ve OAVS spektrumunun

ortak görülen özellikleri olması nedeniyle bu spektrumun izole mikrotianın bir devamı olduğu düşünülür.

Bu nedenle çeşitli araştırmalarda OAVS minimal tanı kriteri olarak izole mikrotia kabul edilir (4). Ayrıca tanı için göz bulgularının gerekmediği birçok çalışmada belirtilmiştir (4).

Ek olarak; literatürde bazı araştırmacılar tarafından OAVS ve radyal defekt birlikteliği (OMIM 141400) ve OAFNS (OMIM 60145) de OAVS alt grubu dahilinde değerlendirilir. Literatürde yapılan çalışmalarda kullanılan minimal tanı kriterleri Tablo 2.6.'da özetlenmiştir. Bu çalışmada minimal tanı kriteri olarak izole mikrotia ya da *preauriküler tag* ve hemifasiyal mikrozomi birlikteliği kabul edilmiştir. OAFNS ve OAVS ve radyal defekt birlikteliği de çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

**Tablo 2.6.** Literatürde bulunan minimal tanı kriterleri (50, 54)

Grabb (1965), Gorlin (1976) Rollnick& Kaye (1983), Lawson (2002), Wiczorek (2007)	İzole Mikrotia
Taysi (1983)	<i>Skin tag</i> ve hemifasiyal mikrozomi ilişkili aile öyküsü birlikteliği
Rollnick (1988)	Mikrotia ve/veya <i>preauriküler tag</i>
Kaye (1992)	Mikrotia ve mandibular hipoplazi
Araneta et al (1997)	(1) Mikrotia, anotia veya <i>preauriküler tag</i> ve (2) mandibula hipoplazisi veya Goldenhar sendromunun değişken klinik bulguları birlikteliği
Maris (1999)	Hemifasiyal mikrozomi
Kelberman (2001)	<i>Skin tag</i> ve hemifasiyal mikrozomi ilişkili aile öyküsü birlikteliği
Wang (2002)	Herhangi bir kulak anomalisi ve OAVS klinik bulgularından 2 bulgu birlikteliği
Werler (2004a)	Hemifasiyal mikrozomi, fasiyal asimetri, Goldenhar sendromu
Werler (2004b)	Hemifasiyal mikrozomi, fasiyal asimetri, Goldenhar sendromu veya tek taraflı mikrotia/ anotia
Tasse (2005), Tasse (2007)	Mikrotia veya hemifasiyal mikrozomi ve <i>skin tag</i> birlikteliği
Van Bennekom (2013)	Mikrotia
Barisic (2014)	Goldenhar sendromu, hemifasiyal mikrozomi
Birgfeld (2016)	Mikrotia veya hemifasiyal mikrozomi ve <i>skin tag</i> birlikteliği

### 2.5.3. OAVS Klinik Bulgular

OAVS karışık terminolojisinin yanı sıra geniş bir klinik heterojenite gösterir. Klinikte izole mikrotia ya da hemifasiyal mikrozomi ve *preauriküler skin tag* birlikteliğinden anotia, vertebra, böbrek, göz, kalp ve SSS anomalileri gibi geniş bir

spektrumda karşımıza çıkabilir. Mikrotia, epibulbar dermoid ve vertebral bulguların birlikte görüldüğü bireyler spektrumun sadece %10'unu oluşturur (50). Aynı ailede etkilenmiş bireyler farklı şiddette klinik bulgular gösterebilir (50). Bireylerde ayrıca düşük doğum ağırlığı ve postnatal dönemde büyüme geriliği de görülebilir (55).

Hastaların %90'ında mikrotia, %25-50 'sinde dış kulak yolu atrezisi ya da stenoza görülür. Dış kulak yolu atrezisi hemen hemen her zaman iletim tipi işitme kaybı ile ilişkilidir. Dış kulak yolu atrezisinin bilateral olduğu durumlarda buna bağlı olarak konuşma gecikmesi görülebilir. İşitme kaybı iletim tipi olabileceği gibi orta ve iç kulak anomalilerinin eşlik etmesi durumunda sensörinöral işitme kaybı da görülebilir. Birinci derece mikrotiaya kemikçik yapılarını (%6-33), yuvarlak ve oval pencereyi (%6-15), mastoid pnömötizasyonunu (%15), kraniyal sinir seyri (%36) ve dış kulak yolunu (%42) etkileyen anomaliler değişken sıklıklarda eşlik eder (56).

*Preauriküler skin tag*, fistül ve veya *pit* hastalarda %40-%60 oranında görülür. *Skin tag* yerleşim olarak *preauriküler* bölgede, tragus ile ağız köşesi arasındaki hat boyunca ve boyun tabanında da bulunabilir. *Preauriküler skin tag* varlığının yanı sıra bu bölgelerde %65 oranında fistül ve sinus oluşumları da görülebilir (57). Hastalarda görülen dış, orta ve iç kulak bulguları Tablo 2.7.'de detaylandırılmıştır.

Hastaların %65'ine hemifasiyal mikrozomi eşlik eder. Sağ tarafta etkilenme daha sık gözlenmekle birlikte %10-33 oranında çift taraflı etkilenme de karşımıza çıkar. Çift taraflı etkilenmenin olduğu durumlarda sağ yüz yarısı daha fazla etkilenir. Hemifasiyal mikrozomi daima etkilenen kulakla aynı taraftadır. Dış kulakta etkilenme bilateral olduğunda da hemifasiyal mikrozomi görülür. Hemifasiyal asimetri 4 yaşından sonra belirginleşir. Kronolojik yaş arttıkça etkilenen bölgedeki dokuların büyümemesi nedeniyle daha belirgin hale gelir (36). Hemifasiyal mikrozomi görülen hastalarda çigneme ve yüz kasları da etkilenir ve mandibula, maksilla, zigomatik kemik ve temporal kemik hipoplazileri gözlenir (57). Hastalarda ayrıca ağız köşesi ve tragus arasında yarıklar görülebilir. Hastaların %15-22'sinde yarı damak/dudak gözlenir. Hastalarda ek olarak makrostomi, dilde yarıklanma, yüksek yerleşimli damak, gingival hipertrofi, malokluzyon, diş anomalileri, çigneme kasları hipoplazisi ve parotis aplazisi gözlenebilir. Hastaların kraniyofasiyal bulguları Şekil 2.9.'da gösterilmektedir.

**Tablo 2.7.** OAVS’de görülen dış-orta-iç kulak anomalileri (58)

Temporal Kemik Anomalileri	Dış Kulak Anomalileri	Orta Kulak Anomalileri	İç Kulak Anomalileri
Mastoid antrumun yetersiz havalanması	Mikrotia/Anotia	Orta kulak boşluğunun yetersiz gelişimi	Hipoplastik Kohlea
Östaki tüp lümeninin genişlemiş kıkırdak bölümü	<i>Preauriküler skin tag</i> ve pit	Kemikçik yokluğu, displazisi	Kohlear akuadukt yokluğu
Östaki tüp lateral lamina kıkırdağının yokluğu	Dış kulak yolu atrezisi /stenozu	Oval ve yuvarlak pencere yokluğu	Vestibuler sistem yetersiz gelişimi ve SCC kanal yokluğu/füzyonu
Uzun mastoid antrum	Timpanik membranın yetersiz gelişimi	Timpanik tensor kas yokluğu	Endolenfatik kanal displazisi
		Fasiyal sinir anormal seyri ve korda timpani yokluğu	Vestibuler akuadukt genişlemesi
			Fasiyal sinir kanal seyri değişimi
			Küçük, geniş ya da duplike iç kulak kanalı
			İç kulak kanal agenezi

OAVS’de en sık görülen göz bulgusu epibulbar dermoiddir (%35). Epibulbar dermoidler farklı boyutlarda sarı-krem renkli kitlelerdir ve genellikle limbusun *inferotemporal* bölgesinde yer alırlar (59). Epibulbar dermoidler %50 oranında tek taraflı görülürken %25 çift taraflıdır. Çift taraflı lezyonlar her iki tarafta da limbusun aynı bölgesinde yerleşim gösterirler.



**Şekil 2.9.** OAVS hastalarının kraniyofasiyal bulguları; mikrotia, hemifasiyal mikrozomi, *preauriküler skin tag* görünümleri (Resim <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5199> internet sitesinden alınarak kullanılmıştır.)

Epibulbar dermoide bağı olarak pupil önünün kapanması ve astigmatizm sonucu görme etkilenebilir. Epibulbar dermoid olan bireylerde göz kapağı kolobomu, iris kolobomu, lakrimal kanal anomalileri, mikrokornea, mikroftalmi, anoftalmi ve blefarofimozis daha çok gözlenir. Ayrıca hastalarda ezotropi, ekzotropi ve *Duane* sendromu görülebilir. Hastalarda nadir olarak retinal anomaliler de bulunur.

Hastalarda %5 ile %58 arasında çeşitli kardiyak anomaliler de bildirilmiştir. Karakteristik bir kardiyak anomali bulunmamakla birlikte VSD ve sağ aortik ark birlikteliği olan/olmadan görülen Fallot tetralojisi konjenital kalp hastalıklarının %65'ini oluşturur. Ayrıca erken zamanda cerrahi müdahale gerektiren situs inversus, dekstrokalardi, büyük arterlerin transpozisyonu ile de karşılaşılabılır. Trakeoözefageal fistül %5 oranında görülür. Akciğer bulguları tamamlanmamış lobülasyondan akciğer agenezisine kadar geniş bir spektrumda olabilir.

Spektrum dahilinde ürogenital anomalilerin görülme sıklığı %2,5-%50 arasındadır. Hastalarda renal agenezi, çift üreter, ektopik böbrek, renal arter anomalileri, hidronefroz, hidroüreter, üreteropelvik bileşke darlığı, imperfore anüs ve rektovajinal fistül ile karşılaşılabılır.

İskelet sistemi bulgularına bakıldığında; vertebral bulgular %18-60 oranında bu spektruma eşlik eder ve hemivertebra, atlas oksipitalizasyonu, vertebral füzyon, blok vertebra, aksesuar vertebra, tortikollis, skolyoz/kifoskolyoz ve spina bifida olarak karşımıza çıkar. Ayrıca hastalarda fazla sayıda kosta ve hipoplazisi şeklinde kosta anomalileri de görülebilir. Vertebral bulgular en sık olarak servikal bölgede (%60), sonra sırasıyla torasik bölge, kosta ve lomber bölgede görülür (60). OAVS spektrumunun bir parçası olarak baş parmak ya da radius hipoplazisi/aplazisi şeklinde radyal defektleride gözlenir (61).

Bu spektruma çeşitli SSS malformasyonları da eşlik edebilir. Özellikle göz bulgularına sahip hastalarda SSS bulguları daha sık gözlenir. Spektrum dahilinde görülen SSS bulguları; *Arnold Chiari* malformasyonu, hidrosefali, ventrikülomegali, serebral hipoplazi, teratoid rabdoid tümör, medulloblastom, ensefalosel, pons ve beyin sapı anomalileri, serebellar hamartom, hemisferik hipotrofi, lisensefali, beyin kalsifikasyonları, orta hat lipomaları, korpus kallosum anomalileri şeklinde karşımıza çıkar. Ayrıca tüm kranial sinirler etkilenebilir. Hastalarda tipik olarak 7. kranial sinirin anormal seyri gözlenir.



SSS bulguları prevalansı literatürde %2-69 arasında, ve kraniyal görüntülemesi olan hastalarda %42-69 arasında değişir. Zihinsel yetersizlik ve gelişme geriliği %8-73 oranında görülür (62). Nörogelişimsel çalışmalarda kas tonusu az olan, çift taraflı etkilenme ve servikal vertebra anomalisi olan hastalarda gelişme geriliği daha fazla bildirilir. Ek olarak; bu spektrum ile izlenen bireylerde psikososyal problemler ve otistik davranışlar da görülebilir (36) .

#### **2.5.4. OAVS Etyolojisi**

Son yıllarda insanlarda gelişimsel anomalilerle karakterize hastalıkların moleküler temeli ve embriyolojik gelişim ile ilişkisi hakkında bilgi birikimi artmasına rağmen OAVS etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Etyolojide mikrotia ile benzer faktörler suçlanır. OAVS'nin prenatal dönemde 30-45. günlerdeki gelişimsel bozukluk sonucu oluştuğu, blastogenez ve nöral krest hücrelerinin migrasyon defekti ile ilişkili olduğu düşünülür (63). OAVS etyolojisinde hem çevresel hem de genetik faktörler rol oynar.

#### **OAVS Çevresel Faktörler**

OAVS'ye neden olan çevresel faktörlerin başında gebelikte kullanılan ilaçlar (talidomid, pirimidon, retinoik asit, tamoksifen psödoefedrin, fenilpropanolam, aspirin ve ibuprofen), gebelikte sigara ve alkol kullanımı gelir (53, 64). Ayrıca bu spektrum maternal hipotiroidi, çölyak hastalığı, gebelikte vajinal kanama ve prematür doğum ile de ilişkilendirilmiştir (55).

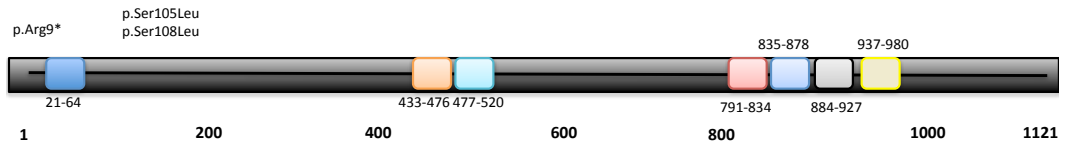
Diyabetik anne bebeklerinde de OAVS fenotipi gözlenir. Prenatal hiperglisemik durumun nöral krest hücre göçünü etkileyerek OAVS klinik bulgularına yol açtığı düşünülür (65). Etyolojide hem ileri maternal yaş hem de ileri paternal yaş suçlanır (55). Ek olarak; çoğul gebelik ve yardımcı üreme teknikleri kullanımı da risk faktörleri arasındadır (66). Çoğul gebelik ve yardımcı üreme teknikleri kullanımında artmış risk bulunması nedeniyle Jongbloet tarafından etyolojide *overripeness ovopathy* hipotezi öne sürülmüştür (67). Ayrıca vasküler yapılanmada bozukluk hipotezi OAVS'nin morfogenez sırasında stapediaal arter iskemisine ikincil gelişen fokal hemorajiler sonucu geliştiğini savunur (40). Vasküler yapılanmada bozukluk hipotezi ekstrakraniyal bulguları açıklamaması nedeniyle çoğu araştırmacı tarafından kabul edilmemektedir.

### OAVS Genetik Faktörler

OAVS karışık terminolojisinin yanı sıra geniş bir genetik heterojenite içerir. Hastaların çoğunda sporadik kalıtım görülmeyle birlikte literatürde %20-45 arasında aile öyküsü bildirilmiştir. Çoğu ailede inkomplet penetrans ve değişken ekspresyon ile birlikte otozomal dominant kalıtım bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda hastaların birinci derece akrabalarında sadece *skin tag* ile karakterize hafif bir etkilenme olabileceği gözlenmiştir (4). Monozigotik ikizlerde hem konkordans hem de diskordans gözlenmiştir. Otozomal dominant ve resesif kalıtım görülen ailelerin bulunması ve farklı kromozomlarda kopya sayısı değişikliklerinin bildirilmesi etyolojide genetik faktörler destekler (68-70).

Hastalık etyolojisini ve moleküler mekanizmaları aydınlatmak için ailesel vakalarda bağlantı analizleri ve mikrodizin çalışmaları yapılmıştır. Huang ve ark. yaptığı çalışmada otozomal dominant kalıtım ve üç kuşak etkilenmenin görüldüğü bir ailede 15q26.2- q26.3 bölgesinde bağlantı gösterilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada 14q32 bölgesinde yüksek LOD skor saptanmış, klinik *GSC* geni ile ilişkilendirilmiş, ancak 2017 yılına kadar *GSC* geni kodlayan kısımda OAVS'ye neden olan herhangi bir değişiklik gösterilmemiştir (70). Mikrodizin çalışmalarında ise genetik heterojeniteyi yansıtan tekrarlamayan ve birbirinden farklı kromozomal bölgelerde delesyonlar, duplikasyonlar, parsiyel trizomiler ve aday bölgeler saptanmıştır. Mikrodizin yönteminin yaygın kullanılmaya başlanmasıyla birlikte çeşitli kromozomlarda yer alan kopya sayısı değişiklikleri de hastaların kliniği ile ilişkilendirilmeye devam etmektedir. Rooryck ve ark. tarafından 86 hastada gerçekleştirilen yüksek çözünürlüklü oligonükleotid *array CGH* sonucunda 11 hastada 12 farklı CNV tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise 14q23.1 bölgesinde *OTX2* genini içeren bir duplikasyon saptanmış ve OAVS etyolojisinde kopya sayısı değişikliklerinin nedenselliği güçlenmiştir (70). OAVS hastalarında tanımlanmış kopya sayısı değişiklikleri Tablo 2.8.'de detaylandırılmıştır. Ek olarak; aynı aile içerisinde ve monozigotik ikizlerde klinik heterojeniteye neden olan epigenetik değişiklikler de etyolojide tartışılır. Yardımcı üreme teknikleri kullanımı sonrası OAVS riskinin artması ve hastalarda *BAPX1* ekspresyon değişikliklerinin görülmesi de etyolojide epigenetik değişikliklerin yer aldığını destekler (71).

OAVS etyolojisinde tek gen değişiklikleri değerlendirildiğinde; OAVS kliniği ile ilişkili ilk gen olan *MYT1* genindeki (şekil 2.10.) mutasyonlar 2016 yılında tanımlanmıştır (3). Özellikle son yıllarda klinik ve araştırmalarda kullanımı yaygınlaşan yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanıldığı tüm ekzom dizileme yöntemi çeşitli konjenital hastalıklara neden olan gen/genlerin saptanmasına olanak sağlamıştır. Bu kapsamda 2017 yılında yapılan bir başka çalışmada *GSC* geni heterozigot *missense* mutasyonu ilk defa OAVS kliniğinde saptanmıştır (72). Aynı çalışmada aurikulokondiler sendroma neden olan *PLCB4* genindeki bir mutasyon da OAVS fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (72). Ayrıca hastalarda *YPELI*, *MAPK1*, *CRKL*, *OTX2* genlerinde mutasyonlar da yakın zamanda tüm ekzom dizileme yöntemi ile gösterilmiştir.



**şekil 2.10.** *MYT1* protein yapısı ve *domainleri* (izim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

**Tablo 2.8.** Literatürde OAVS ile ilişkilendirilmiş kopya sayısı değişiklikleri

Sayısal ve Yapısal Kromozomal Değişiklikler	Kaynaklar
1p22.2-p31.1 delesyonu	(55)
2p11.2(FOXI3) delesyonu	(73)
2q32.1 duplikasyonu	(74)
2q11 delesyonu	(73)
4p16.1.1 duplikasyonu	(74)
4p16.3p15.33 delesyonu	(74)
4q13.3q21.1 delesyonu	(74)
3q29 duplikasyonu	(75)
Del(5p),5p15 delesyonu	(55)
5q13.2 delesyonu	(55)
Del(6q)	(57)
Trizomi 7 Mozaizm	(73)
8q13.3 delesyonu, del(8q)	(74)
8q24.3 duplikasyonu	(74)
t(9;12) (p23;q12.2)	(55)
inv9(p11;q13)	(55)
10p14p15 duplikasyonu	(55)
10q26.2q26.3 delesyonu	(74)
12p13.33 delesyonu	(55)
14q22.3 duplikasyonu	(76)
14q23.1 duplikasyonu	(55)
14q31.1q31.3 delesyonu	(55)
inv14(p11.2;q22.3)	(55)
15q24.1 delesyonu	(55)
15q26.2-q26.3 delesyonu	(72)
16p13.3 delesyonu	(74)
16p13.11p12.3 duplikasyonu	(74)
17q11.2 duplikasyonu	(74)
Trizomi 18	(70)
18p11.23p11.31 duplikasyonu	(73)
Del(18q)	(57)
22q11.1q11.21 duplikasyonu	(76)
22q11.2 delesyonu (Proksimal/ Distal)	(70, 74)
Dup(22q)	(57)
Trizomi 22	(68)
Xp22.33 delesyonu	(74)
Xp22.33 duplikasyonu	(74)
49, XXXXX	(57)
49, XXXXY	(57)
47, XXX	(73)
47, XXY	(57)
X kromozomu translokasyonları	(55, 74)

### 2.5.4.1. *MYT1* Geni

*MYT1* 20q13.33'te lokalize 23 ekzondan oluşan 5614 bp uzunluğunda bir gendir. *MYT1* gelişen santral sinir sisteminde eksprese olan myelin transkripsiyon faktör 1'i kodlar. Myelin transkripsiyon faktör 1; C2HC çinko parmak *domainleri* bulunduran ve nöronal prekürsor hücrelerin seçiminde etkili SSS'de eksprese olan bir proteindir. Ayrıca retinoik sinyal yolağı aracılı kraniyofasiyal bölge kıkırdak yapılarının gelişiminde görev alır. Literatürde OAVS ile ilişkilendirilmiş üç mutasyon (Tablo 2.9) tanımlanmıştır (3, 5). İlgili değişiklikler Tablo 2.8.'de detaylandırılmıştır.

**Tablo 2.9.** Literatürde tanımlanmış *MYT1* mutasyonları

Lokalizasyon	Mutasyon	Klinik özellikler	Kalıtım
Ekzon 3	p.Arg9*	Mikrotia, Preauriküler <i>tag</i> , işitme kaybı, hemifasiyal mikrozomi, epibulbar dermoid, vertebral bulgu, epilepsi	<i>De novo</i>
Ekzon 6	p.Ser105Leu	Makrostomi, Hemifasiyal mikrozomi, <i>Preauriküler skin tag</i> , İşitme kaybı, vertebral tutulum, pilor stenozu, Mikrotia YOK	Paternal
Ekzon 6	p.Ser108Leu	Bilateral mikrotia, <i>preauriküler tag</i> ve pit, işitme kaybı, hemifasiyal mikrozomi	

### 2.5.5. OAVS Ayırıcı Tanı

Literatürde birinci ve ikinci farengal arkların gelişim anomalileri ile karakterize pek çok farklı sendrom bulunur. Tablo 2.10. ve Tablo 2.11.'de OAVS ile örtüşen fenotip ve sendromdan sorumlu genler özetlenmektedir.

**Tablo 2.10.** OAVS ayırıcı tanıda yer alan sendromlar ve sorumlu genler

Hastalık adı	OMIM Numarası	Kalıtım	Sorumlu Gen	Kromozomal Bölge
Aurikulokondiler sendrom	614669 602483 615706	OD/OR OD OR	<i>PLCB4</i> <i>GNAI3</i> <i>EDNI</i>	20p12.3p12.2 1p13.3 6p24.1
Bixler sendromu	239800	OR	-	-
Brankiyookulofasiyal sendrom	113620	OD	<i>TFAP2A</i>	6p24.3
Brankiyootik sendrom	602588 608389 120502	OD	<i>EYAI</i> <i>SIX1</i>	8q13.3 14q23.1
Brankiyootorenal sendrom	113650 610896	OD	<i>EYAI</i> <i>SIX5</i>	8q13.3 19q13.32
Cat- eye sendromu	115470	-	Marker kromozom 22	22q11.2
CHARGE sendromu	214800	OD	<i>CHD7</i> <i>SEMA3E</i>	8q12.2 7q21.11
Hemifasiyal myohiperplazi	606773	-	-	-
LADD sendromu	149730	OD	<i>FGFR3</i> <i>FGFR2</i> <i>FGF10</i>	4p16.3 10q26.13 5p12
LAMM sendromu	610706	OR	<i>FGF3</i>	11q13.3
Kaufman Okuloserebrofasiyal sendrom	244450	OR	<i>UBE3B</i>	12q24.11
Klippel Feil sendromu	118100	OD	<i>GDF6</i>	8q22.1
Mandibulofasiyal Dizostozis ve Mikrosefali	610536	OD	<i>EFTUD2</i>	17q21.31
Meier Gorlin sendromu	224690 613800 613803 613804 613805	OR	<i>ORC1</i> <i>ORC4</i> <i>ORC6</i> <i>CDT1</i> <i>CDC6</i>	1p32.3 2q23.1 16q11.2 16q24.3 17q21.2
Mikrotia-işitme kaybı-yarık damak birlikteliği		OD/OR	<i>HOXA2</i>	7p15.2
Miller sendromu (Postaksiyel akrofasiyal dizostozis)	263750	OR	<i>DHODH</i>	16q22.2
Nager sendromu (Preaksiyel akrofasiyal dizostozis)	154400	OD	<i>SF3B4</i>	1q21.2
Okuloauriküler sendrom	612109	OR	<i>HMX1</i>	4p16.1
Pallister Hall sendromu	146510	OD	<i>GLI3</i>	7p14.1
Parry Romberg sendromu	141300	-	-	-
Townes Brocks sendromu	107480	OD	<i>SALL1</i>	16q12.1
Treacher Collins sendromu	154500 613717 248390	OD OD/OR OR	<i>TCOF1</i> <i>POLR1D</i> <i>POLR1C</i>	5q32q33 13q12.2 6p21.1
VACTERL	192350	-	-	-

**Tablo 2.11.** OAVS ayırıcı tanısında yer alan sendromların karşılaştırılması

	Maksiller/ Mandibuler Hipoplazi	Fasiyal Asimetri	Mikrotia	<i>Skin tag</i>	Vertebra	Kardiyak	Renal
OAVS	×	×	×	×	×	×	×
Aurikulokondiler Sendrom	×	×	×				
Brankiyootorenal sendrom	×	×	×	×			×
Cat-eye Sendromu	×	×	×	×	×	×	×
CHARGE sendromu	×	×	×			×	×
Hemifasiyal myohiperplazi	×	×					
Mandibulofasiyal Dizostozis ve Mikrosefali	×	×	×	×	×	×	
Miller sendromu	×		×				
Nager sendromu	×		×	×		×	×
Parry Romberg sendromu	×	×					
Townes Brocks sendromu	×	×	×	×	×	×	×
Treacher Collins	×		×				
VACTERL					×	×	×

### 3. BİREYLER VE YÖNTEM

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

Bu çalışmada genom boyu kopya sayısı değişikliği tespiti, *MYT1* geni dizi analizi, aday gen yaklaşımı için yolak analizi ve ekzom dizileme kullanılmıştır. Yöntem, bu başlıklar altında detaylandırılacaktır.

##### 3.1.1. Periferik Kandan DNA Eldesi ve Kantitasyon

Amonyum asetat (*Sigma*)

Tris klorür (*Sigma*)

Disodyum EDTA (*Sigma*)

Nanodrop ND-1000 UV-VİS spektrofotometre (*ThermoFisher scientific*)

##### 3.1.2. Genom Boyu Kopya Sayısı Değişikliklerinin Belirlenmesi

*Affymetrix Optima Array Suite CytoScan™ Optima* Kiti (*ThermoFisher Scientific*, Katalog No: 902533)

*MagnaRack™* Miknatis platform (*Invitrogen™*, Katalog No: CS15000)

*GeneChip™* Hibridizasyon Fırını 645 (*Applied Biosystems™*, Katalog no: 00-0331)

*GeneChip™ Fluidics* İstasyonu 450 (*Applied Biosystems™*, Katalog no: 00-0079)

*GeneChip™* Tarayıcı 3000 7G (*Applied Biosystems™*, Katalog no: 00-0210)

##### 3.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve DNA Dizi Analizi

*Geneall* PCR master miks (*Geneall Biotech*)

*Forward* ve *Reverse* Primer

*Veriti 96 Well Fast Thermal Cycler* (*Applied biosystems™*, *ThermoFisher Scientific*, Katalog no 4375305)

*SeaKem®* LE agaroz (*Lonza*, Katalog no 50002)

Etidyum Bromür (*Sigma*)

Orange G (*Sigma*)

*Ladder* markör (*Promega*)

*UVP BioSpectrum 500* Jel Görüntüleme Sistemi

*Geneall* PCR pürifikasyon kiti (*Geneall Biotech*, Katalog no: GA-113-102)

ZR DNA dizileme pürifikasyon kiti (*Zymo Research*, Katalog no: D4050)



3500-Genetic Analyzer (*Applied biosystems*<sup>TM</sup>, Katalog no: 4440462)

Anot Tamponu 3500 Serisi (*Applied biosystems*<sup>TM</sup>, Katalog no: 4393927)

Katot Tamponu 3500 Serisi (*Applied biosystems*<sup>TM</sup>, Katalog no: 4408256)

POP-7<sup>TM</sup> Polimer (*Applied biosystems*<sup>TM</sup>, Katalog no: 4393708)

3500 Genetic Analyzer 8'lik kapiller 50 cm (*Applied biosystems*<sup>TM</sup>, Katalog no: 4404684)

### 3.1.4. Tüm Ekzom Dizi Analizi

*Qubit*<sup>TM</sup> dsDNA HS Assay (*Life technologies*, Katalog no: Q32851)

*Ion Proton*<sup>TM</sup> Sistemi (*Ion torrent*<sup>TM</sup>, Katalog no: 4476610)

*Agencourt AMPURE XP* kiti (*Beckman Coulter*, Katalog no: A63880)

*Dynabeads M-270* Streptavidin (*Invitrogen*, Katalog no: 653-05)

*DynaMag*<sup>TM</sup>-96-kuyulu mıknatıs platform (*Thermofisher Scientific*, Katalog no: 12331D)

*Ion Xpress*<sup>TM</sup> barkod adaptörleri (*Life technologies*, Katalog no: 4471250)

*Ion PI*<sup>TM</sup> Template OT2 200 kiti v3 (*Thermofisher Scientific*, Katalog no: A26434)

*Ion OneTouch*<sup>TM</sup> 2 Instrument (*Ion torrent*<sup>TM</sup>, Katalog no: 4474778)

*Ion PI*<sup>TM</sup> Hi-Q<sup>TM</sup> Sequencing 200 kiti v3 (*Ion torrent*<sup>TM</sup>, Katalog no: A26433)

*Ion AmpliSeq*<sup>TM</sup> Exome RDY kiti (*Ion torrent*<sup>TM</sup>, Katalog no: A38262)

*Ion Proton*<sup>TM</sup> Yıkama 2 şişesi (*Ion torrent*<sup>TM</sup>, Katalog no: A25591)

*Ion PI*<sup>TM</sup> çip kiti v3 (*Ion torrent*<sup>TM</sup>, Katalog no: A26771)

*Ion Chip*<sup>TM</sup> mini santrifüj (*Ion torrent*<sup>TM</sup>, Katalog no: A26433)

### 3.2. Hastaların Değerlendirilmesi

Çalışmaya katılan hasta grubunun seçiminde 2005 yılında Tasse ve arkadaşları tarafından belirlenen kriterler kullanılmıştır (4). Çalışmaya dahil edilecek hastaların saptanması amacıyla; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı'na başvuran hastalar arasında klinik bulguları OAVS ile uyumlu hastalar değerlendirildi. OAFNS ve OAVS ve radyal defekt birlikteliği OAVS alt grubunda kabul edildi. OAVS ile uyumlu bulguları olan toplam 23 hastanın ailelerinden ve uygun koşullarda kendilerinden çalışmaya katılmak amacıyla aydınlatılmış onam formu ve fotoğraf paylaşımına dair izin alındı. Hastalar kişisel özelliklerine, aile öyküsüne, prenatal özelliklerine ve klinik bulgularına göre değerlendirildi. Hastaların kulak morfolojik anomalileri görsel olarak değerlendirildi. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 31/01/2018 tarihli GO-18/118-33 numaralı kararıyla etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: TTU-2018-16935).

#### 3.2.1. Hastaların Farklı Açılardan Fotoğraflarının Çekilmesi ve Sınıflandırması

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik muayeneleri sırasında mikrotia hastalarında fenotipik değerlendirme aracı olarak kullanılan *PAT-Microtia* (77) ile uyumlu olacak şekilde hemifasiyal mikrozomi, malokluzyon ve fasiyal paraliziye değerlendirecek şekilde 12 farklı açıdan fotoğraf çekildi. Ayrıca hastalar Tasse ve arkadaşları tarafından geliştirilen puanlama sistemi revize edilerek sınıflandırıldı. Mikrotia, *skin tag* yada hemifasiyal mikrozomi ve vertebral bulgular ana bulgu (2 puan) olarak kabul edildi. İşitme kaybı, yarı damak, epibulbar dermoid, göz bulgusu, kardiyak anomali, GÜS anomali, mikrosefali, gelişme geriliği, SSS bulgusu, orta kulak anomali, iç kulak anomali ve ekstremitte anomalileri minor bulgu (1 puan) olarak değerlendirildi. Kıvrık kusuru göz bulgusu olarak değerlendirilmedi. Herhangi bir bulgunun çift taraflı görülmesi bilateral etkilenme kabul edildi. Sınıflandırma Tablo 3.1.'de detaylandırılmıştır.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan sınıflandırma kriterleri

Sınıflandırma	Kriter
3b	Mikrotia/ <i>Skin tag</i> +Hemifasiyal Mikrozomi+ Vertebral Bulgu
3u	
2b	Mikrotia+ <i>Skin tag</i> / Mikrotia +Hemifasiyal Mikrozomi/ Mikrotia+ <i>Skin tag</i> + Hemifasiyal Mikrozomi
2u	
1b	Mikrotia
1u	

(b: bilateral etkilenme u: unilateral etkilenme, 1'den 3'e doğru klinik ağırlık artmaktadır.)

### İstatistiksel Analiz:

Verilerin değerlendirilmesinde “*IBM Statistics Package for Social Sciences (SPSS ver. 23.0)*” istatistiksel paket program kullanıldı. Analizlerde tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak, dağılım istatistikleri ise ortalama, standart sapma ve ortanca değerler ile belirlendi. Hasta sayısının 30 kişiden az olması nedeniyle değişkenlerin normal dağılmadığı kabul edildi ve analizler normal dağılım göstermeyen örneklerle yapıldı. Kategorik değişkenler için gruplar arasındaki farklılık Ki-Kare testi ile değerlendirildi. Sayısal değişkenler arasındaki ilişki *Kruskal Wallis* testi ile analiz edildi. Ayrıca değişkenler arasındaki korelasyon *Spearman* korelasyon testine uygun olarak hesaplandı.

### 3.3. Periferik Kandan Genomik DNA Eldesi ve Kantitasyon

EDTA'lı tüplere periferik kan alınmasının ardından amonyum asetat ile çöktürme yöntemi kullanıldı. Bunun için 50 ml'lik *Falcon* tüplere boşaltılan 10 ml'lik kan örneği 40 steril distile su karıştırılarak kuvvetlice çalkalandı. 588 gde 20 dakika santifrüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve kalan çökelti üzerinde aynı işlem tekrarlanarak 694 gde 20 dakika santifrüj edildi. Süpernatant atıldı. Her bir tüpteki çökelti üzerine 3 ml nükleer lizis tampon (10 mM Tris, 400 mM NaCl, 200 µM, pH 8.,2); 150 µl 10 mg/ml proteinaz K ve 200 µl %10'luk sodyum dodesil sülfat solüsyonu eklendi. Tüpler karıştırıldı ve bir gece boyunca 37 derece sıcaklıkta etüvde bekletildi.

Etüvden alınan her bir tüpe 3 ml 148 g/100 ml amonyum asetat eklenerek çalkalandı. Sonra 3076 gde 20 dakika santifrüj edildi. Süpernatant pastör pipeti ile dipteki pelete dokunmadan başka bir temiz tüpe alınarak üzerine etil alkol eklendi.

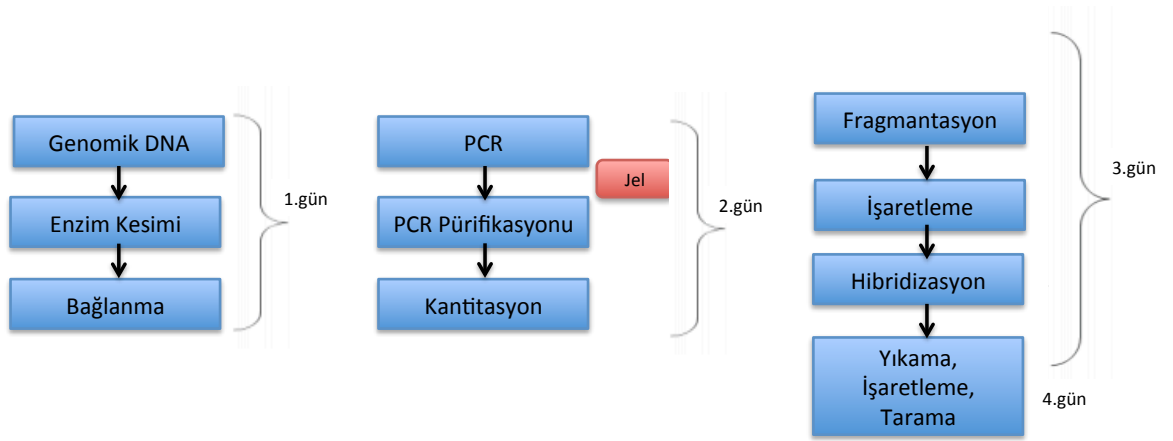
Tüpler hafifçe çalkalandı. Görünür hale gelen DNA pipet ucu yardımıyla toplanarak 400 µl Tris-EDTA tamponu içeren tüpler içerisine yerleştirildi. DNA'nın konsantrasyonu *Nanodrop ND-1000 UV-VIS* spektrofotometre cihazında ND-1000 software ver. 3.8.1. yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Genomik DNA A260/A280 oranı 1.8-2.0 arasında olması ile DNA'lar ile çalışılmaya başlandı.

### 3.4. Genom Boyu Kopya Sayısı Değişikliği Taraması

CNV analizi 18,018 non-polimorfik kopya sayısı probu ve 148,450 SNP probu bulunduran *Affymetrix CytoScan Optima* çipleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Mikrodizin çalışması *Affymetrix* tarafından sağlanan protokole göre çalışıldı ([https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cyto\\_optima\\_userguide.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cyto_optima_userguide.pdf)).

Yöntem temel olarak; genomun enzimle kesimi, kesilen uçlara adaptör bağlanması, adaptöre özgü primer ile tüm genomun amplifikasyonu, amplifiye olmuş ürünlerin fragmentasyonu ve hazır mikrodizin çipleri üzerine hibridizasyonu basamaklarından (Şekil 3.1.) oluşur. Basamaklar aşağıda anlatıldığı şekilde yapılır.



**Şekil 3.1.** *Affymetrix* mikrodizin yöntemi basamakları akış şeması (Çizim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

### a. Genomik DNA'nın Hazırlanması

Bireylerin DNA örnekleri düşük konsantrasyonda EDTA içeren TE tampon solüsyonu ile 50 ng/ $\mu$ l olacak şekilde dilue edildi. 250 ng konsantrasyonunda DNA örnekleri hazırlandı.

### b. Restriksiyon Enzim Kesimi

BSA ve NspI tamponunun oda sıcaklığına gelmesi beklenildi. Enzim kesimi için miks her bir örnek için; nükleaz içermeyen steril distile sudan 11.55  $\mu$ L, NspI tampondan 2  $\mu$ L, 100X BSA'dan 0.20  $\mu$ L ve NspI restriksiyon enziminden 1  $\mu$ L karıştırılarak hazırlandı. DNA örneklerinin üzerlerine 14.75  $\mu$ L NspI enzim miksi eklendi. Enzim kesimi işlemi *Thermal Cycler* cihazında 37°C'de 120 dk, 65°C'de 20 dk ve 4°C'de 5 dk süresince gerçekleştirildi.

### c. Adaptör Bağlanması

Kesim tamamlandıktan sonra enzime uygun adaptörlerin kesilmiş DNA parçalarına bağlanması amacıyla ligasyon işlemi yapıldı. DNA ligaz tamponu, adaptör ve ligaz enziminin oda sıcaklığına gelmesi beklenildi. Ligasyon için miks; DNA ligaz tamponundan 2.5  $\mu$ L, NspI adaptörden 0,75  $\mu$ L ve DNA ligaz enziminden 2  $\mu$ L karıştırılarak hazırlandı. Ligasyon karışımı önceki basamak sonrasında enzim kesimi tamamlanmış örneklerin üzerine eklendi ve toplam hacim 25  $\mu$ L tamamlandı. Sonrasında *Thermal Cycler* cihazında 16°C'de 180 dk, 70°C'de 20 dk ve 4°C'de 5 dk süresince ligasyon gerçekleştirildi.

### d. PCR

*CytoScan Taq* tamponu, dNTP ve PCR primerleri oda sıcaklığına geldiğinde PCR *master* miks hazırlandı. Bir önceki basamak sonrası elde edilen ligasyon ürünleri nükleaz içermeyen su ile ¼ oranında sulandırıldı. Master miks içeriği Tablo 3.2.'de detaylandırılmıştır.

**Tablo 3.2.** Mikrodizin PCR master miksinin içeriği

	Her bir örnek için;	24 örnek için (%15'lik hata düşünülerek)
Nükleaz içermeyen DH <sub>2</sub> O	50.3 µL	2897.3 µL
<i>Cytoscan Taq</i> tamponu	10 µL	576 µL
5M Betain	20 µL	1152 µL
dNTP	3.5 µL	201.6 µL
PCR Primer	4.2 µL	241.9 µL
<i>CytoScan Taq</i> DNA polimeraz	2 µL	115.2 µL
Total Hacim	90 µL	5184 µL

Miks hazırlandıktan sonra dilue edilmiş ligasyon ürünleri ikişer adet 10 µL'ye ayrıldı. Sonraki basamaklarda gerçekleştirilen çalışmalar aynı hastaya ait iki ayrı 10 µL örnek kullanılarak gerçekleştirildi. Dilue ligasyon ürünlerinin 10 µL'si üzerine PCR karışımından 90 µL eklenerek toplam hacim 100 µL'ye tamamlandı. *Thermal Cycler* cihazında 95°C'de 1 dk, sonrasında 30 siklus boyunca 95°C'de 30 sn, 60°C'de 45 sn ve 68°C'de 60 sn süresince ve en son sırasıyla 68°C'de 7 dk ve 4°C'de 5 dk bekletilerek PCR gerçekleştirildi.

#### **PCR Ürünlerinin Kontrolü**

PCR ürünlerinden 3 µL pipetaj yaparak 17 µL yükleme tamponu ile birlikte %2'lik agaroz jele yüklendi ve elektroforez gerçekleştirerek PCR reaksiyonunun kontrolü sağlandı. Ürünlerin çoğunluğunun 150-2200 bp arasında olduğu görüldü.

#### **e. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu**

Pürifikasyon öncesinde PCR basamağında 2 ayrı tüp şeklinde ayrılmış örnekler toplam hacim 197 µL olacak şekilde (200 µL- 3 µL) birleştirildi. ‘‘*Purification Bead*’’ solüsyonundan her bir PCR ürününün üzerine 360 µL eklenerek 10 dakika süresince oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında örnekler 3 dakika boyunca 16.000 gde santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 2 mL'lik ependorf tüpler mıknatıs platforma (*Magnarack*) yerleştirildi. Bekleme sonrasında tüpün alt tarafında bulunan pelete zarar vermeden süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Her bir tüpe 800 µL pürifikasyon yıkama tamponu eklenerek 2 dakika vorteks edildi. Devamında örnekler 3 dakika boyunca 16.000 gde santrifüj edilerek tekrar mıknatıs platforma yerleştirildi ve süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Bu işlem sonrasında tüpler 30 sn 16.000 gde santrifüj edildi ve 20 µL pipet ucu ile tüp içerisinde kalan yıkama

tamponu temizlendi. Geriye kalmış yıkama tamponunun uzaklaştırılması amacıyla tüpler miknatıs platformdan çıkarıldı ve 7 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Sonra tüpler üzerine 27 µL elüsyon tamponu eklendi, 10 dakika boyunca vorteks edildi ve 3 dakika boyunca 16.000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında örnekler tekrar miknatıs platforma yerleştirildi ve 10 dakika boyunca manyetik kürelerin bir tarafa toplanması beklenildi. Son olarak tüpler üzerindeki süpernatant kısım toplanarak yeni tüplere aktarıldı ve pürifiye ürünler elde edildi. Pürifiye olmuş ürünlerin 25 µL'si ile bir sonraki basamağa devam edildi.

#### **f. Kantitasyon**

*Nanopore* kullanılarak 2 µL hacmindeki pürifiye edilmiş ürünlerin absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Bütün ürünlerin verimi  $\geq 3.0$  µg/µL üzerinde ölçüldü.

#### **g. Fragmentasyon**

Ölçümü yapılmış PCR ürünleri 10 dk boyunca buz üzerinde bekletildi. Fragmentasyon tamponunun oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Sonrasında fragmentasyon için master miks; nükleaz içermeyen distile sudan 215 µL, fragmentasyon tamponundan 275 µL ve fragmentasyon solüsyonundan 10 µL karıştırılarak hazırlandı. Pürifiye edilmiş 23 µL PCR ürünlerinin üzerine 5'er µL dağıtılarak toplam hacim 28 µL'ye tamamlandı. Sonra öncesinde ısıtılmış *Thermal Cycler* cihazında 37°C'de 35 dk, 95°C'de 15 dk ve 4°C'de 5 dk süresince fragmentasyon gerçekleştirildi.

#### **h. İşaretleme**

TdT tamponun ve DNA işaretleme solüsyonunun oda sıcaklığına gelmesi beklenildi. Sonra işaretleme için master miks; TdT tamponundan 7 µL, DNA işaretleme solüsyonundan 1 µL ve TdT enziminden 1.8 µL karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan karışım 26 µL'lik fragmente olmuş ürünlerin üzerine her birine 9.8 µL olacak şekilde paylaştırıldı. Sonra *Thermal Cycler*'da 37°C'de 240 dk, 95°C'de 15 dk ve 4°C'de 5 dk süresince işaretleme reaksiyonu gerçekleştirildi.

### i. Hibridizasyon

Öncelikle AGCC (*Affymetrix GeneChip™ Command Console*) yazılımı aracılığı ile *batch* dosyası oluşturuldu. Sonrasında 15 ml tüpte hibridizasyon için master miks hazırlandı. Hibridizasyon miksinin içeriği Tablo 3.3.'te detaylandırılmıştır. İşaretlenmiş örnekler üzerine 95  $\mu$ L miks eklendi. *Thermal Cycler*'da 95°C'de 10 dk ve 49°C'de 3 dk süresince hibridizasyon gerçekleştirildi. Hibridizasyon programı başlatılması ardından hibridizasyon fırını çalıştırılarak sıcaklık 50°C'ye ayarlandı.

**Tablo 3.3.** Hibridizasyon master miks içeriği

	Her bir örnek için;	24 örnek için (%15'lik hata düşünülerek)
Hibridizasyon Tamponu 1	82.5 $\mu$ L	2376 $\mu$ L
Hibridizasyon Tamponu 2	7.5 $\mu$ L	216 $\mu$ L
Hibridizasyon Tamponu 3	3.5 $\mu$ L	100.8 $\mu$ L
Hibridizasyon Tamponu 4	0.5 $\mu$ L	14.4 $\mu$ L
Oligo Kontrol Solüsyonu	1 $\mu$ L	28.8 $\mu$ L
Total Hacim	95 $\mu$ L	2736 $\mu$ L

*Thermal Cycler* hibridizasyon programı sonrası örneklerin 100  $\mu$ L'si teker teker çiplere yüklendi ve hibridizasyon fırınına yerleştirildi (Şekil 3.2.). Gece boyunca hibridizasyon fırınında 60 rpm de ve 50°C sıcaklıkta hibridizasyon gerçekleştirildi.



**Şekil 3.2.** *Affymetrix* çiplerine hibridizasyon solüsyonlarının yüklenmesi

### j. Yıkama-İşaretleme-Tarama

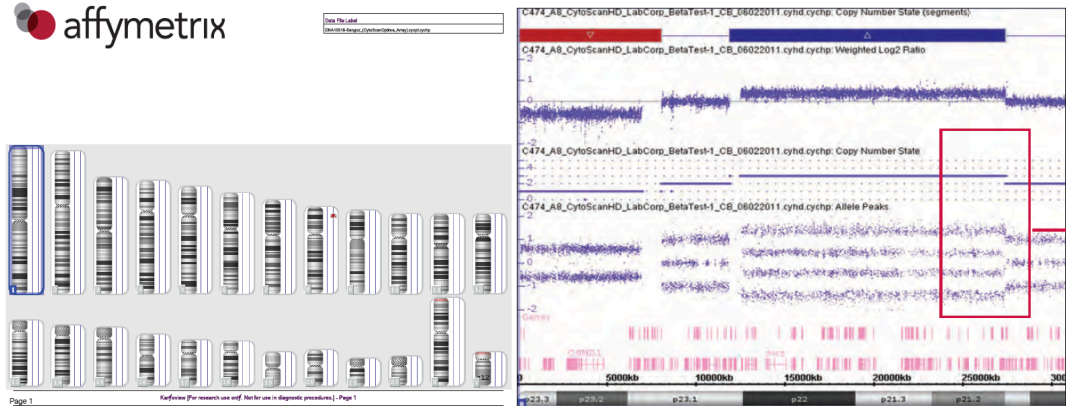
Yıkama işlemi AGCC yazılımı aracılığı ile *Fluidics* istasyonu kontrol edilerek başlatıldı. 500  $\mu$ L işaretleme tamponu 1, 500  $\mu$ L işaretleme tamponu 2 ve 800  $\mu$ L *array holding* tamponu üç farklı ependorfa yüklenerek istasyonun hazırlığı yapıldı.



Bu basamaktan sonra sırasıyla yıkama ve boyama aşamalarına geçildi. Sonrasında istasyondan alınan çiplerde hava olmadığı görülerek çipler *Fluidics* istasyonundan *GeneChip Scanner 3000 7G* tarayıcısına yerleştirildi. Tarama süreci AGCC yazılımı aracılı gerçekleştirildi. Analiz sonuçları çip yoğunluğunu gösteren “.CEL” formatında dosyalandı.

### k. Sonuçların Değerlendirilmesi

*Chromosome Analysis Suite Software version 3.1 (CHAS)* yazılımı aracılığıyla “.CEL” formatındaki dosyalar “.CYCHP” dosyalarına dönüştürüldü. Kalite kontrol basamakları ve sonuçların analizi *CHAS* programı kullanılarak “.CYCHP” dosyaları ile yapıldı. Kalite kontrol için MAPD ve snpQC değerleri analiz edildi. Kalite kontrol değerleri  $\text{mapd} \leq 0.29$ ;  $\text{snpQC} \geq 8.5$  olan hastaların “.CYCHP” dosyaları *CHAS* programı aracılı görselleştirilerek analiz yapıldı (Şekil 3.3.). Hastalardaki değişiklikler  $>1$  marker ve  $>1$  kb olacak şekilde standardın üzerinde yüksek çözünürlükte değerlendirildi.



Şekil 3.3. Mikrodizin sonuçlarının Cychp görüntüsü (Delesyon saptanan alanlar kırmızı, duplike olanlar mavi renk ile gösterilmektedir.)

### 3.4.1. Mikrodizin Sonuçlarının Analizi

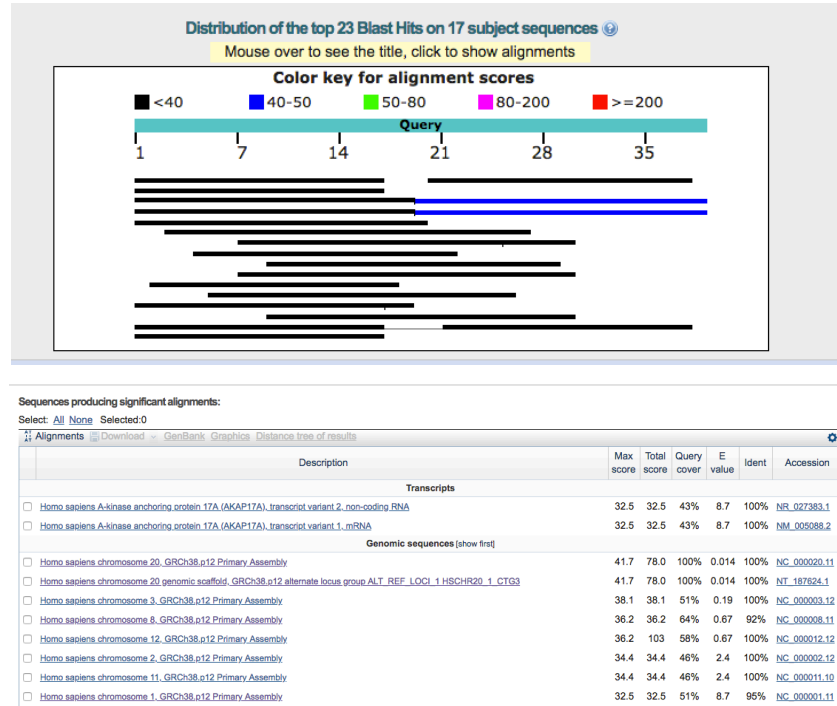
Kopya sayısı değişikliklerinin anlamlandırılması ve klinik ile ilişkilendirilmesi *inhouse* örneklerin karşılaştırması ve *CLINVAR*, *Decipher*, *DGV* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) ve *Miami* Üniversite'si tarafından geliştirilen *online* veri tabanlarının ([http://firefly.ccs.miami.edu/cgi-bin/ROH/ROH\\_analysis\\_tool.cgi](http://firefly.ccs.miami.edu/cgi-bin/ROH/ROH_analysis_tool.cgi)) kullanımı ile gerçekleştirildi. Tüm genomik pozisyonlar Şubat 2009'da "Genom Referans Konsorsiyum" u tarafından belirlenen GRCh37/hg19 insan referans dizisine göre gösterildi. Ayrıca kopya sayısı değişikliği görülen bölgede yer alan genlerin; *GeneMANIA* platformunda ([genemania.org](http://genemania.org)) dış kulak gelişiminde önemi olan genler ile ilişkisi değerlendirildi. Ek olarak hastalarda saptanan kopya sayısı değişikliklerinin genom mimarisine etkisi Yue laboratuvarı Hi-C *online* veri tabanı kullanılarak araştırıldı ([promoter.bx.psu.edu/hi-c](http://promoter.bx.psu.edu/hi-c)).

### 3.5. MYT1 Geni Dizi Analizi

OAVS etyolojisinde *MYT1* genindeki mutasyonlar 2016 yılında tanımlanmıştır (3). Ayrıca klinik bulguları açıklayan başka bir *MYT1* mutasyonu 2017 yılında yapılan bir çalışmada daha gösterilmiştir.

#### 3.5.1. MYT1 Geni Primerlerinin Tasarlanması

*MYT1* geni ekzonların özgül olarak çoğaltılması amacıyla *Windows* işletim sisteminde çalışan *Primer Perl* programı aracılı 21 çift primer tasarlandı. Referans genom olarak *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>) veri tabanında yer alan ENST00000536311.5 transkript numarasına sahip *MYT1* dizisi kullanıldı. *Forward* ve *Reverse* primerlerin Tm derecelerine, GC oranlarına ve primer dimer oluşturma yatkınlıklarına dikkat edildi. Primerlerin *MYT1* geni dışındaki bölgelere bağlanmasının olup olmadığı *UCSC Genome Browser In Silico PCR* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPCR>) ve *BLAST NIH NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) online veri tabanlarında kontrol edildi (Şekil 3.4.).



**Şekil 3.4.** Primer dizilerinin *Blast* programı ile değerlendirilmesi (Mavi renk, *E value*'nin düşük olması ve %100 kapsam bulunması; *MYT1* genine özgülüğünün yüksek olduğunun göstergesidir.)

### 3.5.2. *MYT1* Geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Primer dizileri Tablo 3.4.'te gösterilmektedir. Primerler ana stok 100 mikromolar, çalışmalarda kullanılacak ara stok 10 mikromolar olacak şekilde dilue edildi. Hem ana stok hem ara stok primerler -20 °C'de saklandı. Tüm PCR reaksiyonları 10 µL *Promega 2x* miks, 6 µL DH<sub>2</sub>O, 2 µL DNA, 1 µL Forward primer ve 1 µL reverse primer kullanılarak yapıldı.

*Applied Biosystems Veriti 96 Well Fast Thermal Cycler* cihazında sadece bağlanma sıcaklıkları farklı olmak üzere PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. En iyi sonuç alınan PCR reaksiyon koşulları Tablo 3.5. 'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.4.** *MYT1* geni primerleri listesi

Forward Primer	Reverse Primer	Tm
<i>MYT1</i> _E3F: CTGTCAAAGCTTGAGCCAG	<i>MYT1</i> _E3R:CTTCAAAGCTCAGCAGCC	59°C
<i>MYT1</i> _E4F: GGTCTCACTGAGATTTGCCT	<i>MYT1</i> _E4R:TGGTCAATCCAAGAAGACCC	59°C
<i>MYT1</i> _E5F: CTGGAGACATTCTGCTCCC	<i>MYT1</i> _E5R:TCCATGCTAGAGTGGGAAGT	59°C
<i>MYT1</i> _E6F: AAGGACTGGATGAGTCTGTG	<i>MYT1</i> _E6R:TCAGGAAGGGCTTTCTCTTG	59°C
<i>MYT1</i> _E7-1F:TTCATGTTTCCCCTTGGCTC	<i>MYT1</i> _E7-1R:GGTGTCTTCCTGAAAGATCACA	60°C
<i>MYT1</i> _E7-2F: GAGGAGTCCAGCAAGCAG	<i>MYT1</i> _E7-2R:TGTCCTAGAAGGGCTCTCAG	60°C
<i>MYT1</i> _E8F: TCAAGCTCATGGGCAGTC	<i>MYT1</i> _E8R: AGATGTAAGGATGAGCATCTGG	59°C
<i>MYT1</i> _E9F: CTCTGTGCCCTGAAAGCTTA	<i>MYT1</i> _E9R:ACCTGTACCCACTCCTCA	59°C
<i>MYT1</i> _E10F:AGTTCACCTGGAGTTCTCAC <i>MYT1</i> _E10F2:CATCTTTGCCAGAGCTTTC	<i>MYT1</i> _E10R:ACACATGCACATACAGCCT <i>MYT1</i> 0R2: CCTCTGCAGGCATTTG	59°C
<i>MYT1</i> _E11F: GTCTCCTTCCTCACCAGAC	<i>MYT1</i> _E11R:GGTAGAGTTTCCCTCCCTAGTA	59°C
<i>MYT1</i> _E12F: TGTGAGGACTTGGGACTG	<i>MYT1</i> _E12R:GAATTGCCAGCTAGGCAC	58°C
<i>MYT1</i> _E13F: CTGGACTCTGTACGTTTGATTC	<i>MYT1</i> _E13R:AGCTGCTCAGAAGATGAAGG	59°C
<i>MYT1</i> _14F:TTCTGTGGACACTGTCCTG	<i>MYT1</i> _E14R:GGGAAACCTCTGAATACCCT	59°C
<i>MYT1</i> _15-16F: GCTGTCCTCCAAGGACTGA	<i>MYT1</i> _E15-16R:GGAGAGGCAAACAGCAGAG	60°C
<i>MYT1</i> _17-18F: GAGCCCAGAAGGCTTTCC	<i>MYT1</i> _E17-18R:ATCCAGGGCTCCTATCTTCA	60°C
<i>MYT1</i> _19F: GGCCAGTTCTTCCCTGAG	<i>MYT1</i> _E19R:CCTTTCCTTGAGCAACTCT	59°C
<i>MYT1</i> -20F: GGCTGGTGAATGATATGTGG	<i>MYT</i> -20R: GGTGTCAAGAGCTTCAGAG	59°C
<i>MYT1</i> _21F: TGCCTGAACAACTTCCATC	<i>MYT1</i> _E21R:CTGACAGCAACCTTGATGAG	58°C
<i>MYT1</i> _22-23F: CCAGAGGGTTGTGAGAGG	<i>MYT1</i> _E22-23R:AACGGGAAGTCACTGTGAG	59°C

**Tablo 3.5.** *MYT1* geni PCR Koşulları

Sıcaklık	Süre	
95°C	1dk	
95°C	30sn	35 siklus
58-60°C	45sn	
72°C	45sn	
72°C	7dk	

### 3.5.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Öncelikle 4 gram agaroz ve 200 ml 1x TBE Erlenmayer şişesinde karıştırıldı. Bu karışım 5 dakika süresince mikrodalgada kaynatıldı ve içerisine 12 µL etidyum bromür ilave edilerek %2'lik agaroz jel hazırlandı. 3 µL PCR ürünü 3 µL Orange G ile karıştırılarak %2'lik agaroz jeldeki kuyulara yüklenerek 120 V'da 30 dakika boyunca BIO-RAD PowerPac™ HC High-Current güç kaynağı kullanılarak elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonunda bant büyüklüklerinin karşılaştırılması için 1.5 µL Promega 1000 bp markör kullanıldı. Jel görüntülemesi Biospectrum görüntüleme sistemi ve Vision WorksLS programı aracılığı ile yapıldı.

### 3.5.4. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Elektroforezde uygun uzunlukta ve tek bant elde edilen PCR ürünleri *Geneall Expin™* ile pürifiye edildi. Pürifikasyon üç basamakta gerçekleştirildi. İlk basamak olan bağlanma basamağında; PCR ürünün üzerine 100 µL PB tamponu karıştırılarak minikolonların üzerine eklendi ve sonrasında 30 sn boyunca 12,000 gde santrifüj edildi. Yıkama için; santrifüj sonrasında minikolonların üzerine 500 µL yıkama solüsyonu eklenerek 12.000 gde 30 sn boyunca daha santrifüj gerçekleştirildi. Sonrasında minikolonların toplama tüpünde biriken yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı ve herhangi bir solüsyon eklenmeden yıkama solüsyonun içerisindeki alkolün uzaklaşması amacıyla 16.000 gde 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Son basamak olan elüsyon için önce minikolonların içindeki PCR ürünlerinin bağlı olduğu membrana yeni bir 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Membran üzerine 45 µL elüsyon solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi. Sonrasında 16.000 gde 1 dakika süresince santrifüj işlemi gerçekleştirilerek ependorf tüpün içerisinde saflaştırılmış PCR ürünleri elde edildi. Pürifikasyon işleminin ardından hemen *Sanger* yöntemi ile DNA dizileme işlemine başlandı.

### 3.5.5. *MYT1* Geni Dizi Analizi

Pürifiye edilmiş PCR ürünleri uygun primerler ve *Big Dye Terminator* kiti kullanılarak DNA dizileme reaksiyonu gerçekleştirildi. Dizileme için 4 µL distile dH<sub>2</sub>O, 2 µL *Big Dye* tamponu, 2 µL *Big Dye* enzimi, 1 µL primer ve 1 µL pürifiye PCR ürünü kullanılarak gerçekleştirildi. *MYT1* primerlerinden 7., 10., 11., 12.

ekzonlar için R primer, diğer ekzonlar için F primer kullanıldı. *Sanger* dizileme *Thermal Cycler* cihazında 96°C’de 1 dk, sonra 25 siklus boyunca 96°C’de 10 sn, 50°C’de 0.05 sn ve 60°C’de 4 dk süresince gerçekleştirildi.

### 3.5.6. DNA Dizileme Ürünlerinin Pürifikasyonu

DNA dizileme reaksiyonu sonrası örnekler *Zymo Research ZR DNA sequencing clean up* sekans pürifikasyon kiti kullanılarak saflaştırıldı. Bunun için 20 µL sekans reaksiyonu ürünü ile 240 µL sekans bağlama solüsyonu karıştırıldı ve pürifikasyon kolonlarının üzerine eklendi. 14.000 gde 30 sn santrifüj ile PCR ürünlerinin kolonlara tutunması sağlandı. Ardından, 300µL membran yıkama solüsyonu eklenerek 14.000 gde 30 sn santrifüj ile kolona bağlı olan sekans reaksiyonu ürünleri yıkandı. 20 µL steril distile su eklenerek 14.000 gde 30 sn santrifüj sonrası pürifiye sekans reaksiyonu ürünleri elde edildi. Pürifiye edilmiş sekans ürünlerinin kapiller elektroforezi *ABI Prism 3500 Genetic Analyzer* cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.5.7. MYT1 Geni Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller elektroforez sonrası sonuçlar öncelikle *Seqscape* programı ile değerlendirildi. Sonrasında *Codon code aligner* programı ile saptanan değişiklikler *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>), *MutationTaster* ([www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org)), *EXAC* ([exac.broadinstitute.org](http://exac.broadinstitute.org)), *Human splicing finder* ([www.umd.be/HSF3](http://www.umd.be/HSF3)), *Consurf* (<https://consurf.tau.ac.il/>), ve *PredictSNP* (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>) veritabanları kullanılarak değerlendirildi.

### 3.6. Ekzom Analizi Öncesinde Aday Genlerin Belirlenmesi

Tüm ekzom dizileme öncesinde; *Pubmed*, *Google Scholar* gibi veritabanlarında mikrotia, “*outer ear*”, “*ear*”, *anotia*, *OAVS*, *hemifacial microsomia*, *auricula*, *pinna* ve “*gene*” terimleri birlikte aratıldı. Arama sonucunda bulunan derleme ve makalelerden kulak gelişimi ile ilişkili genlerin ve “*pinna anomalisi*” ontoloji terimi ile ilgili gen setlerinin yer aldığı bir tablo oluşturuldu (EK-1) ([http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome/gene\\_set/](http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome/gene_set/)). Ek olarak hayvan

modellerinde işitme ve kulak fenotipi ontoloji terimleri ile ilişkilendirilmiş genler de bu listeye dahil edildi ([http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome/gene\\_set/](http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome/gene_set/)). Literatür taraması sonucunda kulak fenotipleri ile ilişkili genlerin rol aldığı yolları keşfedebilmek için işlevsel zenginleştirme analizi yapıldı.

İşlevsel zenginleştirme analizi için *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)* veri tabanı kullanıldı. Bu kapsamda kulak gelişimi ile ilişkilendirilmiş bütün genlerin ontolojik olarak tanımlanmış biyolojik süreç ve hücresel fonksiyon sınıflandırması yapıldı. İşlevsel zenginleştirme basamağı sayesinde, mikrotia ilişkili literatürden elde edilen genlerin ve proteinlerin temsil ettiği yolak ve işlevler belirlendi. Oluşturulan aday gen tablosunun yanısıra bu genler kullanılarak zenginleştirilmiş yolak analizi yapılarak kulak fenotipi ile ilgili genlerin hangi biyolojik süreç ve hangi moleküler fonksiyonlarda yer aldığı araştırıldı. Tüm ekzom dizileme analizinde aday gen yaklaşımını kolaylaştırmak için ortak yollar ortaya çıkarıldı. Bu sayede tüm ekzom dizileme analizinde aday genlerin belirlenen yolda yer almasına göre öncelendirilmesi sağlandı. *DAVID* veri tabanına gen listesi *Official Gene-Symbol* şeklinde girildi ve referans genom ve *background* olarak *homo sapiens* genomu kullanıldı. (*Benjamini* protokolü ile sonuçlar 0.005 istatistiksel anlamlı olacak şekilde hesaplandı.)

### 3.7. Tüm Ekzom Dizileme

Bu basamak ‘‘Hacettepe Ekzom Projesi’’ kapsamında gerçekleştirildi (Proje No: TAY-2015-7335). Çalışma kapsamında iki hastada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda yer alan *Ion Proton* sistemi ile tüm ekzom dizileme gerçekleştirildi. Ekzom dizileme için öncelikle hastaların genomik DNA’sı 50 ng’a dilue edildi. Sonra spektrofotometrik ölçümler *Qubit™ dsDNA HS* cihazı kullanılarak doğrulandı.

### 3.7.1. Kütüphane Oluşturulması

#### a. PCR

Her bir örnek için içerisinde 14  $\mu\text{L}$  *5x Ion AmpliSeq™ HiFi* miks ve 50 ng konsantrasyonunda DNA bulunan miks hazırlanarak distile su ile 70  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandı. Hazırlanan karışımdan 5'er  $\mu\text{L}$  96'lık *plate*'in ilgili 12 sırasına dağıtıldı ve *Thermal Cycler*'da 99°C'de 2 dk, sonra 10 siklus boyunca 99°C'de 15 sn ve 60°C'de 16 dk süresince PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR sonrasında 12 farklı kuyuda bulunan karışım 6 nolu kuyuda birleştirildi.

#### b. Amplikonların Kesimi

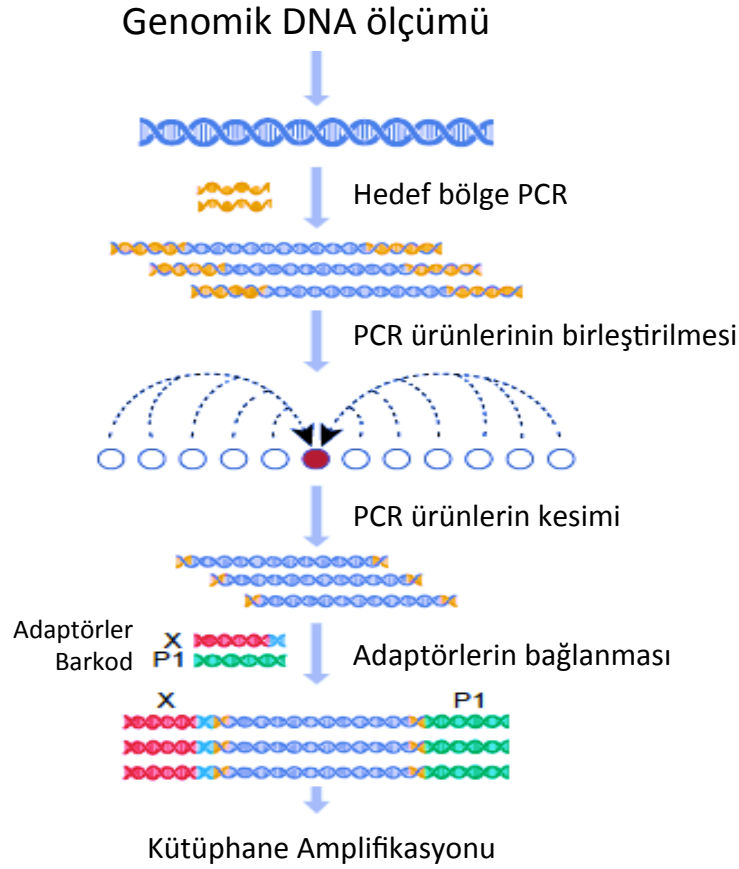
Her bir örneğe 6  $\mu\text{L}$  *FuPA* solüsyonu eklenerek kesim işlemi *Thermal Cycler*'da 50°C'de 20 dk, 55°C'de 20 dk ve 60°C'de 20 dk süresince yapıldı.

#### c. Adaptör Bağlanması ve Pürifikasyon

Her bir örneğe 12  $\mu\text{L}$  *Switch* solüsyonu, 6  $\mu\text{L}$  *IonCode™* barkod adaptörler ve 6  $\mu\text{L}$  DNA ligaz eklenerek toplam hacim 84  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandı. Örnekler; *Thermal Cycler* cihazında adaptörlerin bağlanması için 22°C'de 30 dk, 68°C'de 50 dk ve 72°C'de 5 dk süresince bırakıldı. Kütüphane oluşturulması ile ilgili tüm basamaklar Şekil 3.5.'te özetlenmiştir. Pürifikasyon için *Agencourt™ AMPure™ XP* solüsyonunun oda sıcaklığına gelmesi beklenildi. Her bir örnek üzerine 80  $\mu\text{L}$  *AMPure™ XP* solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

Sonrasında örnekler *DynaMag™-96* mıknatıs platformunda 5 dakika bekletildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve örnekler üzerine 150  $\mu\text{L}$  %70'lik etanol eklendi. Örneklerin mıknatıslı platform üzerindeki yeri değiştirildi ve süpernatant kısım tekrar uzaklaştırıldı. Etanolle yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Sonrasında etanolün tamamen uzaklaşması için örnekler mıknatıs platform üzerinde 5 dakika daha bekletildi.





**Şekil 3.5.** Kütüphane oluşturma basamaklarının akış şeması (Resim <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4480442> internet sitesinden Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

### 3.7.2. Kütüphane Amplifikasyonu ve Dizileme

Kantitasyon öncesi kütüphane amplifikasyonu gerçekleştirildi. Mıknatıs platformdan çıkarılan örneklerin üzerine 50  $\mu\text{L}$  *1x Library Amp* Miks ve 2  $\mu\text{L}$  *25x Library Amp* primerleri eklendi. *Thermal Cycler* cihazında 98°C’de 2 dk, sonra 5 siklus boyunca 98°C’de 15 sn ve 64°C’de 1 dk süresince amplifikasyon yapıldı.

Kütüphane amplifikasyonu sonrası tekrar pürifikasyon gerçekleştirildi. Örneklere 25  $\mu\text{L}$  *Agencourt™ AMPure™ XP* solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Sonrasında örnekler mıknatıs platforma yerleştirildi ve 5 dakika beklenildi. Sonrasında süpernatant kısım başka 96 kuyulu *plate*’e aktarıldı. Yeni *plate*’e aktarılmış süpernatant üzerine 60  $\mu\text{L}$  *Agencourt™ AMPure™ XP* solüsyonu eklendi, pipetaj yapılarak oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

Süre sonunda örnekler mıknatıs platform üzerine yerleştirilerek 3 dakika daha beklenildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Sonrasında 150 µL %70'lik etanol ile örneklerin mıknatıs platformdaki yeri değiştirilerek yıkama yapıldı. Yıkama işlemi 150 µL %70'lik etanol kullanarak tekrarlandı. Yıkama sonrasında etanolün uzaklaşması amacıyla örnekler 5 dakika süresince oda sıcaklığında bekletildi. Sonra örnekler mıknatıs platformdan uzaklaştırıldı. Her örneğe 50 µL TE tamponu eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika beklendi. Örnekler mıknatıs platforma yerleştirildi ve süpernatant kısım ayrılarak kantitasyon basamağına geçildi. Ölçüm için *Qubit™ dsDNA HS* cihazı kullanıldı ve örnekler TE tamponu ile 22ng/ µL'e dilue edildi.

#### **a. Emülsiyon PCR ile Klonal Amplifikasyon**

150 µL *Ion OneTouch™ Breaking* solüsyonu *Ion OneTouch™* cihazının içine yerleştirilen *recovery* tüplerin içine konuldu. Sonrasında cihaza amplifikasyon *plate*'i, *Ion OneTouch™* yağ solüsyonu ve *recovery* solüsyonu yerleştirildi. Önceki basamakta elde edilen 6 µL'lik kütüphane nükleaz içermeyen distile su ile 100 µL'ye tamamlandı. Amplifikasyon solüsyonu her bir örnek için amplifikasyon master miksten 2000 µL, nükleaz içermeyen sudan 80 µL, *Ion PI™* enzim miksten 120 µL, *Ion PI™ Ion Sphere™*den 100 µL ve dilue kütüphane örneğinden 100 µL olacak şekilde hazırlandı. Sonrasında *Ion OneTouch™* reaksiyon filtresi üç *portu* yukarı bakacak şekilde yerleştirildi ve hazırlanan amplifikasyon karışımı üç kez 800 µL olacak şekilde *porta* yüklendi. Ardından 200 µL *Ion OneTouch™* reaksiyon yağı da *porta* yüklenerek *Ion OneTouch™* reaksiyon filtresi *Ion OneTouch™* cihazına yerleştirildi. Cihazda emülsiyon PCR ile klonal amplifikasyon başlatıldı.

#### **b. Pozitif ISP'lerin Elde Edilmesi**

Amplifikasyon tamamlandığında cihazdan *recovery* tüpleri alındı. Dipteki pelete hasar vermeden tüplerde 100 µL örnek kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında her iki tüpün içeriği yeni bir tüpte birleştirildi ve toplam hacim 1000 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen distile su eklendi. 15,500 gde 8 dakika süresince örnek santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüp içerisinde 20 µL örnek kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı. Örnek üzerine ISP resüspansiyon

solüsyonu eklenerek hacim 100 µL'ye tamamlandı. Tüp 30 sn vorteks edildikten sonra 2 sn süresince santrifüj yapıldı.

#### **c. *Ion OneTouch™ ES* Cihazı ile Pozitif ISP'lerin Zenginleştirilmesi**

Öncelikle 280 µL *Tween™* solüsyonu ve 40 µL 1M NaOH karıştırılarak *Melt Off* solüsyonu hazırlandı. Sonrasında 100 µL *Dynabeads™ MyOne™* Streptavidin C1 küreler 2 dakika süresince *DynaMag™-96 Side* mıknatıs platformunda bekletildi ve pelete zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı. Küreler üzerine 1 ml *Ion OneTouch™* yıkama solüsyonu eklenerek 2 dakika daha mıknatıs platform üzerinde bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kürelerin üzerine 130 µL *MyOne™ Beads* yakalama solüsyonu ilave edildi. Sonrasında 8 kuyulu stripte 1. kuyuya bir önceki basamakta hazırlanan pozitif ISP örneği, 2. kuyuya manyetik küreler, 3., 4. ve 5. kuyuya *Ion OneTouch™* yıkama solüsyonu ve 7. kuyuya *Melt Off* solüsyonu eklendi.

#### **d. Pozitif ISP'lerin Yıkanması**

Sonra elde edilen örnek 15,500 gde 5 dk boyunca santrifüj edildi. Tüp içerisinde 10 µL kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılarak üzerine 200 µL nükleaz içermeyen distile su ilave edildi. Sonra örnek tekrar 15,500 gde 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Pelete zarar vermeden tüpte 10 µL kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve toplam hacim nükleaz içermeyen distile su ile 100 µL'ye tamamlandı.

#### **e. Pozitif ISP'lerin Dizilenmesi**

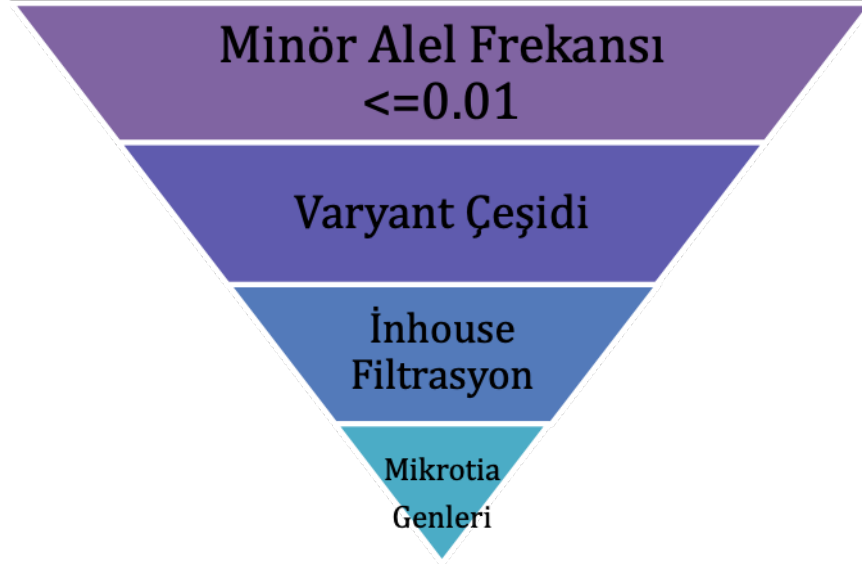
Öncelikle *Ion Reporter™* yazılımında hastaların kodları tanımlanarak run planı oluşturuldu. NaOH solüsyonu ve klorit tablet kullanılarak *Ion Proton™* dizileme cihazının yıkaması ve bakımı gerçekleştirildi. Daha önce kullanılmış olan herhangi bir çip ile cihazın gaz basıncı değerlendirildi. Cihaza yıkama 1, yıkama 2 ve yıkama 3 solüsyonları yerleştirildi. Son olarak ilgili nükleotid solüsyonları cihazda belirtilen yerlerine yerleştirilerek çip yükleme basamağına geçildi. Bir önceki basamakta elde edilen pozitif ISP'lerin üzerine 5 µL kontrol ISP'ler eklendi. Sonrasında örnek 5 dakika at 15,500 gde santrifüj edilerek tüp içerisinde 10 µL kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve örnek üzerine 15 µL *Ion PI™* bağlanma

tamponu eklendi. Devamında örneklere 20 µL *Ion PI*<sup>TM</sup> dizileme primeri eklenerek toplam hacim 45 µL'ye tamamlandı. Örnek *Thermal Cycler* aracılı 95°C'de 2 dakika ve 37°C'de dakika bekletildi. *Thermal Cycler*'dan alınan örnek üzerine 10 µL *Ion PI*<sup>TM</sup> yükleme tamponu eklendi. Hazırlanan 55 µL'lik karışım *Ion PI*<sup>TM</sup> çipine yüklenerek çip *Ion Chip*<sup>TM</sup> mini santrifüj cihazında 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sırasında başka bir tüp içerisinde 49 µL %50'lik bağlanma tamponu ile 1 µL *Foaming* solüsyonu karıştırıldı ve karışım pipetaj yapılarak köpürtüldü. Santrifüj bittiğinde çipe 100 µL köpük yüklenerek yıkama gerçekleştirildi. Sonrasında çipe 55 µL %50'lik bağlanma tamponu yüklenerek 30 sn santrifüj edildi. Köpük ile yıkama, %50'lik bağlanma tamponu yükleme ve santrifüj işlemi tekrar gerçekleştirildi. Sonrasında 100 µL *Flushing* solüsyonu çipe yüklenerek boşaltıldı. Ardından 100 µL %50'lik bağlanma tamponu çipe yüklenerek boşaltıldı. Sonra 6 µL *Ion PI*<sup>TM</sup> *Hi-Q*<sup>TM</sup> dizileme polimerazı ile 60 µl %50'lik bağlanma tamponu karıştırılarak çipe yüklendi. Son olarak çip 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve *Ion Proton*<sup>TM</sup> dizileme cihazında planlanmış dizileme başlatıldı.

### 3.7.3. Tüm Ekzom Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Veri analizinde Ubuntu 10.04 işletim sistemine sahip, 128 GB RAM ve 27 TB veri depolama özelliği bulunan, *Dual* 8 kor 2.9 GHZ işlemcili *Proton*<sup>TM</sup> *Torrent* sunucu kullanıldı. Biyoinformatik yazılımlar için aynı ünite içerisinde bulunan *Windows Server* 2012 işletim sistemli, 32 GB RAM ve 1,25 TB veri depolama kapasitesine sahip 2.33 GHZ *Intel Xeon* işlemcili *IBMX3650* sunucudan yararlanıldı. Hizalama sonrası dizilenen bölgelerin görselleştirilmesi için .bam dosyaları, referans genom ile bulunan farklılıkların tablo halinde sunulması için .vcf dosyaları oluşturuldu. Verilerin analizinde ve filtrelenmesinde *Ion Reporter*, *Torrent Variant Caller*, *R* ve *HomSI* yazılımlarından yararlanıldı. Varyantların genomdaki pozisyonuna, kalıtım kalıbına ve popülasyonda görülme sıklığına (MAF) göre filtreleme yapıldı. Varyant tablosunun filtrelenmesi için Hacettepe Ekzom Projesi veri bankası (n=409) kullanıldı. Filtreleme (Şekil 3.6.) sonrası kalan değişikliklerin okuma hatası olup olmadıkları IGV (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute) programı ile aynı *run* diğer örnekler karşılaştırılarak değerlendirildi. Analizde ilk olarak *nonsense* ve frameshift mutasyonlar değerlendirildi.

İlgili değişiklerin patojenitesi *MYT1* dizi sonuçlarına benzer şekilde aynı veritabanları kullanılarak değerlendirildi. Hastalıkla ilişkili olarak dūřünölen varyantlar için validasyon primerleri tasarlandı ve indeks hastalarda doğrulama gerçekleştirildi.



**şekil 3.6.** Tüm ekzom dizileme sonucu filtreleme basamakları (izim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı'na başvuran hastalar arasında klinik bulguları OAVS ile uyumlu 23 hasta ve kritik aile bireyleri klinik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik açıdan incelenmiştir.

### 4.1. Klinik Bulgular

Hastaların tamamının detaylı klinik muayeneleri tamamlanmıştır. Muayene bulguları Tablo 4.1.'de detaylandırılmış EK-2'de pedigriler üzerinde gösterilmiştir. OAVS minimal tanı kriteri olan mikrotia ya da *skin tag* ve hemifasiyal mikrozomi birlikteliğinin tüm hastalarda bulunması esas alınmıştır. Tüm çalışma popülasyonunda birikim gösteren özellikler tanımlayıcı istatistikler ile birlikte Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Çalışma grubunun %65,2'lik bölümünü erkekler oluşturmaktadır (Erkek/Kız oranı 15:8). Hastaların ilk muayene yaş ortalaması 40.6 ay iken son fizik muayene yaşları ortalaması 7 yaş 8 ay olarak bulunmuştur. Hastalarda akrabalık ve aynı köy/ bölge köken olma durumları incelendiğinde altı hastanın anne ve babası arasında akrabalık bulunduğu ve altı hastanın ailesinin de aynı bölge/köy kökenli olduğu görülmüştür (n:22, %54,5). Ayrıca dokuz hastanın ailesinde de benzer şikayetlere sahip başka bireyler bulunduğu saptanmıştır (n:21, %42,9). Hasta 3'ün biyolojik anne ve babasına ulaşamamıştır. Bu nedenle prenatal dönem bilgileri değerlendirilememiştir. Hastaların dış kulak bulguları mikrotia, dış kulak stenozu/atrezisi ve anotia şeklinde olup, 12 hastada (%52,2) bilateral etkilenme saptanmıştır. Tek taraflı etkilenme olan hastaların büyük çoğunluğunda sol taraf etkilenmiştir ve sadece üç hastada sağ tarafta etkilenme görülmüştür (%13).

Hastaların retrospektif kayıtları incelendiğinde; dokuz hastanın kraniyal MRG ve yedi hastanın da temporal kemik BT ile değerlendirildiği görülmüştür. Kraniyal MRG ile değerlendirilen hastaların üçünde inkomplet partiyon tip 2, kohlear ve semisirkuler kanal hipoplazisi şeklinde iç kulak anomalileri saptanmıştır. Ayrıca temporal kemik BT ile değerlendirilen bütün hastalarda orta kulak havalanma

yokluğu, kemikçik defekti ve agenezisi şeklinde orta kulak bulguları izlenmiştir. Hastaların kulak bulgusu dışında kalan kraniyal bulguları değerlendirildiğinde; hastaların 17'sinde (n=23, %72,7) *preauriküler* yerleşimli *skin tag* gözlenirken 10 hastada da epibulbar dermoid gözlenmiştir (n:23, %43,5). Epibulbar dermoid dışında göz bulgusu olarak hastalarda; strabismus, ptosis, *Duane* anomalisi, blefarofimozis,лагоftalmus, nazolakrimal kanal anomalisi,лагоftalmus ve mikroftalmi izlenmiştir. OAVS'nin diğer bulgularından olan makrostomi dört hastada, ağız kenarında çekilme dört hastada ve parotis agenezisi bir hastada gözlenmiştir. Ayrıca iki hastada mikrosefali saptanmıştır. Ek olarak hastaların birinde gustolakrimasyon görülmüştür.

Ekstrakraniyal bulgular değerlendirildiğinde; yirmibir hastada en az bir ekstrakraniyal bulgu varlığı tespit edilmiştir. En sık gözlenen ekstrakraniyal bulgu kardiyak anomalilerdir ve VSD, ASD, PDA, PFO, MY, PS, AK ve TGA olarak karşımıza çıkmıştır. Hastaların birinde OAVS'nin nadir bir kardiyak bulgusu olan dekstropozisyon da gözlenmiştir. Ekstrakraniyal diğer bir bulgu olan vertebral anomaliler sırasıyla torasik, servikal ve lomber vertebralarda gözlenmiştir. Hastaların beşinde vertebral bulguların yanısıra kosta sayısı fazlalığı şeklinde kosta anomalileri de saptanmıştır. Renal bulgular değerlendirildiğinde; iki hastada sırasıyla renal agenezi ve hidroüreteronefroz şeklinde renal bulgular görülmüştür. Ekstremitte anomalisi olarak radyal defekt büyüme geriliğinin de gözlendiği bir hastada saptanmıştır. Ayrıca bir hastada da OAFNS klinik bulguları gözlenmiştir. Ek olarak hastaların; üç tanesinde dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun, üç tanesinde epilepsinin ve iki tanesinde stereotipik hareketlerin klinik bulgularına eşlik ettiği görülmüştür. Hastaların sınıflandırması ve puanları Tablo 4.3.'te sunulmuştur.

**Tablo 4.1.** Hastaların demografik ve klinik özellikleri (i: bulgunun değerlendirilmediğini gösterir.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Cinsiyet	E	K	K	K	E	E	E	K	K	K	E	E	E	E	E	E	E	E	K	E	K	E	E
Yaş	6y 9/12	8y 9/12	17y	19y	2y	6y 6/12	12y 9/12	4y 10/12	3y 5/12	9y	3y 1/12	11y	1y 3/12	33y	4y 6/12	6y 6/12	1y 8/12	11 y	6 ay	1y 8/12	3y	8y 8/12	6ay
DK<2500g	-	-	i	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-	i	-
Anne yaşı>35y	+	-	i	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-	i	+
Baba yaşı>35y	+	-	i	-	-	i	+	-	i	-	-	-	-	i	-	-	-	-	-	-	i	i	+
Çoğul Gebelik	-	-	i	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	i	-	+	-	-	-	-	-	i	-
Prenatal İlaç	-	-	i	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	i	-
YÜT	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-	-	-	-	-	+	-	i	-
GDM	-	+	i-	-	-	-	-	-	-	i	-	-	-	i	-	-	+	-	-	-	-	i	-
Akrabalık	+	+	i	A	-	-	A	-	-	A	A	+	+	+	-	-	-	A	-	A	-	+	-
Benzer birey	-	-	i	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	i	-
Tutulum	B	so	so	B	so	so	B	B	so	B	B	so	B	B	sa	B	so	B	B	so	sa	B	sa
Skin tag	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Hfm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Mikrotia/ Anotia	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
DKY stenoz/atrezisi	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Orta Kulak a.	+	i	i	i	i	+	i	+	+	i	i	i	i	i	i	+	i	+	i	i	i	i	+
İç Kulak a.	+	i	i	i	i	-	+	-	+	i	i	i	i	i	i	-	-	-	i	i	i	i	-
Epibulbar dermoid	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Diğer göz bulguları	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Yarık Damak	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
İşitme Kaybı	+	-	-	+	+	i	+	+	+	+	+	+	+	i	+	+	-	+	-	+	+	+	-
SSS bulgu	+	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
Ekstremiteler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GÜS	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kardiyak	+	i	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Vertebra/ Kosta	+/-	+/+	+/+	+	-	-	+/-	-	+	-	-	+	-	+	+	+/+	+/+	+	-	-	-	i	-/+
Gelişme geriliği	+	-	-	-	-	-	i	-	+	+	+	i	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Sınıflandırma	3b	3u	3u	3b	2u	2u	3b	2b	3u	2b	2b	3u	2b	3b	3u	3b	3u	3b	2b	2u	1u	2b	2u
Puan	15	7	8	8	7	6	10	8	11	10	8	9	7	10	11	12	9	10	7	6	3	6	6



**Tablo 4.2.** Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin istatistiksel tablosu

<b>Özellik</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>	<b>Özellik</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>
<b>Cinsiyet (n=23)</b>			<b>HFM (n=23)</b>		
Erkek	15	65,2	Hfm bulunması	21	91,3
Kadın	8	34,8	Hfm bulunmaması	2	8,7
<b>İlk muayene Yaşı (n=23)</b>			<b>Mikrotia (n=23)</b>		
40 ay altı	16	69,6	Mikrotia bulunması	15	65,2
40 ay üstü	7	30,4	Mikrotia bulunmaması	8	34,8
<b>IUGR (n=20)</b>			<b>Epibulbar dermoid dışı göz bulgusu (n=23)</b>		
Doğum Kilosu <2500g	3	15	Epibulbar dermoid dışı göz bulgusu olan	9	39,1
Doğum Kilosu >2500g	17	85	Epibulbar dermoid dışı göz bulgusu olmayan	14	60,9
<b>Gebelik Durumu (n=20)</b>			<b>İşitme (n=21)</b>		
Çoğul Gebelik	3	15	İşitme kaybı olan	16	76,2
Tekil Gebelik	17	85	İşitme kaybı olmayan	5	23,8
<b>Prenatal Özellik (n=21)</b>			<b>Vertebra (n=22)</b>		
Prenatal İlaç Kullanımı bulunması	8	38,1	Vertebral bulgu olan	12	54,6
Prenatal İlaç Kullanımı bulunmaması	13	69,1	Vertebral bulgu olmayan	10	45,4
<b>Dış Kulak Yolu (n=23)</b>			<b>Yarık Damak (n=23)</b>		
DKY stenozu bulunması	14	60,9	YD olan	3	13
DKY stenozu bulunmaması	9	39,1	YD olmayan	20	87

Hastalarda görülen klinik bulgular arasındaki ilişki de ayrıca incelenmiştir. Korelasyon analizinde sınıf 1u'dan 3b'ye doğru artışın gelişme geriliği, epibulbar dermoid ve epibulbar dermoid dışı göz bulguları ile ilişkili olduğu gözlenmiştir ( $r_s = 0.454$   $p=0.019$ /  $r_s = 0.436$   $p=0.019$ /  $r_s=0.408$   $p=0.027$ ). Bilateral etkilenme ile epibulbar dermoid, yarık damak görülmesi ve gelişme geriliği arasında pozitif ilişki saptanmıştır ( $r_s = 0.366$   $p=0.043$ /  $r_s=0.356$   $p=0.048$ /  $r_s = 0.470$   $p=0.016$ ). Klinik bulgulardan *skin tag* ve epibulbar dermoidin de ilişkili olduğu saptanmıştır ( $r_s = 0.521$   $p=0.005$ ). Ayrıca gelişme geriliği ve işitme kaybı arasında da ilişki gözlenmiştir ( $r_s = 0.567$   $p=0.006$ ). Epibulbar dermoid ile epibulbar dermoid dışı göz bulguları arasında da pozitif ilişki ortaya konulmuştur ( $r_s = 0.555$   $p=0.003$ ).

**Tablo 4.3.** Hastaların revize edilmiş Tasse kriterlerine göre sınıflaması

Sınıflandırma	Toplam Puan	Ortalama Puan	Hasta Sayısı
3b	65 puan	18,17	6 hasta
3u	55 puan	14,83	6 hasta
2b	46 puan	9,83	6 hasta
2u	25 puan	4,5	4 hasta
1b	-	-	-
1u	3 puan	1	1 hasta

Hastaların klinik bulgularına göre sınıflandırılması sonucunda; 1u 'dan 3b'ye doğru gidildiğinde ilişkili anomalilerin arttığı ve her bir grubun ortalama puanının yükseldiği görülmüştür (p=0.006). Klinik bulgulara bakılmaksızın bilateral etkilenmenin olduğu alt gruplarda da ortalama puanın daha yüksek olduğu izlenmiştir. Her bir alt grupta klinik özelliklerin görülme oranları Tablo 4.4.'tedir.

**Tablo 4.4.** Sınıflama sonucunda alt gruplarda klinik bulgu görülme oranları

	3b	3u	2b	2u	1u	Toplam
Mikrotia	3/6 (%50)	3/6 (%50)	4/6 (%66)	4/4 (%100)	1/1 (%100)	15/23 (%65,2)
Skin tag	6/6 (%100)	4/6 (%66)	4/6 (%66)	3/4 (%75)	0/1 (%0)	17/23 (%73,9)
DKY stenoz	3/6 (%50)	3/6 (%50)	5/6 (%83)	2/4 (%50)	1/1 (%100)	14/23 (%60,9)
HFM	5/6 (%83)	6/6 (%100)	6/6 (%100)	4/4 (%100)	0/1 (%0)	21/23 (%91,3)
Epibulbar dermoid	5/6 (%83)	2/6 (%33)	2/6 (%33)	1/4 (%25)	0/1 (%0)	10/23 (%43,5)
ED dışı göz	4/6 (%66)	3/6 (%50)	1/6 (%16)	1/4 (%25)	0/1 (%0)	9/23 (%39,1)
Kardiyak	4/6 (%66)	4/6 (%66)	5/6 (%83)	3/4 (%75)	0/1 (%0)	16/22 (%72,7)
Vertebra	6/6 (%100)	6/6 (%100)	0/6 (%0)	0/4 (%0)	0/1 (%0)	12/22 (%54,6)
Yarık damak	2/6 (%33)	0/6 (%0)	1/6 (%16)	0/6 (%0)	0/6 (%0)	3/23 (%13)
Gelişme geriliği	4/6 (%66)	2/6 (%33)	4/6 (%66)	0/4 (%0)	0/1 (%0)	10/21 (%47,6)

## 4.2. Laboratuvar Bulguları

### 4.2.1. Mikrodizin Analizi Sonuçları

Tüm hastaların *Affymetrix Optima* platformu kullanılarak mikrodizin analizleri gerçekleştirilmiştir. Hastaların sonuçları ve değişikliklerin patojenitesi *USCS Genome Browser* online veri tabanı ile değerlendirilmiştir. Hastaların mikrodizin analizi sonuçları Tablo 4.5.'te özetlenmiştir.

Hastalarda saptanan değişikliklerden 3., 10., 11. ve 23. nolu hastalardaki CNV'ler patojenik olarak değerlendirilmiş ve klinikle ilişkili olabilecekleri düşünülmüştür. Diğer hastalarda saptanan CNV'lerin inhouse başka hastalarda saptanması ya da *DGV* veri tabanında bulunması nedeniyle hastalıkla ilişkilendirilmemiştir. Patojenik olarak değerlendirilen CNV tespit edilen hastaların anne ve babalarında da mikrodizin analizi gerçekleştirilerek ilgili değişikliklerin segregasyonu değerlendirilmiştir.

Hasta 3'ün 15q11.2 bölgesinde 506 kb büyüklüğünde *NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIPI*, *TUBGCP5* genlerini içeren bir duplikasyon saptanmıştır ancak; hastanın anne ve babasına ulaşamaması nedeniyle bu duplikasyon için segregasyon analizi yapılamamıştır.

Hasta 10'un 4. kromozomda 162 milyon baz büyüklüğünde bir duplikasyon saptanmıştır. Bu bölgede kulak gelişimi ile ilgili *HAND2*, *EDRNA*, *SHROOM3* ve *DSPP* genleri başta olmak üzere toplam 493 OMIM geninin yer aldığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı hastada X kromozomunda da 88 milyon baz büyüklüğünde bir duplikasyon saptanmıştır. Hastanın iki farklı kromozomunda da büyük duplikasyonlar saptanması üzerine hastada, hastanın anne ve babasında periferik kandan kromozom analizi gerçekleştirilmiştir. Hastada X kromozomu uzun kolunun ve 4. kromozomun birleşerek derivate bir 47. bir kromozom yapısı oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.1.). Anne ve babanın kromozom analizinde herhangi bir translokasyon saptanmamıştır. Hastada görülen değişikliğin *de novo* olduğu gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** Hasta 10'un periferik kandan yapılan kromozom analizi;

47, XX, + der(4)t(X;4)(q12;p15.1)

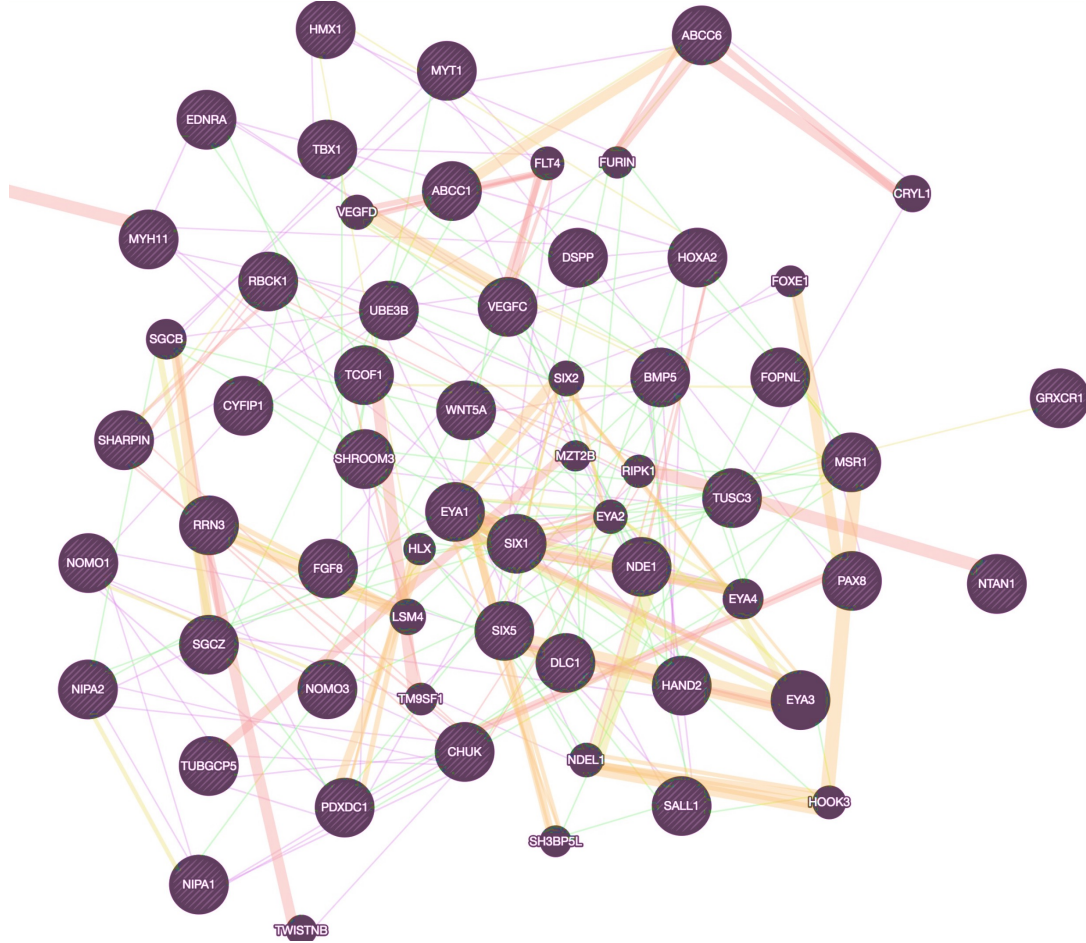
Hasta 11'in 8p22.3 bölgesinde 2.7 milyon baz büyüğünde *DLCl*, *SGCZ*, *TUSC3*, *MSR1* genlerini içeren bir delesyon saptanmıştır. İlgili değışikliğın klinik olarak etkilenmemiş anneden kalıtıldığı belirlenmiştir.

Hasta 23'ün ise 16p13.11 bölgesinde 1.9 milyon baz büyüğünde bir duplikasyon bulunmuştur. Hastanın babasında da 16p13.11 bölgesinde 810kb büyüğünde duplikasyon saptanmış ve ilgili değışikliğın büyüğünü ve içerdiğı gen sayısını arttırarak indeks hastaya aktarıldığı gösterilmiştir. Bu bulgularla; *NOMO1*, *NPIPA1*, *PDXDC1*, *NTAN1*, *RRN3*, *NOMO3* genlerinin sadece indeks hastada duplike olduğı gösterilmiştir.

Kopya sayısı değışikliğı görülen bölgede yer alan genlerin; dış kulak gelişiminde önemi olan genler ile ilişkisi *GeneMANIA* veri tabanında değılendirilmiştir. İlgili ilişkiler Şekil 4.2.'te gösterilmektedir.

**Tablo 4.5.** Hastaların mikrodizin analizi sonuçları

Hasta No	Kopya Sayısı Değişiklikleri	Büyüklik/Marker	Delesyon/ Duplikasyon	OMIM Genler
1	Normal			
2	Normal			
3	8p21.3(22,803,049-23,060,256)x1	257kb /16 marker	Delesyon	<i>RHOBTB2, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF10A</i>
3	15q11.2(22,770,421-23,276,605)x3	506 kb/ 20marker	Duplikasyon	<i>NIPAI, NIPAI2, CYFIP1, TUBGCP5</i>
4	Normal			
5	Normal			
6	19p12(20,575,719-20,789,504)x1	214 kb /12 marker	Delesyon	<i>ZNF737</i>
7	2p16.3p16.2(52,730,020-52,915,546)x1	186kb/12 marker	Delesyon	-
8	Normal			
9	Normal			
10	4p15.1q35.2(28,896,760-190,957,473)x3	162,061kb/ 9,130 marker	Duplikasyon	<i>493 gen</i>
10	Xq12q28(66,779,361-155,233,731)x3	88,454kb/ 5,650 marker	Duplikasyon	<i>414 gen</i>
11	8p22(13,404,241-16,137,123)x1	2,733kb/ 176 marker	Delesyon	<i>DLC1, SGCZ, TUSC3, MSR1</i>
12	4q13.2(69,320,945-69,571,630)x1	251kb/10 marker	Delesyon	<i>TMPRSS11E, UGT2B1, UGT2B15</i>
13	Xq21.32(92,124,730-92,368,944)x2	244kb/14 marker	Duplikasyon	-
14	8q24.23(137,677,895-137,849,821)x1	172kb/ 12 marker	Delesyon	-
15	Normal			
16	2p22.3(34,575,181-34,777,014)x1	202kb/12 marker	Delesyon	-
17	Normal			
18	Normal			
19	8q24.23(137,677,895-137,849,821)x1	172kb/ 12 marker	Delesyon	-
19	15q13.3(32,170,481-32,436,226)x3	266kb /32 marker	Duplikasyon	<i>CHRNA7</i>
20	Normal			
21	Xq13.3(74,139,273-74,349,030)x1	210kb/ 13 marker	Delesyon	<i>KIAA2022, ABCB7</i>
22	Normal			
23	16p13.11p12.3(14,929,737-16,858,308)x3	1,929kb/ 96 marker	Duplikasyon	<i>NOMO1, NPIP1, PDXDC1, NTAN1, RRN3, MPV17L, KIAA0430, NDE1, MYH11, FOPNL, ABCC1, ABCC6, NOMO3</i>



**Şekil 4.2.** *GeneMANIA* veri tabanı kullanımı; CNV görülen bölgelerdeki ilgili genlerin kulak gelişiminde etkili olan diğer genler ile etkileşimi. (mor renk koekspresyon, sarı renk ortak protein domain bulunmasını, yeşil renk genetik etkileşimi, kırmızı renk fiziksel etkileşimi, turuncu renk ise tahmini etkileşim bulunmasını temsil etmektedir.)

#### 4.2.2. *MYT1* Geni *Sanger* Dizileme Sonuçları

Tüm hastalarda *MYT1* geni kodlayan 21 ekzon ve ekzon-intron sınırları *Sanger* yöntemi ile dizilenmiştir. *MYT1* geni kodlayan ve kodlamayan (intronik) bölgelerde homozigot ve heterozigot değişiklikler saptanmıştır. İlgili değişiklikler *Ensembl*, *EXAC*, *Human Splicing Finder*, *Consurf* ve *MutationTaster* veritabanlarında değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda; bu değişikliklerin sinonim olması, MAF değerlerinin yüksek olması veya *splicing* mekanizmasını etkilememesi nedeniyle hastaların klinikleri ile ilişkilendirilmemiştir. Değişiklikler Tablo 4.6.'da

özetlenmiştir. Hastalarda saptanan değişikliklerin elektroferogram görünümleri Şekil 4.3.'tedir.

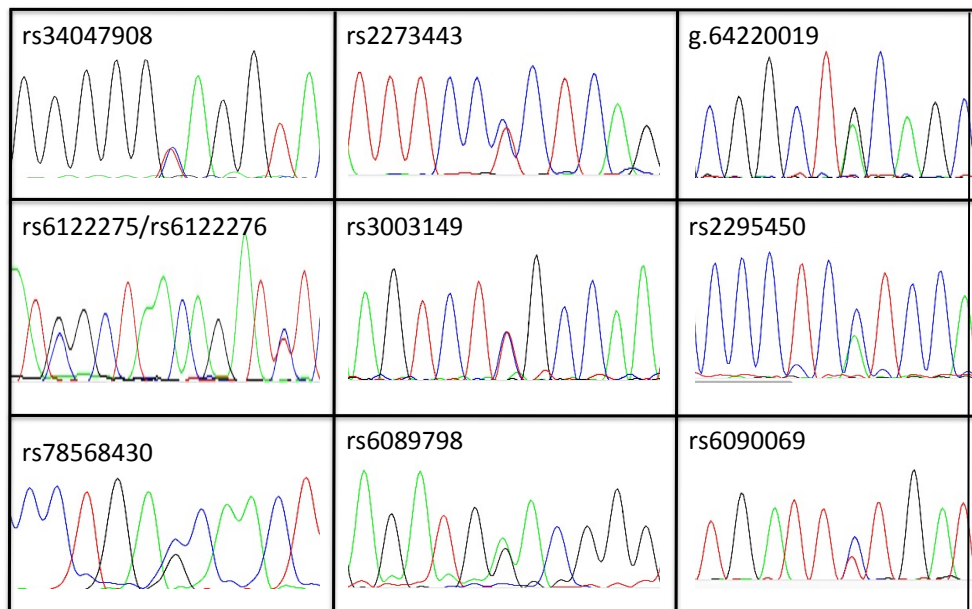
**Tablo 4.6.** Hastaların *MYT1* geni dizi analizi sonucunda saptanan değişiklikler

Hasta No	Lokasyon	Hom./ Het.	Refseq No	Varyant	Protein	MAF	EXAC Het.	EXAC Hom.
1	Intron 14-15	Het.	rs34047908	c.2478-47C>T	-	0.1	15892	1228
2	Ekzon 7	Het.	rs147483668	c.917_919delGA G	p.Glu306del	0.03	268	2
3	Ekzon 7	Hom.	rs61746505	c.1161G>C	p.Leu387Leu	0.04	5868	215
3	Intron 9-10	Het.	-	g.64212162A>G	-	-	-	-
4	Ekzon 7	Hom.	rs61746505	c.1161G>C	p.Leu387Leu	0.04	5868	215
5	Intron 9-10	Het.	rs1428974144	c.1517+55_1517+56insGCT	-	<0.01	-	-
5	Intron 14-15	Het.	rs34047908	c.2478-47C>T	-	0.1	15892	1228
6	Intron 3-4	Het.	rs2295450	c.55+21C>A	-	0.08	13135	750
6	Intron 9-10	Het.	-	g.64212162A>G	-	-	-	-
7	Intron 5-6	Het.	rs6062662	c.149+70T>C	-	0.2	-	-
7	Intron 9-10	Het.	-	g.64212162A>G	-	-	-	-
8	Intron 6-7	Het.	rs6090069	c.398-14T>C	-	0.16	27181	3534
8	Ekzon 12	Het.	rs41279348	c.1047C>T	p.Leu349Leu	0.08	13326	787
9	Ekzon 7	Hom.	rs61746505	c.1161G>C	p.Leu387Leu	0.04	5868	215
9	Intron 9-10	Het.	rs1428974144	c.1517+55_1517+56insGCT	-	<0.01	-	-
9	Intron 17-18	Het.	rs6089798	c.2673-62A>G	-	0.1	-	-
9	Intron 17-18	Het.	rs34184798	c.2672+125A>C	-	0.07	-	-
9	Intron 17-18	Het.	rs41279350	c.2672+14A>G	-	0.11	13028	816
10	Intron 4-5	Het.	rs2273443	c.87-6C>T	-	0.08	13038	743
10	Intron 9-10	Hom.	rs351881	c.1517+169C>T	-	0.08	-	-
10	Intron 9-10	Hom.	rs351882	c.1517+138G>T	-	0.11	-	-
10	Intron 9-10	Hom.	rs757149680	c.1517+56_1517+102del	-	<0.01	-	-
11	Intron 4-5	Het.	rs2273443	c.87-6C>T	-	0.08	13038	743

11	Intron 6-7	Het.	rs6090069	c.398-14T>C	-	0.16	27181	3534
11	Ekzon 7	Hom.	rs61746505	c.1161G>C	p.Leu387Leu	0.04	5868	215
11	Intron 9-10	Het.	rs1428974144	c.1517+55_1517+56insGCT	-	<0.01	-	-
13	Ekzon 22	Het.	rs3003149	c.3294C>T	p.Leu1098Leu	0.16	15424	1347
14	Intron 3-4	Het.	rs2295450	c.55+21C>A	-	0.08	13135	750
14	Intron 4-5	Het.	rs2273443	c.87-6C>T	-	0.08	13038	743
14	Intron 6-7	Het.	rs6090069	c.398-14T>C	-	0.16	27181	3534
14	Ekzon 12	Het.	rs41279348	c.1047C>T	p.Leu349Leu	0.08	13326	787
15	Intron 3-4	Het.	rs2295450	c.55+21C>A	-	0.08	13135	750
15	Intron 4-5	Het.	rs2273443	c.87-6C>T	-	0.08	13038	743
15	Intron 6-7	Het.	rs6090069	c.398-14T>C	-	0.16	27181	3534
15	Ekzon 12	Het.	rs41279348	c.1047C>T	p.Leu349Leu	0.08	13326	787
15	Intron 14-15	Het.	rs34047908	c.2478-47C>T	-	0.1	15892	1228
15	Intron 16-17	Het.	rs34877267	c.2609+66G>A	-	0.02	-	-
15	Ekzon 22	Het.	rs3003149	c.3294C>T	p.Leu1098Leu	0.16	15424	1347
16	Intron 14-15	Het.	rs34047908	c.2478-47C>T	-	0.1	15892	1228
16	Intron 17-18	Het.	rs34184798	c.2672+125A>C	-	0.07	-	-
16	Ekzon 19	Het.	rs41279352	c.2820C>T	p.Ser940Ser	0.05	6166	219
16	Intron 22-23	Het.	rs2427624	c.3319-15G>T	-	0.08	7459	326
17	Ekzon 7	Hom.	rs61746505	c.1161G>C	p.Leu387Leu	0.04	5868	215
17	Intron 17-18	Het.	rs41279350	c.2672+14A>G	-	0.11	13028	816
17	Intron 17-18	Het.	rs6089798	c.2673-62A>G	-	0.1	-	-
18	Intron 14-15	Het.	rs34047908	c.2478-47C>T	-	0.1	15892	1228
18	Intron 17-18	Het.	rs34184798	c.2672+125A>C	-	0.07	-	-
18	Ekzon 22	Het.	rs3003149	c.3294C>T	p.Leu1098Leu	0.16	15424	1347
19	Intron 22-	Het.	rs542415287	c.3319-103T>A	-	<0.01	-	-

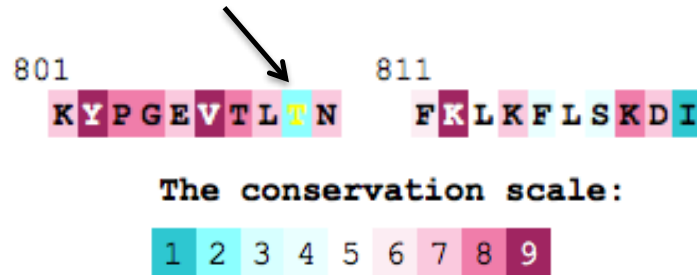


	23							
19	Intron 13-14	Het.	-	g.64220019G>A	-	-	-	-
20	Intron 9-10	Het.	-	g.64212162A>G	-	-	-	-
20	Ekzon 14	Het.	rs78568430	c.2426C>G	p.Thr80Ser	0.01	1949	29
20	Intron 17-18	Het.	rs6089798	c.2673-62A>G	-	0.1	-	-
21	Ekzon 7	Het.	rs147483668	c.917_919delGAG	p.Glu306del	0.03	268	2
21	Ekzon 19	Het.	rs41279352	c.2820C>T	p.Ser940Ser	0.05	6166	219
22	Ekzon 19	Het.	rs41279352	c.2820C>T	p.Ser940Ser	0.05	6166	219
22	Intron 12-13	Het.	rs6122275	c.2053-30C>T	-	0.07	3547	169
22	Intron 12-13	Het.	rs6122276	c.2053-19C>T	-	0.07	3911	192
23	Intron 22-23	Het.	rs2427624	c.3319-15G>T	-	0.08	7459	326



**Şekil 4.3.** Hastalarda saptanan değişikliklerin elektroferogram görüntüleri

Bu değişikliklerden rs34047908, rs2273443, rs6122275, rs6122276, rs6090069, rs2295450, rs6089798, g.64220019G>A ve rs41279350 kodlu değişikliklerinin splicing mekanizmasını etkilemedikleri belirlenmiştir. *MYT1* geni 14. ekzonda bulunan rs78568430 değişikliğinin ekzonik splicing enhancer bölgesini değiştirerek splicing’i etkileyebilecek potansiyelde olduğu gösterilmiştir. Bu değişiklik *MutationTaster*’da patojenik olarak değerlendirilmiştir. *PredictSNP* veri tabanında da polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. *Consurf* veri tabanında evrimsel korunmuşluğunun düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.4.). Ancak *EXAC* veri tabanında heterozigot durumda fazla sayıda bildirilmesi nedeniyle klinik ile ilişkilendirilmemiştir. *MYT1* geni 22. ekzonda yer alan rs3003149 değişikliğinin ekzonik *splicing silencer* oluşturarak *splicing* defektine yola açabileceği sonucuna ulaşılmakla birlikte; bu değişiklik *MutationTaster*’da polimorfizm olarak değerlendirilmiş ve klinik ile ilişkilendirilmemiştir. Yine de ileride yapılacak fonksiyonel genetik çalışmalar ilgili değişikliklerin hastalık ile ilişkisini ortaya çıkarabilir.



Şekil 4.4. rs78568430 değişikliğinin *Consurf* veri tabanında değerlendirilmesi

### 4.2.3. Tüm Ekzom Dizileme Sonuçları

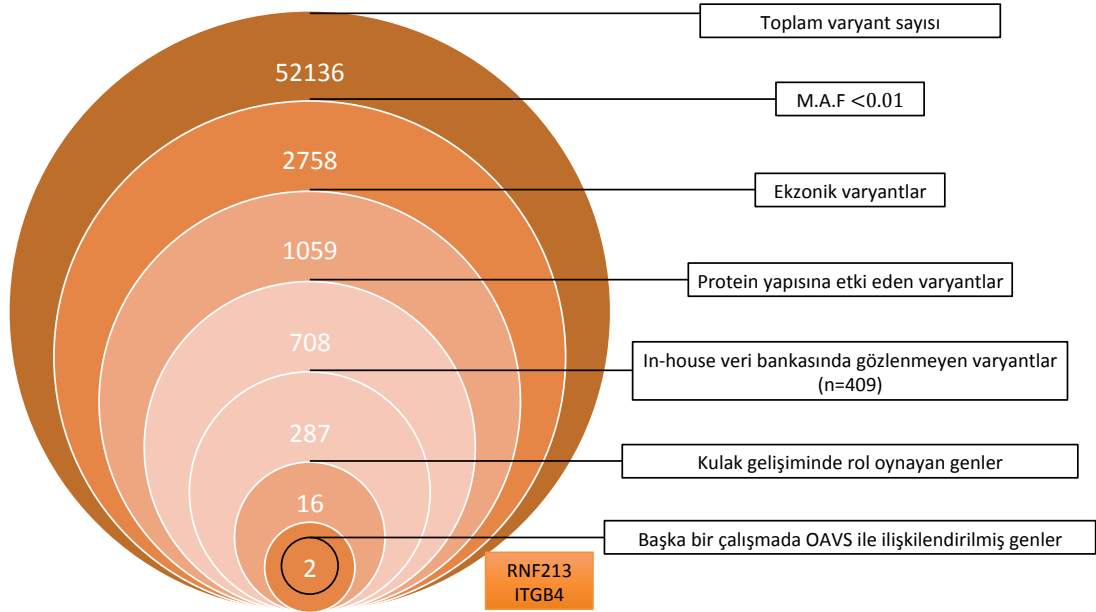
#### Ekzom Analizi Öncesi Aday Genlerin Belirlenmesi

Literatür taraması sonucunda kulak anomalileri ile ilişkili 761 genin ontolojik olarak tanımlanmış biyolojik süreç ve moleküler fonksiyonları temel alınarak zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. İlgili genlerin embriyonik morfogenez, iç kulak gelişimi, iskelet sistemi gelişimi, epitel morfogenezi, nöron farklılaşması, ön beyin gelişimi gibi biyolojik süreçler ile ilgili olduğu belirlenmiştir. Bu genlerin

moleküler fonksiyonları değerlendirildiğinde diziye özgü DNA bağlanması, transkripsiyon faktörü ve tirozin kinaz aktivitesi, kromatin bağlanması terimleri ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir.

### Tüm Ekzom Dizileme

OAVS spektrumunun bütün özelliklerini gösteren Hasta 16 ve klinik bulgularına zihinsel yetersizlik eşlik eden Hasta 18’de tüm ekzom dizileme gerçekleştirilmiştir. Hastaların tüm ekzom dizileme sonucunda ulaşılan varyantlarının heterozigot filtremesi 16 nolu hasta için Şekil 4.5.’te ve 18 nolu hasta için Şekil 4.8.’de gösterilmektedir. Hastalarda homozigot filtreleme stratejisi ile klinik ile ilişkili herhangi bir değişiklik saptanmaması nedeniyle sadece heterozigot filtreleme basamakları gösterilmiştir.



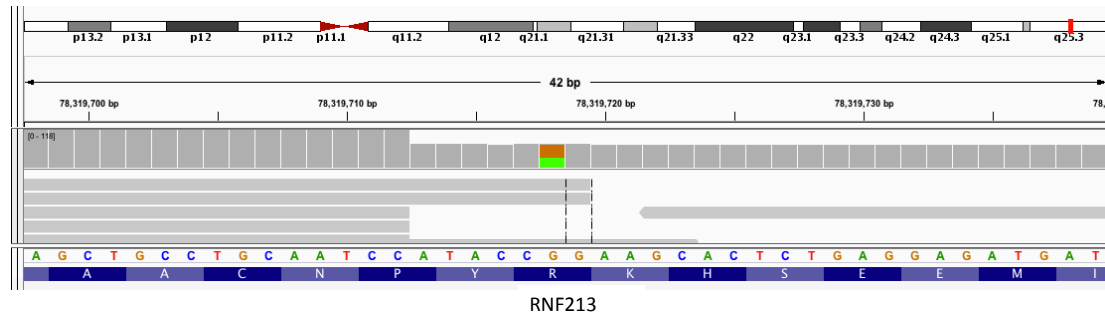
Şekil 4.5. Hasta 16’da gerçekleştirilen filtreleme basamakları

Hasta 16’da heterozigot filtreleme sonucunda *RNF213* (NM\_001256071.2) ve *ITGB4* (NM\_000213.4) genlerinde sırasıyla p.Arg2528Gln(c.7583G>A) ve p.Glu1063Gly(c.3188A>G) heterozigot missense mutasyonlar saptanmıştır. İlgili değişikliklerden *RNF213* geninde yer alan değişiklik *Sanger* dizileme ile doğrulanırken *ITGB4* genindeki değişiklik doğrulanmamıştır. *RNF213* genindeki

değişikliğin patojenitesi *PredictsSNP* veri tabanı ile gösterilmiştir (Şekil 4.6.). Hastanın anne ve babasında da *RNF213* için *Sanger* dizileme gerçekleştirilmiş ve *RNF213* genindeki mutasyon babada da tespit edilmiştir. Hasta 16'da saptanan *RNF213* genindeki değişikliğin IGV görüntüsü Şekil 4.7.'dedir.

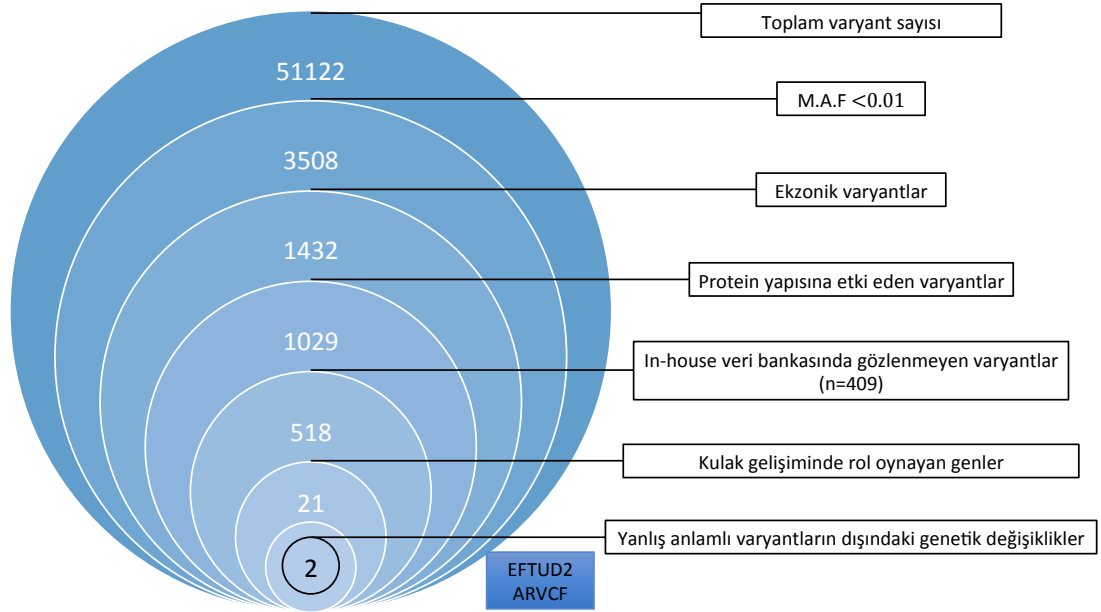
RESULTS		deleterious	XX % expected accuracy			Expand all annotations	
Annotation	Mutation	PredictSNP	PolyPhen-1	PolyPhen-2	SIFT	SNAP	
	<b>R2528Q</b>	<b>61 %</b>	74 %	81 %	53 %	81 %	

Şekil 4.6. *RNF213* değişikliğinin *PredictsSNP* veri tabanında gösterimi

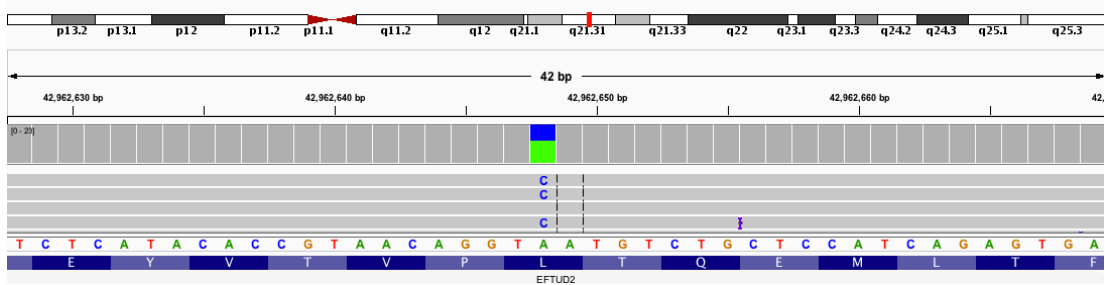


Şekil 4.7. Hasta 16'nın *RNF213* genindeki mutasyonun IGV görüntüsü

Tüm ekzom dizileme yapılan ikinci hastada ise heterozigot filtreleme yaklaşımı ile *EFTUD2* geni (NM\_004247.3) 4. ekzonda prematür stop kodon değişikliğine yol açan p.Leu109Ter(c.326T>G) mutasyonu heterozigot durumda saptanmıştır. Bu mutasyonun daha önce herhangi bir veri tabanında bulunmadığı görülmüştür. *MutationTaster* veri tabanında gerçekleştirilen in silico analizde değişikliğin hastalıktan sorumlu olabileceği gösterilmiştir. *Sanger* dizileme ile *EFTUD2* genindeki mutasyon doğrulanmıştır. Hastanın anne ve babasında da *EFTUD2* geni dizilemesi yapılmış ve babada da aynı mutasyonun heterozigot şekilde bulunduğu saptanmıştır. Hastada saptanan *EFTUD2* geni değişikliğinin görüntüsü Şekil 4.9.'dadır.



**Şekil 4.8.** Hasta 18’de gerçekleştirilen filtreleme basamakları: *EFTUD2* ve *ARVCF* genlerinde heterozigot *nonsense* mutasyonlar saptanmıştır. (*EFTUD2* genindeki değişiklik *Sanger* dizileme yöntemi ile doğrulanırken *ARVCF* geni değişikliği valide edilememiştir.)



**Şekil 4.9.** Hasta 18’in *EFTUD2* genindeki mutasyonun IGV görüntüsü

## 5.TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında klinik ön tanıları OAVS ile uyumlu olan 23 hastada sistematik olarak bu spektruma yol açan genetik etyoloji araştırılmıştır. Bu kapsamda; tüm hastalar puanlama yaparak değerlendirilmiş, kopya sayısı değişikliklerine yönelik mikrodizin analizleri gerçekleştirilmiş ve dört hastada klinik ile ilişkili olabilecek CNV'ler gösterilmiştir. Hastalarda ayrıca *MYT1* geni dizi analizleri yapılmış ancak klinikle ilişkili herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Son olarak; iki hastada tüm ekzom dizileme analizleri gerçekleştirilmiştir. Hastaların bir tanesinde başka bir çalışmada OAVS aday geni olarak öne sürülen *RNF213* geninde heterozigot *missense* mutasyon saptanmıştır. Diğer hastada ise OAVS ayırıcı tanısında yer alan Mandibulofasiyal Dizostozis ve mikrosefali birlikteliğinden sorumlu *EFTUD2* geninde *nonsense* bir mutasyon tespit edilmiştir. Bu çalışma ülkemizde OAVS fenotipine yönelik olarak yapılan en geniş kapsamlı ve OAVS moleküler genetiğinin çalışıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Hastaların demografik ve klinik özelliklerine bakıldığında; erkek ve kız oranı yaklaşık olarak literatürle uyumlu olarak bulunurken sağ taraflı etkilenmenin az olması literatür bilgisinden farklılık göstermektedir (42). Ayrıca bu çalışmada bilateral etkilenmenin daha fazla oranda gözlenmesinin nedeni çalışmada bilateralite için kulak bulgularının yanısıra *skin tag* ve göz bulguların da dahil edilmesi olduğu düşünülmüştür (4). Çalışmada; ailede benzer şikayetlere sahip birey bulunması oranı %42,9 olarak bulunmuştur. Bu nedenle şikayeti bulunmayan aile bireylerinin de iyi bir şekilde sorgulanması ve muayene edilmesi gereklidir.

Çalışmamızda literatür ile benzer şekilde kardiyak anomaliler en sık görülen ekstrakraniyal bulgu olarak karşımıza çıkarken vertebral bulgular literatürden farklı olarak torakal vertebra seviyesinde daha çok gözlenmiştir (53, 60). Bu nedenle OAVS ile izlenen hastalarda tek başına servikal grafi değerlendirmesinin yeterli olmadığı söylenebilir. Hastalarda literatürde bildirilenden daha fazla gelişme geriliği gözlenmiştir. Gelişme geriliği gözlenen hastaların genellikle bilateral etkilenme gösteren hastalar olduğu görülmüştür ve bu hastalarda gelişme geriliğini işitme kaybının etkilemiş olabileceği düşünülmüştür. İşitme kaybı ile gelişme geriliği arasında korelasyon bulunması da bu düşünceyi desteklemektedir.

Ayrıca bu çalışmada hastaların klinik bulgularının ağırlığına ve çift taraflı etkilenme olup olmamasına yönelik bir sınıflandırma yapılmıştır. Literatürde yapılan sınıflamadan farklı olarak orta kulak ve iç kulak bulguları da değerlendirmeye dahil edilmiştir. Literatürle uyumlu olarak hastaların klinik puanları yükseldikçe ilişkili anomalilerin arttığı görülmüştür. Bu nedenle hastaların izleminde bir klinik sınıflama yapılması ve orta ve iç kulak yapılarının da değerlendirilmesi prognoz açısından yararlı olacaktır.

Literatürde OAVS spektrumunda iç kulak anomalileri nadir olarak ele alınmıştır (78). Bu çalışma OAVS hastalarında görülen kohlear bulgulara ilave olarak inkomplet partiyon tip 2 bulgusu ile iç kulak anomalileri spektrumunu genişletmiştir. Ayrıca iç kulak bulgusu görülen bir hastada aynı taraflı aberran fasiyal kanal seyri eşlik ettiği görülmüştür. OAVS hastalarında tükürük bezi anomalileri de bildirilmiş ve hastaların %30'unda parotis aplazisi izlenmiştir (79). Bu çalışmada da bir hastada etkilenme ile aynı tarafta parotis aplazisi saptanmıştır. Ek olarak bir hastada da gustolakrimasyon izlenmiştir.

Hastaların klinik bulgularının yanısıra üçünde dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, üçünde de stereotipik hareketler gözlenmiştir. Eşlik eden bu bulgular daha önce yapılan çalışmalarda OAVS kohortunda otizm, DEHB ve davranış bozukluğunun normal popülasyondan daha yüksek bildirilmesi ile uyumlu bulunmuştur (80).

Hastalarda belirgin klinik heterojenitenin yanısıra genetik heterojenite de görülmüştür. Bu çalışmanın en önemli bulgularından bir tanesi kopya sayısı değişikliklerinin OAVS kliniği ile ilişkilendirilmesidir. Kohortta yer alan 23 hastanın dördünde (%17,4) farklı kromozomlarda kopya sayısı değişiklikleri tespit edilerek bu değişikliklerin hastalıktan sorumlu oldukları düşünülmüştür. Kopya sayısı değişikliklerinin klinikle ilişkilendirilmesinde gerek literatürde gerek bu çalışmada inkomplet penetrans bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen Hasta 10'da mikrodizin analizinde *gross* bir anomali saptanması üzerine sitogenetik inceleme gerçekleştirilmiştir. Hastada daha önce literatürde bulunmayan 47,XX,+der(4)t(X;4)(q12;p15) kromozom yapısı *de novo* olarak gözlenmiş ve bu kromozomal düzenlenmenin konstitusyonu mikrodizin yöntemi ile de gösterilmiştir.

Literatürde translokasyonların segregasyonu genellikle *adjacent* ve *alternate segregasyon* ve nadir olarak 3:1 aracılı gerçekleşmektedir (81). Anne ve babada germline kromozom analizi yapılmamakla birlikte hastada bu kromozom yapısının çok nadir görülen 3:1 segregasyon ile oluştuğu tahmin edilmektedir.

Trizomi 13, 18, 21 dışındaki otozomal kromozom trizomilerinin yaşama bağdaşmadığı bilinmektedir. Literatürde Emanuel sendromu dışında 47+derivatif kromozom yapısı nadir olarak ya da mozaik şekilde bildirilmiştir. Hastada periferik kan kromozom analizinde mozaik bir yapıya rastlanmamıştır. Bu nedenle hastada görülen kromozom anomalisini yaşama bağdaştıran en uygun açıklama X ve otozomal kromozomlar arasında görülen translokasyonlarda X inaktivasyonunun otozomal kromozoma yayılarak rölatif bir mozaik yapı oluşturmasıdır. X inaktivasyonun otozomal kromozomdaki alanlara yayılmasını LINE dizileri kolaylaştırmaktadır. X ve 4. kromozomda da X inaktivasyonun 4. kromozoma da yayıldığı düşüncesini destekleyecek şekilde diğer kromozomlardan fazla miktarda LINE tekrarları bulunmaktadır (82, 83). Bu açıdan bakıldığında; hasta ilk olarak OAVS spektrumunda değerlendirilmekle birlikte mozaik trizomi 4 ile de örtüşen bulguları bulunmaktadır. Literatürde görülen mozaik trizomi 4 hastaları ile hastanın klinik bulgularının karşılaştırması Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Mozaik trizomi 4 IUGR, kardiyak anomaliler, baş parmak hipoplazi/aplazisi, hipo/hiperpigmentasyon, zihinsel yetersizlik ve dismorfik bulgular ile karakterize nadir görülen bir hastalıktır (84). Hastalarının bir kısmında belirgin tragus ile karakterize displastik kulak, *posterior* rotasyona uğramış dış kulak bildirilmiştir (85). Ek olarak Caracossa ve ark. tarafından 4q35q37 duplikasyonun belirgin antiheliks ve tragus hipoplazisi ile karakterize büyük displastik kulak, ekstremit ve renal anomaliler görülmesi sonucu ‘‘Auriculo-Acro-Renal’’ sendrom olarak isimlendirilmesi de önerilmiştir ancak bu tanım literatürde tekrar kullanılmamıştır (86). Bu bilgilerle; 4. kromozom trizomilerinde dış kulak malformasyonları ve renal hipoplazi görülmekle birlikte tez kapsamındaki hastada bulunan mikrotia/anotia ya da renal agenezi bildirilmemiştir. Hastanın kulak bulgularının literatürde bildirilen mozaik trizomi 4 ya da 4q trizomisi hastalarındaki heliks anomalilerinden daha ağır olması dikkat çekicidir. Bu farklılığın nedeni hem 4. kromozom hem de X kromozomundaki trizomik bölge etkilerinin kliniği ağırlaştırması olabilir.



**Tablo 5.1.** Mozaik trizomi 4 ile 10 nolu hastanın bulgularının karşılaştırılması  
(i: bulgunun değerlendirilmediğini gösterir.)

	Wieczorek et al. [2003] (85)	Brady [2005] (87)	Bouman et al [2015] (84)	10 nolu hasta
IUGR	+	+	+	+
Fasiyal asimetri	+	+	-	+
Mikroftalmi	+	-	-	i
Ptozis	+		-	i
Düşük yerleşimli kulak	+	+	-	+
Kulak malformasyonu	+	+	-	+
Mikrognathi/Retrognathi	-	+	+	+
Kardiyak anomali	+	+	+	+
Baş parmak anomalisi	+	+	+	+
Ayak anomalileri	-	+	-	+
Kısa boy	+	+	-	+
Skolyoz		+		-
Gelişme geriliği	+	+	+	+
Hirsutizm	+	+	+	+
Cilt bulguları	+	+	-	i

Hastada 4. Kromozomda duplike olan genlerin kraniyofasiyal bulgular ile ilişkisine bakıldığında; bölgede yer alan 493 gen içerisinde; *SHROOM3*'ün hemifasiyal mikrozomiye yatkınlık oluşturduğu gözlenmiştir (88). *DSPP* geni de işitme kaybı ile ilişkilendirilmiş bir gen dir ve mikrotiaya neden olabileceği biyoinformatik analizlerle gösterilmiştir (89). *HAND2* kulak gelişiminde önemli olan *BAPX1* ve *GSC* ile birlikte endotelin sinyal yolağında görevli ve mandibulada eksprese olan bir gen dir. *HAND2* ekspresyon artışında *HOX* genleri dışındaki *homeobox* transkripsiyon faktörlerinde düzensizlikler görülmektedir (90). *EDNRA*, farengal arkların oluşumu sırasında mandibular kimlik için gerekli ve endotelin sinyal yolağında görevli gerekli bir gen dir. Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde hastada görülen klinik bulguların bölgede yer alan ve mikrotia etyolojisine katılan

çok sayıda genin duplike olması ile ilişkili olabilir. Ancak; hastada hangi gen veya genlerin OAVS benzeri klinik bulgulara yol açtığı gösterilmesi derive kromozomda inaktivasyonun hangi bölgeleri kapsadığı ile anlaşılacaktır. Bu nedenle ilgili kromozomda metilasyon çalışması yaptıktan sonra inaktive durumda olmayan genlerin belirlenmesi etyolojik ilişkinin belirlenmesini kolaylaştıracaktır.

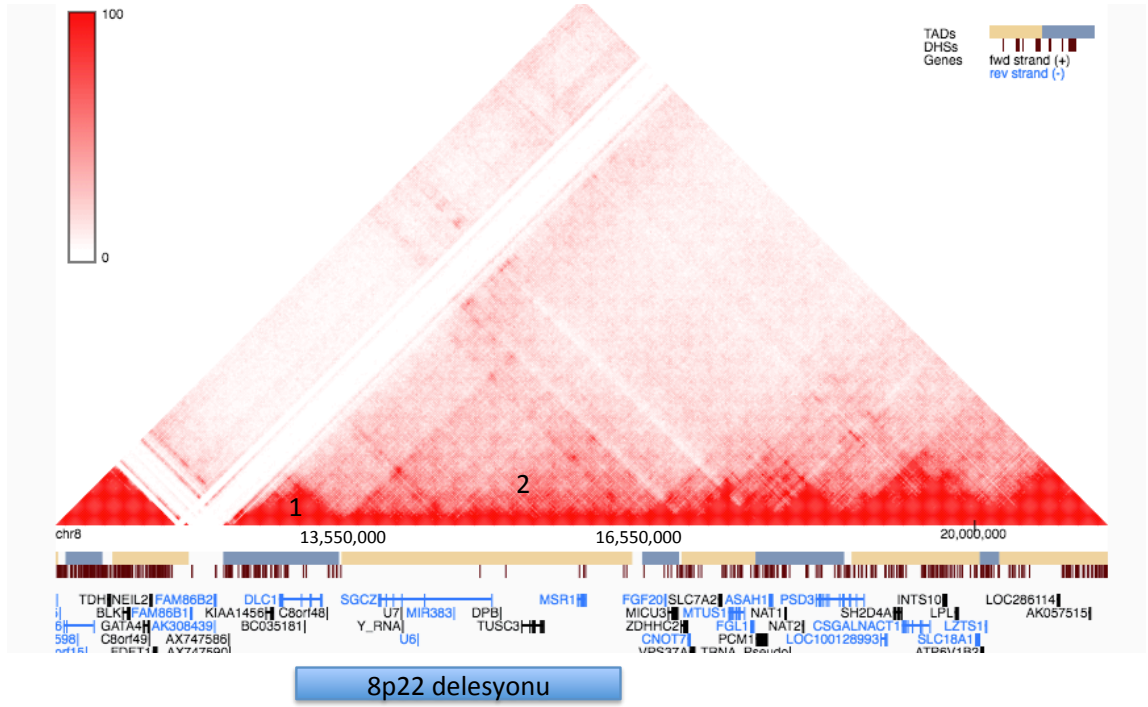
Literatürde farklı kromozomların trizomileri OAVS klinik bulguları ile ilişkilendirilmiş durumdadır. Fasiyal asimetri, dış kulak bulguları, renal ve baş parmak anomalileri benzeri klinik bulguların mozaik trizomi 4'te görülmesi; 4. kromozom anöplodilerinin de OAVS ayırıcı tanısında düşünülmesi gerektiğini göstermiştir.

Hastaların iki tanesinde (Hasta 16 ve Hasta 18) inkomplet penetrans gözlenen iki farklı kopya sayısı değişikliği saptanmıştır. İnkomplet penetrans; 1q21.1, 16p12.1, 16p11.2, 15q13.3, 2q11.2q13 bölgelerindeki CNV'ler başta olmak üzere farklı kromozom anomalilerinde sıklıkla bildirilmektedir. Buna ek olarak; Rooryck ve ark. yaptığı çalışmada; OAVS kohortunda saptanan 10 CNV'nin 9 tanesinin etkilenmemiş aile üyelerinde de gösterilmesi ile OAVS'de inkomplet penetrans bulunduğu belirtilmiştir (73). Bu çalışmada da her iki hastada da anne ya da babada aynı CNV'nin görülmesi inkomplet penetrans ile uyumlu bulunmuştur.

Bu hastalardan Hasta 11'de 8p22 bölgesinde yaklaşık 2.7 milyon baz büyüklüğünde delesyon saptanmıştır. Bu delesyon *DGV* veri tabanında bulunmamaktadır ve *Clinvar* veri tabanında da klinik anlamı bilinmeyen kopya sayısı değişikliği olarak değerlendirilmektedir. Bu bölgede *DLC1*, *SGCZ*, *TUSC3*, *MSR1* genleri yer almaktadır. Hastanın annesinde de aynı büyüklükte delesyon saptanması bu delesyonun inkomplet penetrans dahilinde monoalelik ekspresyon mekanizması ile klinikten sorumlu olabileceğini gösterir. Bununla uyumlu olarak yapılan bir çalışmada bu bölgede yer alan *TUSC3* geni paternal metilasyonun görülmesi de bu bölge için maternal monoalelik ekspresyonu desteklemektedir (91). *TUSC3* mutasyonları kulak anomalisi ile ilişkilendirilmemiş olmakla birlikte bu bölgede maternal alelin delesyona uğraması ve paternal alelinin eksprese olmaması sonucu klinik bulgular ortaya çıkmış olabilir. Ayrıca *Decipher* veri tabanında bu bölgeyi de içeren daha büyük delesyona sahip hastada pinna anomalisi, düşük yerleşimli kulaklar ve zihinsel yetersizlik gözlenmiştir. Bununla birlikte; *TUSC3* homozigot

delesyonları ve nokta mutasyonları literatürde otozomal resesif sendromik olmayan zihinsel yetersizlik (OMIM 601385) ile ilişkilendirilmiştir. Kohortumuzda delesyon saptanan hastada da zihinsel yetersizlik görülmesi klinik bulguların örtüştüğünü göstermektedir. *TUSC3* geninin diğer genler ile etkileşimine bakıldığında *TUSC3* ve kulak gelişimi için önemli olan *EYA-SIX* kompleksi arasında transkripsiyonel bir ilişki bulunmaktadır (92).

Yakın zamanda kopya sayısı değişikliklerinin genom mimarisini etkileyerek hastalıklara neden olduğu farklı çalışmalarda gözlenmiştir. Genomun bir düzenlemesinin olduğu, ‘‘*Topolojik Asosiyasyon Domaini*’’ (*TAD*) olarak adlandırılan yaklaşık 1 milyon baz büyüklüğünde bölünmüş türler arası korunmuş kromatin bölgelerin tanımlanmasıyla gösterilmiştir. Kopya sayısı değişiklikleri *TAD* sınırlarını ve burada yer alan düzenleyici elemanları etkileyerek hastalıklara neden olabilir (93). Bununla uyumlu olarak; fare çalışmasında 20 kb büyüklüğünde bir inversiyonun kromatin insulator bölgesini etkileyerek gen ekspresyonunu değiştirdiği ve OAVS kliniğe neden olduğu gösterilmiştir (94). Benzer şekilde yakın zamanda OAVS ayırıcı tanısında yer alan BOFS sendromunda da inversiyon sonucu ilgili *TAD* yapısının değişerek klinik bulgulara yol açtığı gözlenmiştir (95). Bu görüşten yola çıkarak hastada saptanan delesyonun genomdaki üç boyutlu etkisi araştırıldığında, delesyonun 8p22 bölgesinde *TAD* yapısında değişiklik oluşturduğu görülmüştür (Şekil 5.1). Bu nedenle hastanın klinik bulguları *TAD* defekti sonucu bölgesel gen ekspresyonunun değişikliği ile ilişkili olabilir. Kulak gelişiminde etkili olan genlerle yapılan zenginleştirme analizi sonucunda da kromatin bağlanması şeklinde moleküler fonksiyonda kümelenme görülmesi de bu düşünceyi desteklemektedir. Hastada saptanan değişikliğin biyoinformatik analiz sonucu *TAD* arası sınırı kaldırdığının gösterilmesi kraniyofasiyal anomaliler ve genomun üç boyutlu yapısı penceresinden de incelenmesi gerektiğini göstermiştir.



**Şekil 5.1.** 8. Kromozom *Hi-C* görüntüsü; *TAD* yapılarının ve içerdikleri genlerin görünümü, hastada saptanan delesyon birinci ve ikinci topolojik birim arasındaki sınırı kaldırmaktadır. (<http://promoter.bx.psu.edu/hi-c>)

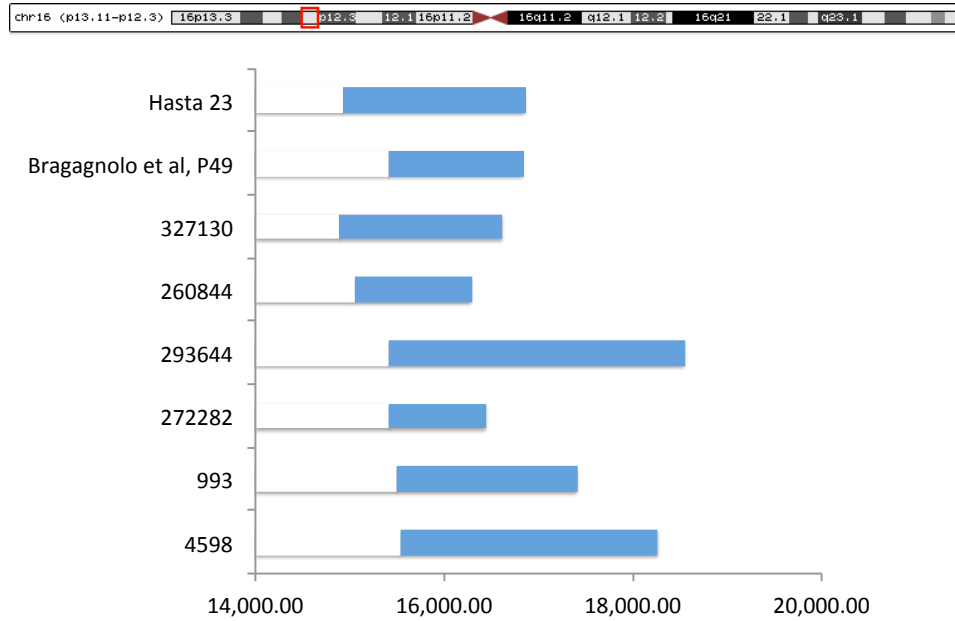
Çalışma kapsamında inkomplet penetrans görülen bir diğer hastada (Hasta 23) 16p13.11 bölgesinde paternal kalıtılan duplikasyon saptanmıştır. 16p13.11 bölgesinde görülen delesyon ve duplikasyonların oluşum mekanizması; 16. kromozomun p kolunda sık bulunan ve yüksek homoloji gösteren ‘‘*Low Copy Repeat (LCR)*’’ lere bağlanmıştır. Literatürde 16p13.11 görülen kopya sayısı değişiklikleri nörogelişimsel gerilik ve otizm, şizofreni ve DEHB benzeri nöropsikiyatrik hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Bazı hastalarda kraniyosinostoz, polidaktiki ve eklem laksitesi şeklinde iskelet sistemi bulguları da gözlenmiştir. Ayrıca bu bölgedeki duplikasyonların normal popülasyonda da görüldüğü bilinmektedir. Bu nedenle bu CNV için de inkomplet penetranstan bahsedilebilir. Bu bölge duplikasyonları ayrıca *Decipher* veri tabanında mikrotia, *posterior* heliks piti, düşük yerleşimli kulak, *posterior* rotasyona uğramış kulak, dış kulak yolu stenozu, hemivertebra, kosta eksikliği, aurikula anomalisi, fasyal asimetri, vestibuler disfonksiyon ve renal agenezi bulguları ile de bildirilmiştir (Şekil 5.2.) Ek olarak; bu

bölge duplikasyonu 2018 yılında Bragagnolo ve ark. tarafından OAVS spektrumunda da saptanmıştır (74). Kohortumuzdaki hasta ve çalışmadaki hastada 13 kosta çifti bulunması ortak olarak görülmektedir (Tablo 5.2.). Bu nedenle bu spektrumda takip edilen hastalarda kosta sayısı fazlalığı tespit edildiğinde; 16p13.11 bölgesi CNV'leri açısından değerlendirme önerilir.

**Tablo 5.2.** 16p13.11 duplikasyonu saptanan OAVS hastası ile 23 nolu hastanın bulgularının karşılaştırılması

	Bragagnolo et al, Hasta 49 (74)	23.nolu hasta
Duplikasyon Bölgesi	16p13.11p12.3(15,417,030-16,837,613)x3	16p13.11p12.3(14,929,737-16,858,308)x3
Fasiyal asimetri	+	+
Fasiyal sinir paralizisi	+	Formal değerlendirme yok. Ağlarken asimetri
Epibulbar dermoid	+	-
<i>Preauriküler skin tag</i>	+	+
Kosta sayısı fazlalığı	+	+
Skolyoz	+(14yaş)	-(6 ay)
Nörogelişimsel gerilik	?	-

Bu bölgedeki duplikasyonların miR-484 aracılı X kromozomunda yer alan *PCDH19* genini etkileyerek davranış anomalilerine yol açtığı yakın zamanda gösterilmiştir (96). Duplikasyonların OAVS fenotipine, kulak ve iskelet bulgularına nasıl yol açtığı bilinmemektedir. Literatürde bu bölge duplikasyonların pleiotropik etkilerinden bahsedilmektedir (97). Hastada yalnızca OAVS fenotipinin görülmesi ve nörogelişimsel bulguların ya da kraniyosinostoz ve polidaktili benzeri iskelet bulgularının bulunmaması da bu görüşü desteklemektedir. Ayrıca hastanın klinik olarak etkilenmemiş babasında duplikasyon boyutunun büyüklüğünün artarak indeks hastaya geçmesi homoloji gösteren bölgeler arasında CNV instabilitesi varlığına iyi bir örnektir. Ancak artış gösteren bölgede doğrudan kulak gelişimi ile ilişkilendirilen bir gen saptanmamıştır.



**Şekil 5.2.** Kulak bulgusu olan 16p13.11 bölgesi duplikasyonlarının görünümü; bölgede kulak bulgusu görülmeyen ve sadece zihinsel yetersizlik gözlenen bireylerin olması nedeniyle herhangi bir genotip-fenotip korelasyonu yapılamamıştır. (Çizim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

Mikrodizin analizinde klinikle ilişkili olduğu düşünülen son CNV 15q11.2 bölgesi duplikasyonudur. 15q11.2 bölgesinde BP1'den BP5'e kadar toplam beş kırık bölgesi (*breakpoint*) tanımlanmıştır. Bu çalışmada 15q11.2 bölgesinde duplikasyon saptanan hastada (Hasta 3) kırık bölgeleri BP1 ile BP2 arasında yer almaktadır. Literatürde bu bölge delesyon ve duplikasyonları gelişme geriliği, zihinsel yetersizlik, konuşma geriliği, davranış problemleri, otizm ve şizofreni gibi nöropsikiyatrik hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (98). Ayrıca hastalarda epilepsi ve çeşitli dismorfik bulgular da bildirilmiştir. Ancak sağlıklı popülasyon veri tabanında (*DGV*) bu bölgeyi kapsayan çok sayıda delesyon ve duplikasyon tanımlanmış durumdadır. Bu nedenle bu bölge kopya sayısı değişikliklerinin tam penetrans göstermediğinden bahsedilmekle birlikte Hasta 3'ün anne ve babasına ulaşamadığı için ilgili değişikliğin segregasyonu değerlendirilememiştir. *Decipher* veri tabanında benzer bölge duplikasyonlarında; pinna anomalisi, düşük yerleşimli kulak, dış kulak aplazisi/hipoplazisi ve hafif hipoakuzi şeklinde çeşitli kulak bulguları bildirilmiştir.

Ayrıca bu bölgedeki delesyonlarda %46 oranında dismorfik kulak görünümü de saptanmıştır.

15q11.2 bölgesinde yer alan duplikasyon *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2* ve *NIPA1* genlerini içermektedir. Çalışma kapsamında yapılan yolak analizinde; duplikasyon görülen genler ve kulak gelişiminde önemli olan genlerin etkileşimleri incelendiğinde *NIPA1* ile *CHUK* genlerinin birlikte ekspresyonu gözlenmiştir. Ayrıca sırasıyla *CYFIP1*'in *HAND2* ile *NIPA2*'nin de *FGF8* ile genetik etkileşimin olduğu görülmüştür. Bu etkileşimlerden; 4. kromozomda yer alan *HAND2* etkileşimin önemli olduğu düşünülmüştür. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada 15q duplike olmuş nöronlarda *HAND2* ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (99). *HAND2* ekstremiteler, kardiyak ve farengeal ark gelişiminde transkripsiyonel düzenleyici olarak görev almaktadır. Özellikle farengeal aparatusta etkilerini; mutasyonları kulak anomalileri ile ilişkilendirilmiş *GSC* geni üzerinden gerçekleştirmektedir. *Hand2* mutant veya *knock-out* hayvan modellerinde *GSC* ekspresyonu da azalmaktadır (90). Bu nedenle bu bölge duplikasyonlarının *HAND2* ve dolayısıyla *GSC* ekspresyonunu azaltarak hastada görülen kliniği oluşturacağı düşünülmüştür. Nedenselliğinin kesin olarak gösterilmesi için ileride fonksiyonel çalışmaları yapılması gereklidir.

Bu çalışmanın bir bulgusu da *MYT1* dizi analizi sonuçlarıdır. Hastalarda *MYT1* geninde heterozigot ve homozigot durumda değişiklikler bulunmasına rağmen bu değişiklikler OAVS kliniği ile ilişkilendirilmemiştir. Başka bir çalışmada hastalıktan sorumlu olarak gösterilen rs147483668 ve rs78568430 değişiklikleri kohortumuzda da saptanmıştır ancak toplumda görülme sıklıklarının fazla olması nedeniyle klinik anlamlı kabul edilmemiştir (72). Yine de ilgili değişikliklerin fonksiyon çalışmaları ile etkilerinin belirlenmesi gereklidir. Literatürde 226 OAVS hastasının üçünde *MYT1* mutasyonları tanımlanmış ve klinik ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle *MYT1* mutasyonlarının genetik etyolojinin nadir bir kısmını oluşturduğu söylenebilir.

Bu çalışmanın bir diğer bulgusu da iki hastada gerçekleştirilen tüm ekzom dizileme sonuçlarıdır. İlk hastada (Hasta 16) heterozigot filtreleme sonucunda daha önce başka bir çalışmada OAVS aday geni olabileceği belirlenen *RNF213* geninde *missense* bir mutasyon bulunmuştur (72). *RNF213* geni özelleşmiş bir zing finger

domain içerir ve protein protein etkileşimlerinde görevlidir. *RNF213* ayrıca anjiyogenezde de önemlidir ve bu gendeki birtakım değişikliklerin arteriyel iskemi ile karakterize *Moya-Moya* hastalığına yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir. Zebrafish modelinde *RNF213* knockdown yapıldığında anormal kraniyofasiyal vasküler yapı görülmektedir. Ayrıca yakın zamanda *RNF213* değişiklikleri intrakraniyal arter stenozunun yanısıra nöral krest köken alan koroner arter ve pulmoner arter yapılarının stenozu ile de ilişkilendirilmiştir. Bu bulgularla *RNF213* değişikliklerinin vasküler bir nörokristopatiye yol açtığından söz edilmektedir (100). Bu nedenle hastada saptanan mutasyon; OAVS vasküler yapılanmada bozukluk hipotezinin genetik temeli ile ilişkili olabilir. *RNF213*'ün OAVS aday geni olarak önerildiği çalışmada da hem etkilenmiş bireylerde hem de klinik olarak etkilenmemiş annede *RNF213 splice* bölge mutasyonu saptanmış ve inkomplet penetranstan bahsedilmiştir (72). Bu çalışmada da *RNF213* değişikliğinin klinik olarak etkilenmemiş babada da bulunması inkomplet penetransla açıklanabilir. Önceki çalışmadaki hastanın kliniği detaylandırılmadığı için klinik bulguların karşılaştırması yapılamamıştır. Her ne kadar *RNF213* ve nörokristopati arasında ilişki vurgulansa da moleküler fonksiyonel analizler bu ilişkinin kanıtlanması ve detaylandırılması için gereklidir. Ayrıca *RNF213* geni değişikliklerinin OAVS etyopatogenezindeki yeri için de hastada saptanan *missense* değişikliğin hayvan çalışmalarında modellenmesi ve başka OAVS hastalarında da bu genin taranması esastır.

Tüm ekzom dizileme yapılan diğer hastada (Hasta 18) da daha önce literatürde bulunmayan *EFTUD2* geninde heterozigot *nonsense* bir mutasyon gösterilmiş ve hastanın fenotipik özelliklerinden sorumlu olduğu düşünülmüştür. *MutationTaster* programı ve *PredictSNP* programları ile yapılan *in silico* analizler de bu varyasyonu %100 (skor: 1;0) patojenik olarak nitelendirmiştir. *EFTUD2* genindeki heterozigot mutasyonlar literatürde OAVS kliniği ile örtüşen bulgulara sahip olan Mandibulofasiyal Dizostozis ve mikrosefali ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte literatürde OAVS spektrumu ile izlenen hastalarda da *EFTUD2* mutasyonlarına rastlanılmaktadır. Luquetti ve ark. iki hastalığın klinik bulguları arasında benzerlik bulunması nedeniyle OAVS spektrumunda *EFTUD2* geninin dizilenmesini önermiştir (101). Ek olarak yakın zamanda OAVS ön tanısı ile ekzom analizi yapılmış bir hastada *EFTUD2* 3. Ekzonda *nonsense* bir mutasyon (p.Gln87\*)



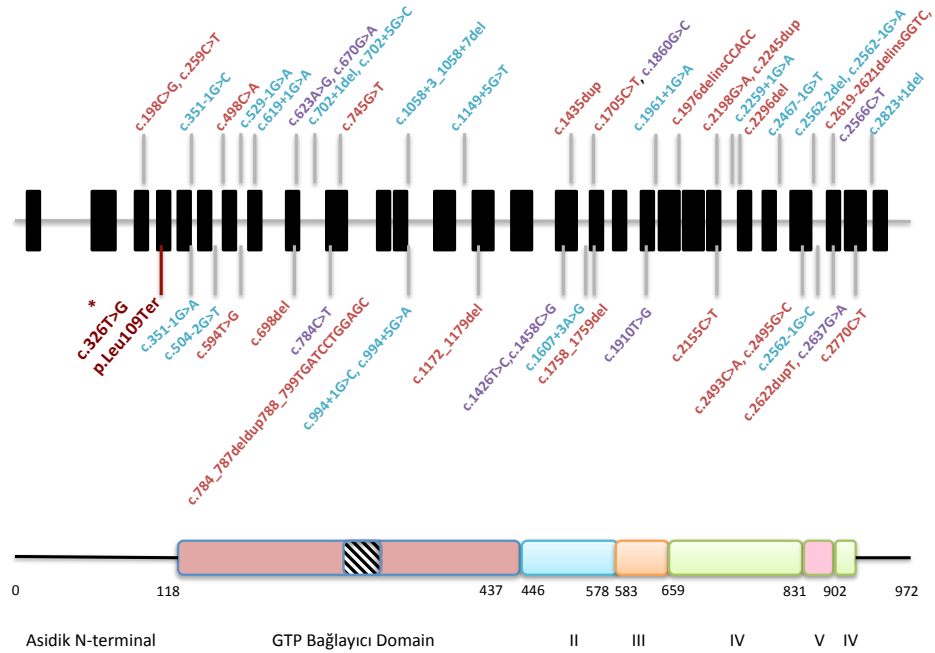
tespit edilmiştir ve bu çalışmada *EFTUD2* değişikliklerinin geniş bir klinik spektrumda görülmesi mutasyonun tipine, lokalizasyonuna ve penetransına bağlanmıştır (102). *EFTUD2* geninde *nonsense* mutasyon saptanan hastanın klinik bulgularının literatürde tanımlanmış hastalar ile karşılaştırması Tablo 5.3.'te sunulmuştur.

**Tablo 5.3.** *EFTUD2* mutasyonu saptanan hastalar ile 18 nolu hastanın bulgularının karşılaştırılması

Klinik Bulgular	Tahmini penetrans	<i>Splice</i> bölge mutasyonları	Diğer mutasyonlar	18 nolu hasta
Mikrognathia	%97,6	%92	%100	+
Mikrotia/Displastik kulak	%96,6	%96,3	%96,8	+
Malar hipoplazi	%93,1	%92	%93,5	+
İletim tipi İşitme kaybı	%59,3	%56,5	%61,3	+
Sensörinöral işitme kaybı	%11,1	%13,1	%9,7	-
Miks tip işitme kaybı	%29,6	%30,4	%29	-
Dış kulak stenozu/atrezisi	%65,8	%61,9	%67,3	+
Vestibuler sistem anomalileri	%60,7	%67,7	%57,9	-
Kemikçik anomalileri	%61,1	%33,3	%88,9	+
Fasiyal asimetri	%14	%50	%55,6	-
<i>Preauriküler tag</i>	%51,7	%59,3	%48,4	+
Yarık damak	%47,3	%32,1	%53,9	+
Koanal atrezi	%31,4	%18,5	%37,3	-
Trakeostomi	%20,8	%18,5	%24	-
Baş parmak anomalileri	%31,3	%29,6	%32	-
Kardiyak anomali	%31,5	%24	%34,3	-
Özefageal atrezi / TÖF	%26,1	%35,7	%21,7	-
Gelişme geriliği	%100	%100	%100	+
Mikrosefali	%88	%69,2	%95,5	-
Epilepsi	%27,5	%30,4	%26,3	+

*EFTUD2 nonsense* mutasyonunun saptandığı Hasta 18'de mikrosefali yokluğu ve zihinsel yetersizliğin kulak anomalilerine eşlik etmesi ilginçtir. *EFTUD2* mutasyonu saptanan hastalarda; mikrosefali penetransı yüksek olan bir klinik bulgu olarak hastalarda hem konjenital hem de postnatal olarak bildirilmiştir. Ancak; Huang ve ark. tarafından hastalarda erken yaşta mikrosefali görülüp ilerleyen

yaşlarda baş çevresinin normal aralığa gelebileceği de ortaya konmuştur (103). Hasta bu açıdan incelendiğinde 8,5 aylıkken baş çevresinin 3. persentilin altında olduğu ve baş çevresinin artan yaşla birlikte normal aralığa geldiği görülmüştür. Literatürde mikrosefali bulunmayan ya da rölatif mikrosefali olan hastalarda zihinsel yetersizliğin hafif olduğu gözlenmiştir (101). *Nonsense* mutasyon saptanan hastada belirgin zihinsel yetersizlik bulunmasına rağmen mikrosefali görülmemesi dikkat çekicidir ve ilk 1 yaş aralığındaki mikrosefaliye bağlı bir etkilenmenin olduğu düşünülebilir. Ek olarak; bazı hastalarda zigomatik arkta yarı tanımlanmış ve bu bulgunun *EFTUD2* geni için yol göstericiliğinden bahsedilmiştir (101). Hastada zigomatik arkta defekt gösterilmesi de klinik olarak uyumludur. Hastanın *EFTUD2* geni 4. ekzonda saptanan değişiklik *EFTUD2* proteinin asidik N terminal bölgesinde yer almaktadır. İki değişiklik dışında bu bölgede başka mutasyonların tanımlanmaması da dikkat çekicidir. Hastada saptanan değişiklik Şekil 5.3.'te literatürde daha önce tanımlanmış mutasyonlar ile birlikte gösterilmektedir.



**Şekil 5.3.** *EFTUD2* geni ve domainleri; çalışmada saptanan mutasyon yıldız ile işaretlidir. (Çizim: Naz Güleray, tez kapsamında hazırlanmıştır.)

*EFTUD2* mutasyonları çoğunlukla *de novo* olarak gözlenmekle birlikte yaklaşık %19'unun dominant kalıtım gösterdiği gözlenmiştir (103). Dominant kalıtım gösteren ailelerin biri hariç hastalıkta komplet penetrans gözlenmiştir. İnkomplet penetrans görülen bu ailede; *splice* bölge değişikliği zigomatik hipoplazi dışında klinik bulgu görülmeyen anneden; zihinsel yetersizlik ve belirgin dismorfik bulgular gösteren çocuklarına aktarılmıştır (104). Annede görülen zigomatik hipoplazisi de klinik muayeneye ek yapılan görüntüleme yöntemleri aracılığıyla saptanmıştır. Bu çalışmada *EFTUD2 nonsense* mutasyonu hastanın babasında da gösterilmiştir ancak babanın detaylı muayenesi yapılamamıştır. Babanın erkek kardeşinin eksitus olan kızında fasiyal asimetri, kulak anomalisi ve polidaktili gözlenmesi ailede inkomplet penetrans olabileceğini göstermekle birlikte saptanan mutasyonun etkisinin gösterilmesi için fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

OAVS moleküler etiyolojisini aydınlatma adına, bu tez çalışmasını özgün ve kritik öneme sahip kılan unsurlardan en önemlisi farklı kromozomlarda saptanan kopya sayısı değişiklikleridir. Bu değişiklikler içinde yer alan aday genlerin *MYT1* geni ile benzer şekilde nörogelişimsel kliniğe yol açtığı gösterilmiştir. Literatürde 20q13.3 bölgesinde *MYT1* genini içeren delesyonlar bildirilmiştir. Bu bölgedeki delesyonlar nörogelişimsel gerilik ve davranış bozuklukları ile ilişkilendirilmiş ve delesyonların herhangi bir dismorfik bulgu ya da kraniyofasiyal anomali ile birlikteliği gösterilmemiştir. Aynı şekilde kohortta saptanan 16p13.11 bölge duplikasyonları ve *TUSC3* delesyonları da nörogelişimsel gerilik ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca gelişme geriliği görülebilen 22q11.2 bölgesi kopya sayısı değişikliklerinin OAVS etiyolojisinde bahsi geçmektedir. Yapılan klinik çalışmalarda da OAVS hastalarında normal popülasyondan daha yüksek oranda nöropsikiyatrik problemlerin görüldüğünden bahsedilmektedir (80). Bu açıdan bir değerlendirme yapıldığında etyolojide tartışılan bölgelerin/genlerin bazı hastalarda nöropsikiyatrik bulgu bazı hastalarda da kulak bulgusu şeklinde klinik bulgular ile ilişkili olduğu söylenebilir. Bu nedenle etyolojide adı geçen bölge/genler için pleiotropik etkiden bahsedilebilir. Kulak gelişimi ile ilişkili genler ile yapılan yolak analizinde nöron farklılaşması, ön beyin gelişimi ve nöron gelişimi gibi biyolojik süreçlerde

kümelenmesi görülmesi de bu düşüncenin ileride yapılacak çalışmalarda sorgulanabilirliğini gösterir.

Sonuç olarak;

OAVS klinik tanısı için kabul görmüş belirli bir minimal tanı kriterinin olmaması, OAVS ve ayırıcı tanısında yer alan sendromların örtüşen fenotipik özelliklerin bulunması bu spektrumda fenotip tanımlamasını karmaşıktır. Bu çalışma; OAVS vb. kompleks fenotipik bulgulara sahip hastalıklarda genetik etyolojinin tanımlanmasında mikrodizin analizi ve tüm ekzom dizileme gibi genom boyu ölçeğinde gerçekleştirilen yöntemlerin önemini ortaya koymaktadır. Ancak; çalışmanın kısıtlılıkları ise ekzom analizlerinin sadece indeks bireylerde gerçekleştirilmiş olması, OAVS etyolojisinde suçlanan miRNA, epigenetik değişiklikler, somatik mutasyonlar ve kodlamayan bölge varyantlarının çalışma kapsamı dışında bırakılması olmuştur. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda genomik verilerin tüm genom, transkriptom ve metilasyon çalışmaları ile desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Bu çalışma Türkiye’de OAVS moleküler genetiğinin çalışıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

2. OAVS moleküler etyolojisini aydınlatma adına, bu tez çalışmasını özgün ve kritik öneme sahip kılan unsurlardan en önemlisi hastalarda saptanan kopya sayısı değişiklikleridir. Bu nedenle OAVS spektrumunda öncelikle mikrodizin analizleri gerçekleştirilmelidir.

3. Nörogelişimsel gerilik ile ilişkili 16p13.11 bölge duplikasyonu ikinci kez OAVS klinik bulgularına sahip bir hastada gösterilmiştir. Ayrıca hastada saptanan kopya sayısı değişikliğinin biyoinformatik analiz sonucu *TAD* birimini değiştirdiği gösterilmiştir. Kopya sayısı değişikliklerinin genomun üç boyutlu yapısını değiştirerek OAVS klinik bulgularından sorumlu olabileceği öne sürülmüştür.

4. *MYT1* geninde klinik anlamlı bir değişikliğin saptanmaması *MYT1* geni değişikliklerinin OAVS genetik etyolojisinde daha az yer aldığını göstermiştir.

5. Bu çalışma birbiriyle örtüşen bulguları olan kompleks fenotip ve genetik heterojeniteye sahip hastalıklarda tanıda tüm ekzom dizileme yönteminin önemini ortaya koymuştur.

6. Hastalarda saptanan değişikliklerin kulak ve kraniyofasiyal yapıların gelişimine yönelik fonksiyon çalışmaları yapılması gerekir.

7. Hastalarda farklı kromozomlarda kopya sayısı değişikliklerinin yanısıra tek gen değişikliklerinin gösterilmesi spektrumdaki geniş genetik heterojeniteyi desteklemektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Twigg SR, Wilkie AO. New insights into craniofacial malformations. *Human molecular genetics*. 2015;24(R1):R50-R9.
2. Heike C, Hing A, Aspinall C, Bartlett S, Birgfeld C, Drake A, et al., editors. Clinical care in craniofacial microsomia: a review of current management recommendations and opportunities to advance research. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*; 2013: Wiley Online Library.
3. Lopez E, Berenguer M, Tingaud-Sequeira A, Marlin S, Toutain A, Denoyelle F, et al. Mutations in MYT1, encoding the myelin transcription factor 1, are a rare cause of OAVS. *Journal of medical genetics*. 2016;jmedgenet-2016-103774.
4. Tasse C, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke H-J, Albrecht B, Horn D, et al. Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for a new classification. *European journal of medical genetics*. 2005;48(4):397-411.
5. Berenguer M, Tingaud-Sequeira A, Colovati M, Melaragno MI, Bragagnolo S, Perez AB, et al. A novel de novo mutation in MYT1, the unique OAVS gene identified so far. *European Journal of Human Genetics*. 2017;25(9):1083.
6. Alberti PW. The anatomy and physiology of the ear and hearing. *Occupational exposure to noise: Evaluation, prevention, and control*. 2001:53-62.
7. Hofman PM, Van Riswick JG, Van Opstal AJ. Relearning sound localization with new ears. *Nature neuroscience*. 1998;1(5):417.
8. Klockars T, Rautio J. Embryology and epidemiology of microtia. *Facial plastic surgery : FPS*. 2009;25(3):145-8.
9. Anthwal N, Thompson H. The development of the mammalian outer and middle ear. *Journal of anatomy*. 2016;228(2):217-32.
10. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, et al. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*. 1998;125(5):813-24.
11. Trainor P. *Neural crest cells: evolution, development and disease*: Academic Press; 2013.
12. Graham A, Richardson J. Developmental and evolutionary origins of the pharyngeal apparatus. *EvoDevo*. 2012;3(1):24.
13. Marchioni D, Presutti L. *Endoscopic Ear Surgery: Principles, Indications, and Techniques*: Thieme; 2014.
14. Lipan MJ, Eshraghi AA. Otologic and audiology aspects of microtia repair. *Seminars in plastic surgery*. 2011;25(4):273-8.
15. Shiffman MA. *Advanced cosmetic otoplasty: art, science, and new clinical techniques*: Springer Science & Business Media; 2013.
16. Greenberg AM, Prein J. *Craniomaxillofacial reconstructive and corrective bone surgery: principles of internal fixation using AO/ASIF technique*: Springer Science & Business Media; 2007.

17. Bartel-Friedrich S, Wulke C. Classification and diagnosis of ear malformations. *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*. 2007;6.
18. Francis - West P, Crespo - Enriquez I. *Vertebrate Embryo: Craniofacial Development*. eLS. 2001:1-15.
19. Minoux M, Rijli FM. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development*. 2010;137(16):2605-21.
20. Mallo M. Reassessing the Role of Hox Genes during Vertebrate Development and Evolution. *Trends in genetics : TIG*. 2017.
21. Santagati F, Rijli FM. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003;4(10):806.
22. Dupé V, Pellerin I. Retinoic acid receptors exhibit cell - autonomous functions in cranial neural crest cells. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2009;238(10):2701-11.
23. Minoux M, Kratochwil CF, Ducret S, Amin S, Kitazawa T, Kurihara H, et al. Mouse *Hoxa2* mutations provide a model for microtia and auricle duplication. *Development*. 2013:dev. 098046.
24. Rieder MJ, Green GE, Park SS, Stamper BD, Gordon CT, Johnson JM, et al. A human homeotic transformation resulting from mutations in *PLCB4* and *GNAI3* causes auriculocondylar syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;90(5):907-14.
25. Luise F. A systems biology approach to model the development of the mouse second branchial arch in mouse embryonic stem cells: University of Manchester; 2018.
26. Rosa FW, Wilk AL, Kelsey FO. Teratogen update: vitamin A congeners. *Teratology*. 1986;33(3):355-64.
27. Alasti F, Van Camp G. Genetics of microtia and associated syndromes. *Journal of medical genetics*. 2009;46(6):361-9.
28. Luquetti DV, Leoncini E, Mastroiacovo P. Microtia-anotia: a global review of prevalence rates. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2011;91(9):813-22.
29. Schloss MD. Congenital anomalies of the external auditory canal and the middle ear. Surgical management. *Congenital anomalies of the ear, nose, and throat New York*. 1997:119-24.
30. Shoman NM, Samy RN, Choo DI. Congenital Malformations of the Ear. *Congenital Malformations of the Head and Neck: Springer*; 2014. p. 23-66.
31. Qiao R, He Y, Pan B, Xiao S, Zhang X, Li J, et al. Understanding the molecular mechanisms of human microtia via a pig model of *HOXA1* syndrome. *Disease models & mechanisms*. 2015;8(6):611-22.
32. Gendron C, Schwentker A, van Aalst JA. Genetic Advances in the Understanding of Microtia. *Journal of pediatric genetics*. 2016;5(4):189-97.
33. Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Associated anomalies in cases with anotia and microtia 2016.
34. Li X, Hu J, Zhang J, Jin Q, Wang DM, Yu J, et al. Genome-wide linkage study suggests a susceptibility locus for isolated bilateral microtia on 4p15.32-4p16.2. *PloS one*. 2014;9(7):e101152.

35. Tracy JC, Lee AS, Scott AR, Karmody CS. Embryology and anomalies of the external ear. *Advanced Cosmetic Otoplasty*: Springer; 2013. p. 3-13.
36. Gorlin RJ, Cohen Jr MM, Hennekam RC. *Syndromes of the head and neck*: Oxford University Press; 2001.
37. Suzuki Y. Classification of shapes (auricle/external auditory canal). *Microtia and Atresia-Combined Approach by Plastic and Otologic Surgery*. 75: Karger Publishers; 2014. p. 10-2.
38. Tripathee S, Zhang J, Xiong M. Risk factors of microtia: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Plastic Surgery*. 2016;39(5):335-44.
39. González-Andrade F, López-Pulles R, Espín VH, Paz-y-Miño C. High altitude and microtia in Ecuadorian patients. *Journal of neonatal-perinatal medicine*. 2010;3(2):109-16.
40. Poswillo D. The pathogenesis of the first and second branchial arch syndrome. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*. 1973;35(3):302-28.
41. Brown KK, Viana LM, Helwig CC, Artunduaga MA, Quintanilla - Dieck L, Jarrin P, et al. HOXA 2 Haploinsufficiency in Dominant Bilateral Microtia and Hearing Loss. *Human mutation*. 2013;34(10):1347-51.
42. Luquetti DV, Heike CL, Hing AV, Cunningham ML, Cox TC. Microtia: epidemiology and genetics. *American journal of medical genetics Part A*. 2012;158A(1):124-39.
43. Katzbach R, Klaiber S, Nitsch S, Steffen A, Frenzel H. [Auricular reconstruction for severe microtia. Schedule of treatment, operative strategy, and modifications]. *Hno*. 2006;54(6):493-511; quiz 2-3.
44. Donaldson IJ, Amin S, Hensman JJ, Kutejova E, Rattray M, Lawrence N, et al. Genome-wide occupancy links Hoxa2 to Wnt- $\beta$ -catenin signaling in mouse embryonic development. *Nucleic acids research*. 2012;40(9):3990-4001.
45. Fuchs JC, Tucker AS. Development and Integration of the Ear. *Current topics in developmental biology*. 115: Elsevier; 2015. p. 213-32.
46. Torres L, Juárez U, García L, Miranda-Ríos J, Frias S. External ear microRNA expression profiles during mouse development. *International Journal of Developmental Biology*. 2016;59(10-11-12):497-503.
47. Turner EE, Cox TC. Genetic evidence for conserved non-coding element function across species—the ears have it. *Frontiers in physiology*. 2014;5:7.
48. Rosin JM, Li W, Cox LL, Rolfe SM, Latorre V, Akiyama JA, et al. A distal 594 bp ECR specifies Hmx1 expression in pinna and lateral facial morphogenesis and is regulated by the Hox-Pbx-Meis complex. *Development*. 2016;143(14):2582-92.
49. Romand R, Varela-Nieto I. *Development of auditory and vestibular systems*: Academic Press; 2014.
50. Cohen JM, Rollnick B, Kaye C. Oculoauriculovertebral spectrum: an updated critique. *The Cleft palate journal*. 1989;26(4):276-86.
51. Hennekam R, Allanson J, Krantz I. *Gorlin's Syndromes of the Head and Neck (Oxford Monographs on Medical Genetics)*. Genetics. 2010;1000:32976.
52. George RJ, Sam ST. Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum (OAVS): An Overview. *International Journal of Nursing Education and Research*. 2016;4(2):217-22.



53. Barisic I, Odak L, Loane M, Garne E, Wellesley D, Calzolari E, et al. Prevalence, prenatal diagnosis and clinical features of oculo-auriculo-vertebral spectrum: a registry-based study in Europe. *European journal of human genetics*. 2014;22(8):1026.
54. Birgfeld CB, Heike CL, Saltzman BS, Leroux BG, Evans KN, Luquetti DV. Reliable classification of facial phenotypic variation in craniofacial microsomia: a comparison of physical exam and photographs. *Head & face medicine*. 2016;12(1):14.
55. Bogusiak K, Puch A, Arkuszewski P. Goldenhar syndrome: current perspectives. *World Journal of Pediatrics*. 2017;13(5):405-15.
56. Ishimoto S-i, Ito K, Yamasoba T, Kondo K, Karino S, Takegoshi H, et al. Correlation between microtia and temporal bone malformation evaluated using grading systems. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2005;131(4):326-9.
57. Sinha S, Singh AK, Mehra A, Singh R. Goldenhar Syndrome–A. *JSM*. 2015;3(1):1052.
58. Rosa RFM, da Silva AP, Goetze TB, de Almeida Bier B, de Almeida ST, Paskulin GA, et al. Ear abnormalities in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum (Goldenhar syndrome). *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2011;77(4):455-60.
59. Walker BA, Saltzman BS, Herlihy EP, Luquetti DV. Phenotypic characterization of epibulbar dermoids. *International ophthalmology*. 2017;37(3):499-505.
60. Renkema R, Caron C, Mathijssen I, Wolvius E, Dunaway D, Forrest C, et al. Vertebral anomalies in craniofacial microsomia: a systematic review. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2017;46(10):1319-29.
61. Vendramini S, Richieri-Costa A, Guion-Almeida ML. Oculoauriculovertebral spectrum with radial defects: a new syndrome or an extension of the oculoauriculovertebral spectrum? Report of fourteen Brazilian cases and review of the literature. *European Journal of Human Genetics*. 2007;15(4):411.
62. Renkema R, Caron C, Wolvius E, Dunaway D, Forrest C, Padwa BL, et al. Central nervous system anomalies in craniofacial microsomia: a systematic review. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2017.
63. Murialdo G, Piazzzi A, Badolati G, Calcagno E, Berio A. Oculo-auriculo-vertebral spectrum with myopathy and velopharyngeal insufficiency. A case report with a non-branchiomic muscle biopsy. *La Pediatria Medica e Chirurgica*. 2016;38(2).
64. Passos-Bueno MR, Ornelas CC, Fanganiello RD. Syndromes of the first and second pharyngeal arches: A review. *American journal of medical genetics Part A*. 2009;149A(8):1853-9.
65. Wang R, Martínez-Frías ML, Graham Jr JM. Infants of diabetic mothers are at increased risk for the oculo-auriculo-vertebral sequence: a case-based and case-control approach. *The Journal of pediatrics*. 2002;141(5):611-7.
66. Lawson K, Waterhouse N, Gault DT, Ng R, Calvert ML. Is hemifacial microsomia linked to multiple maternities? *British journal of plastic surgery*. 2002;55(6):474-8.

67. Balci S, Engiz O, Alikasifoglu M, Esinler I, Beksac MS. Association of assisted reproductive technology with twinning and congenital anomalies. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2008;75(6):638.
68. Farra C, Yunis K, Yazbeck N, Majdalani M, Charafeddine L, Wakim R, et al. A Lebanese family with autosomal recessive oculo-auriculo-vertebral (OAV) spectrum and review of the literature: is OAV a genetically heterogeneous disorder? *The application of clinical genetics*. 2011;4:93-7.
69. Muñoz-Pedroza LA, Arenas-Sordo ML. Clinical features of 149 patients with facio-auriculo-vertebral spectrum. *Acta Otorrinolaringologica (English Edition)*. 2013;64(5):359-62.
70. Beleza-Meireles A, Clayton-Smith J, Saraiva JM, Tassabehji M. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: a review of the literature and genetic update. *Journal of medical genetics*. 2014:jmedgenet-2014-102476.
71. Fischer S, Lüdecke H-J, Wiczorek D, Böhringer S, Gillissen-Kaesbach G, Horsthemke B. Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of BAPX1 in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Human molecular genetics*. 2006;15(4):581-7.
72. PICECI S. Study of molecular basis of Oculo-Auriculo-Vertebral-Spectrum. 2017.
73. Rooryck C, Souakri N, Cailley D, Bouron J, Goizet C, Delrue MA, et al. Array - CGH analysis of a cohort of 86 patients with oculoauriculovertebral spectrum. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152(8):1984-9.
74. Bragagnolo S, Colovati ME, Souza MZ, Dantas AG, F de Soares MF, Melaragno MI, et al. Clinical and cytogenomic findings in OAV spectrum. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2018;176(3):638-48.
75. Guida V, Sinibaldi L, Pagnoni M, Bernardini L, Loddo S, Margiotti K, et al. A de novo proximal 3q29 chromosome microduplication in a patient with oculo auriculo vertebral spectrum. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015;167(4):797-801.
76. Quintero - Rivera F, Martinez - Agosto JA. Hemifacial microsomia in cat - eye syndrome: 22q11. 1-q11. 21 as candidate loci for facial symmetry. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013;161(8):1985-91.
77. Heike CL, Stueckle LP, Stuhauug ET, Pimenta LA, Drake AF, Vivaldi D, et al. Photographic protocol for image acquisition in craniofacial microsomia. *Head & face medicine*. 2011;7(1):25.
78. Hennersdorf F, Friese N, Löwenheim H, Tropitzsch A, Ernemann U, Bisdas S. Temporal bone changes in patients with Goldenhar syndrome with special emphasis on inner ear abnormalities. *Otology & Neurotology*. 2014;35(5):826-30.
79. Brotto D, Manara R, Vio S, Ghiselli S, Cantone E, Mardari R, et al. Salivary glands abnormalities in oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Clinical oral investigations*. 2018;22(1):395-400.
80. Strömmland K, Miller M, Sjögreen L, Johansson M, Joelsson BME, Billstedt E, et al. Oculo - auriculo - vertebral spectrum: Associated anomalies, functional deficits and possible developmental risk factors. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2007;143(12):1317-25.

81. Jobanputra V, Chung WK, Hacker AM, Emanuel BS, Warburton D. A unique case of der (11) t (11; 22), - 22 arising from 3: 1 segregation of a maternal t (11; 22) in a family with co - segregation of the translocation and breast cancer. *Prenatal diagnosis*. 2005;25(8):683-6.
82. Graham T, Boissinot S. The genomic distribution of L1 elements: the role of insertion bias and natural selection. *BioMed research international*. 2006;2006.
83. Loda A, Brandsma JH, Vassilev I, Servant N, Loos F, Amirnasr A, et al. Genetic and epigenetic features direct differential efficiency of Xist-mediated silencing at X-chromosomal and autosomal locations. *Nature communications*. 2017;8(1):690.
84. Bouman A, van der Kevie - Kersemaekers AM, Huijsdens - van Amsterdam K, Dahhan N, Knecht L, Vansenne F, et al. Trisomy 4 mosaicism: Delineation of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2016;170(4):1040-5.
85. Wiczorek D, Prott EC, Robinson WP, Passarge E, Gillissen - Kaesbach G. Prenatally detected trisomy 4 and 6 mosaicism—cytogenetic results and clinical phenotype. *Prenatal diagnosis*. 2003;23(2):128-33.
86. Carrascosa MR, García OM, Cabezas MT, González JP, editors. Partial duplication of chromosome 4q (q31, q35): auriculo-acro-renal syndrome. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain: 2003)*; 2008.
87. Brady AN, May KM, Fernhoff PM. Mosaic trisomy 4: Long - term outcome on the first reported liveborn. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2005;132(4):411-3.
88. Zhang Y-B, Hu J, Zhang J, Zhou X, Li X, Gu C, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for craniofacial microsomia. *Nature communications*. 2016;7:10605.
89. Wang P, Fan X, Wang Y, Fan Y, Liu Y, Zhang S, et al. Target sequencing of 307 deafness genes identifies candidate genes implicated in microtia. *Oncotarget*. 2017;8(38):63324.
90. Funato N, Kokubo H, Nakamura M, Yanagisawa H, Saga Y. Specification of jaw identity by the Hand2 transcription factor. *Scientific reports*. 2016;6:28405.
91. Yuen RK, Avila L, Peñaherrera MS, von Dadelszen P, Lefebvre L, Kobor MS, et al. Human placental-specific epipolymorphism and its association with adverse pregnancy outcomes. *PloS one*. 2009;4(10):e7389.
92. Yan B, Neilson KM, Ranganathan R, Maynard T, Streit A, Moody SA. Microarray identification of novel genes downstream of Six1, a critical factor in cranial placode, somite, and kidney development. *Developmental Dynamics*. 2015;244(2):181-210.
93. Jones B. Genome organization: Disorder—from chromatin to limb development. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16(7):378.
94. Camci E, Cox T, editors. DELETION OF AN EVOLUTIONARILY CONSERVED CHROMATIN INSULATOR ELEMENT ASSOCIATED WITH ELEVATED RETINOID SIGNALING AS THE GENETIC BASIS FOR AN OAVS-LIKE PRESENTATION IN MICE. *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART A*; 2018: WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA.

95. Laugsch M, Bartusel M, Alirzayeva H, Karaolidou A, Rehim R, Crispatzu G, et al. DISRUPTION OF THE TFAP2A REGULATORY DOMAIN CAUSES BRANCHIO-OCULO-FACIAL SYNDROME (BOFS) AND ILLUMINATES PATHOMECHANISMS FOR OTHER HUMAN NEUROCRISTOPATHIES.
96. Fujitani M, Zhang S, Fujiki R, Fujihara Y, Yamashita T. A chromosome 16p13. 11 microduplication causes hyperactivity through dysregulation of miR-484/protocadherin-19 signaling. *Molecular psychiatry*. 2017;22(3):364.
97. Loureiro S, Almeida J, Café C, Conceição I, Mouga S, Beleza A, et al. Copy number variations in chromosome 16p13. 11-The neurodevelopmental clinical spectrum. *Current Pediatric Research*. 2017;21(1).
98. Benitez-Burraco A, Barcos-Martinez M, Espejo-Portero I, Jiménez-Romero S. Variable penetrance of the 15q11. 2 BP1-BP2 microduplication in a family with cognitive and language impairment. *Molecular syndromology*. 2017;8(3):139-47.
99. Urraca N, Hope K, Victor AK, Belgard TG, Memon R, Goorha S, et al. Significant transcriptional changes in 15q duplication but not Angelman syndrome deletion stem cell-derived neurons. *Molecular autism*. 2018;9(1):6.
100. Komiyama M. Cardio-cephalic neural crest syndrome: A novel hypothesis of vascular neurocristopathy. *Interventional Neuroradiology*. 2017;23(6):572-6.
101. Luquetti DV, Hing AV, Rieder MJ, Nickerson DA, Turner EH, Smith J, et al. "Mandibulofacial dysostosis with microcephaly" caused by EFTUD2 mutations: expanding the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2013;161(1):108-13.
102. Rengasamy Venugopalan S, Farrow E, Lypka M. Whole - exome sequencing identified a variant in EFTUD 2 gene in establishing a genetic diagnosis. *Orthodontics & craniofacial research*. 2017;20:50-6.
103. Huang L, Vanstone MR, Hartley T, Osmond M, Barrowman N, Allanson J, et al. Mandibulofacial dysostosis with microcephaly: mutation and database update. *Human mutation*. 2016;37(2):148-54.
104. Wiczorek D, Shaw - Smith C, Kohlhase J, Schmitt W, Buiting K, Coffey A, et al. Esophageal atresia, hypoplasia of zygomatic complex, microcephaly, cup - shaped ears, congenital heart defect, and mental retardation—New MCA/MR syndrome in two affected sibs and a mildly affected mother? *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2007;143(11):1135-42.

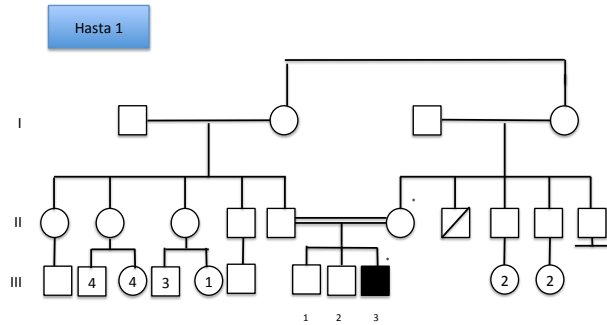
## 8. EKLER

## EK-1. Literatürde kulak fenotipleri ile ilişkilendirilmiş genler

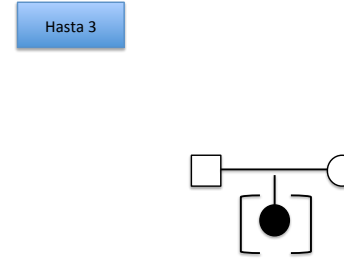
A2ML1	CACNA1C	DFNA5	FLRT2	HYLS1	MED11	OPRL1	RAF1	SYNE4
ABCA12	CACNA1D	DFNB31	FMR1	ICK	MED12	ORC1	RAG1	SYNJ2
ABCB1	CACNG2	DFNB59	FOLR1	IDUA	MEGF8	ORC4	RARA	TAZ
ABCD3	CALCB	DHCR24	FOS	IFT88	MEOX1	ORC6	RB1	TBC1D20
ABHD12	CAMTA1	DHODH	FOXC2	IGBP1	METTTL24	OSR2	RBBP8	TBL2
ABHD5	CASK	DIO2	FOXG1	IGF1	MGAT2	OTOA	RBM10	TBX1
ACAN	CASP3	DIS3L2	FOXI1	IGF1R	MGP	OTOF	RDH10	TBX10
ACD	CBL	DLX1	FOXI3	IL17RD	MID2	OTOG	RDX	TBX15
ACHE	CBY1	DLX2	FOXL2	IL1RAPL1	MIR96	OTOP1	RERE	TBX22
ACSL4	CCDC33	DLX5	FOXN1	IL22	MITF	OTOS	RFC2	TCF15
ACTB	CCDC8	DLX6	FOXP2	ILDR1	MKKS	OTX1	RGN	TCF4
ACTG1	CD96	DMD	FOXP3	INSR	MKS1	OTX2	RIPK4	TCOF1
ADAMTSL2	CDC6	DNAH5	FRAS1	IREB2	MMACHC	OVOL2	RIT1	TCNT3
ADGRB1	CDH23	DNAJC5	FREM2	IRF6	MMP14	PAK3	RMRP	TECTA
ADGRV1	CDKN1B	DNM1	FSCN2	IRS1	MPLKIP	PARP1	RND3	TECTB
AFF3	CDKN2D	DOCK6	FUZ	ISL1	MPST	PAX1	RNU4ATAC	TFAP2A
AGAP1	CDO1	DOCK7	FZD4	ISPD	MPV17	PAX2	ROBO1	TFAP2B
AGTPBP1	CDT1	DPCD	GABRA5	ITGA8	MSRB3	PAX3	ROR2	TGFB2
AHDC1	CEACAM16	DPP6	GABRB2	IRX5	MSX1	PAX6	RPL27A	TGIF1
AHR	CELSR1	DSE	GABRB3	JAG1	MSX2	PAX8	RPL38	TGM1
ALDH18A1	CENPJ	DUOX2	GALC	JAG2	MT-ND4	PAX9	RPS6KA3	THRA
ALDH1A2	CEP152	DUSP6	GAS1	JAK1	MT-ND5	PBX1	RSP02	THRB
ALG10	CHD7	DVL3	GATA1	KANSL1	MT-ND6	PCDH15	S1PR2	TMC1
ALG3	CHRD	E2F4	GATA3	KAT6B	MT-TF	PCNT	SALL1	TMC2
ALMS1	CHRNA1	EBP	GBA	KCNA1	MT-TH	PDZD7	SALL4	TMEM5
ALOX12B	CHRNA10	ECE1	GBX2	KCNA10	MT-TL1	PEX1	SCARB2	TMIE
AMER1	CHRNA7	EDARADD	GDF6	KCNJ1	MT-TQ	PEX3	SCARF2	TMPRSS3
ANKH	CHRNA9	EDN1	GF11	KCNJ10	MT-TS1	PEX5	SCN8A	TNFRSF11B
ANKRD11	CHRND	EDNRA	GIPC3	KCNMA1	MT-TS2	PGAP1	SCRIB	TNNI2
ANP32B	CHRNE	EDNRB	GJA1	KCNQ1	MT-TW	PHEX	SDF1	TNNT3
ANTXR1	CHST14	EFEMP2	GJB3	KCNQ4	MTHFR	PHF20	SEC24B	TP63
AP3B1	CHST3	EFNB1	GJB4	KCTD1	MUC5B	PHF6	SEL1L	TP73
AP3B2	CHUK	EFNB2	GJB6	KDF1	MYD88	PHGDH	SEMA3E	TPM2
AP3D1	CIB2	<i>EFTUD2</i>	GJC3	KDM5C	MYH3	PIAS2	SEMA7A	TPO
AP4E1	CISD2	EGFR	GLI2	KDM6A	MYH9	PIEZO2	SETBP1	TRAM2
APAF1	CKMT1A	EHMT1	GLI3	KIF11	MYO15A	PIGA	SFN	TRIOBP
APOE	CLCF1	EIF3C	GNA11	KIF1BP	MYO1C	PIGL	SFSWAP	TRPA1
AQP4	CLDN11	EIF4A3	GNAI3	KIF27	MYO3A	PIGN	SH3PXD2B	TRPS1
ARSA	CLDN14	ELMOD1	GNAQ	KIF7	MYO5A	PIK3CA	SHANK3	TRPV4
ARSB	CLDN9	ELN	GNAS	KIT	MYO6	PIK3R1	SHH	TSHR
<i>ARVCF</i>	CLEC16A	EMX2	GP1BB	KITLG	MYO7A	PITPNM1	SHOC2	TSHZ1
ARX	CLIC2	ENPP1	GPC3	KLC2	NAA10	PITX1	SHROOM3	TSPAN12
ASIC2	CLIC5	EPAS1	GPC4	KLF12	NABP2	PKHD1	SIM1	TTC37
ASIC3	CLIP2	EPHB2	GPX1	KLHL18	NAGLU	PLA2G3	SIRT1	TTI2
ASNS	CLRN1	EPS8	GRB2	KMT2A	NALCN	PLAU	<i>SIX1</i>	TTLL1
ATF2	COCH	EPS8L1	GRID1	KMT2D	NBN	PLCB4	<i>SIX6</i>	TUB
ATG4B	COL11A1	EPS8L2	GRID2	KRAS	NCOA3	PLCD3	SKI	TUBGCP6
ATG5	COL11A2	ERCC6	GRIP1	KRT10	ND1	PLEC	SLC12A2	TWIST1
ATOH1	COL1A1	ERCC8	GRXCR1	KRT2	NDE1	PLOD3	SLC12A6	TWIST2
ATP2B2	COL2A1	ERF	GSC	LAMA2	NDP	PMM2	SLC12A7	TWSG1
ATP6V0A4	COL3A1	ESCO2	GTF2A1	LAMC2	NDST1	PMP22	SLC16A2	TYRP1
ATP7A	COL4A1	ESPN	GTF2I	LARGE	NF1	POC1A	SLC17A5	UBA1
ATP8A2	COL4A3	ESR2	GTF2IRD1	LHFPL2	NFIX	POLG	SLC17A8	UBE3B
ATP8B1	COL4A4	ETFA	GUSB	LHFPL5	NFKB1	POLH	SLC19A2	UCN
ATR	COL5A1	ETFB	HAND2	LIG4	NGFR	POMGNT1	SLC1A3	UFDIL
ATRIP	COL5A2	ETFDH	HAPLN1	LIMK1	NHS	POMGNT2	SLC24A5	ULK4
ATRX	COL6A1	EVC	HBA1	LIPN	NIN	POMK	SLC25A21	UPF3B
AXIN1	COL6A2	EVC2	HBA2	LMBRD1	NIPAL4	POMT1	SLC26A2	USH1C
B3GALNT2	COL6A3	EXT1	HCCS	LMNA	NIPBL	POMT2	SLC26A4	USH1G
B3GALTL	COL9A1	EYA1	HCN2	LMO4	NKX3-2	POR	SLC26A5	USH2A
B3GAT3	COMT	EYA4	HDAC8	LMX1A	NOG	PORCN	SLC2A10	VANGL1

B3GNT1	COX1	EZH2	HES1	LOC102723475	NOS1AP	POU3F3	SLC30A4	VANGL2
B4GALT7	COX2	FAM107B	HES5	LOXHD1	NOTCH1	POU3F4	SLC4A11	VDR
BAPX1	COX3	FAM111A	HESX1	LRIG1	NOTCH2	POU4F3	SLC4A2	VPS13B
BARHL1	COX7B	FAM20C	HFM	LRIG2	NOTCH3	PQBP1	SLC4A7	VRK1
BAZ1B	CPLX1	FAS	HGD	LRIG3	NOX3	PRKRA	SLC6A8	WDPCP
BBS1	CPT2	FAT4	HHAT	LRP2	NOXO1	PRRX1	SLC9A6	WDR1
BBS4	CREBBP	FBLN1	HIC1	LRP4	NPR3	PSAP	SLITRK6	WDR19
BCL2	CRKL	FBN1	HIRA	LRP6	NPTN	PSAT1	SMAD4	WDR35
BDNF	CS	FBN2	HMGA2	LRRC4	NR2F1	PSMB8	SMC1A	WDC1
BHLHA9	CSF1	FBXL4	HMGB3	LRTOMT	NR4A3	PSTPIP2	SMC3	WNT1
BIRIC	CSF1R	FBXO11	HMX1	LYST	NRAS	PTCH1	SMS	WNT5A
BLM	CSK	FBXO2	HMX2	MAFB	NRP2	PTDSS1	SNAP25	WNT5B
BLOC1S3	CSNK2A1	FGD1	HMX3	MAN2B1	NSD1	PTEN	SNAP29	WNT7A
BLOC1S5	CTNNA2	FGF10	<i>HOXA1</i>	MAP1A	NSUN2	PTF1A	SOBP	ZBTB18
BLOC1S6	CTNNB1	FGF20	<i>HOXA2</i>	MAP2K1	NTN1	PTK7	SOD1	ZBTB20
BMP1	CTSV	FGF3	HOXA5	MAP2K2	NTNG2	PTN	SOS1	ZCCHC14
BMP2	CUL7	FGF9	HOXB2	MARVELD2	NTRK2	PTPN11	SOX2	ZDHHC9
BMP4	CXCL12	FGFR1	HPN	MBD5	NTRK3	PTPRQ	SPNS2	ZEB1
BMP5	CYBA	FGFR2	HPS1	MBP	OBSL1	PVRL1	SPRY2	ZEB2
BMP7	CYP19A1	FGFR3	HPS4	MBTPS2	OC90	PYCR1	SPTBN1	ZIC2
BMPER	CYP4F22	FIG4	HPS5	MC1R	OCA2	QKI	SPTBN4	ZIC3
BRAF	CYS1	FIGN	HPS6	MCOLN3	OCLN	RAB18	SRRM4	ZMPSTE24
BRWD3	DCAF17	FKRP	HR	MCPH1	OCM	RAB23	STK36	ZNF24
BSN	DCHS1	FKTN	HRAS	MDK	OCRL	RAB3GAP1	STON2	ZNF81
C12ORF57	DDR1	FLG	HSPG2	MECOM	OGFOD3	RAB3GAP2	STRC	
CA8	DDX11	FLNA	HTT	MECP2	OPHN1	RAD21	SUN1	

## EK-2. Hastaların pedigrileri ve detaylı klinik bulguları

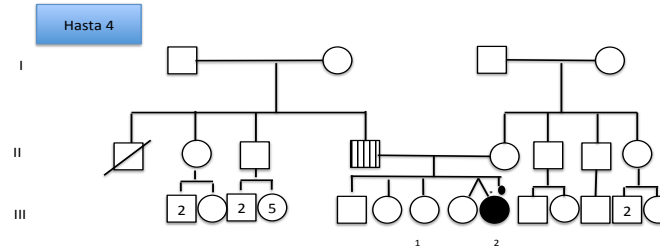
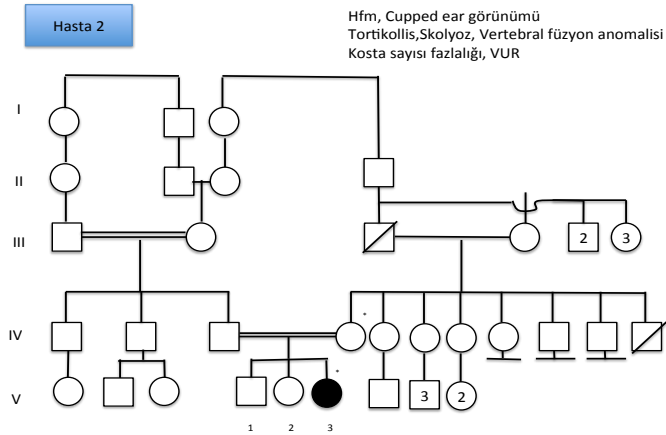


Hfm, Mikrotia, DKY atrezisi, Skin tag, Yarık damak, İşitme kaybı  
Epibulbar dermoid, Mikroftalmi, orta kulak yapılarında agenezi  
Kohlear inkomplet partisyon tip 2, Aberran fasiyal kanal, parotis agenezisi  
Epibulbar dermoid, Mandibular ramus yokluğu  
VSD, PS, Vertebral füzyon defekti



15q11.2 duplikasyonu

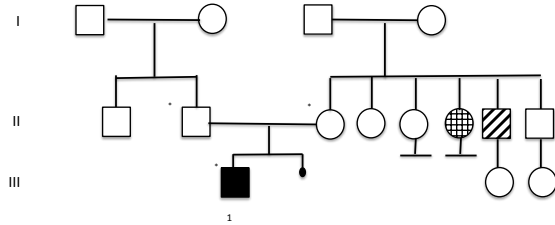
Hfm, Skin tag, Epibulbar dermoid, Mikroftalmi, Ptozis  
Skolyoz, Vertebral füzyon anomalisi



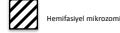
Skin Tag

Hfm, Skin tag, Makrostomi  
Epibulbar dermoid  
İşitme kaybı  
Duane sendromu  
Bifid odontoid çıkıntı

Hasta 5



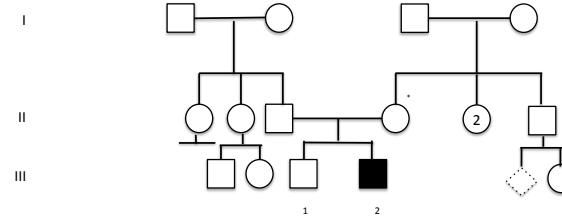
Mikrotia



Hemisayyel mikroozomi

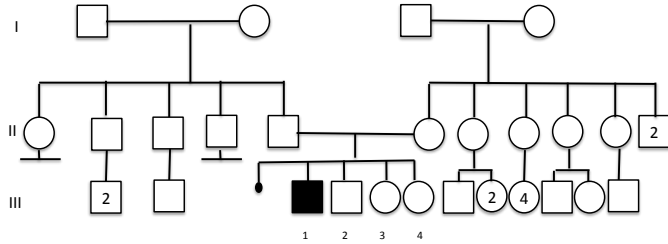
Hfm, Mikrotia, DKY atrezi, İşitme kaybı  
Lagoftalmus, blefarofimozis  
Tortikollis

Hasta 7



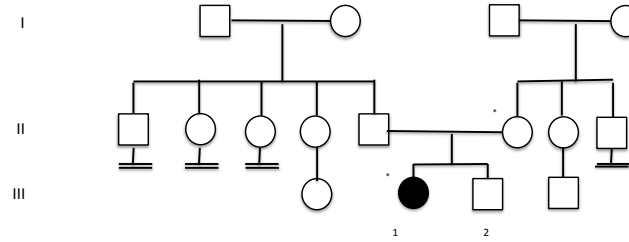
Hfm, Skin tag, İşitme kaybı, Epibulbar dermoid  
Bilateral internal akustik kanal yokluğu, kohlear hipoplazi  
ASD, VSD, Kelebek vertebra, skolyoz  
DEHB

Hasta 6



Hfm, Anotia, DKY atrezisi, Skin tag  
Epibulbar dermoid, Mandibular kondil yokluğu  
Zigomatik arkus hipoplazisi, orta kulak kemikçikleri agenezisi

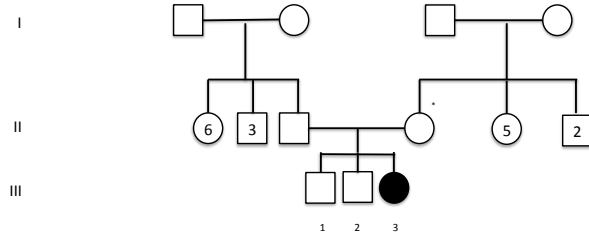
Hasta 8



Mikrotia, Hfm, Skin tag, DKY atrezi  
İşitme kaybı, mandibular hipoplazi, makrostomi  
Epibulbar dermoid, Tesier no 7 cleft, displastik orta kulak  
kemikçikleri, Zigomatik arkus hipoplazisi, Kondil anormal yerleşimi  
Sek. ASD

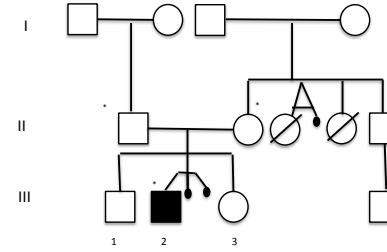


Hasta 9



Hfm, Skin tag, DKY atrezisi  
Mandibuler ve maksiller hipoplazi  
İşitme kaybı, displastik orta kulak kemikçikleri  
MY, Hemivertebra, skolyoz

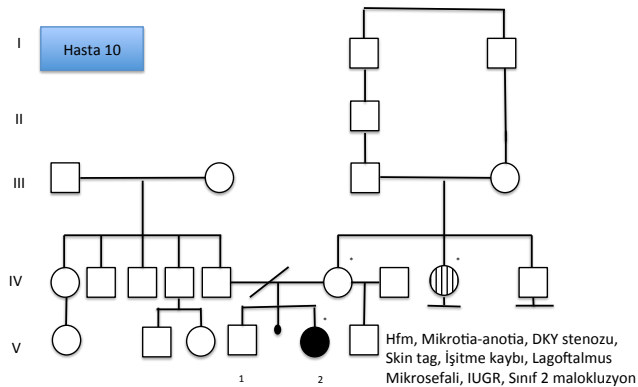
Hasta 11



8p22.3 delesyonu

Hfm, Bilateral düşük yerleşimli kulaklar  
DKY stenozu, Skin Tag  
Yarı damak  
İşitme kaybı  
Dekstropozisyon, PFO  
Zihinsel yetmezlik

Hasta 10

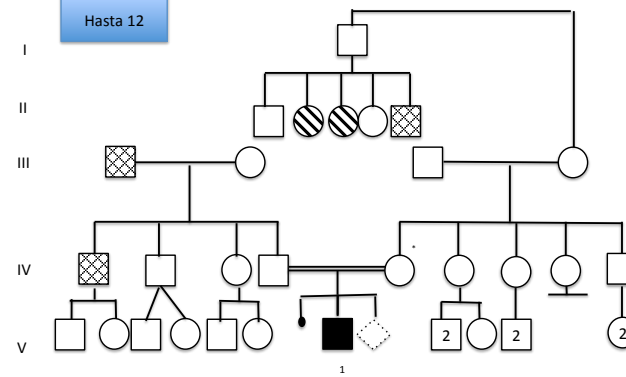


Hfm, Mikrotia-anotia, DKY stenozu,  
Skin tag, İşitme kaybı, Lagofthalmus  
Mikrocefali, IUGR, Sınıf 2 malokluzyon  
Baş parmak hipoplazisi  
Trakeal darlık, sek. ASD, PDA  
Renal agenezi  
Stereotipik hareketler

Skin Tag

47,XX,+der(X;4)(q12;p15.1)

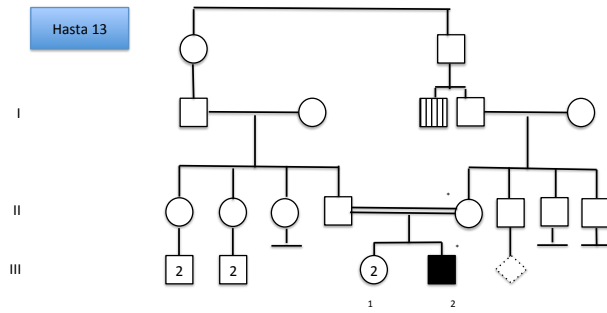
Hasta 12



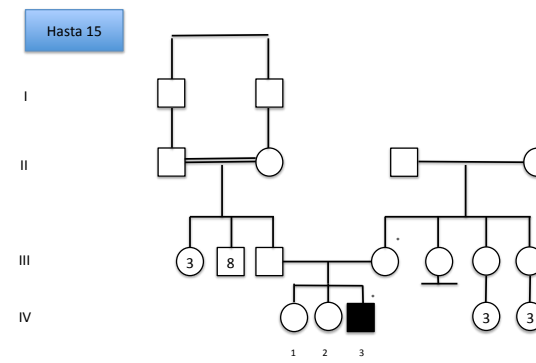
Mikrotia, işitme kaybı

İşitme kaybı

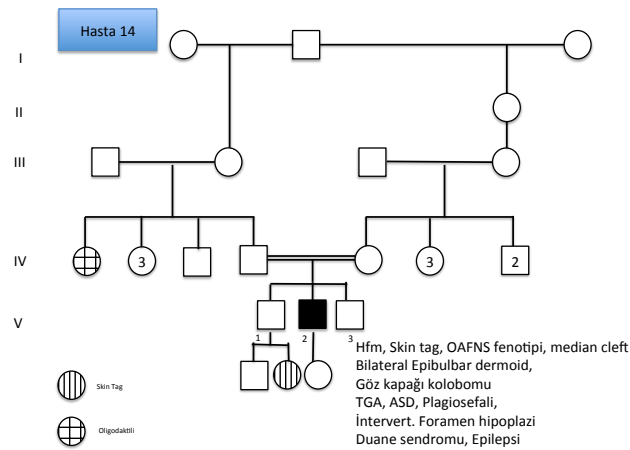
Hfm, Heliks anomalisi, DKY stenozu, İşitme kaybı,  
MVP, Vertebral füzyon anomalisi  
DEHB, Epilepsi



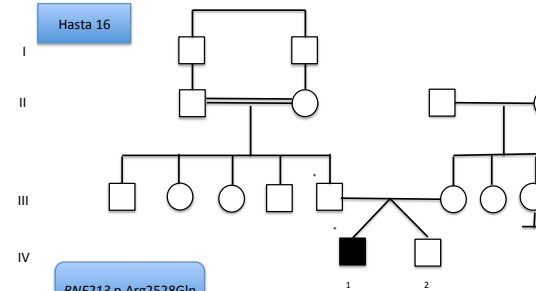
Hfm, Anotia-mikrotia, Skin tag, DKY stenozu  
Fasiyal paralizi, lagoftalmus, ASD



Hfm, Mikrotia, DKY stenozu, İşitme kaybı  
Malar hipoplazi, ptozis  
PS, AK, Vertebral füzyon anomalisi

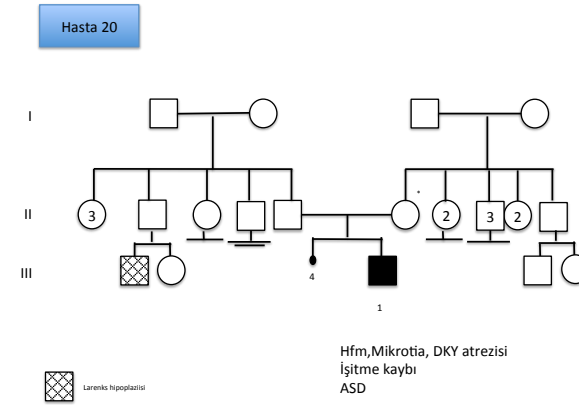
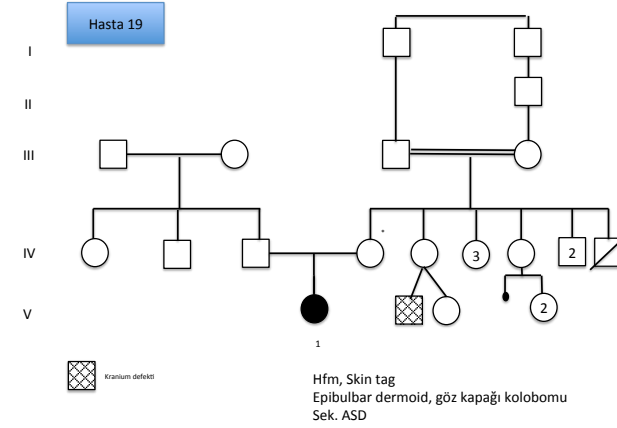
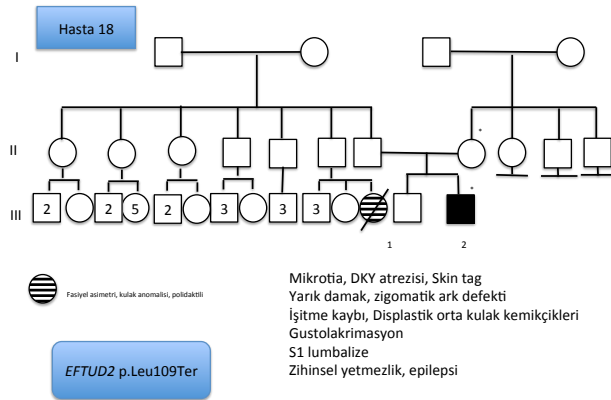
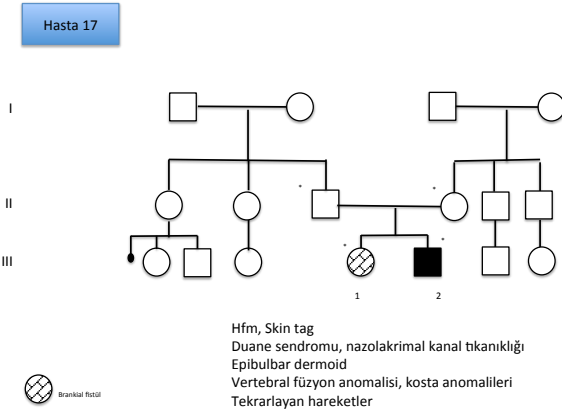


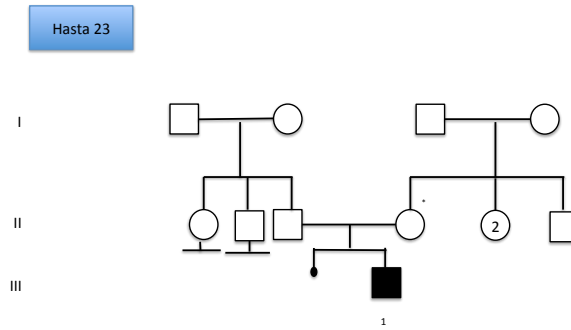
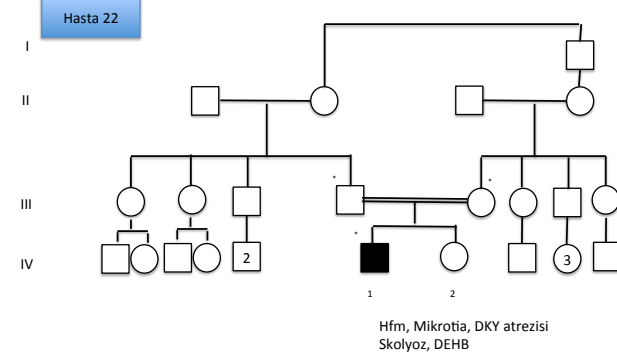
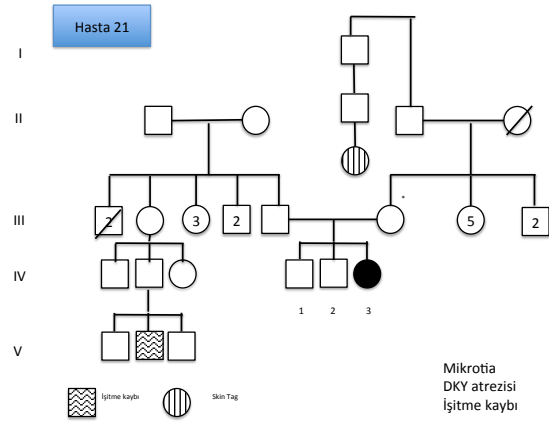
Hfm, Skin tag, OAFNS fenotipi, median cleft  
Bilateral Epibulbar dermoid,  
Göz kapağı kolobomu  
TGA, ASD, Plagiosefali,  
Intervert. Foramen hipoplazi  
Duane sendromu, Epilepsi



**RNF213 p.Arg2528Gln**

Hfm, Mikrotia, DKY stenozu, Skin tag, Pit, İşitme kaybı  
Epibulbar dermoid, Mikroftalmi, İris kolobomu  
Nazolakrimal kanal agenezisi, Mandibular hipoplazi, TME kondil yokluğu  
Vertebral füzyon defekti, Hemivertebra, kosta hipoplazisi, MY





**16p13.11  
duplikasyonu**