T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRENATAL DÖNEMDE 1. VE 2. TRİMESTER ENSE KALINLIĞI ARTIŞINDA RASOPATİ İLİŞKİLİ GENETİK VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

ÇİSEM MAİL

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan GÜRKAN

EDİRNE-2023

Çisem MAİL'in hazırladığı "**PRENATAL DÖNEMDE 1. VE 2. TRİMESTER ENSE KALINLIĞI ARTIŞINDA RASOPATİ İLİŞKİLİ GENETİK VARYASYONLARIN ARAŞTIRILMASI**" başlıklı tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Hakan GÜRKAN	.....
Doç. Dr. Jülide TOZKIR	.....
Dr. Öğr. Üyesi Hayati ARDA	.....
Prof. Dr. Fatma SILAN	.....
Prof. Dr. Birsen KARAMAN	.....

Tez Savunma Tarihi: 20/01/23

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Pof. Dr. Hakan GÜRKAN

Tez Danışmanı .....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

20/01/2023

Çisem MAİL

Doktora Tezi
Prenatal Dönemde 1. ve 2. Trimester Ense Kalınlığı Artışında RASopati İlişkili Genetik Varyasyonların Araştırılması
Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Ras/mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağında görev alan ya da düzenleyen genlerde meydana gelen germline patojenik varyasyonların neden olduğu, klinik olarak tanımlanmış genetik sendromlar grubuna RASopatiler denir. Noonan Sendromu, Costella Sendromu, Nörofibromatozis tip 1, Kardiyofasyokutanöz Sendrom, Çoklu lentijinli Noonan Sendromu (eski adıyla LEOPARD Sendromu) ve Legius Sendromu bu grupta yer almaktadır. RASopatilerin prenatal tanısı fetuslarda spesifik bulguların olmaması ve ekspresivitede farklılık göstermesi nedeniyle zordur. Prenatal bulgu olarak hidrops fetalis, asit veya torasik efüzyonlar, hipertrofik kardiyomiyopati, polihidramnios, böbrek anomalileri bildirilmekle birlikte en sık ense kalınlığında artış (NT), nukal fold (NF) artışı, kistik higroma (KH) bulguları ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızda prenatal dönemde 1. ve 2. trimester NT artışında RASopati ilişkili genetik varyasyonların araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla 1. ve 2. trimesterde NT artışı ve/veya kistik higroma saptanan, rutin olarak yapılan hızlı test, kromozom analizi ve arrayCGH analizleri sonucunda patojenite saptanmayan fetuslarda RASopatiler ile ilişkili 18 gen (*BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1, MAP2K21, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RASA2, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1)* yeni nesil dizi analizi (NGS) yöntemi ile dizilenmiştir.

Çalışmamızda NT artışı ve/veya KH saptanan ve girişimsel işlem uygulanan 113 gebe değerlendirildi. Girişimsel işlem sonrası rutin olarak yapılan hızlı test (FISH), kromozom analizi, arrayCGH analizlerinde patojenite saptanmayan 75 fetus çalışmaya

dahil edildi. Çalışma sonucunda 3 fetusda patojenik varyant, 5 fetusda klinik önemi bilinmeyen (VUS) varyant saptandı.

Çalışmamızda tanı katkı oranları değerlendirildiğinde; hızlı test ve kromozom analizi %30, arrayCGH analizi %4 ve RASopati ile ilişkili genlerin değerlendirilmesinin %4 oranında tanıya katkı sağladığı saptandı. Çalışmamızda arrayCGH analizi ile RASopati ilişkili genlerin değerlendirilmesinin tanıya eşit oranda katkı sağlaması RASopatiler ile ilişkili genlerin değerlendirilmesinin önemini gösterir niteliktedir.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 130

Anahtar Kelimeler : Prenatal Tanı, RASopati, Ense Kalınlığında Artış, Kistik Higroma, Nuchal Fold Artışı, Yeni Nesil Dizi Analizi

Doctorate Thesis
Investigation of Genetic Variations Associated with RASopathy in Increased Nuchal Translucency During 1st and 2nd Trimester of Prenatal Period
Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences
Departmant of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

RASopathies are a group of clinically defined genetic syndromes caused by germline pathogenic variations in the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Noonan Syndrome, Costella Syndrome, Neurofibromatosis type 1, Cardiofasciocutaneous Syndrome, Noonan Syndrome with Multiple Lentigines (formerly LEOPARD Syndrome) and Legius Syndrome are included in this group. Prenatal diagnosis of RASopathies is difficult due to the lack of specific findings in fetuses and differences in expression. Although hydrops fetalis, ascites or thoracic effusions, hypertrophic cardiomyopathy, polyhydramnios, and renal anomalies have been reported as prenatal findings, most frequently associated findings are increased nuchal translucency (NT), cystic hygroma (CH) and increased nuchal fold (NF).

The aim of our study is to investigate genetic variations associated with RASopathy in increased nuchal translucency during 1st and 2nd trimester of prenatal period. For this purpose, 18 genes associated with RASopathies (*BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1, MAP2K21, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RASA2, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1*) were sequenced by new generation sequencing (NGS).

In our study, 113 pregnant women who had increased NT and/or CH and underwent invasive procedure were evaluated. Seventy-five fetuses with normal results in the rapid test (FISH), chromosome analysis and arrayCGH analysis, which were routinely performed after the invasive procedure, were included in the study. As a result

of the study, pathogenic variants were detected in three fetuses and variants of unknown clinical significance (VUS) were detected in five fetuses.

When the diagnostic contribution rates were evaluated in our study; It was determined that rapid test and chromosome analysis contributed 30%, arrayCGH analysis contributed 4%, whereas evaluation of genes associated with RASopathy contributed 4%. RASopathy related genes and arrayCGH analysis contributed equally to the diagnosis in our study, which indicates the importance of genetic analysis of the genes associated with RASopathy.

Year : 2023

Number of Pages : 130

Keywords : Prenatal Diagnosis, RASopathy, Increase Nuchal Translucency, Cystic Hygroma, Nuchal Fold Increase, Next Generation Sequence Analysis

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sürecinde bilgi ve emeği ile desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Hakan GÜRKAN'a,

Doktara tez sürecimde yorum ve katkıları ile desteklerini gösteren değerli tez izleme komitesi hocalarım; Doç. Dr. Jülide TOZKIR ve Dr. Öğr. Üyesi Hayati ARDA'ya

Her zaman yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Selma DEMİR, Doç. Dr. Emine İkbal ATLI ve Öğr. Gör. Dr. Engin ATLI'ya,

Tez çalışmam sürecinde olgularıma genetik danışmanlık veren, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tüm yaşamımda yanımda yer alan değerli hocam Doç. Dr. Sinem YALÇINTEPE'ye,

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Asistanlarına,

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan değerli annem, babam ve eşime desteklerinden dolayı en içten duygularımla teşekkür ederim.

Çisem MAİL

İÇİNDEKİLER

ÖZET....iv
ABSTRACT....vi
TEŞEKKÜR....viii
İÇİNDEKİLER....ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....xi
ŞEKİLLER DİZİNİ....xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ....xv
EKLER DİZİNİ....xvi
BÖLÜM 1....1
GİRİŞ ve AMAÇ....1
BÖLÜM 2....3
GENEL BİLGİLER....3
2.1. Prenatal Dönem....3
2.1.1 Gebelik Takibinde 1. Trimester....4
2.1.1.1. Ense Kalınlığı....6
2.1.1. 2. Birinci Trimesterde Uygulanan Girişimsel İşlemler....7
2.1.2. Gebelik Takibinde 2. Trimester....8
2.1.2.1. İkinci Trimester Ultrasonografi Değerlendirmesi....10
2.1.2.2. İkinci Trimesterde Uygulanan İnvaziv İşlemler....11
2.2. Prenatal Tanı....13
2.3. RASopatiler....15
2.3.1 RAS/mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal zinciri....17
2.3.2. Nörofibromatozis Tip 1....18

2.3.3. Noonan Sendromu 19
2.3.4. Costello Sendromu 25
2.3.5. Legius Sendromu 26
2.3.6. Kardiyofasyokutanöz Sendromu 26
2.3.7. Multiple Lentijinli Noonan Sendromu 28
2.4. Yeni Nesil Dizi Analizi Yöntemi 30
2.4.1. Klinik Pratikte Yeni Nesil Sekanslama Uygulamaları 31
BÖLÜM 3 33
MATERYAL VE YÖNTEM 33
3.1. Materyal 33
3.2. Yöntem 36
BÖLÜM 4 49
BULGULAR 49
BÖLÜM 5 70
TARTIŞMA 70
BÖLÜM 6 78
SONUÇ 78
KAYNAKLAR 80
EKLER 105
ÖZGEÇMİŞ 110

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACMG	**:**	Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji
ACOG	**:**	Amerikan Kadın Doğum Uzmanları Ve Jinekologlar Grubu
AFP	**:**	Alfa Fetoprotein
AIUM	**:**	Amerikan Tıpta Ultrason Enstitüsü
arrayCGH	**:**	Array Comparative Genomic Hybridization
ARSA	**:**	Anormal Sağ Subklavyen Arter
AS	**:**	Amniyosentez
BPM	**:**	Baş-Popo Mesafesi
BRAF	**:**	B-Raf Protoonkogen Serin/Threonin Kinaz Geni
CALM	**:**	Café Au Lait Makülleri
CBL	**:**	Casitas B-Lineage Lenfoma Protoonkogeni
CFC1	**:**	Kardiyofasyokutanöz Sendrom Tip 1
CFC2	**:**	Kardiyofasyokutanöz Sendromu Tip 2
CFC3	**:**	Kardiyofasyokutanöz Sendromu Tip 3
CFC	**:**	Kardiyofasyokutanöz Sendromu
cffDNA	**:**	Hücre Dışı Fetal Dna
CNV	**:**	Copy Number Variation
CS	**:**	Costello Sendromu
CVS	**:**	Koryon Villus Örneklemesi
ddNTP	**:**	Dideoksi Nükleotid Trifosfat
DEHB	**:**	Dikkat Eksikliği Ve Hiperaktivite Bozukluğu
FISH	**:**	Floresan İn Situ Hibridizasyon
GEF	**:**	Guanozin Nükleotid Değişim Faktörleridir
GRB2	**:**	Büyüme Faktörü Reseptörüne Bağlı Protein 2
hCG	**:**	Koryonik Gonadotropin
HRAS	**:**	Harvey Rat Sarcoma Viral Onkogen Homolog Geni
IGV	**:**	Integrative Genomics Viewer
IUFD	**:**	İntrauterin Fetal Ölüm
IUFD	**:**	İntrauterin Gelişme Geriliği
JMML	**:**	Jüvenil Miyelomonositik Lösemi
KH	**:**	Kistik Higroma
KRAS	**:**	Kras Protoonkogen Gtpaz Geni
LPRD2	**:**	Leopard Sendrom Tip 2
LPRD3	**:**	Leopard Sendrom Tip 3
LS	**:**	Legius Sendromu

LZTR1	**:**	Lösin Fermuar Benzeri Transkripsiyonel Regülatör 1 Geni
MAP2K1	**:**	Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 1 Geni
MAP2K2	**:**	Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 2 Geni
NCBI	**:**	National Center For Biotechnology Information
NF	**:**	Nukal Fold
NF1	**:**	Nörofibromin 1 Geni
NF1	**:**	Nörofibromatozis Tip 1
NF2	**:**	Nörofibromatozis Tip 2
NGS	**:**	Yeni Nesil Dizi Analizi
NHGRI	**:**	Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü
NIPT	**:**	Non-İnvaziv Prenatal Test
NMSL	**:**	Multiple Lentijinli Noonan Sendromu
NRAS	**:**	Nras Protoonkogen Gtpaz Geni
NS	**:**	Noonan Sendromu
NS10	**:**	Noonan Sendromunu Tip 10
NS2	**:**	Noonan Sendromunu Tip 2
NS3	**:**	Noonan Sendromunu Tip 3
NS4	**:**	Noonan Sendromu Tip 4
NS5	**:**	Noonan Sendromunu Tip 5
NS6	**:**	Noonan Sendromunu Tip 6
NS8	**:**	Noonan Sendromunu Tip 8
NS9	**:**	Noonan Sendromunu Tip 9
NSLH1	**:**	Noonan Sendromu Benzeri Anagen Saçlı Hastalık 1
NSLL	**:**	Juvenil Miyelomonositik Lösemi Olan Veya Olmayan Noonan Sendromu Benzeri Bozukluk
NT	**:**	Ense Kalınlığında Artış
NTD	**:**	Nöral Tüp Defekti
OD	**:**	Otozomal Dominant Kalıtım
OR	**:**	Otozomal Resesif Kalıtım
PAPP-A	**:**	Plazma Protein A
PTP	**:**	Protein Tirozin Fosfataz
PTPN11	**:**	Protein-Tirosin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11 Geni
QCI	**:**	Qiagen Clinical Insight
QF-PCR	**:**	Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction
RAF1	**:**	Raf1 Protoonkogen, Serin/Threonin Kinaz Geni
RAS/MAPK	**:**	Ras Kaynaklı Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz Yolağı
RASA2	**:**	Ras P21 Protein Activator 2
RIT1	**:**	Caax Motifi Olmayan Rıc Benzeri Protein 1 Geni
RTK	**:**	Reseptör Tirozin Kinazlar
SH2	**:**	Src Homolog Bölge 2
SHOC2	**:**	Shoc2 Leucıne-Rıch Repeat Scaffold Proteın
SMFM	**:**	Maternal Fetal Tıp Deneği

SOS	**:**	Son Of Sevenless Proteinine
SOS1	**:**	Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 1 Geni
SOS2	**:**	Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 2 Geni
SPREED1	**:**	Sprouty İlişkili Evh1 Domain İçeren Protein 1 Geni
UCSC	**:**	University Of California Santa Cruz Genomics Institute
uE3	**:**	Konjuge Olmayan Estrion
UNICEF	**:**	United Nations Children's Fund
VUS	**:**	Klinik Önemi Bilinmeyen Varyant
WES	**:**	Tüm Ekzom Dizileme
WGS	**:**	Tim Genom Dizilem
WHO	**:**	The World Health Organization
β-hCG	**:**	Serbest B-Koryonik Gonadotropin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 11-14 gebelik haftaları arasında fetusta NT ölçümü (Shiefa vd., 2013).....6

Şekil 2.2. Koryon villus örneklemesi (CVS) işlemi transabdominal (A), transvajinal (B) (Vink & Quinn, 2017).....8

Şekil 2.3. Nukal Fold (NF) ölçümü (Süt vd., 2022).....11

Şekil 2.4. Amniyosentez (AS) işlemi transabdominal (Cruz-Lemini vd., 2014).....12

Şekil 2.5. RASopatiler ve ilişkili genler (Rauen, 2013).....16

Şekil 2.6. Ras/MAPK sinyal iletimi a (Yuan, Dong & Hu, 2020) b (Kolch, 2005).....18

Şekil 3.1. NextSeq 550 dizileme cihazı.....47

Şekil 4.1. Sayısal Anomali Saptanan Fetuslarda Sendromların Dağılım Oranları.....49

Şekil 4.2. Rutin Analizi Yöntemleri ile NT Artışı ve/veya KH Saptanan Gebelerdeki Tanı Oran Dağılılımları.....51

Şekil 4.3. C05 kodlu fetusun *CBL* geni aile segregasyonu sonucu.....61

Şekil 4.4. C08 kodlu fetusun *PTPN11* geni aile segregasyonu sonucu.....62

Şekil 4.5. C08 kodlu fetusun terminasyon sonrası görüntüleri.....63

Şekil 4.6. A24 ve A25 kodlu MKDA fetusların *LZTR1* geni aile segregasyonu sonucu64

Şekil 4.7. A32 kodlu fetusun *RIT1* geni aile segregasyonu sonucu.....65

Şekil 4.8. A33 kodlu fetusun *MAP2K2* geni aile segregasyonu sonucu.....66

Şekil 4.9. A42 kodlu fetusun *SOS2* geni aile segregasyonu sonucu.....67

Şekil 4.10. C18 kodlu fetusun *BRAF* geni aile segregasyonu sonucu.....68

Şekil 4.11. A43 kodlu fetusun *RAF1* genindeki varyant.....69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Koryon Villus örneklemesi (CVS) ve Amniyosentez (AS) işlemlerinde görülen risklerin karşılaştırılması 13

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler 34

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar 35

Çizelge 3.3. Yeni nesil sekanslama Panel bileşenleri 35

Çizelge 3.4. RASopati ile ilişkili Genlere ait bilgiler 39

Çizelge 3.5. Fragmentasyon PCR koşulları 41

Çizelge 3.6. Hedef zenginleştirme PCR koşulları 43

Çizelge 3.7. Universal PCR amplifikasyon koşulları 44

Çizelge 3.8. SYBR green PCR bileşenleri 45

Çizelge 3.9. Real-Time PCR protokolü 46

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilmeyen gebelerin sayısı ve dışlanma nedenleri 51

Çizelge 4.2. Çalışmaya Dahil Edilen 75 Gebenin Bilgileri 53

Çizelge 4.3. Çalışmada saptanan (patojenik/muhtemel patojenik/VUS) varyasyonlar 59

Çizelge 4.4. Varyasyonların ACMG-2015, ClinVar, Franklin ve patojenite bilgileri 60

EKLER DİZİNİ

Ek-1 Bilgilendirilmiş Onam Formu.....105

Ek-2 Etik Kurul Formu.....109

BÖLÜM 1

GİRİŞ ve AMAÇ

Prenatal dönem, konsepsiyon ile doğum arasında geçen süre olarak tanımlanır (Moore & Persaud, 2002). Geçmişte gebelik, kadın ve bebek için yaşamın belirsiz olduğu bir dönem olarak görülürken, günümüzde aktif gebelik takip süreci ve prenatal tarama programları mortalite ile birlikte morbiditenin önlenmesinde büyük önem taşımaktadır (Kitchen & Jack, 2022). Gebelik takip süreci üç trimester şeklinde incelenmektedir (Yoshizato vd., 2021). Birinci ve ikinci trimesterde uygulanan tarama testleri ve ayrıntılı ultrasonografik değerlendirmeler sonucunda yüksek riskli gebelerin tespiti sağlanmaktadır (Shiefa, Amargandhi, Bhupendra, Moulali & Kristine, 2013). Ense kalınlığında artış (NT) ve/veya kistik higroma (KH) saptanan fetuslarda kromozomal anomaliler için artmış bir risk söz konusudur (Shakoor vd., 2017). Rutin gebelik takibinde bu gebelere gebelik haftasına uygun girişimsel (invazif) işlem önerilir (Navaratnam, Alfirevic & ROCG, 2021). Girişimsel işlem sonucunda elde edilen örnekten hızlı test (Floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya Kantitatif Floresans Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QF-PCR), kromozom analizi ve arrayCGH analizleri planlanır (Su vd., 2021). NT artışı ve/veya KH saptanan fetusların %20'sinde kromozomal anomali görüldüğü bildirilmiştir (Bakker, Pajkrt & Bilardo, 2014). Kromozom analizinde anomali saptanmayan olgularda arrayCGH analizinin yapılmasının tanıya %5 oranında katkı sağladığı bildirilmiştir (Grande vd., 2015). Sonuç olarak NT artışı ve/veya KH saptanan fetusların %25 – 30'una genetik tanı konulmuş olmaktadır. ArrayCGH analizinde patojenik kopya sayısı varyasyonu (CNV) saptanmayan olgularda fetusun RASopatiler açısından değerlendirilmesi önerilmektedir (Güven vd., 2021).

Çalışmamızda 1. ve 2. trimesterde NT artışı ve/veya KH saptanan olgularda rutin olarak yapılan FISH analizi, kromozom analizi ve arrayCGH analizleri normal saptanan fetusların, RASopati hastalık grubu ile ilişkili *BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1,*

MAP2K21, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RASA2, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1 genlerini (18 gen) kapsayan özgün tasarlanmış çoklu gen panelinin yeni nesil dizi analizi (NGS) yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Prenatal Dönem

İnsan gelişimini temel olarak prenatal ve postnatal dönem olmak üzere iki döneme ayırılır (Moore & Persaud, 2002). Konsepsiyon ile doğum arasında geçen süre prenatal dönem, doğum ile ölüm arasında geçen süre postnatal dönem olarak adlandırılır (Moore & Persaud, 2002). Prenatal dönem embriyonik ve fetal period olmak üzere kendi içerisinde ikiye ayrılır (O'Rahilly & Müller, 2010). Embriyonik dönem fertilizasyon ile gebeliğin 8. haftasında organogenezin tamamlanması arasında geçen süre, 9. hafta ve doğum arasında geçen süre fetal dönem olarak tanımlanır (O'Rahilly & Müller, 2000). Gebelik süresi son adet tarihi itibari ile 280 gün, 40 hafta olarak hesaplanır (Jukic, Baird, Weinberg, McConnaughey & Wilcox, 2013). Klinik olarak gebelik takip süreci üç aylık dönemlerden oluşan üç trimestere ayrılmıştır (Yoshizato vd., 2021).

Gebelik süreci, tarihsel olarak bakıldığında, gebelik ile ilişkili yüksek ölüm oranı nedeniyle bir kadının yaşamının çok belirsiz bir parçasıydı (Kitchen & Jack, 2022). 1900'lerin başında anne ölüm oranları 1000 canlı doğumdan 6 - 9, bebeklerin yaşamının ilk 12 ayında ölüm oranı ise 1000 canlı doğan bebekte 100 olarak bildirilmiştir (Kitchen & Jack, 2022). Birleşmiş Milletler Uluslararası Çocuk Acil Yardım Fonu (UNICEF), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler'in tahminlerine göre yayınlanan raporda; 2017 yılında anne ölüm dünya ortalaması 100.000 canlı doğumda 211 olarak bildirilmiştir (UNICEF, 2017).

Günümüzde aktif gebelik takip süreci ve prenatal tarama programları hem mortalite ile birlikte morbiditenin önlenmesi hem de gebenin fiziksel ihtiyaçlarının karşılanmasında büyük önem taşımaktadır (Kitchen & Jack, 2022).

2.1.1 Gebelik Takibinde 1. Trimester

Birinci trimester olarak adlandırılan dönem gebeliğin ilk üç aylık periyodu olan 1. gebelik haftası ile 12. gebelik haftalarındaki süreci tanımlamaktadır (Çiçek & Mungan, 2007). Bu dönemde fertilizasyon, konsepsiyon, gastrulasyon, morfogenez ve organogenezin tamamlanması gerçekleşir (Moore & Persaud, 2002). 9. gebelik haftasından sonra embriyo, fetus olarak isimlendirilir (O'Rahilly & Müller, 2000). İlk trimester gelişim açısından çok önemli bir dönemdir, bu dönemde meydana gelen hatalar majör konjenital anomalilere sebep olur (Briggs & Yaffle, 2012).

İlk trimester tarama testlerinin amacı Patau Sendromu (Trizomi 13), Edwards Sendromu (Trizomi 18) ve Down Sendromu (Trizomi 21) için artmış risk saptanan fetusların belirlenmesi ve gebelerin girişimsel tanı testlerine yönlendirilebilmesidir (Shiefa, Amargandhi, Bhupendra, Moulali & Kristine, 2013). İlk trimester tarama test seçenekleri; hücre dışı fetal DNA(cffDNA) kullanılarak yapılan non-invaziv prenatal test (NIPT) veya ikili tarama testidir (Bardi, Smith, Kuilman, Snijders & Bilardo, 2019).

Plazmada yer alan hücre dışı DNA (cfDNA), hücre döngüsü sonucunda plazmaya salınan ve dolaşımdan hızlıca temizlenen kısa DNA fragmentlerinden oluşur (Harraway, 2017). Gebelikte maternal plazmada yer alan cfDNA grubuna trofoblastların apoptozu sonucu oluşan cffDNA eklenir (Alberry, Aziz, Ahmed & Adbel-Fattah, 2021). Maternal plazmada cffDNA'nın keşfi ve prenatal tarama amacı ile kullanımı devrim niteliğindedir (Lo vd., 1997). Günümüzde NIPT, 10. gebelik haftası itibari ile uygulanılabilmekte, Down sendromunu %99 sensitivite, %99,5 spesifite ve 0,35 yanlış pozitiflik oranı ile tespit edebilmektedir (Gil, Quezada, Revello, Akolekar & Nicolaides, 2015). Düşük yanlış pozitiflik oranı ile yüksek sensitivite ve spesifite gösterse de bu durum tüm kromozomlar için aynı değildir (Gregg vd., 2013). Pozitif saptanan NIPT sonuçlarının gebelik haftasına uygun olarak yapılan girişimsel işlem ile tanının doğrulanması önerilir (Minear, Lewis, Pradhan & Chandrasekharan, 2015).

İkili tarama testinde gebenin yaşı ile serumda gebelik ile ilişkili plazma protein A (PAPP-A) ve serbest β-koryonik gonadotropin (β-hCG) biyokimsal değerlerinin kombine değerlendirilmesi ve ultrasonografi aracılığı ile fetusun ense kalınlığının (NT) ölçülmesidir (Ellestad, Wells & Kuller, 2005).

Gebenin yaşının fetus gelişimine olan etkisi bir çok farklı çalışma ile ortaya konulmuştur (Shiefa vd., 2013). Kadınlarda 13 ile 19 yaş aralığında gerçekleşen gebelikler adolesan gebelik olarak adlandırılır (Chandra, Schiavello, Ravi, Weinstein & Hook, 2002). Bu grupta yer alan gebeliklerde düşük, preeklampsi, erken doğum, düşük doğum ağırlıklı bebek, ölü doğum ve doğum esnasında ölüm için artmış risk söz konusudur (Leftwich & Alves, 2017). 35 yaş ve üzeri gebeler, ileri anne yaşı olarak kabul edilir (Snijders, Sebire & Nicoilaides, 1995). İleri anne yaşı; düşük, kromozomal anomaliler, ölü doğum, fetal büyüme kısıtlaması, erken doğum, preeklampsi, gestasyonel diyabetes mellitus ve artan sezaryen oranları dahil olmak üzere çok çeşitli olumsuz gebelik sonuçları ile ilişkilidir (Frick, 2021). Kromozomal olarak anormal bir fetusa sahip olma riski, 35 yaş altı grupta %0,2 ile %0,5, 35-39 yaş aralığındaki grupta %0,8 ile %1.3, 40 yaş ve üzeri grupta ise %1,9 ile %3,8 olarak bildirilmiştir (Frederiksen vd., 2018).

PAPP-A; sinsisyotrofoblast tarafından üretilen, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 4'e bağlanan ve insülin benzeri büyüme faktörlerinin pozitif düzenleyicisi olan bir plasental glikoproteindir (Morris, Bilagi, Davani & Kilby, 2017). Maternal dolaşımda serum PAPP-A konsantrasonu >0,5 MoM altında ise düşük olarak olarak değerlendirilir (Patil, Panchanadikar & Wagh, 2014). Düşük PAPP-A düzeyinin, zayıf plasentasyon, intrauterin fetal ölüm (IUFD), erken doğum, düşük doğum ağırlığının yanı sıra preeklampsi ve IUGR dâhil olmak üzere çeşitli kötü obstetrik sonuçlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Morris, Bilagi, Davani & Kilby, 2017). Yüksek PAPP-A değeri IUFD ile ilişkilendirilmiştir (Saletra-Bielińska vd., 2020). 14. gebelik haftasından önce azalan PAPP-A seviyesi, trizomi 18 (T18) ve trizomi 21 (T21) için artan risk ile ilişkilidir (Shiefa vd., 2013).

β-hCG; sinsisyotrofoblast tarafından sentezlenen bir glikoproteindir (Alfthan vd., 1988). Maternal serumda β-hCG seviyeleri, hem birinci hem de ikinci trimester tarama testlerinde kullanılan bir belirteçtir (Sirikunalai vd., 2016). Birinci trimesterde düşük β-hCG konsantrasyonu ve ikinci trimesterde yüksek β-hCG konsantrasyonu gebelik kaybı ve preeklampsi ile ilişkilendirilmiştir (Barjaktarovic vd., 2017). T21 gebeliklerde maternal serumda β-hCG, normal gebeliklerdeki değerlere kıyasla yaklaşık iki kat daha yüksektir ve PAPP-A yarıya düşer (Kagan, Wright, Spencer, Molina & Nicolaides, 2008).

İkili tarama testi 11-14. gebelik haftaları arasında uygulanır, trizomi 13 (T13), T18, T21, monozomi X ve triploidi için sensivitesi %95, yanlış pozitiflik oranı %4 olarak bildirilmiştir (Santorum, Wright, Syngelaki, Karagioti & Nicolaides, 2017). İkili tarama testinde risk saptanan gebelere girişimsel işlem önerilir.

2.1.1.1. Ense Kalınlığı

Fetusta omurganın arkası ile fetal boyundaki deri arasındaki deri altı sıvı dolu boşluğun ölçülmesi ense kalınlığını (NT) ifade eder (Shiefa vd., 2013). Şekil 2.1'de ultrasanda NT ölçümü gösterilmiştir.



Şekil 2.1. 11-14 gebelik haftaları arasında fetusta NT ölçümü (Shiefa vd., 2013).

İlk olarak Benacerraf, Gelman ve Frigoletto (1987), 16. gebelik haftasında 5500 fetus üzerinde yapmış oldukları çalışma sonucunda ense kalınlığındaki artış ile T21 arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Nicolaides vd. (1992), 10-14. gebelik haftalarında ense kalınlığındaki artışın fetuslarda artan kromozom anomalisi riskini tanımlamıştır (Clur, Ottenkamp & Bilardo, 2009). NT ölçümü 10 ile 13+6 gebelik haftaları arasında gerçekleştirilir (Shakoor vd., 2017). NT ölçümü, konusunda eğitim almış uzmanlarca gerçekleştirilmelidir, transabdominal veya transvajinal yolla ölçülebilir (Salomon vd., 2013). Fetal Tıp Vakfı (FMF)'nın NT ölçümü için oluşturduğu klavuza göre; fetus nötral pozisyonda olmalı, sagital kesit alınmalı ve görüntü sadece fetal başı ve üst toraksı içerecek şekilde büyütülmelidir. Görüntüde burnun ekojenik ucunun varlığı,

önde damağın dikdörtgen şekli, merkezde yarı saydam diensefalon ve arkada ense zarı tanımlanmalıdır. Fetal deri ile amniyon ayrımına dikkat edilmeli ve saydamlığın en geniş kısmı her zaman ölçülmelidir (Onyeacholem vd., 2016). Baş-popo mesafesi (BPM) en az 45 mm ve en fazla 84 mm olmalıdır (Nicolaides, Azar, Snijders & Gosden, 1992). Amerikan Kadın Doğum Uzmanları ve Jinekologlar grubu (ACOG) ve Maternal Fetal Tıp Deneği (SMFM) NT artışını >3,0 mm veya 99th centil olarak tanımlar (ACOG, 2020).

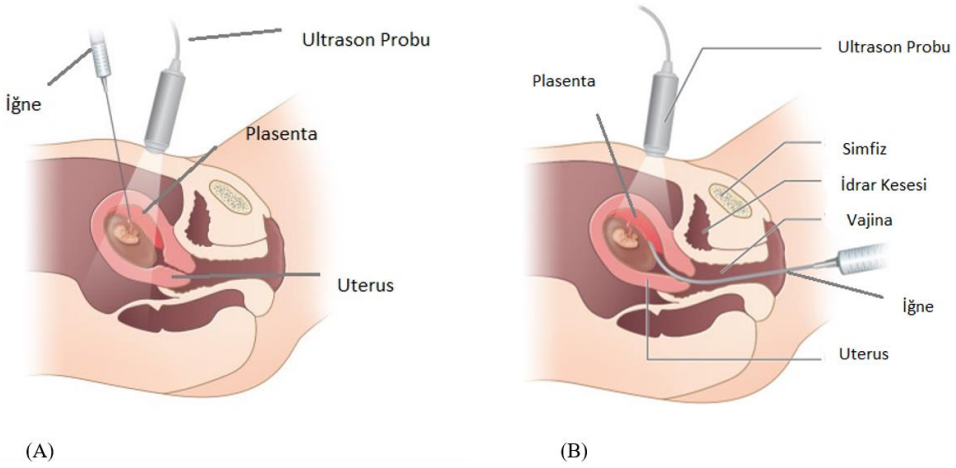
NT gebelik haftası ilerledikçe haftada yaklaşık %17 oranında artar, 14. Gebelik haftasından sonra yarı saydam alan, subkutan doku daha ekojenik hale geldiğinde kaybolur bu nedenle geçici bir fenomendir (Shiefa vd., 2013). NT artışı, aort istmus daralması, baş ve boyunda aşırı perfüzyona neden olan kardiyovasküler kusurlar veya lenfatik sistemin anormal/gecikmiş gelişimi ile ilişkilendirilir (Shiefa vd., 2013). NT artışı anöploidi için bir risk faktörü olmasının yanı sıra, kalp kusurları, yapısal anormallikler ve nadir görülen genetik sendromlar için de yararlı bir belirteçtir (Shakoor vd., 2017).

NT artışı ile birlikte ya da izole olarak da görülebilen kistik higroma (KH); lenfatik ve venöz sistemler arasındaki iletişim eksikliği nedeniyle anatomik olarak dilate lenfatik kanallarla karakterize vasküler/lenfatik bir malformasyondur (Noia vd., 2019). KH, gebeliğin altıncı haftasının sonunda gelişir ve ağırlıklı olarak boyunda bulunur (Breg vd., 1983). KH tanısı ultrasonografi aracılığı ile konulur (Malone vd., 2005). Görülme sıklığı canlı doğumda 1/1000 – 1/6000, düşük olgularında 1/750 olarak bildirilmiştir (Noia vd., 2019). KH, T13, T18, T21 ve monozomi X, kromozomal anomaliler ve genetik sendromlar ile ilişkilendirilmiştir (Scholl vd., 2012). NT artışı ve/veya KH saptanan gebelere girişimsel işlem önerilir.

2.1.1. 2. Birinci Trimesterde Uygulanan Girişimsel İşlemler

Birinci trimester tarama testinde yüksek risk saptanan gebelere tanı konulması amacı ile koryon villus örneklemesi (CVS) işlemi önerilir (Navaratnam, Alfirevic & ROCG, 2021). CVS; ultrasonografi (USG) gözetiminde iğne yardımı ile transabdominal veya transvajinal olarak plasental dokunun aspirasyonudur (Şekil 2.2 A, B) (Alfirevic, Sundberg & Brigham, 2003). İlk olarak 1970'li yılında Çinde tanımlanmıştır (Chine, 1975). 11^{+0}.ve 13^{+6}. gebelik haftaları arasında uygulanır, girişimsel bir yöntem olması

sebebi ile gebelik kaybı riski vardır (Navaratnam, Alfirevic & ROCG, 2021). Farklı kaynaklarda bu risk oranı %0,2 ile %1 arasında bildirilmektedir (Likar, Jere, Možina, Verdenik & Tul, 2020). Örneğin plasenta olması sebebi yapılan testlerde % 1-2 oranında plasenta ile sınırlı mozaiklik ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır (Hahnemann & Vejerslev, 1997).



Şekil 2.2. Koryon villus örneklemesi (CVS) işlemi transabdominal (A), transvajinal (B) (Vink & Quinn, 2017)

2.1.2. Gebelik Takibinde 2. Trimester

İkinci trimester olarak adlandırılan dönem gebeliğin ikinci üç aylık periyodu olup, 13. gebelik haftası ile 25. gebelik haftaları arasında kalan süreci tanımlamaktadır (Çiçek & Mungan, 2007). Bu dönemde gelişim hızlıdır, fetusta önemli miktarda ağırlık artışı olur ve fetal hareketler anne tarafından hissedilir (Moore & Persaud, 2002).

İkinci trimesterde uygulanan tarama testleri; üçlü test, dörtlü test olarak isimlendirilen biyokimyasal testler ve ikinci trimester ultrasonografi değerlendirmesidir (Reynolds, 2010). İkinci trimester biyokimyasal tarama testleri gebeliğin 15^{+0} ve 21^{+6} gebelik haftaları arasında uygulanılabilirken, günümüzde 16. ve 18. gebellik haftaları arasında uygulanmaktadır (Shamshirsaz, Benn & Egan, 2010).

Üçlü tarama testi; maternal serumda alfa fetoprotein (AFP), koryonik gonadotropin (hCG), konjuge olmayan estrion (uE3) seviyelerinin değerlendirilmesidir. Bu belirteçlere inhibin A seviyesinin eklenmesi, dörtlü tarama testi olarak adlandırılır

(Shamshirsaz, Benn & Egan, 2010). AFP, fetal malformasyonlar ve kromozom anomlileri için belirlenen ve en çok çalışılan ilk biyobelirteçtir (Mizejewski, 2004). Gebeliğin erken döneminde yolk kesesinden, daha sonra fetal karaciğer tarafından salgılanan onkofetal proteindir, plasenta aracığı ile maternal dolaşıma taşınır (Brock, 1976). 16. ve 18. gebelik haftaları arasında maternal serum AFP düzeyi 0,5 – 2,49 MoM aralığında ise normal, > 2,5 MoM ise yüksek ve < 0,5 MoM ise düşük olarak değerlendirilir (Bartkute, Balsyte, Wisser & Kurmanavicius, 2017). AFP düzeyi nöral tüp defekti (NTD)'ni %80 saptama oranına sahiptir (Wald, Cuckle, Brock, Peto, Polani & Woodford, 1977). NTD saptanmayan olgularda da yüksek AFP düzeyi hatalı test okuması, yanlış hesaplanan gebelik haftası, çoklu gebelik, viral enfeksiyon, plasental anomaliler, anöploidi ve fetal malformasyon ile ilişki olabilir (Goetzinger & Odibo, 2014). AFP düzeyinin düşük saptandığı olgularda T21 için risk artmıştır (Bartkute vd., 2017).

hCG; sinsisyotrofoblastlar tarafında üretilen bir glikoproteindir, yüksek düzeyde saptandığı durumlar anöploidi ve plasental anomaliler ile ilişkilendirilmiştir (Goetzinger & Odibo, 2014). İkinci trimesterde yüksek β-hCG konsantrasyonu gestasyonel hipertansiyon, fetal büyüme kısıtlaması, fetal ölüm ve erken doğum ile ilişkilendirilmiştir (Barjaktarovic vd., 2017).

Estriol, diğer östrojenik hormonlar ile birlikte gebelik, fetal gelişim ve immünomodülasyonun sürdürülmesinde önemli bir rol oynar (Huang vd., 2018). Dolaşımda estriol sülfat ve glukuronat ile konjuge formlarda bulunur, mevcut olan estriolun çok küçük bir bölümü konjuge olmayan estriol (uE3) olarak bulunur (Huang vd., 2018). uE3 10. gebelik haftasından sonra plasentadan salgılanır, bu nedenle uE3 konsantrasyonu bir dereceye kadar fetal gelişimi yansıtır (Yue, Zhang & Ying, 2020). Düşük uE3 düzeyinin anöploidi, adrenal yetmezlik, steroid sülfataz eksikliği, Zellweger Sendromu, Smith-Lemli-Opitz Sendromu, Aromataz eksikliği ile ilişkilendirilmiştir (Minsart, Van Onderbergen, Jacques, Kurt & Gillerot, 2008).

İnhibin A, dönüştürücü büyüme faktörü β süper ailesinin bir üyesidir, gebelik dışında overlerden sentezlenir fakat bu durum gebelik ile birlikte artan plasental üretime doğru bir kayma yaşanır (Goetzinger & Odibo, 2014). İnhibin A düzeyin yüksek saptanması anöploidiler için artmış risk, sayısal anomali saptanmayan fetuslarda yüksek saptanan inhibin A düzeyi ise preeklampsi ile ilişkilendirilmiştir (Ree vd., 2011).

T21 için riskli olgularda; düşük AFP, düşük uE3, yüksek hCG ve yüksek inhibin A düzeyi, T18 için riskli olgularda; düşük AFP, düşük uE3, düşük hCG, normail İnhibin A düzeyi, T13 için riskli olgularda; normal AFP, normal uE3 ve normal İnhibin A düzeyi saptanmıştır (Carlson & Vora, 2017). 3'lü ya da 4'lü tarama testinde risk saptanan olgulara girişimsel işlem önerilir.

2.1.2.1. İkinci Trimester Ultrasonografi Değerlendirmesi

İkinci trimester ultrason taraması 18. ve 22. gebelik haftaları arasında gerçekleştirilebilir (ACOG, 2004). Fetus sayısı, gebelik yaşı, plasentanın yeri ve fetusta konjenital anomalileri teşhis etme, soft anöploidi markerlarını saptama ve maternal pelvik patolojiyi belirleme fırsatı sunmaktır (Cargill & Morin, 2017). Amerikan Tıpta Ultrason Enstitüsü'ne (AIUM) göre, ikinci trimester ultrasonografi değerlendirmeleri, fetal kardiyak aktivite, amniyotik sıvısının tahmini hacmi, plasental yerleşim ve görünüm, umblikal kordun görüntülenmesi, gebelik haftası (biparietal çap, baş çevresi, femur diyafiz uzunluğu, karın çevresi veya ortalama karın çapına göre), fetal ağırlık tahmini, gebe anatomisi (rahim, adneksiyal yapılar, serviks) ve fetal anatomik incelemeyi içermelidir (Kitchen & Jack, 2022).

Fetal anatomik incelemede baş, yüz, boyun, göğüs (fetal kalbin dört odacıklı görünümü dâhil), karın, mide, böbrekler, mesane, abdominal kord giriş bölgesi, omurga, ekstremiteler ve cinsiyet görüntülenmelidir (AIUM, 2018). Fetal biyometrik ölçümler; biparietal çap, baş çevresi, karın çevresi ve femur uzunluğu içermelidir (Salomon vd., 2022). Nukal Fold (NF), cisterna magna, serebellar çap anormal ise milimetre olarak bildirilmelidir. (Cargill & Morin, 2017).

Soft markerlar, USG sırasında genellikle yapısal bir anormalliği temsil etmeyen ve normal varyantlar olabilen, ancak artan anöploidi riski ile ilişkileri nedeniyle dikkate değer olan minör USG bulgularıdır (SMFM, 2021). En yaygın olarak incelenen belirteçler lateral serebral ventrikülomegali, burun kemiği hipoplazisi ya da yokluğu, NF artışı, hiperekojenik kardiyak odak, anormal sağ subklavyen arter (ARSA), hiperekojenik bağırsak, hafif hidronefroz, femur veya humerusta kısalıktır (Agathokleous, Chaveeva, Kosinski & Nicolaides, 2013).

NF ölçümü, şüpheli T21 vakalarının tanımlanması için en spesifik ve izole ultrason belirteçlerinden biri olarak kabul edilir (Li, Fu, Li,Liu & Liao, 2018). USGde aksiyel kesitte; fetal başın transserebellar düzlemi kavum septi pellusidi, lateral ventriküllerin atriyumları, serebral pedinküller ve serebellar hemisferleri gösterecek şekilde görüntülenmeli ve kaliperler oksipital kemiğin dış kenarından üstteki derinin dış kenarına yerleştirilerek yaklaşık 30 derece ile nukal fold kalınlığı ölçülür. (Süt vd., 2022). Şekil 2.3'de ultrasanda NF ölçümü gösterilmiştir. 15^{+0} ile 20^{+6} gebelik haftaları arasında NF ≥ 6 mm ise artış olarak değerlendirilir (SMFM, 2021).



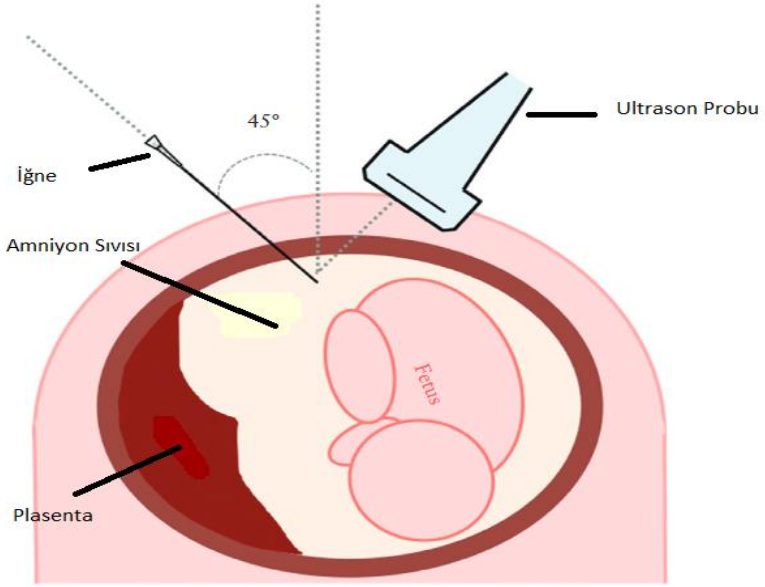
Şekil 2.3. Nukal Fold (NF) ölçümü (Süt vd., 2022)

İzole soft markerların normal fetusların en az %10'unda saptandığı bildirilmiştir (Dashe, 2016). Bu sebeple birden fazla soft markerın birlikteliğinde gebelere girişimsel işlem önerilir.

2.1.2.2. İkinci Trimesterde Uygulanan İnvaziv İşlemler

İkinci trimester tarama testinde yüksek risk saptanan gebelere kesin tanı koyulması amacı ile amniyosentez (AS) işlemi önerilir (Alfirevic, Navaratnam & Mujezinovic, 2017). Girişimsel bir yöntem olan AS, transabdominal olarak, USG gözetiminde bir iğne yardımı ile rahim içi boşluktan sıvı alınması işlemidir (Alfirevic, Sundberg & Brigham, 2003). Şekil 2.4'de AS işlemi şematize edilmiştir. İlk olarak Fuchs ve Riis (1956) fetusun cinsiyetini belirlemek amacı ile uygulamıştır. Günümüzde tanı ve

tedavi amacı ile en yaygın kullanılan fetal örnekleme yöntemidir (Nizard, 2010). Tanı amacı ile genetik, biyokimyasal, mikrobiyal ve histopatolojik olarak kullanılmaktadır (Jindal, Sharma & Chaudhary, 2021). Tedavi amacı ile polihidramnioslu olgularda amniyon sıvısının hacmini azaltmak amacı ile uygulanmaktadır (Piantelli vd., 2004).



Şekil 2.4. Amniyosentez (AS) işlemi transabdominal (Cruz-Lemini vd., 2014)

Amniyon sıvısının içeriği fetal deriden dökülen hücreler, transüdat, idrar ve diğer salgılardan oluşur (Jindal, Sharma & Chaudhary, 2021). AS işlemi 15^{+0} gebelik haftası itibari ile uygulanabilmektedir, önceki gebelik haftalarında kültür başarısızlığı ve talipes ekinovarus riskinin artması sebebi ile önerilmemektedir (Navaratnam, Alfirevic & ROCG, 2021). Sıklıkla 17 – 23. gebelik haftaları arasında uygulanır (Daum vd., 2019). Gerekli görülen olgularda 3. trimesterde de uygulanabilmektedir. Fakat gebelik kaybı ve kültür başarısızlığı riski bu grupta artar (Zalud & Janas, 2008). AS girişimsel bir yöntem olması sebebi ile fetal kayıp riski taşır, bu oran işlem günü %0,11, işlemden sonraki 28 gün içerisinde %0,56 ve 42 gün içerisinde %0,09 olarak bildirilmektedir (Ghi vd., 2016). CVS ve AS işlemlerinde görülen risklerin karşılaştırıldığı Çizelge 2.1'de yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Koryon Villus örneklemesi (CVS) ve Amniyosentez (AS) işlemlerinde görülen risklerin karşılaştırılması

RİSKLER	Amniyosentez (AS)	Koryon Villus Örneklemesi (CVS)
Prosedürün Tekrar Riski	≤ % 6	≤ % 6
Kanlı Örnek	% 0,8	Görülmez
Plasenta Sınırlı Mozaiklik	Görülmez	< % 2
Maternal Hücre Kontaminasyonu	% 1-2	% 1-2
Hızlı Test Başarısızlık Oranı	% 2	% 2
Hücre Kültürü Başarısızlık Oranı	% 0,5-1	% 0,5-1
Enfeksiyon	Nadir	Nadir
Fetal Yaralanma	Nadir	Nadir
Gebede İç Organlarda Hasar	Nadir	Nadir

2.2. Prenatal Tanı

Anomalili fetusların tespitinde ultrason kullanımının 1960'lı yıllara dayandığı bilinmektedir (Donald, 1962). Eş zamanlı görüntüleme özelliği, renkli Doppler ve görüntü kalitesindeki iyileştirmeler sonucunda günümüzde yüksek riskli gebelerin tespitinde ve girişimsel işlemlerin uygulanmasında USG'nin önemi büyüktür (Levy & Stosic, 2019).

İlk olarak 1966 yılında amniyosentez örneğinden kültür işlemi sonrası kromozom analizinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi prenatal tanı alanını doğurmuştur (Steele & Breg,1966). Ultrason görüntülemesine ek olarak 1970'li yıllarda prenatal tarama testi olarak 2. trimester gebelerde maternal serumdan AFP düzeyi nörol tüp defekti için bir belirteç olarak kullanılmaya başlandı (Cuckle & Maymon, 2016). 1980'li yıllarda

anöploidiler açısında riskli gebelerin belirlenmesine yönelik tarama testleri hayatımıza girdi (Cuckle & Maymon, 2016).

Günümüzde ultrasonografik değerlendirme ve biyokimyasal testler veya NIPT sonucunda yüksek risk saptanan gebelere gebelik haftalarına uygun olarak girişimsel işlem önerilir (Alfirevic, Navaratnam & Mujezinovic, 2017). Gebelik haftasına uygun olarak gerçekleştirilen CVS, AS, kordosentez işlemleri sonrasında elde edilen materyalden fetusun endikasyonlarına paralel genetik testler planlanır (Jindal, Sharma, Karena & Chaudhary, 2022). Bu genetik testler moleküler sitogenetik, sitogenetik ve moleküler genetik yöntemler olmak üzere birçok farklı yöntemi kapsayabilir (Jindal, Sharma, Karena & Chaudhary, 2022).

Birinci trimesterde NT artışı, genişlemiş juguler keseler, kistik higroma (bölmeli artmış NT) veya hidrops arasındaki ayrımlar belirsiz olabilir; bununla birlikte, klinik yönetim, görünümdeki farklılıklardan bağımsız olarak benzer bir yaklaşımı takip eder (Kelley, McGillivray,Meagher & Hui, 2021). İlk trimesterde NT artışı ve/veya KH saptanan olgularda klinik yaklaşım CVS işlemi sonrasında genetik değerlendirmede hızlı test ile 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarının sayısal anomalilerin değerlendirilmesidir (Su vd., 2021). Bu amaçla Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi veya kantitatif fluoresan polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR) yöntemi kullanılarak 24 - 48 saat içerisinde sonuç elde edilebilir (Conrad, Bena & Dahoun-Hadorn, 2005). CVS materyalinden uzun süreli hücre kültürü sonrasında yapılan kromozom analizi ile kromozomların sayısal ve yapısal anomalileri değerlendirilir (Wieacker & Steinhard, 2010). Prenatal tanıda konvansiyonel sitogenetik onlarca yıldır kromozom anormalliklerinin teşhisinde altın standart olarak kullanılmaktadır (Levy & Stosic, 2019). Ancak, uzun süreli hücre kültürü olması sebebi ile zaman alıcı, emek yoğun, büyük ölçüde hücre kültürünün başarısına bağlı ve $5 \sim 10$ Mb gibi düşük bir kromozom çözünürlüğüne sahiptir (Zhang vd., 2021). Günümüzde kromozom analizi sonucunda sayısal ve yapısal bir anomali saptanmayan olgularda arrayCGH yöntemi kullanılarak yüksek çözünürlükle fetusda patojenik kopya sayısı değişimlerinin (CNV) varlığı analiz edilir (Levy & Stosic, 2019). Bazı çalışmalar hızlı testde anomali saptanmayan olgularda direk arrayCGH çalışılmasını önermektedir (Chung vd., 2020). ArrayCGH analizinde

patojenik CNV saptanmayan olgularda fetusun RASopatiler açısından değerlendirilmesi önerilmektedir (Güven vd., 2021).

İkinci trimesterde NF artışı soft marker olarak değerlendirmek ile birlikte artmış T21 riski ile ilişkilendiren birçok yayın bulunmaktadır (Shipp & Benacerraf, 2002; Benacerraf B 2005). Bu olgularda AS işlemi sonrasında genetik değerlendirmede hızlı test (FISH veya QF-PCR) önerilerek, 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarının sayısal anomalileri değerlendirilmelidir. NF artışı ile diğer kromozomal anomaliler arasındaki ilişkiyi değerlendiren çok az miktarda çalışma bulunmaktadır bu sebeple kromozom analizine ek olarak arrayCGH yönteminin kullanılması tavsiye edilmektedir (Li, Fu, Li, Liu & Liao, 2018).

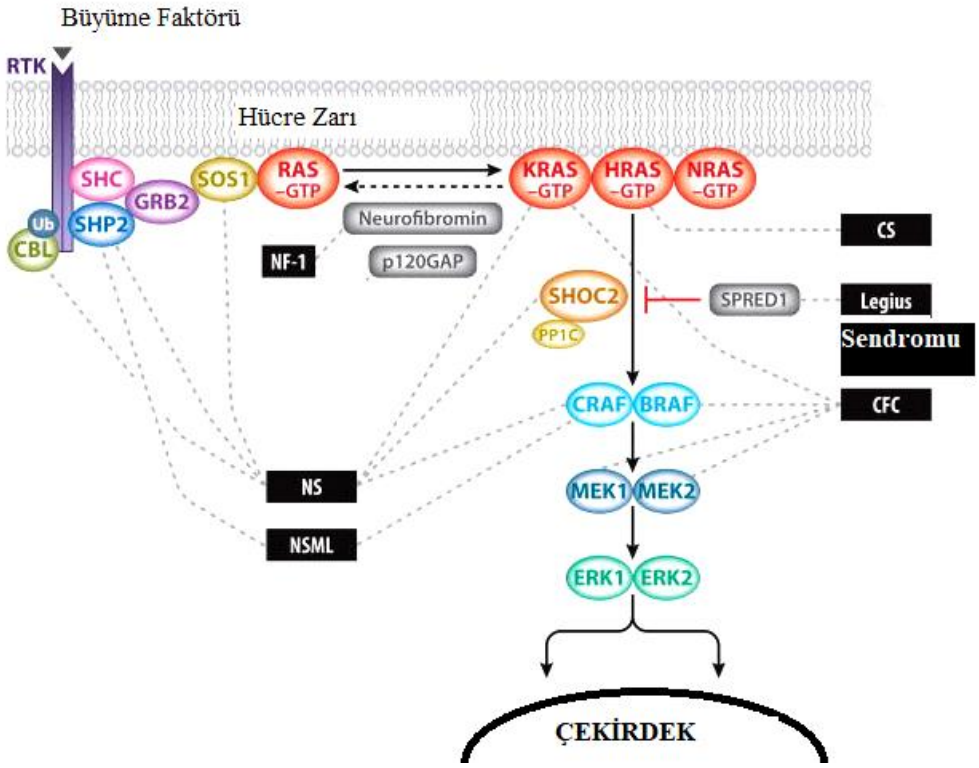
Birinci trimester NT artışı ile ikinci trimester NF artışının benzer patofizyolojiye sahip olduğu tahmin edilmektedir (Miguelez, 2012). Fakat 2001 ve 2008 yıllarında yapılan iki çalışmada da T21 taramalarında birbirlerinden bağımsız markerlar olarak değerlendirmeleri önerilmiştir (Salomon, Bernard, Taupin, Benard & Ville, 2001; Maymon, Zimerman, Weinraub, Herman & Cuckle, 2008). Miguelez vd. (2012) yapmış oldukları çalışma sonucunda, NT artışı saptanan olgularda ikinci trimesterde NF saptanması arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirmiştir. Bu nedenle tez çalışmamızda NF artışı olan ve arrayCGH analizinde patojenik CNV saptanmayan fetusların RASopatiler açısından değerlendirilmesini planladık.

2.3. RASopatiler

Ras/mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağında görev alan ya da düzenleyen genlerde meydana gelen germline patojenik varyasyonların neden olduğu, klinik olarak tanımlanmış genetik sendromlar grubuna RASopatiler denir (Hebron, Hernandez & Yone, 2011). Noonan Sendromu, Costella Sendromu, Nörofibromatozis tip 1, Kardiyofasyokutanöz Sendrom, Çoklu Lentijinli Noonan Sendromu (eski adıyla LEOPARD Sendromu) ve Legius Sendromu bu grupta yer almaktadır (Riller & Rieux-Laucat, 2021). Bu grupta yer alan hastalar kraniyofasiyal dismorfoloji, kardiak malformasyonlar, kutanöz, kas-iskelet sistemi anomalileri, oküler anomaliler, nörobilişsel bozukluk ve malignitelere yatkınlık gibi ortak ve ayırt edici klinik özelliklerin belirli kombinasyonlarını sergilerler (Tidyman & Rauken, 2009). Ras/MAPK

yolağının disregülasyonu sebebi ile RASopatiler birçok örtüşen fenotipik özellik içerirler (Rauen, 2013). Toplum sıklığı 1000 de 1 olarak bildirilmektedir (Tajan, Paccound, Branka, Edouard & Yart, 2018).

Noonan Sendromu klinik olarak 50 yılı aşkın bir süre önce tanımlanmasına rahmen ilişkili genlerin ortaya konulması son 30 yılda gerçekleşmiştir. Bu da RASopatilerin fizyopatolojilerini daha iyi anlamak ve terapötik strateji hedeflerini belirlemek için moleküler bir temel oluşturmuştur (Tajan, Paccound, Branka, Edouard & Yart, 2018). Günümüzde Ras/MAPK yolağında 20 den fazla gen - hastalık ilişkisi tanımlanmıştır (Scott vd., 2021). Şekil 2.5'de Sendrom ve ilişkili genler şematize edilmiştir.



Şekil 2.5. RASopatiler ve ilişkili genler (Rauen, 2013)

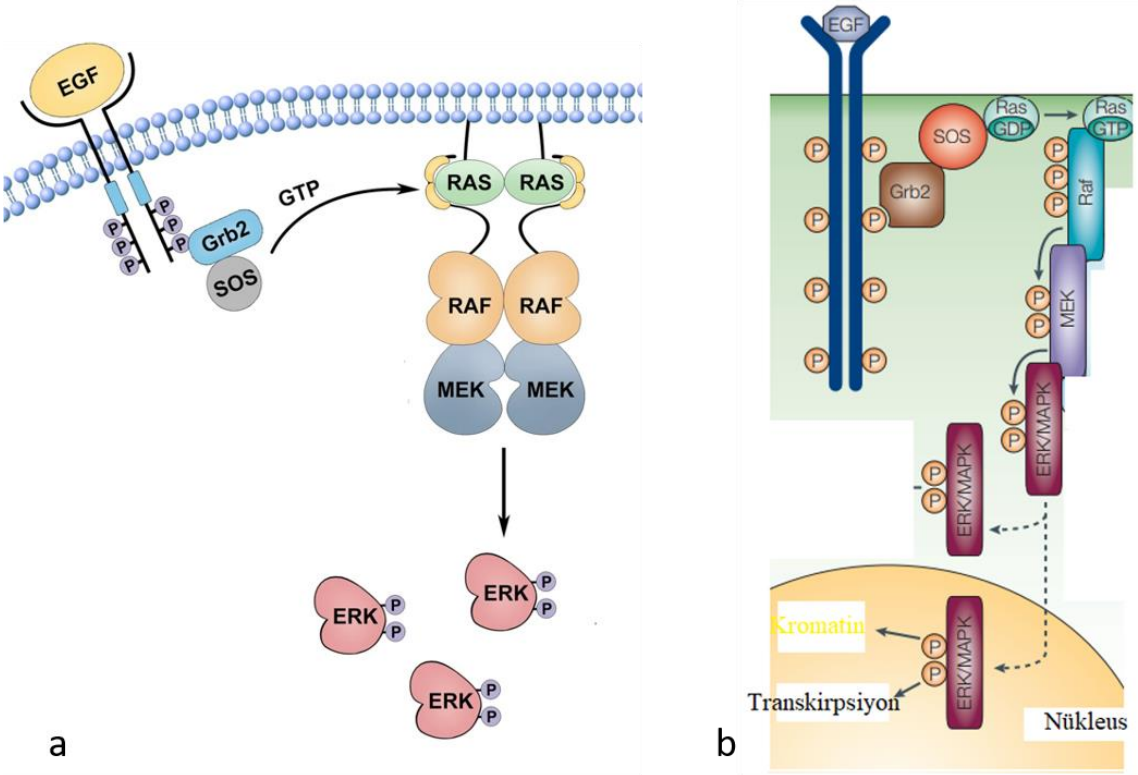
RASopatilerin prenatal tanısı fetuslarda spesifik bulguların olmaması ve ekspresivitede farklılık göstermesi nedeniyle zordur (Leach vd., 2019). Prenatal bulgu olarak NT artışı, NF artışı, KH, hidrops fetalis, asit veya torasik efüzyonlar, hipertrofik kardiyomiyopati, polihidramnios ve böbrek anomalileri bildirilmiştir (Scott vd., 2021). Bu bulgular izole veya kombine bir şekilde bulunabilir (Bakker, Pajkrt, Mathijssen & Bilardo, 2011). RASopatili olguları prenatal tanısı ikinci trimester ultrasonografi veya

fetal ekokardiyogram ile tespit edilmesi zor olabilen solunum komplikasyonları, kardiyak problemler ve lenfatik anormallikler dahil olmak üzere olumsuz perinatal komplikasyonlar ve ailelere ileriye dönük rehberlik sağlama imkânı barındırdığı için çok önemlidir (Mangels vd., 2021).

2.3.1 RAS/mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal zinciri

Ras/MAPK yolağı, tümü normal gelişim için kritik olan hücre döngüsü, hücresel büyüme, farklılaşma, yaşlanma, apoptoz ve hücreler arası iletişimin düzenlenmesinde görev alır (Tidyman & Rauen, 2016). Kanser ile ilişkisi ve olası tedavi yaklaşımlarındaki rolü nedeniyle üzerine çok fazla çalışma yapılmaktadır. (Değirmenci, Wang & Hu, 2020).

Ras kaynaklı mitojenle aktive olan protein kinaz (RAS/MAPK) yolağı, hücre dışı uyaranların hücre içi ortama sinyal iletiminde merkezi bir rol oynar (Tidyman & Rauren, 2008). Ras proteinleri, hücre içinde kritik bir sinyalleşme merkezi olarak işlev gören küçük guanozin nükleotide bağlı GTPazlardır, Reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler), G proteinine bağlı reseptörler, sitokin reseptörlerine ve hücre dışı matris reseptörlerine bağlanan büyüme faktörleri aracılığıyla aktive edilirler (Rauen, 2013). Ras proteinleri, aktif bir GTP'ye bağlı form ile aktif olmayan bir GDP'ye bağlı form arasında geçiş yapar (Rauen, 2013). RTK'ler aracılığıyla aktivasyon, RTK otofosforilasyonuna neden olan bir büyüme faktörünün bağlanması ve adaptör protein büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2 (GRB2) ile etkileşime girmesiyle gerçekleşir (Tidyman & Rauen, 2016). GRB2, daha sonra plazma zarına alınan Son of sevenless (SOS) proteinine bağlanır (Rauen, 2013). SOS proteinleri, guanozin nükleotid değişim faktörleridir (GEF'ler), Ras proteinin GDP'den GTP ye nükleotid değişim oranını arttırır bu da aktif GTP'ye bağlı formda Ras'ın artmasına neden olur (Simanshu, Nissley & McCormick, 2017). Aktive edilmiş Ras, Raf'ın (ARAF, BRAF, CRAF) aktivasyonuna yol açar (Tidyman & Rauen, 2016). Raf, MAPK kinazları MEK1 ve/veya MEK2'yi fosforile eder ve aktive eder; bunlar da ERK1 ve/veya ERK2'yi fosforile eder ve aktive eder (Tidyman & Rauen, 2016). Şekil 2.6'de Ras/MAPK sinyal iletimi tasvir edilmiştir.



Şekil 2.6. Ras/MAPK sinyal iletimi a (Yuan, Dong & Hu, 2020) b (Kolch, 2005)

ERK1 ve ERK2 nihai efektörlerdir ve işlevlerini hem nükleer hem de sitozolik çok sayıda aşağı akış molekülü üzerinde uygularlar (Yoon & Seger, 2006). Hücre döngüsünün ilerlemesi, hücresel farklılaşma ve hücresel büyüme dahil olmak üzere hayati hücresel fonksiyonlarını kontrol eder (Yoon & Seger, 2006).

2.3.2. Nörofibromatozis Tip 1

Nörofibromatozis; Nörofibromatozis Tip 1 (NF1) (#162200), Nörofibromatozis Tip 2 (NF2) (#10100) ve Schwannomatosis (#162091) hastalıklarını içeren, heterojen ama belirleyici özellikleri olan, bening ve malign özelikli tümörlere yatkınlık oluşturan nörogenetik bir hastalıktır (Cimio & Gutmann, 2018).

NF1, kafe-au-lait lekeleri, gözde Lisch nodülleri ve deride fibramatöz tümörleri ile karakterize bir çoklu sistem bozukluğudur (Shen, Harper & Upadhyaya, 1996). Nörofibromatozlar içerisinde en yaygın görülen tipidir, görülme sıklığı 1/2500 ile 1/3000 arasındadır (Evans vd., 2010). Nörofibromin 1 (*NF1*) geninde meydana gelen patajenik, olası patojenik varyasyonlar NF1 fenotipine neden olur (Upadhyaya vd., 1990). Ras/MAPK yolağında germline mutasyonu ilk olarak saptanan multipl konjenital anomali

sendromu NF1'dir (Wallace vd., 1990). Otozomal dominant kalıtım özelliği gösterir ve *de novo* varyant oranın % 50 olarak bildirilmiştir (Wilson, John, Handler & Schwartz, 2015). NF1'li bireylerde genel nüfusa oranla kanser gelişimde artmış bir risk söz konudur (Nguyen vd., 2014).

NF1 tanısı klinik bulgulara dayanır (NIH 1988). Klinik bulgularına bakılarak, aile öyküsü olmayan ve etkilenen çocukların 1 yaşına kadar %50'sine, 8 yaşına kadar da %95'ine tanı konulabilmektedir (Shofty, Constatini & Ben-Shachar, 2015). Prenatal tanıda, yaş grubunun 8'den küçük olduğu olgular ve klinik bulguların diğer sendromlar ile örtüştüğü durumlarda moleküler genetik testlere ihtiyaç duyulur (Louvrier vd., 2018, Shoft vd., 2015).

2.3.2.1 Nörofibromin 1 (*NF1*) Geni

NF1 (MIM* 613113) geni kromozom 17q11.2'de haritalanmıştır. 60 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 250-280 kd ve 2818 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (Bergoug vd., 2020). *NF1* geni nörofibromin proteini kodlar, bu bir RasGAP, yani Ras'ın negatif bir düzenleyicisi olan GTPaz aktive edici bir proteindir (Rad & Tee, 2016). Ras GTPaz'ı aktive ederek hücresel proliferasyonu kontrol eder ve bir tümör supresör görevi görür (Ratner & Miller, 2015). *NF1* patojenik varyasyonları nörofibromin fonksiyon kaybına, bu da hücre içerinde haploinsufficienciye neden olur (Upadhyaya & Cooper 2012, Esposito vd., 2015).

2.3.3. Noonan Sendromu

İlk olarak 1963 yılında Noonan tarafından tanımlanmıştır (Noonan & Ehmke, 1963). Noonan Sendromu (NS), karakteristik yüz görünümü, kısa boy, konjenital kalp anomalileri ve gelişme geriliği ile karakterize çoklu konjenital anomali sendromudur (Allanson, 2007). Bu bulgulara ek olarak geniş ve perdeli boyun, göğüs deformitesi, kriptorşidizm, lenfatik displaziler ve oküler anomaliler görülebilir (Roberts, 2001). Görülme sıklığı 1/1000-2500 olarak bildirilmektedir (Bhambhani & Muenke, 2014). Otozomal dominant kalıtım özelliği gösterir, vakaların %60'ında *de novo* olarak patojenik varyant saptanmıştır (Shaw, Kalidas, Crosby, Jeffery & Patoon, 2007).

Lösin Fermuar Benzeri Transkripsiyonel Regülatör 1 (*LZTR1*)'deki patojenik varyantların neden olduğu NS olgularında otozomal dominant veya otozomal resesif kalıtım modeli görülebilir (Roberts, 2001).

LZTR1, B-Raf Protoonkogen Serin/Threonin Kinaz (*BRAF)*, Kras Protoonkogen GTPaz *(KRAS)*, Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 1 *(MAP2K1)*, NRAS Protoonkogen GTPaz *(NRAS)*, Protein-Tirosin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11 *(PTPN11)*, Raf1 Protoonkogen, Serin/Threonin Kinaz (*RAF1*), CAAX Motifi Olmayan RIC Benzeri Protein 1(*RIT1*), Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 1 (*SOS1*) ve Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 2 (*SOS2*) genlerinin germline patojenik varyantları NS ile ilişkilendirilmiştir (Roberts, Allanson & Gelb, 2013).

NS tanısı alan olguların %50'sinde *PTPN11* geninde, %13'ünde *SOS1* geninde, %5'inde *RAF1* geninde ve *RIT1* geninde ve %5 den azında *KRAS* geninde patojenik varyant saptanmıştır. Vakaların %1'den daha azında *BRAF*, *LZTR1*, *MAP2K1* ve *NRAS* genlerinden birinde patojenik varyant saptanmıştır (Rauen, 2013).

NS tanısı alan çocuklar maligniteler geliştirmeye eğilimlidir ve en yaygın olarak jüvenil miyelomonositik lösemi (JMML) (#607785) bildirilmiştir (Emanuel, 2004).

2.3.3.1 Protein-Tirosin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11 *(PTPN11)* Geni

PTPN11 (MIM* 176876) geni kromozom 12q24.13'de haritalanmıştır, 16 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 68 kd ve 593 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (Athota vd., 2020). *PTPN11* geni protein tirozin fosfataz (PTP) ailesinin bir üyesidir, ubikuitöz reseptör olmayan tirozin fosfataz, Src homolog bölge 2 (SH2) alanı içeren tirozin fosfataz 2 veya SHP2 proteinini kodlar (Tajan, Rocca, Valet & Yart, 2015). *PTPN11* geninde saptanan patojenik varyasyonlar Noonan Sendrom (NS1) ile ilişkilendirmiştir (#163950). NS1'e sebep olan *PTPN11* geni patojenik varyasyonları, N-SH2 ve PTP alanlarının etkileşimli kısımlarında kümelenmiştir. Bu durumun aktif konformasyonda SHP-2'yi stabilize ettiği ve bu nedenle bir fonksiyon kazanımını indüklediği öne sürülmüştür (Tartaglia, 2002).

2.3.3.2 Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 1 *(SOS1)* Geni

SOS1 (MIM* 182530) geni kromozom 2p22.1'de haritalanmıştır, 23 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 152 kd ve 1333 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır (Athota vd., 2020). *SOS1* geni RAS proteini için GEF olan SOS1 proteinini kodlar (Hart vd., 2002). RAS-MAP kinaz yolağında, RAS proteini, GTP'yi GAP aracılığıyla GDP'ye hidrolize ederek etkisiz hale getirilir. Yeniden etkinleştirilmesi

için, RAS proteininin bağlı GDP'yi, SOS1 yoluyla GTP ile değiştirmesi gerekir (El Bouchikhi vd., 2016). *SOS1* geninde saptanan patojenik varyantlar Noonan Sendromu (NS4) ile ilişkilendirmiştir (#610733). SOS1 proteinin Dbl homoloji domainine yakın bölgede meydana gelen patojenik varyantların RAS-GEF aktivitesini inhibe ettiğini ve RAS-MAP kinaz yolunda fonksiyon kazanıma neden olduğu düşünülmektedir (Roberts vd., 2007; Lepri vd., 2011). *SOS1* geninde patojenik varyasyon ile ilişkili NS4 olgularında ektodermal anomali prevalansının yüksek olduğu bildirilmiştir (Lepri vd, 2011). Pulmoner stenozun, *PTPN11'*e oranla *SOS1* geninde patojenik varyant saptanan hastalarda daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Lee vd., 2011).

2.3.3.3 Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 2 *(SOS2)* Geni

SOS2 (MIM* 601247) geni kromozom 14q21.3'de haritalanmıştır, 28 ekzondan oluşur, 1332 aminoasit uzunluğundaki SOS2 proteinini kodlamaktadır (Chardin vd., 1993). *SOS2* geni ve *SOS1* geni % 70 oranında homologdur (Yamamoto vd., 2015). 2015 yılında Yamamoto ve ark.'ları *SOS2* geninde saptanan patojenik varyantlar ile Noonan Sendromunu (NS9) (#616559) ilişkilendirmiştir (Yamamoto vd., 2015). Bildirilen patojenik varyantlar SOS1'e benzer şekilde Dbl homoloji domainine yakın bölgede kümelenmektedir (El Bouchikhi vd., 2016). *SOS1'*e benzer şekilde, bu patojenik varyantlar ektodermal defektlerle ilişkilendirilmiştir (Yamamoto vd., 2015).

2.3.3.4 CAAX Motifi Olmayan RIC Benzeri Protein 1 (*RIT1*) Geni

RIT1 (MIM* 609591) geni kromozom 1q22'de haritalanmıştır, 6 ekzondan oluşur, 219 aminoasit uzunluğundaki RIT1 proteinini kodlamaktadır (El Bouchikhi vd., 2016). RIT1 proteini RAS ailesinin küçük GTPaz üyesidir (Hynds, Spencer, Andres & Snow, 2003). RIT1, Ras ile yaklaşık %50 yapısal homoloji gösterir ancak bir C-terminal lipidasyon bölgesi yoktur (Rauen & Tidyman, 2016). *RIT1* geninde saptanan patojenik varyantlar ile Noonan Sendromunu (NS8) (#615355) ilişkilendirilmiştir (Aoki vd., 2015). *RIT1* geninde patojenik varyant saptanan NS olgularda özellikle hipertrofik kardiyomiyopati ve pulmoner stenoz olmak üzere konjenital kalp anomalilerinin görülme sıklığının çok yüksek olduğu bildirilmiştir (El Bouchikhi vd., 2016).

2.3.3.5 Raf1 Protoonkogen, Serin/Threonin Kinaz (RAF1) Geni

RAF1 (MIM* 164760) geni kromozom 3p25.2'de haritalanmıştır, 17 ekzondan oluşur, 648 aminoasit uzunluğundaki RIT1 proteinini kodlamaktadır (Pandit vd., 2007). RAF protein ailesinin bir üyesi olan RAF1 proteini, Ras/MAPK yolağında MEK-ERK aktivasyonunda görev alan Serin/Threonin kinazdır (El Bouchikhi vd., 2016). *RAF1* geninde saptanan patojenik varyantlar, Noonan Sendromunu (NS5) (#611553) ile ilişkilendirmiştir (Pandit vd., 2007). Bu hastalarda hipertrofik kardiyomiyopati görülme riski yüksektir ((Pandit vd., 2007). RAF1 proteinin 3 adet korunmuş bölgesi (CR1, CR2, CR3) bulunmaktadır. Bu bölgelerde CR2 domaininde patojenik varyant saptanan olgularda hipertrofik kardiyomiyopati görülürken, CR3 domaninde patojenik varyant saptanan olgularda hipertrofik kardiyomiyopati saptanmamıştır (Razzaque vd., 2007).

2.3.3.6 NRAS Protoonkogen GTPaz (*NRAS*) Geni

NRAS (MIM* 164790) geni kromozom 1p13.2'de haritalanmıştır, 7 ekzondan oluşur, 189 aminoasit uzunluğundaki NRAS proteinini kodlamaktadır (El Bouchikhi vd., 2016). NRAS proteini RAS ailesinin küçük GTPaz üyesidir (Hynds, Spencer, Andres & Snow, 2003). Ras/MAPK yolağından mebran ilişkili moleküler anahtar görevi görür (Cirstea vd., 2010). *NRAS* geninde saptanan patojenik varyantlar ile Noonan Sendromunu (NS6) (#613224) ilişkilendirilmiştir (Cirstea vd., 2010). Genel bilgi patojenik varyasyontların Ras/MAPK yolağında sinyal iletimini arttırdığı doğrultusundadır (Cirstea vd., 2010). *NRAS* geni, onkogenler olarak bilinen Ras onkogen ailesindedir (NRAS, KRAS ,HRAS) (Ekval vd., 2015). Bu gende meydana gelen somatik patojenik varyasyonlar kanser gelişimde rol oynar (Nikiforova vd., 2003).

2.3.3.7 KRAS Protoonkogen GTPaz (*KRAS*) Geni

KRAS (MIM* 190070) geni kromozom 12p12.1'de haritalanmıştır, 5 ekzondan oluşur, 188 aminoasit uzunluğundaki KRAS proteinini kodlamaktadır (El Bouchikhi vd., 2016). KRAS proteini RAS ailesinin bir üyesidir, RAS-GAP'ler tarafından desteklenen, GTP'yi GDP'ye bağlayarak kendini etkisiz hale getiren içsel GTPaz aktivitesine sahiptir (Donovan, Shannon & Bollag, 2002). *KRAS* geninde saptanan patojenik varyantlar ile Noonan Sendromunu (NS3) (#609942) ilişkilendirilmiştir (Schubbert vd., 2006). Patojenik varyantlar KRAS proteinin GTPaz aktivitesini değiştirerek RAS-GAP'lere

duyarsızlık yaratır bu da Ras/MAPK yolağında fonksiyon kazanımına sebep olur (Carta vd., 2006). *KRAS* geninde patojenik varyasyon sonucu NS ile ilişkilendirilen olgularda ciddi entelektüel yetersizlik ve ağır fenotipik bulgular bildirilmiştir (Carta vd. 2006; El Bouchikhi vd., 2016).

2.3.3.8 B-Raf Protoonkogen Serin/Threonin Kinaz (*BRAF)* Geni

BRAF (MIM*164757) geni kromozom 7q34'de haritalanmıştır, 18 ekzondan oluşur, 766 aminoasit uzunluğundaki BRAF proteinini kodlamaktadır (El Bouchikhi vd., 2016). BRAF proteini RAF ailesine üyesi Serin/Treonin protein kinazdır (Wellbrock, Karasarides & Marais, 2004). Ras/MAPK yolağında MEK-ERK aktivasyonunda görev alır (El Bouchikhi vd., 2016). *BRAF* geninde saptanan patojenik varyantlar ile Noonan Sendromunu (NS7) (#613706) ilişkilendirilmiştir (Sarkozy vd., 2009). *BRAF* geninde saptanan patojenik varyantların ERK aktivasyonunu artırarak NS patogenezinde yer aldığı bildirilmiştir (El Bouchikhi vd., 2016). *BRAF* geninin patojenik varyantlarının diğer bir RAF ailesi üyesi olan *RAT1* genine oranla kinaz aktivitesini orta düzeyde arttırdığı bildirilmiştir (Lee vd., 2011).

2.3.3.9 Lösin Fermuar Benzeri Transkripsiyonel Regülatör 1 (*LZTR1*) Geni

LZTR1 (MIM* 600574) geni kromozom 22q11.21'de haritalanmıştır, 21 ekzondan oluşur, 840 aminoasit uzunluğunda, BTB-Kelch ailesine ait bir golgi proteinini kodlar (El Bouchikhi vd., 2016). BTB içeren proteinler, kromatin konformasyonunun düzenlenmesinden hücre döngüsüne kadar değişen temel hücresel süreçleri kontrol eder (Piotrowski vd., 2014). *LZTR1* tümör baskılayıcı bir gendir, germline ve somatik patojenik varyasyonları schwannomatosis (#615670) ve glioblastoma ile ilişkilendirilmiştir (Piotrowski vd., 2014; Franceschi vd., 2016). *LZTR1* geninden sentezlenen protein proteazomal bozunma sistemleri yoluyla dört RAS proteininin poliubikutinasyonuna, bunun sonucunda da RAS/MAPK yolağının sinyal iletiminde inhibisyonuna sebep olur (Abe vd., 2020). *LZTR1* geninin patojenik varyasyonlarının *LZTR1* geni aracılı RAS bozunma sisteminde işlev kaybına, bunun sonucunda da RASopatilere neden olması oldukça olasıdır (Motto vd., 2019). *LZTR1* geninde saptanan patojenik varyantlar ile Noonan Sendromunu (NS10) (#616564) ilişkilendirilmiştir (Yamamoto vd., 2015). Johnston vd. (2018) *LZTR1* geninde saptanan patojenik varyantlar

ile otozomal resesif kalıtım gösteren Noonan Sendromunu (NS2) (#605275) ilişkilendirmiştir. *LZTR1* genin saptanılan patojenik varyantların kalıtım modelinin farklılık göstermesi NS moleküler tanısının önemini ve genetik danışmadaki rolünü ortaya koymuştur (Johnston vd., 2018).

2.3.3.10 CBL Protoonkogen *(CBL)* Geni

CBL (MIM* 165360) geni kromozom 11q23.3'de haritalanmıştır, 16 ekzondan oluşur, 906 aminoasit uzunluğundaki CBL proteinini kodlamaktadır (Fu, Hsu, Tang & Shih, 2003). CBL proteini öncelikle bir E3 ubikuitin ligaz olarak işlev görür ve bozunma için reseptörleri hedefleyerek, protein tirozin kinaz sinyal yollarının negatif düzenleyicisi olarak görev yapar (Thien, Walker & Langdon, 2001). Germline patojenik *CBL* varasyonları bozulmuş reseptör ubikutinasyona bağlı olarak RAS hücre içi sinyal iletiminde düzensizliğe sebep olabilir (Martinelli vd., 2010). Martinelli vd. (2010) *CBL* geninde saptanan patojenik varyantlar ile Noonan sendromuna benzeyen bir gelişimsel bozukluk olarak bildirilmiş daha sonra *CBL* geninde heterozigot patojenik varyasyon kaynaklı Juvenil miyelomonositik lösemi olan veya olmayan Noonan sendromu benzeri bozukluk (NSLL) (#613533) olarak tanımlanmıştır.

2.3.3.11 SHOC2 Lösince Zengin Scaffold Protein *(SHOC2)* Geni

SHOC2 (MIM* 602775) geni kromozom 10q25.2'de haritalanmıştır, 9 ekzondan oluşur, 582 aminoasit uzunluğundaki SHOC2 proteinini kodlamaktadır (Selfors, Schutzman, Borland & Stern, 1998). SHOC2 proteini ERK1/ERK2 sinyal yolunun aktivasyonunda önemli rol oynar (Jang vd., 2019). RAS ailesinin üyesi olan HRAS, KRAS ve NRAS bağlanarak etki gösterdiği bildirilmiştir (Kwon & Hahn, 2021). 1991 ve 1997 yıllarında iki olguda Noonan sendromu ile ilişkili gevşek anagen saç bildirilmiştir (Tosti vd., 1991; Tosti vd., 1997). Komatsuzaki vd. (2010) NS, CS, CFC Sendrom tanılı olgularla *SHOC2* geninde patojenik varyant saptanan olguları karşılaştırmış, fenotipik örtüşmeler olmakla birlikte gevşek anagen/kolayca koparılabilir saç yapısı bildirilmemiştir. Bu bulgular sonucunda *SHOC2* geninde saptanan patojenik varyantlar ile Noonan Sendromu Benzeri Anagen Saçlı Hastalık 1 (NSLH1) (#607721) ilişkilendirilmiştir (Komatsuzaki vd., 2010).

2.3.3.12 RAS p21 Protein Aktivatörü 2 (RASA2) Geni

RASA2 (MIM*601589) geni kromozom 3q23'de haritalanmıştır, 24 ekzondan oluşur, 849 aminoasit uzunluğundaki RASA2 proteinini kodlamaktadır (Li, Satoh, Watanabe, Nakamura & Hattori, 1996). GAP ile ilgili alanı içeren rekombinant protein olarak ifade edilir, RAS'ın GTPaz aktivitesini uyardığı gösterilmiştir (Chen vd., 2014). *RASA2* geninde saptanan patojenik varyantlar, Noonan Sendromunu ile ilişkili aday gen olarak bildirmiştir (Chen vd., 2014).

2.3.4. Costello Sendromu

İlk olarak 1971 yılında Costello tarafından tanımlanmıştır. Costello Sendromu (CS) (#218040), yüksek doğum ağırlığı, yeni doğan döneminde ciddi beslenme güçlükleri sebebi ile gelişme geriliği gösteren; kısa boy; gelişimsel gecikme veya öğrenme güçlüğü; kaba yüz hatları (dolgun dudaklar, geniş ağız, belirgin burun ucu); kıvırcık veya seyrek, ince saç; derin palmar ve plantar kırışıklıkları olan gevşek, yumuşak cilt; yüz ve perianal bölgenin papillomaları; bileklerin ve parmakların ulnar deviasyonu ile yaygın hipotoni ve konjenital kalp anomalileri ile karakterize birçoklu sistem bozukluğudur (Gripp & Rauen, 2006).

Görülme sıklığı 1/300.000 olarak bildirilmektedir (Abe vd., 2012). Otozomal dominant kalıtım gösterir, Harvey rat sarcoma viral onkogen homolog (*HRAS*) geninde germline, heterozigot patojenik varyasyonlar CS'a sebep olur (Gripp vd., 2019). Hastaların büyük çoğunluğunda *de novo* olarak saptanmıştır, literatürde vertikal geçiş gösteren iki aile bildirilmiştir (Gripp & Rauen, 2006).

CS'li olgularda, çocukluk döneminde rabdomiyosarkom ve nöroblastom, ergen ve genç erişkin dönemde mesanenin geniş hücreli karsinomu dahil olmak üzere malign tümörler açısında %15 oranında artmış riske sahiptir (Gripp vd., 2019). CS tansı *HRAS* geninin moleküler genetik analizi sonucunda konulur (Gripp & Lin, 2012).

2.3.4.1 *HRAS* (Harvey Rat Sarcoma Viral Onkogen Homolog) Geni

HRAS (MIM* 190020) geni kromozom 11p15.5'de haritalanmıştır, 6 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 21 kd ve 189 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (Gripp & Lin, 2012). Ras onkogen ailesine ait, memeli sarkomu retrovirüslerinden transforme bir gendir. (Wong-Staal, Dalla-Favera, Franchini, Gelmann & Gallo, 1981).

HRAS geninde meydana gelen patojenik varyasyonlar RAS proteininin aktivasyonuna neden olan bir fonksiyon kazanımı ile sonuçlanır (Aoki vd., 2005).

2.3.5. Legius Sendromu

Legius Sendromu (LS) (#611431), nörofibromlar veya NF1'in diğer tümör belirtileri olmayan çoklu café au lait makülleri (CALM) ile karakterizedir (Brems & Legius, 2013). CALM bulgusuna ek olarak intertriginöz çillenme, lipomlar, makrosefali, öğrenme güçlüğü, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ve gelişimsel gerilik yer alır (Legius & Stevenson, 2010). Görülme sıklığı 1:46000 - 1:75000 aralığında bildirilmiştir (Legius & Stevenson, 2010).

Sprouty ilişkili EVH1 domain içeren protein 1 (*SPRED1)* geninde meydana gelen heterozigot patojenik varyasyonlar LS'e sebep olur (Legius & Stevenson, 2010). Otozomal dominant kalıtım gösterir (Legius & Stevenson, 2010). LS tansı *SPRED1* geninin moleküler genetik analizi sonucunda konulur (Brems & Legius, 2013).

2.3.5.1 *SPRED1* (Sprouty İlişkili EVH1 Domain İçeren Protein 1) Geni

SPRED (MIM*609291) geni kromozom 15q14'de haritalanmıştır, 7 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 50 kd ve 444 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (Brems & Legius, 2013). *SPRED1* geni, Spred-1 proteininin oluşumunda görev alır. Spred-1 proteini, Ras/MAPK yolağında yer alan Raf proteinine bağlanır, Raf aktivasyonunu bloke ederek, Ras/MAPK yolunun geri kalanı boyunca sinyalleşmeyi durdurur (Wakioka vd., 2001).

2.3.6. Kardiyofasyokutanöz Sendromu

İlk olarak Reynolds vd. (1986) tarafından tanımlanmıştır. Kardiyofasyokutanöz (CFC) Sendromu; kardiyak anormallikler (pulmoner stenoz, septal defektler, hipertrofik kardiyomiyopati, ritim bozuklukları), belirgin kraniyofasiyal görünüm ve kutanöz anormallikler, nörolojik ve/veya bilişsel gecikme ile karakterizedir (Rauen, 2007). Genel prevalansı bilinmemektedir, Japonyada 1/810000 olarak bildirilmiştir (Abe vd., 2012).

BRAF geni, *KRAS* geni, Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 1 *(MAP2K1)* geni ve Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 2 *(MAP2K2)* geninde saptanan patojenik varyantlar CFC sendrom ile ilişkilendirilmiştir (Pierpont vd., 2014). Otozomal

dominant kalıtım gösterir, hastaların büyük çoğunluğunda *de novo* olarak patojenik varyant saptanmıştır (Jurcă vd.,2021). CFC sendromunun tanısı klinik bulgulara ve moleküler genetik testlere dayanır (Rauen, 2007). CFC ile ilişkili olduğu bilinen genlerde patojenik varyantların dağılımı: *BRAF* (~%75), *MAP2K1* ve *MAP2K2* (~%25) ve *KRAS* (<%2) olarak bildirilmiştir (Rauen, 2007). CFC sendrom tanısı alan bireylerin malignite açısından artmış risk altında olup olmadığı belirsizdir (Pierpont vd., 2014).

2.3.6.1 B-Raf Protoonkogen Serin/Threonin Kinaz (*BRAF)* Geni

BRAF (MIM*164757) geni kromozom 7q34'de haritalanmıştır, 20 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 29 kd ve 807 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (Hussain vd., 2015). Serin/treonin protein kinazların RAF ailesine ait BRAF proteinini kodlar (Eychène, Barnier, Apiou, Dutrillaux & Calothy, 1992). Protein ekspresyonunda veya aktivitesinde bir artış Ras-MAPK sinyal yolağında hasara ve bu da NS, CFC sendrom ve CS neden olur (Hussain vd., 2015). *BRAF* geninde saptanant patojenik varyantlar CFC Sendrom (CFC1) (#115150) ile ilişkilendirilmiştir (Niihori vd., 2006). Yüksek kinaz aktivitesine sahip mutant BRAF proteinleri daha yüksek seviyelerde MEK ve ERK fosforilasyonu indükler (Rodriguez-Viciana vd., 2006).

2.3.6.2 Kras Protoonkogen GTPaz *(KRAS)* Geni,

KRAS (MIM*190070) geni kromozom 12p12.1'de haritalanmıştır, 5 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 29 kd ve 188 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (Popescu vd., 1985). Kirsten ras onkogen homoloğu olan memeli ras gen ailesinde, küçük GTPaz süper ailesinin üyesi olan bir proteini kodlar (Kranenburg, 2005). *KRAS* geninde saptanan patojenik varyantlar CFC Sendrom (CFC2) (#615278) ile ilişkilendirilmiştir (Niihori vd., 2006). CFC sendrom tanılı tanılı *BRAF* pozitif ve *KRAS* pozitif bireylerin fenotipik karşılaştırmasında, *KRAS* pozitif olgularda, *BRAF* pozitif olgularda bulunan iktiyoz, hiperkeratoz ve hemanjiyom gibi cilt anormalliklerinin olmadığını gözlemlemiştir (Niihori vd., 2006). *KRAS* patojenik varyantları, klinik olarak tanısı konulan CFC Sendrom veya NS bireylerde tanımlandığından *KRAS* protein ürünü GTPaz'ın CFS sendromundaki rolü henüz açıklığa kavuşturulmamıştır.

2.3.6.3 Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 1 *(MAP2K1)* Geni

MAP2K1 (MIM*176872) geni kromozom 15q22.1'de haritalanmıştır, 11 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 43 kd ve 393 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır Rampoldi vd., 1997). *MAP2K1* geni MAPK1 proteini kodlar, MEK1 olarak da bilinir (Chen vd., 2020). MAPK1, bir mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz kinaz olarak işlev gören ikili özgül protein kinaz ailesinin bir üyesidir, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK'ler) olarak da bilinir (Crews, Alessandrini & Erikson, 1992). *MAP2K1* geninde saptanant patojenik varyantlar CFC Sendrom (CFC3) (#615279) ile ilişkilendirilmiştir (Schulz vd., 2008). CFC Sendrom ile ilişkilili patojenik *MAP2K1* varyantları ERK fosforilasyonu uyardığı bildirilmiştir (Rodriguez-Viciana vd., 2006). CFC Sendromları içerisinde CFC3'ün ayırt edici özellikleri makrostomi ve palpebral fissürlerin yatay şeklidir (Schulz vd., 2008).

2.3.6.4 Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 2 *(MAP2K2)* Geni

MAP2K2 (MIM*601263) geni kromozom 19p13.3'de haritalanmıştır, 11 ekzondan oluşur, yaklaşık moleküler ağırlığı 44 kd ve 400 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (Puttangunta vd., 2000). *MAP2K2* geni, ERK2'yi aktive etme yeteneğine sahip treonin/tirozin kinaz olan mitojenle aktive protein kinazı 2'i (MEK2) kodlar (Rauen, 2007). *MAP2K2* geninde meydana gelen patajonik varyantlar CFC Sendrom (CFC4) (# 615280) ile ilişkilendirilmiştir (Nowaczyk vd., 2014). CFC Sendrom ile ilişkilili patojenik *MAP2K2* varyantları ERK fosforilasyonu uyardığı bildirilmiştir (Rodriguez-Viciana vd., 2006).

2.3.7. Multiple Lentijinli Noonan Sendromu

İlk olarak Gorlin, Anderson & Blaw (1969) tarafından LEOPARD sendromu adı ile tanımlanmıştır. Sendromun ismi bir akronimdir; multiple lentigines, elektrokardiyografik iletim anormallikleri, oküler hipertelorizm, pulmonik stenoz, anormal genitalya, büyüme geriliği ve sensörinöral sağırlık bulgularından alır (Gorlin, Anderson & Blaw, 1969). Günümüzde Multiple lentijinli Noonan Sendromu (NMSL) olarak da adlandırılmaktadır (Rauen, 2013).

NMSL; multiple lentijin, pektus deformitesi, dismorfik yüz görünümü, tanı alan olguların %85'inde kalp anomalileri, %50'sinde kısa boy, %20'sinde sensörinöral işitme

bozuklukları ve %30'unda öğrenme güçlüğü bildirilmiştir (Gelb & Trataglia, 2007). Multiple lentijin, 4 yaşına kadar görülmeyebilir fakat ergenlik ile birlikte sayıları binleri bulur (Gelb & Trataglia, 2007). NSML'nin popülasyon prevalansı bilinmemektedir (Sarkozy, Digilio & Dallapiccola, 2008).

PTPN11 geni, *RAF1* geni, *BRAF* geninde saptanan patojenik varyantlar NMSL ile ilişkilendirilmiştir (Kauffman vd., 2021). Otozomal dominant kalıtım gösterir, tanı alan olgularda *de novo* olarak patojenik varyant saptanmıştır (Gelb & Trataglia, 2007). *PTPN11* geninde saptanant patojenik varyantlar; LEOPARD Sendrom 1 (LRPD1) (#151100), *RAF1* geninde saptanant patojenik varyantlar; LEOPARD Sendrom 2 (LRPD2) (#611554), *BRAF* geninde saptanant patojenik varyantlar; LEOPARD Sendrom 3 (LRPD3) (#613707) olarak tanımlanmıştır. NSML tanısı klinik bulgulara ve moleküler genetik testlere dayanır (Gelb & Trataglia, 2007). Tanı kriterlerine bakıldığında multiple lentijinlere ek, 2 adet klinik bulgu (kalp anomalisi, dismorfik yüz vb.), Lentijin bulgusu yok ise 3 adet klinik bulgu ve hastalık tanısı almış birinci derece akraba varlığı klinik tanı koyulması için yeterlidir (Sarkozy, Digilio & Dallapiccola, 2008). NSML ile ilişkili olduğu bilinen genlerde patojenik varyantların dağılımı: *PTPN11* (~%95), *BRAF(<%2)* ve *RAF1*(<%3) olarak bildirilmiştir (Gelb & Trataglia, 2007). Villani ve arkadaşları NSML'li bireylerde genel tümör riskinin düşük olduğunu, dolayısıyla NSML'li bireyler için rutin bir sürveyansın önerilmediğini bildirmiştir (Villani vd., 2017).

2.3.7.1 Protein-Tirosin Fosfataz, Reseptör Olmayan Tip 11 (*PTPN11)* Geni

PTPN11 geninde NSML tanısında saptanan patojenik varyantlar ile NS tanısında saptanan patojenik varyantlar faklıdır ve varyantları, MAPK ve PI3k-AKT-mTOR sinyal yollakları üzerindeki etkileri de farklıdır (Gelb & Trataglia, 2007). NS da *PTPN11* de saptanan patojenik varyantlar fonksiyon kazanımına sebep olurken, NSML de saptanan patojenik *PTPN11* varyantları dominant negatif etkiye sebep olurlar (Zhu vd.,2020).

2.3.7.2 B-Raf Protoonkogen Serin/Threonin Kinaz (*BRAF)* ve Raf1 Protoonkogen, Serin/Threonin Kinaz (*RAF1*) Geni

BRAF ve *RAF1* genleri RAS-MAPK yolağındaki proteinleri fosforile eden kinazları kodlar. Bu proteinlerdeki değişikliklerin NSML'ye aracılık edebileceği kesin mekanizma(lar) bilinmemektedir (Gelb & Trataglia, 2007).

2.4. Yeni Nesil Dizi Analizi Yöntemi

DNA dizileme yöntemleri ilk olarak Maxam & Gilbert (1977) kimyasal kırılma yöntemi ve Sanger, Nicklen & Coulson (1977) didoksinükleotid (ddNTP- dideoksi nükleotid trifosfat) zincir sonlandırma yöntemi olmak üzere iki farklı yöntem olarak bildirilmiştir. Maxam & Gilbert yöntemi DNA'nın kimyasal modifikasyonuna dayanır ve toksik kimyasallar içermektedir (Verma, Kulshrestha & Puri, 2017). Sanger, Nicklen & Coulson zincir sonlandırma yönteminde 3'-OH grubu içermeyen nükleotidler (ddNTP) kullanılarak DNA polimeraz tarafından fosfodiester bağı oluşturulması önlenir bu da büyüyen DNA zincirinin bu konumda sonlandırılmasıyla sonuçlanır (Slatko, Gardner & Ausubel, 2018). Her iki yöntemde de diziyi belirlemek için jel elektroforezi ile analiz edilir (Hu, Chitnis, Monos & Dinh, 2021). Maxam & Gilbert yönteminde sonraki yıllarda toksik kimyasallar elimine edilse de Sanger sekanslama standart DNA sekanslama yöntemi olarak kabul edilmektedir (Slatko, Gardner & Ausubel, 2018). Sanger dizileme kılcal elektroforezin tanıtılmasıyla gelişmeye devam etti, bakteri ve fajlardan insanlara küçük ve büyük genomları dizilemek için "birinci nesil dizileme" yöntemi olarak geniş çapta kabul gördü (Verma, Kulshrestha & Puri, 2017).

Sanger sekanslama tekniği 2004 yılında ilk insan genom dizisinin tamamlanmasını sağlamıştır (IHGSC, 2004). İnsan Genomu Projesi çok uzun zaman ve büyük miktarda kaynak gerektirdi. Bununla birlikte daha hızlı, daha yüksek verimli ve daha ucuz teknolojilere ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymuştur (van Dijk, Auger, Jaszczyszyn & Thermes, 2014). Bu nedenle, aynı yıl (2004) Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü (NHGRI), insan genomu dizileme maliyetini on yıl içinde 1000 ABD Dolarına düşürmek amacıyla bir finansman programı başlattı (Schloss, 2008). Bu da yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojilerinin geliştirilmesini ve ticarileştirilmesini teşvik etti (van Dijk, Auger, Jaszczyszyn & Thermes, 2014).

İkinci nesil sekanslama yöntemi olarak da adlandırılan yeni nesil sekanslama (Next Generation Sequencing, Massively Parallel Sequencing, NGS) teknolojileri 2004 ile 2006 yılları arasında ilk olarak tanıtıldı (Hu, Chitnis, Monos & Dinh, 2021). Bakteriyel klonlama gerektirmemesi, binlerce sekans reaksiyonu yerine paralel sekanslama yapılması ve elektroforez ihtiyacı olmaksızın görüntülenmesi yöntemi Sanger sekanslamadan ayıran ilk geliştirmelerdir (van Dijk, Auger, Jaszczyszyn & Thermes,

2014). 2005 yılında kullanıma sunulan Roche 454 cihazı (Roche, Basel, İsviçre), piyasaya sunulan ilk NGS platformudur, günümüzde farklı ticari şirketler tarafından çeşitli ikinci nesil dizileme teknolojileri geliştirilmiştir (Zhong, Xu, Wu, Schubert & Li, 2021).

Yöntem DNA izolasyonu sonrası DNA'nın fragmentasyonu, fragmentlerin uç kısımlarına adoptörlerin eklenmesi, çalışmanın kapsamına uygun olarak (hedefli, tüm ekzon, tüm genom) zenginleştirme işleminin yapılması ve sonrasında sekanslama işleminden oluşmaktadır (Yohe & Thyagarajan, 2017). Sekanslama sonrası elde edilen ham veriler bir dizi biyoinformatik işlemlerden geçirilir bu işlemler; dizilerin kalitelerinin belirlenmesi (Qscore), sekans dizilerinin referans bir genom dizisi ile eşlenmesi (alignment), varyant tanımlama ve her bir baz için okuma derinliğinin belirlenmesidir (de Leng vd., 2016). Yapılan biyoinformatik işlemler sonucunda farklı formatta dosyalar oluşturulur. Ham sekans datasının yer aldığı dosya FASTQ, alignment sonrası elde edilen dosya BAM, varyant tanımlamalarının yapıldığı dosya ise VCF olarak isimdirilir (Van der Auwera vd., 2013). VCF formatına getirilen sekans verisi insiliko tahmin programları aracılığı ile değerlendirilir (Yohe & Thyagarajan, 2017).

2.4.1. Klinik Pratikte Yeni Nesil Sekanslama Uygulamaları

Sanger sekanslamanın tanı amacı ile kullanımında araştırılan genin veya lokusun önceden bilinmesi gerekmektedir fakat NGS tekniği seçiciliğe gerek olmaksızın yeni varyasyonlar ve hastalıkla ilişkili genlerin keşfetmek için tüm genom ve tüm ekzom analizi imkanı tanımıştır (Behjati & Tarpey, 2013). Bu sayede birden fazla genin veya gen bölgesinin tek bir test ile hızlı bir şekilde dizilenebilmesi NGS yönteminin klinik laboratuvarda hızla benimsenmesini sağlamıştır (Yohe & Thyagarajan, 2017). Kullanım alanları genetik hastalıkların tanısı, kanser olgularının tanı, tedavi ve prognozu, kanserde öncü biyomarkerların değerlendirilmesi, enfeksiyon hastalıklarında profillendirme, epidemiyoloji çalışmaları, prenatal tanı gibi bir çok klinik alanda sınırsız uygulaması bulunmaktadır (Zhong, Xu, Wu, Schubert & Li, 2021). Ayrıca transkriptom, epigenetik analizler ve metagenomiks gibi farklı amaçlar için de kullanılmaktadır (31çta31., 2021; Zhang, He & Cai, 2018).

Birçok çalışmada NGS ile diğer DNA analizi yöntemlerinin tanı koyma oranlarını karşılaştırıldığında; arrayCGH yönteminin tanı oranı %15-20 (Miller vd. 2010), WES analizinin mendeliyen hastalıklar için tanı oranı %25 (Yang vd., 2013), tüm genom

sekanslama (WGS) %27 (Jacob vd., 2013) oranında pediatrik ve yetişkin genetik hastalıklar için tanısal verime sahip olduğu bildirilmiştir (Zhong, Xu, Wu, Schubert & Li, 2021). Hedefli gen panellerinde ise belirli bir hastalık grubuna bağlı olarak birkaç taneden yüzlercesine ulaşan gen gruplarına odaklanıldığı için WES ve WGS analizlerine oranla tanı oranın belirgin olarak arttığı saptanmıştır (Zhong, Xu, Wu, Schubert & Li, 2021).

Rutin de klinik bir fenotiple ilişkili genler için hedefli paneller, genellikle kalıtsal hastalıklar için ilk basamak NGS yaklaşımını oluşturur (Sawyer vd., 2016). Tüm ekzom dizilimi (WES) ise, hedefli testin bilgi vermediği ya da hedefli test planlanamadığı durumlarda uygulanır (Yang vd., 2013). WES testi planlanırken genellikle proband (fenotipin ilk kez ortaya çıktığı birey) ve her iki ebeveyninin de analizi (Trio, üçlü test) varyantların doğru bir şekilde yorumlanması için önemlidir (Yang vd., 2013).

NGS ile elde edilen varyantların sınıflandırılmasında farklı kriterler bulunmakla birlikte en çok kabul gören 2015 ACMG (Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji) kriterleridir (Richards vd., 2015). Bu kriterlere göre, varyantlar "Patojenik (P)", "Muhtemel Patojenik (LP)", "VUS (önemi belirsiz varyant)", " Benign (B)" ve "Muhtemel Benign (LB)" olarak isimlendirilir (Richards vd., 2015). Varyantların değerlendirilmesinde in siliko analiz programları kullanılır. İn-siliko tahmin araçları nükleotid (Mutation Taster), amino asit (SIFT) ve protein seviyesinde (PolyPhen2) varyantın potansiyel etkisinin değerlendirilmesini, toplumda görülme sıklığını (ExAC veritabanı), evrimsel korunmuşluğu (GERP skoru) ya da daha önce bu varyantın her hangi bir hastalık ile ilişkisi (HGMD, ClinVar, OMIM) ile ilgili bize bir bilgi sağlar. Her programda farklı bir algoritma kullanılmaktadır. Elde edilen verinin doğruluğu birden fazla program ile karşılaştırılmalı ve gerekli görülen olgulardan segregasyon analizi yapılmalıdır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Örneklem Grubunun Oluşturulması

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Perinatoloji Bilim Dalı polikliniğinde NT artışı ve/veya KH saptanan gebeler girişimsel işlem öncesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğine genetik danışma amacı ile yönlendirildi. Genetik danışma sonrası girişimsel işlem uygulanan gebelerin rutin takipleri yapıldı. Çalışmaya dahil edilme/edilmeme kriterleri aşağıdaki belirtilmiştir.

Örneklerin çalışmaya dahil edilme kriterleri;

Girişimsel işlemler sonrası rutin olarak yapılan anöploidi FISH, kromozom analizi, arrayCGH analizlerinde patojenite saptanmayan olgular çalışmaya dahil edildi.

Örneklerin Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri;

Girişimsel işlem sonrası rutin olarak yapılan anöploidi FISH, kromozom analizi, arrayCGH analizlerinden birinde patojenite saptanan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.1.2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını, katılımın tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olduğunu, katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin araştırmadan çekilebileceklerini bildiren "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" çalışmaya dahil edilen gebelerden yazılı onayları alınarak saklandı (Ek 1).

3.1.3. Etik Kurul Onayı

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulunun 01.07.2019 tarih, 12/09 karar numarası ve sayılı belgesi (TÜTF-BAEK 2019/265) ile çalışmanın etik kurul onayı alındı (Ek-2).

3.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri Çizelge 3.1'de özetlendi.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

• High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Almanya)
• Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
• NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles) (Flowcell, Buffer, Kartuş)
• Qubit Assay Tüp (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
• 15 ml'lik Falkon Tüp (Isolab)
• 1.5 ml LoBind Tüp (Eppendorf, Hamburg, Almanya)
• 0.2 ml PCR Tüp (Axygen Biosciences, Union City, Amerika Birleşik Devletleri)
• 50 ml'lik Falkon Tüp (Isolab)
• Ethanol (%99) (Isolab)
• Hibridizasyon Buffer (HT1)
• Distile Su (Qiagen)
• 10 µl'lik pipet ucu
• 100 µl'lik pipet ucu
• 1000 µl'lik pipet ucu
• Nitril Eldiven
• 5 ml'lik steril Pastör Pipet

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.2'de listelendi.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

• Santrifüj (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
• Vorteks (LMS, Tokyo, Japan)
• Applied Biosystem 3500 Sanger Sekans dizileme Cihazı (Applied Biosystem, Kalifornia, ABD)
• QIAgility (Qiagen, Hilden, Almanya)
• Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
• NextSeq™ 550 Sequencing System (Illumina, Cambridge, İngiltere)
• Real-Time PCR (Qiagen, Rotor-Gene Q, Almanya)
• Applied Thermal Cycler (PCR Cihazı) (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
• Tek kanallı Pipetler (0,2-10ul / 2-20 ul / 20-100 ul/ 100-1000ul) (Eppendorf, Hamburg, Almanya)
• DynaMag-96 Side (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
• +4°C Soğuk Blok (Qiagen, Hilden, Almanya)
• Sensquest Thermal Cycler (PCR Cihazı) (Labcycler, Hilden, Almanya)
• DynaMag -2 Magnet (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
• Çok kanallı Pipet (2-20 ul) (Eppendorf, Hamburg, Almanya)

Çalışmada NGS panelinde kullanılan bileşenler Çizelge 3.3'de yer almaktadır.

Çizelge 3.3. Yeni Nesil Sekanslama panel bileşenleri (Qiagen)

• Fragmantasyon Buffer, 10X
• QIAseq A Read 1 Primer
• HotStar Tag DNA Polimeraz
• İlgili Genlere Özel Primerleri İçeren Custom Probe
• QIAseq Purifikasyon Bead
• Fragmantasyon Enzim Mix
• DNA Ligaz
• FERA Solusyonu
• Ligasyon Solusyonu
• IL-N7## Index Adaptor
• IL-S5## Index Adaptor
• TEPCR Buffer, 5X
• UPCR Buffer, 5X
• QIAseq™ Library Quant Assay Kit
• Ligation Buffer, 5X
• IL-Forward Primer

3.2. Yöntem

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Perinatoloji Bilim Dalı polikliniğinde NT artışı ve/veya KH saptanan gebelere ayrıcı tanı amacı ile girişimsel işlem uygulanmıştır. Gebelik haftasına uygun olarak elde edilen AS veya CVS örneklerinden uzun süreli hücre kültürü yapıldı. Çalışmamızda kullanılan fetal DNA örneği, uzun süreli hücre kültürü sonrası hücre kültüründen DNA izolasyonu ile elde edildi.

Çalışmanın laboratuvar işlemleri Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışma esnasında kullanılan yöntemler aşağıda sırasıyla belirtilmiştir. Çalışmaya dahil edilen gebelerin, rutin analizlerinde kullanılan fetal DNA örneği çalışmada da kullanılmıştır. Gebelerden çalışma amacıyla ek bir örnek alınmadı.

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

AS veya CVS materyalinden uzun süreli hücre kültürü yapılması amacı ile her gebeye ait örnek iki farklı besi yeri kullanılarak, üç ayrı flaska ekildi. Ekim sonrası üremesi olan iki flaskı kromozom analizinde, bir flask ise fetal DNA eldesi amacıyla DNA izolasyonunda kullanıldı.

Uzun süreli hücre kültüründen DNA izolasyonu yapabilmek için öncelikli olarak flaskın zemine yapışık halde bulunan hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması gerekir. Bu amaçla işlem sıralamamız;

1- Flaskın içerisinde yer alan besi yeri 15 ml falkon tüpe boşaltılır.

2- Flaskın yüzeyi 1cc Tripsin-EDTA ile yıkanır. Tripsin 15 ml falkon içerisine boşaltılır.

3- Flaskın içerisine tekrardan 1cc Tripsin-EDTA eklenir ve 37°C'deki etüvde 3 dk süre ile inkübe edilir. Sonrasında invert mikroskop aracılığıyla hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları değerlendirilir. Bazı durumlarda mekanik güç uygulayak bu süreç hızlandırılmaktadır.

4- Yeterli oranda hücrenin yüzeyden ayrıldığına karar verildiğinde, flaskın içerisinde yer alan sıvı 15 ml falkona boşaltılır. Flaskın yüzeyi içeriğinde %20 Fetal Bovine serum olan RPMI besi yerinden 3cc kullanılarak yıkanır. Yıkama solüsyonu da 15 ml falkona aktarılır. DNA izolasyonunda kullanacağımız hücreler artık 15 ml falkonda bulunmaktadır. Falkon 1200 rpmda 8 dk santrifüj edilir. Flask üzerine 3 cc A10 besiyeri eklenerek, alt kültür olarak saklanmak üzere CO_2'li inkübatöre kaldırılır.

5- Santrifüj sonrası örneğin süpernatant kısmı atılır. Pellet vortexlenir. Üzerine %20 Fetal Bovine serum içeren RPMI besi yerinden 5cc eklenir. Örnek 1200 rpmda 8 dk tekrar santrifüj edilir.

6- Santrifüj sonrası süpernatant atılır. Pellet DNA izolasyonunda kullanılır.

Fetal DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak, kitin izolasyon protokolüne göre yapıldı. Aşamaları;

1- 200 µl pellet üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K eklenerek. 70°C'de 10 dk inkübasyona bırakılır.

2- İnkübasyon sonrası örneğin içerisine 100 µl izopropanol eklenir. Pipetaj yapılır. Örneğin tamamı High Pure filtreli tüpe aktarılır. 8000g'de 1dk santrifüj edilir.

3- Santrifüj sonrası filtreli tüpün altında yer alan toplama tüpündeki sıvı atılır. Filtreli tüpe 500 µl Removel Buffer eklenir. 8000g 1dk santrifüj edilir.

4- Santrifüj sonrası filtreli tüpün altında yer alan toplama tüpündeki sıvı atılır. Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer eklenir. 8000g 1dk santrifüj edilir.

5- Santrifüj sonrası filtreli tüpün altında yer alan toplama tüpündeki sıvı atılır. Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer eklenir. 13000g 10 saniye santrifüj edilir.

6- Santrifüj sonrası filtreli tüpün altında yer alan toplama tüpü atılır. Filtrenin altına 1,5 ml'lik ependorf tüp yerleştirilir. Filtreli tüpün üzerine 50 µl 70°C'de ısıtılmış Elution Buffer eklenir. Elution buffer ile 5 dk inkübasyon sonrası 8000g 1dk santrifüj edilir.

7- Santrifüj sonrası filtreli tüpün altında yer alan toplama tüpünde DNA örneği yer almaktadır. Filtreli tüp atılır. DNA örneği kodlanıp, hastaya ait özel kod bilgileri yazılır.

Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kiti (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak *Qubit 4 Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) cihazında fetal DNA'ların konsantrasyonları ölçüldü. Konsantrasyon ve saflık kontrolünden geçen her bir fetal DNA örneği hasta haklarının korunması ve etik değerler sebebi ile kod verilerek, -20 ºC'de uygun şartlar altında saklandı.

3.2.2. Hedef Gen Panellerinin Hazırlanması

Literatür araştırması sonucunda NT artışı ve/veya KH ilişkili olduğu düşünülen Rasopati hastalık grubu ile ilgili toplam 18 gen (*BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1, MAP2K21, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RASA2, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1*) çalışmaya dahil edildi. Amplikon temelli Qiaseq panel kullanılarak 18 gen dizilendi. Çalışmada ilgili genlerin tüm ekzon bölgelerinin dizilenmesine dikkat edildi. Çalışılan 18 genin tanımı, NCBI gen ID, kromozomal

lokasyonu, transkript ID (Identifier), NCBI Referans ve kalıtım şekilleri Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. RASopati ile ilişkili Genlere ait bilgiler

Gen İsmi	Gen Tanımı	NCBI Gen ID	Kromozom Lokasyonu	Transkript ID	NCBI Referans	Kalıtım Paterni
BRAF	B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Treonin Kinaz	673	7q34	ENST00000288602.6	NM_004333.6	OD
CBL	Cbl Proto-Onkogen, E3 Ubikuitin Protein Ligaz	867	11q23.3	ENST00000264033.4	NM_005188.4	OD
HRAS	Harvey Rat Sarkom Viral Onkogen Homolog	3265	11p15.5	ENST00000451590.1	NM_001130442.2	OD
KAT6B	Lizin Asetiltransferaz 6B	23522	10q22.2	ENST00000287239.4	NM_012330.4	OD
KRAS	Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogen Homolog	3845	12p12.1	ENST00000256078.4	NM_033360.4	OD
LZTR1	Lösin Fermuar Benzeri Transkripsiyonel Regülatör 1	8216	22q11.21	ENST00000215739.8	NM_006767.4	OD/OR
MAP2K1	Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 1	5604	15q22.31	ENST00000307102.5	NM_002755.4	OD
MAP2K2	Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz Kinaz 2	5605	19p13.3	ENST00000262948.5	NM_030662.4	OD
NF1	Neurofibromin 1	4763	17q11.2	ENST00000358273.4	NM_001042492.3	OD
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Onkogen Homolog	4893	1p13.2	ENST00000369535.4	NM_002524.5	OD
PTPN11	Protein-Tirosin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11	5781	12q24.13	ENST00000351677.2	NM_002834.5	OD

RAF1	Raf1 Protoonkoge,Serin/Threonin Kinaz	5894	3p25.2	ENST00000251849.4	NM_002880.3	OD
RASA2	RAS P21 Protein Aktivatör 2	5922	3q23	ENST00000286364.3	NM_006506.5	OD
RIT1	CAAX Motifi Olmayan RIC Benzeri Protein 1	6016	1q22	ENST00000368322.3	NM_001256821.2	OD
SHOC2	SHOC2 Lösince Zengin Scaffold Protein 2	8036	10q25.2	ENST00000369452.4	NM_007373.4	OD
SOS1	Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 1	6654	2p22.1	ENST00000426016.1	NM_005633.3	OD
SOS2	Sos Ras/Rac Guanin Nükleotit Değişim Faktörü 2	6655	14q21.3	ENST00000216373.5	NM_006939.4	OD
SPRED1	Sprouty ilişkili EVH1 domain içeren protein 1	161742	15q14	ENST00000299084.4	NM_152594.3	OD

3.2.3. NGS ile Genlerin Dizilenmesi

Kütüphanelerin Oluşturulması

Fetal DNA örnekleri kullanılarak, RASopatiler ile ilişkili 18 geni içeren kütüphanelerinin oluşturulması için amplikon temelli Qiaseq yöntemi kullanıldı. Yöntemin iş akış şeması genomik DNA, UMI ve index eklenmesi, hedef zenginleştirme, amplifikasyon, kütüphane kantitasyonu ve kütüphanelerin yüklenmesi basamaklarını içermektedir. İşlem basamakları aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Genomik DNA:

1. Çalışmada kullanılacak fetal DNA örnekleri final hacmi 16,75 µl ve konsatrasyonu 10-40 ng aralığında olacak şekilde hazırlandı.
2. Fetal DNA'nın fragmentasyonu için; 2,5 µl *Fragmentasyon Buffer*, 10X *Ligasyon* Solüsyonu, 0,75 µl *FERA* solüsyonu ve 5 µl Fragmentasyon Enzim karıştıralarak oluşturulan mix fetal DNA'nın üzerine eklendi.
3. 4°C'ye getirilen Termal Cycler'a tüpler yerleştirildi ve PCR başlatıldı. DNA Fragmentasyon PCR koşulları Çizelge 3.5'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. Fragmentasyon PCR koşulları

4 °C	**32 °C**	**72 °C**	**4 °C**
1 Dakika	24 Dakika	30 Dakika	1 Dakika

UMI ve Indeks Eklenmesi:

4. PCR sonrası örnekler +4 °C soğuk blok üzerine alındı.
5. Örnek indexleme aşaması da denilen bu aşamada PCR ile parçalara ayrılan DNA'nın *Unique Molecular Index* (UMI) ve 7## Index ile işaretlenmesi yapılır. 10 µl Ligasyon Buffer, 7,2 µl 5X Ligasyon Solusyonu, 2,8 µl IL-N7## Index ve 5 ul DNA ligaz PCR ürününün üzerine eklendi. Ardından örnekler kısa bir vorteks-spin yapılır ve PCR cihazına yerleştirilir.

6. Tüpler cihaza yerleştirildi ve PCR başlatıldı. İndexleme PCR koşulları; 20°C de 15 dakika olacak ayarlandı. 15 dakika sonunda örnekler cihazdan alındı (Bu aşamada örnekler -20°C'de 3 gün saklanabilir).

7. *QIAseq Bead*'ler (Magnetik boncuk) kullanılarak indexlenmiş DNA parçaları temizlenir. Bu amaçla tüm reaksiyon hacmi, 50 µl nukleaz içermeyen su ve 100 ul *QIAseq Bead* 1.5 ml'lik DNA lobind tüp içerisine konuldu. Pipetaj yapılıp homojen hale getirildi.

8. 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Oda ısında inkübasyon sonrası 10 dakika magnetik stand üzerine alındı.

9. Magnetik boncuklar sıvıdan ayrıldıktan sonra magnetik boncuklara temas edilmeden üst sıvı alınıp, atıldı.

10. Magnetik stand üzerinde bulunan tüp içerisine taze hazırlanmış %80'lik ethanol çözeltisinden 200 µl eklendi. Hafifçe çevrilerek boncukların yıkanması sağlandı. Üst sıvı alınıp, atıldı.

11. Alkol aşaması bir kez daha tekrarlandı (10. aşama tekrarlandı). Tüp içerisinde alkol uzaklaşması için magnetik stand üzerindeki tüp oda ısısında kurumaya bırakıldı.

12. Alkol ortamdan uzaklaştığı gözle tespit edildikten sonra 52 µl nukleaz içermeyen su eklendi. Pipetaj yaparak homojen hale getirildi.

13. Homojen haldeki örnekler tekrar magnetik stand üzerine alınarak sıvının berraklaşması beklendi.

14. Berraklaşan sıvıdan 50 µl örnek alındı ve yeni bir lobind tüp içerisine aktarıldı. Üzerine 50 µl *QIAseq Bead* eklenerek homojen olana kadar pipetaj yapıldı. Oda ısısında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

15. İnkübasyon sonrası örnek magnetik stand üzerine alındı ve 5 dakika oda ısısında stand üzerinde inkübasyona bırakıldı.

16. Magnetik boncuklar sıvıdan ayrılınca boncuklara dokunmamaya dikkat edilerek sıvı uzaklaştırıldı.

17. Magnetik stand üzerindeki örneğin içerisine 200 µl %80'lik ethanol çözeltisi eklendi. Magnetik boncukların alkol ile temizlenmesi amacı ile stand saat yönünde ve saat yönünün tersi olacak şekilde 90°'lik açı ile döndürüldü.

18. Sıvı uzaklaştırıldı ve 17. Basamakda yer alan işlem tekrarlandı.

19. Tüpteki alkolün uzaklaştırılması için örnekler 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

20. Magnetik stand üzerinde yer alan magnetik boncukların üzerine 12 µl nukleaz içermeyen su eklendi ve pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Sıvı berraklaşana kadar stand üzerinde beklendi. Ardından berrak sıvıdan 9,4 µl örnek alınarak temiz bir PCR tüpüne alındı.

Hedef Zenginleştirme:

21. 9,4 µl örnek (hedef kütüphane) üzerine 4 µl *TEPCR Buffer*, 5X Ligasyon Solusyonu, 0,8 µl *IL-Forward Primer*, 5 µl *QIAseq Targeted DNA Panel* (Sentetik oligonükleotid karışımı) oluşan mix ve 0,8 µl HotStar Taq DNA Polimeraz eklendi Vorteks-spin yapıldı. Bu aşamada ilgili genleri içeren sentetik oligonükletidler kullanılarak hedef zenginleştirme işlemi yapılmaktadır. Hedef zenginleştirme PCR koşulları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Hedef zenginleştirme PCR koşulları

Denatürasyon		**8 Döngü**		**1 Döngü**		
95°C	**98 °C**	**98 °C**	**68 °C**	**72 °C**	**4 °C**	**4 °C**
13 Dakika	2 Dakika	15 Saniye	10 Dakika	5 Dakika	5 Dakika	∞

22. PCR işlemi sonrası son hacmi 20 µl olan PCR reaksiyonu, 1.5 ml'lik Lobind tüpe aktarıldı. 80 µl nukleaz içermeyen su ve 100 µl *QIAseq Bead* ilave edilir. Pipetaj yardımıyla homojen hale getirilir. 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır.

23. Oda ısısında inkübasyon sonrası 5 dakika magnetik stand üzerinde magnetik boncukların uzaklaşması beklendi. Boncuklar ayrıldıktan sonra sıvı uzaklaştırıldı.

24. Magnetik stand üzerindeki tüpün içerisine 200 µl %80'lik ethanol çözeltisi eklendi. Tüp elimizde döndürülerek boncuklar yıkandı, sıvı ortamdan uzaklaştırldı. Sonrasında tekrar 200 µl %80'lik ethanol çözeltisi eklenerek tekrar yıkandı.

25. Tüpteki tüm alkol 5 dakika oda ısında sonra da 5 dakika magnetik stand üzerindeyken buharlaştırılmaya bırakıldı. Alkolun uzaklaştığı gözle kontrol edildi.

26. Magnetik boncukların üzerine 16 µl nukleaz içermeyen su ilave edildi, hafifçe pipetaj yapıldı. Tekrar magnetik stand üzerine alındı.

Amplifikasyon:

Bu aşamada Universal PCR amplifikasyonu geçildi. İçerisinde liyofilize halde, birbirinden farklı IL-S5## Index'ler içeren strip tüplerde kullanılarak Universal PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi.

27. Magnetik boncuklara dokunmadan 13,4 µl berraklaşan sıvı alındı ve her bir olguya ait örnek stripte yer alan farklı bir kuyuya eklendi.

28. Strip tüpler içerisine 4 µl *UPCR Buffer*, 1,6 µl nukleaz içermeyen su ve 1 µl HotStart Taq DNA polimerazdan oluşan mix eklendi. Universal PCR amplifikasyon koşullarına uygun olarak PCR işlemi gerçekleştirildi (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Universal PCR amplifikasyon koşulları

Denatürasyon		**20 Döngü**		**1 Döngü**		
95°C	**98 °C**	**98 °C**	**60 °C**	**72 °C**	**4 °C**	**4 °C**
13 Dakika	2 Dakika	15 Saniye	2 Dakika	5 Dakika	5 Dakika	∞

29. PCR sonrası tüm PCR reaksiyonu hacmi 1.5 ml'lik Lobind tüpe aktarıldı. Üzerine 80 µl nukleaz içermeyen su ve 100 µl QIAseq Bead ilave eklendi. Pipetaj yardımı ile homojen hale getirildi. 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

30. Oda ısısında inkübasyon sonrası 5 dakika magnetik stand üzerinde bekletildi. Magnetik boncukların ayrışması sonrası sıvı alınıp, atıldı.

31. Magnetik stand üzerindeki tüpün içerisine 200 µl %80'lik ethanol çözeltisi konuldu. Magnetik boncukların dağılamamasına özen gösterilerek yıkandı. Sıvı ortamdan uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi tekrarlandı.

32. Yıkama işlemi sonrası Lobind tüpteki sıvı uzaklaştırıldı ve magnetik stand üzerindeyken oda ısısında 10 dakika alkolün buharlaşması beklendi.

33. Alkolden uzaklaştığı gözlemlendikten sonra magnetik boncukların üzerine 32 µl nukleaz içermeyen su ilave edildi. Homojen bir şekilde dağılana kadar hafifçe pipetaj yapıldı. Tekrar magnetik stand üzerine alındı. Oda ısısında magnetik boncukların ayrışması beklendi. Berraklaşan sıvıdan 28 µl alınarak, 0,2 µl'lik yeni bir PCR tüpüne aktarıldı.

34. 0,2 µl'lik PCR tüpü içerisinde yer alan kütüphaneler -20°C buzdolabında saklandı.

Kütüphane Kantitasyonu:

35. *QIAseq Library Quant Assay Kit* ve Rotor Gene Real Time PCR cihazı kullanılarak, hazırlanan kütüphanenin kantitasyonu değerlendirildi.

36. Kütüphane örnekleri, 1/50'lik, 1/5000'lik ve 1/50.000'lik olacak şekilde sıralı dilüsyon serilerinde hazırlandı. *QIAseq Library Quant Assay* kit içerisinde yer alan ILM DNA standardından da 5 adet seri dilüsyon hazırlandı.

37. SYBR Green boya kullanılarak PCR hazırlandı. SYBR Green PCR bileşenleri Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. SYBR green PCR Bileşenleri

Reaktifler	**Hacim (µl)**
Nukleaz İçermeyen Su	6.7 µl
SYBR Green ROX FAST MasterMix	10 µl
Primer Mix (10 µM)	0.8 µl

38. Hazırlanan SYBR Green boya karışımı 17,5 µl olarak dağıtıldı ve her bir tüp üzerine 2,5 µl dilue edilen standart eklendi. Çalışmada tüm örnekler 3 tekrar örnek ve 3 tekrar NTC (Non Template kontrol- Su kontrol) kontrol olacak şekilde hazırlandı.

39. 1/50, 1/5000 ve 1/50.000 olarak dilue edilen kütüphaneler de sırasıyla eklendi, Real Time PCR cihazına yüklendi. PCR protokülü Çizelge 3.9'de verilmiştir.

Çizelge 3.9. Real-Time PCR protokolü

95°C	**95°C**	**68°C**	**65°C**	**60°C**
10 Dakika	15 Saniye	5 Saniye	5 Saniye	60 Saniye*
1 Döngü	**30 Döngü**			
*** 30. Döngü sonunda floresans ışıma için veri toplanmaktadır.**				

40. RT-PCR sonrası örnekler Green kanaldan analizleri yapıldı. Tüm dilue edilen örneklerden elde edilen C_T (threshold cycle, reaksiyona girdiği döngü) değerleri Nanomolar (nM) cinsine çevrilerek (1000 pikomolar = 1 Nanomolar), kütüphanelerin kantitasyonu yapıldı.

Yeni Nesil Dizi Analizi Cihazına Kütüphanelerin Yüklenmesi :

- Kantitasyonu yapılan örnek kütüphaneleri, yükleme konsantrasyonu 4 nM'e olacak şekilde nükleaz içermeyen su kullanılarak hazırlandı.
- Her örnekten 5 µl alınarak ortak bir kütüphane hazırlandı. Kütüphanenin denatürasyonu için 0,2N NaOH çözeltisi kullanıldı.
- Temiz bir PCR tüpü içerisine 4 nM olan örnekten 5 µl ve 0,2 N NaOH çözeltisinden 5 µl eklenerek, pipetaj yapıldı. Oda ısısında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonrası denatürasyonunu durdurmak için 5 µl 200 mM konsatrasyonunda ki Tris HCL (Hidroklorik Asit) çözeltisinden eklendi.
- Temiz bir 1,5ml'lik eppendorf tüp üzerine 20 pM yazıldı. Eppendorfun içerisine 985 µl HT1 ve 15 µl denaturasyonu yapılmış kütüphane örneği (5 µl 4nM kütüphane + 5 µl 0,2 N NaOH + 5 µl 200mM TrisHCL) eklendi. Pipetaj yapılarak homojen hale getirildi.
- Temiz bir 1,5ml'lik eppendorf tüp üzerine 1,5 pM yazıldı. Ependorf tüp içerisine 1203 µl HT1 ve 20 pM kütüphaneden 97 µl eklendi. Pipetaj yapılarak homojen hale getirildi.
- Temiz bir 1,5ml'lik eppendorf tüp içerisine 1994 µl HT1 eklendi ve içerisine 6 µl 100 µM Read 1 Primer eklendi ve homojen bir şekilde karıştırıldı.
- 1,5 pM olarak hazırlanan kütüphanenin tüm hacmi ve Read 1 Primer ile hazırlanan tüm hacim NextSeq kartuşunda ilgili kısımlara yüklendi.

- Cihaz bileşenleri olan NextSeq Flowcell, NextSeq kartuş, Buffer ve atık kutusu cihazda ilgili kısımlara yerleştirildi (Şekil 3.1) ve sekanslama başlatıldı.



Şekil 3.1. NextSeq 550 dizileme cihazı

3.2.5. Biyoinformatik Analiz

Her bir örnekten elde edilen FastQ verileri referans olarak kabul edilen insan genom (Hg19/GRCh37) dizisi ile karşılaştırıldı. Biyoinformatik analizde *Qiagen Clinical Insight* (QCI) çevrimiçi biyoinformatik analiz programları kullanıldı. *Qiagen Clinical Insight* biyoinformatik analiz programları, varyasyonların tespit edilmesi ile birlikte saptanılan varyantın filtrelenmesi ve değerlendirilmesine amacıyla da kullanıldı.

Varyasyonların patojenitesininn değerlendirilmesinde QCI ile birlikte açık erişimli tahmin araçları olan Franklin, VarSome (*The Human Genomics Community*) ve ClinVar veri girişleri kullanıldı. ACMG-2015 kriterleri dikkate alınarak patojenite skorlaması yapıldı. Biyoinformatik analiz programlarınca saptanılan varyantlar ile ilgili literatür taraması yapıldı. Varyantın saptandığı genin kalıtım paterni ve fenotip-genotip ilişkisini değerlendirilmesi amacıyla OMIM veri bankası kullanıldı. İn-siliko analiz için Mutation Taster, PolyPhen, SIFT, DANN skoru, CADD Skoru, Gerp skoru verileri patojenitenin değerlendirilmesinde gözden geçirildi. Ayrıca ilgili genlerin sekans

dizilerinin görsel olarak incelenmesi için *Integrative Genomics Viewer* (IGV) programının güncel formatı kullanılarak varyant doğrulaması yapıldı.

3.2.7. Sanger Sekans Yöntemi İle Varyantların Doğrulanması

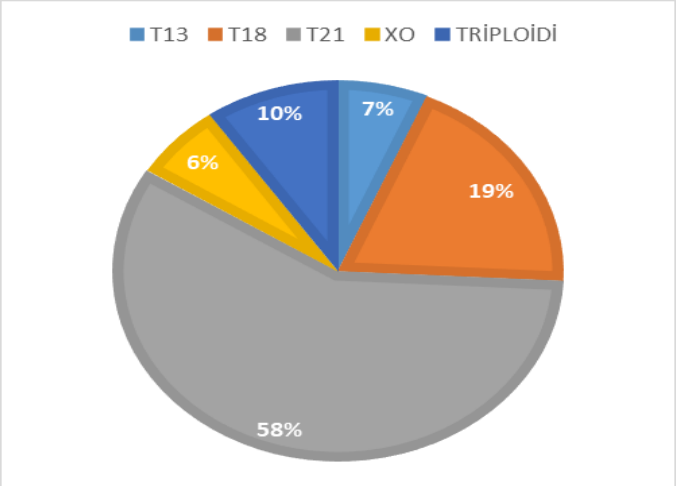
Yapılan biyoinformatik analiz sonucunda patojenik ya da muhtemel patojenik saptanılan varyantların doğrulanması, VUS olarak saptanan varyantların patojeniteye olan etkilerinin değerlendirilmesinde DNA dizileme yöntemlerinin altın standartı olarak kabul edilen Sanger Sekans yöntemi kullanıldı. Saptanılan patojenik, muhtemel patojenik ve VUS varyantların kalıtım paternlerinin belirlenmesi amacı ile aile segregasyon analizi yapıldı. Segregasyon planlanan her bir varyanta özgü primer tarafımızca (inhouse) olarak dizayn edilmiştir. Primer tasarımında ilgili genin dizisi Ensembl, dizayn edilen primerin genom üzerinde oturduğu alan NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Primer Blast ve UCSC (*University of California Santa Cruz Genomics Institute*) açık erişimli veri tabanları kullanılarak değerlendirildi. FastPCR'dan yararlanırak primere özgü PCR koşulları ve primerin kendi üzerinde katlanma durumu değerlendirildi. Primere özgü PCR koşullarında çoğaltılan amplikonlar %2'lik agaroz jelde UV transluminatör altında uzunluk ve PCR başarısı açısından değerlendirildi. Sonrasında ExoSap-IT ile pürifikasyon (temizleme) PCR'ı, *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* kit v3.1 kullanılarak sekans PCR'ı gerçekleştirildi. PCR ürünlerine Sefadex ve spin kolon ile yapılan pürifikasyon işlemi sonrası örnekler Applied Biosystems ABI 3130XL (Applied Biosystem, Kalifornia, ABD) sanger sekans dizileme cihazında dizilendi. Proseq ve BioEdit yazılım programları kullanılarak elde edilen diziler değerlendirildi.

BÖLÜM 4

BULGULAR

Çalışmamıza 1 Temmuz 2019 – 1 Ekim 2022 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Perinatoloji Bilim Dalı polikliniğinde NT artışı ve/veya KH saptanan ve girişimsel işlem uygulanan 113 gebe değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun olmayan 38 gebe çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya dahil edilmeyen 38 gebenin 32'sinde rutin olarak yapılan anöploidi FISH analizi sonucunda sayısal anomali saptandı. Bu sayısal kromozom anomalileri, 3 fetusta Trizomi 13, 6 fetusta Trizomi 18, 18 fetusta Trizomi 21, 3 fetusta Mozomi X (Turner Sendomu), 2 fetusta Triploidi şeklindeydi. Sayısal anomali saptanan fetuslar içerinde en sık görülen sayısal anomali % 58 oranı ile Trizomi 21'di (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Sayısal Anomali Saptanan Fetuslarda Sendromların Dağılım Oranları

Sayısal anomali saptan tüm gebelerde FISH sonucu, karyotip analizi ile doğrulanarak, aileye Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde genetik danışma verildi.

Rutin olarak yapılan kromozom analizi sonucunda dışlanan 2 fetustan; 1 fetusta 18. kromozomda q21.3 bölgesinde delesyon, 1 fetusta derivatif 3. kromozom saptandı. Yapısal kromozomal anomali saptanan 2 fetusta kromozom analizi sonrası arrayCGH analizi ve parental karyotip analizi yapıldı. Her iki aileye Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde genetik danışma verildi.

Rutin olarak yapılan arrayCGH analizi sonucunda 4 gebe çalışmadan çıkarıldı. Gebelerde saptanan anomaliler;

- Kromozom analizinde üreme elde edilemeyen bir CVS örneğinden yapılan analizde Monozomi 19 saptandı.

- Kromozom analizinde üreme elde edilemeyen bir CVS örneğinden yapılan analizde 8. Kromozomun p22.3-p23.2 bölgelerinde 5 Megabaz büyüklüğünde bir delesyon ve 8. Kromozomun q21.3-q24.3 bölgelerinde 59 Megabaz büyüklüğünde delesyon saptandı. Aileye segregasyon analizi ve parental karyotipleme önerildi.

- 1 fetusta 2. Kromozomun p15 bölgesinde 427 kb büyüklüğünde delesyon saptandı. Ailede yapılan segregasyon analizi sonucunda saptanan delesyon *de novo* ve patojenik olarak değerlendirildi.

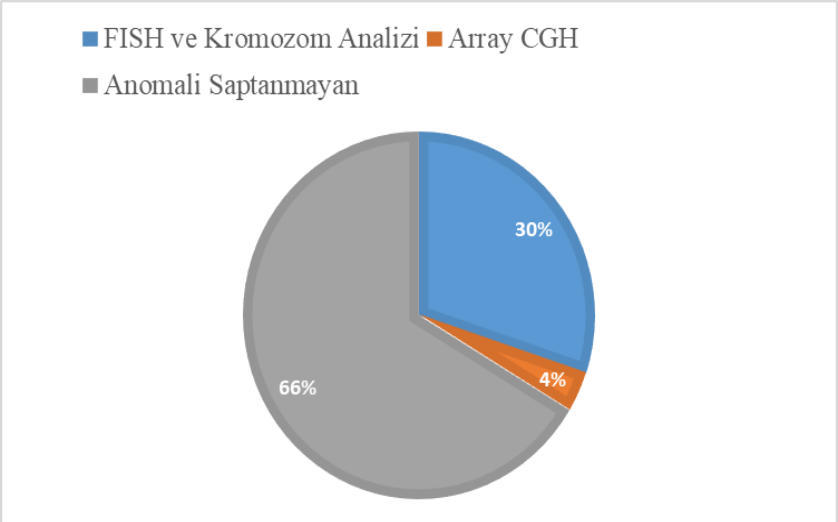
- 1 fetusta 15. Kromozomonun q21.1 bölgesinde 2.5 Mb büyüklüğünde duplikasyon saptandı. Ailede yapılan segregasyon analizi sonucunda saptanan duplikasyon *de novo* ve patojenik olarak değerlendirildi.

Ailelere Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde arrayCGH analizi sonuçları hakkında genetik danışma verildi. FISH, kromozom analizi ve arrayCGH analizi sonuçları dikkate alınarak çalışmadan çıkarılan 38 gebe Çizelge 4.1’ de özetlendi.

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilmeyen gebelerin sayısı ve dışlanma nedenleri

Dışlanma Nedenleri	**Gebe Sayısı**
Trizomi 13 (Patau Sendromu) Saptanan Fetus	2
Trizomi 21 (Down Sendromu) Saptanan Fetus	18
Trizomi 18 (Edwards Sendromu) Saptanan Fetus	6
Triploidi Saptanan Fetus	2
Monozomi X (Turner Sendromu) Saptanan Fetus	3
Kromozom Analizinde Yapısal Anomali	2
ArrayCGH Analizinde Patojenik CNV	4
	Toplam 38

NT artışı ve/veya KH saptanan ve girişimsel işlem uygulanan 113 gebeye rutin olarak yapılan FISH ve kromozom analizi sonucunda %30'una tanı konuldu. FISH ve kromozom analizi sonucunda anomali saptanmayan 79 gebeye, rutin olarak yapılan arrayCGH analizi sonucunda %4'ünde patolojik CNV saptandı. Sonuç olarak rutin analiz yöntemleri ile NT artışı ve/veya KH saptanan fetusların %34'üne tanı konuldu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Rutin Analizi Yöntemleri ile NT Artışı ve/veya KH Saptanan Gebelerdeki Tanı Oran Dağılılımları

Girişimsel işlem sonrası rutin olarak yapılan anöploidi FISH, kromozom analizi, arrayCGH analizi sonuçları normal saptanan 75 gebe çalışmaya dahil edildi. Gebelerin yaşları 19 ile 44 yaş arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 30,3 (standart sapma: 6,13) olarak saptandı.

Çalışmaya dahil edilen örnekler; 22 CVS, 51 AS ve 2 adet abort materyalinden elde edilen cilt biyopsisi örneğinden oluşmaktadır. Örnek tiplerindeki değişkenlik, gebelerin gebelik haftasına uygun olarak planlanan girişimsel işlemlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Çalışmaya dahil edilen gebelerin gebelik öyküsü, gebelik haftası ve endikasyon bilgileri Çizelde 4.2de yer almaktadır.

Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen 75 gebenin gebelik öyküsü, gebelik haftası ve endikasyon bilgileri

Kod	Materyal [1]	Yaş	Gebelik Öyküsü [2]	Gebelik Haftası	Endikasyon [3]
C01	CVS	25	G2P0A1	12+1	Kistik Higroma
A01	AS	26	G2P1A0	18	Kistik Higroma
A02	AS	35	G4P1A2	18+2	NF Artışı, VSD, Pulmoner Hipoplazi, Triküspit Atrezi, Pulmoner Stenoz
A03	AS	38	G1P0A0	23	NF Artışı, Uzun Kemiklerde Kısalık
A04	AS	37	G3P1A1	22+6	NF: 6,3 mm
C02	CVS	20	G4P3A0	14	NT Artışı, Batın İçi Anoksik Görüntü, Triküspit Kapak Kalınlaşmış, Umblikal Kord 1+1
C03	CVS	37	G6P3A2	12	Kistik Higroma, NT: 3,6 mm
C04	CVS	35	G1P0A0	11	Kistik Higroma
A05	AS	28	G1P0A0	16+3	NF Artışı, Önceki Gebelikte Multiple Anomalili Fetus Öyküsü
A06	AS	30	G2P1A0	23+1	NF Artışı, USGde Multiple Anomali
A07	AS	30	G3P2A0	13+4	Fetal Boyunda Kitle? USGde Multiple Anomali
A08	AS	26	G2P1A0	22	NF: 8,3 mm
C05	CVS	30	G1P0A0	10+3	NT: 4 mm, Kistik Higroma
A09	AS	28	G1P0A0	16	Kistik Higroma

A10	AS	30	G4P1A2	18+2	NF: 5,5 mm, Kalpte Hiperekojen Odak
A11	AS	29	G4P3A0	23+1	NF Artışı, Perikardiyal Efüzyon
A12	AS	38	G5P3A1	20+4	NF: 6 mm, Koroid Plexus Kisti
A13	AS	41	G1P0A0	22+4	NF Artışı
A14	AS	35	G2P1A0	26	NF:6,34 mm, Bilateral Renal Pelviektazi, AVSD, Aort Koarktasyonu
A15	AS	36	G2P1A0	23	NF:6,3 mm
A16	AS	28	G1P0A0	21	NF Artışı, Hipoplazik Torax, VSD, İskelet Displazisi
A17	AS	29	G3P1A1	21+5	NF:5,3 mm
A18	AS	21	G2P0A1	18+3	NF:7,2 mm, Umblikal Kord:1+1
A19	AS	44	G4P1A2	19	NF:5,37 mm, 2'li TTde T21:1/56
A20	AS	25	G2P0A1	19	NF: 6,14 mm, Bilateral Koreid Plexus Kisti
A21	AS	31	G3P1A1	23+4	NF: 6,81 mm, Batında Asit, Hiperekojen Barsak, Nazal Kemik Hipoplazik
A22	AS	35	G3P2A0	16+6	Kistik Higroma, Uzun Kemiklerde Generalize Mikromelik Kısalık, Hipertelorizm, Eller Ayaklarda Dismorfik Görünüm
A23	AS	27	G1P0A0	21+4	NF Artışı, ARSA+
C06	CVS	25	G1P0A0	12	Kistik Higroma, NT: 10,1 mm
A24	AS	40	G2P10	16+4	MKDA İkiz Gebelik, Kistik Higroma

A25	AS	40	G2P1A0	16+4	MKDA İkiz Gebelik İkizi Eşinde Kistik Higroma
A26	AS	36	G4P1A2	24+4	NF: 7,2 mm
A27	AS	24	G2P1A0	19+4	NF: 5,3 mm, Sol Renal Pelviektazi
A28	AS	31	G2P1A0	16+3	İskelet Displazisi, Sol Ventrikülde Hiperekojen Odak, Torax Dar, Alt Ve Üst Ekstremite Mikromelik Kısalık, Mikrognati, Frontal Bossing
C07	CVS	36	G2P1A0	12+1	NT: 3,3 mm
D01	Abort	39	G5P2A2	12	Kistik Higroma
A29	AS	35	G2P1A0	22	NF: 8 mm, Grade 1 Hiperekojen Barsak
A30	AS	24	G2P0A1	20+5	Kistik Higroma, Hiperekojen Barsak, Hipoplastik Sol Kalp, Hipoplazik Aort
C08	CVS	24	G1P0A0	13+2	Kistik Higroma 2. Trimester USGde NF:7,2 mm
C09	CVS	31	G1P0A0	10+6	NT:3,8 mm, Kistik Higroma
A31	AS	33	G1P0A0	23+1	NF:6 mm
A32	AS	37	G2P1A0	17	Bilateral Plevral Efüzyon, Kistik Higroma, NF Artışı
A33	AS	32	G3P1A1	20+4	NF Artışı
C10	CVS	24	G1P0A0	12+5	Kistik Higroma, Generalize Ödem/Hidropik Fetus, Bilateral PEV
A34	AS	20	G1P0A0	23+3	NF: 6.5 mm, Perikardial Efüzyon, Kardiyomegali, Batında Yaygın Asit

C11	CVS	22	G2P1A0	12+2	Monokaryonik, Monoamniyotik İkiz Gebelik, Yapışık İkiz, Tek Ventrikül, Kistik Higroma, Batında Asit
A35	AS	44	G3P1A1	22+1	2'li TT T21:1/87, NF:7,5 mm
C12	CVS	27	G1P0A0	12+1	Kistik Higroma, Batın Önduvarında Ödem 2. Trimester USGde NF:6,1mm
A36	AS	37	G3P2A0	16+3	NF Artışı, 3'lü Ttde T21:1/66
D02	Abort	37	G1P0A0	26	Kistik Higroma
A37	AS	35	G4P2A1	19+2	NF Artışı, Humerus ve Femur Kısalığı, Önceki Gebeliği T21 Termine,
C13	CVS	24	G1P0A0	12+3	NT:4 mm
A38	AS	26	G1P0A0	20	NF: 6,5 mm, Aralıklı Bradikardi
C14	CVS	27	G1P0A0	13	NT Artışı
A39	AS	31	G1P0A0	22+3	Kardiyak Anomali, NF: 6,6 mm
C15	CVS	34	G1P0A0	12+3	Kistik Higroma, Karın Ön Duvarı Defekti, Spinal Defekt
A40	AS	28	G2P1A0	14+6	NT Artışı
C16	CVS	35	G1P0A0	12+3	NT:7 mm, 2'li TT T18 Riski Yüksek
C17	CVS	22	G2P1A0	13+4	Kistik Higroma, NT: 4,8 mm
A41	AS	19	G1P0A0	22+6	NT Artışı, Pelviektazi, Hiperekojen Kardiyak Odak

A42	AS	30	G3P1A1	26+5	NF Artışı, Hidrotoroks, Sol Renal Pelviektazi, Polihidroamnioz
A43	AS	44	G6P4A1	22	NF: 9,22 mm, Bilateral Renal Pelviektaz
C18	CVS	23	G1P0A0	12+3	NT: 3,1 mm
C19	CVS	27	G2P1A0	11+4	NT: 5 mm
A44	AS	28	G1P0A0	21+3	NF: 6,35 mm
A45	AS	31	G1P0A0	22+3	NF: 9,14 mm, Polihidroamnios
C20	CVS	38	G1P0A0	12+3	NT:3,47 mm, 2'li TT Yüksek Risk
A46	AS	30	G2P1A0	22+4	NF Artışı, Bilateral Renal Pelviektazi
C21	CVS	32	G4P0A3	12	NT: 4mm
AS47	AS	29	G1P0A0	21+5	NF:6,6 mm
AS48	AS	20	G1P0A0	24	NF Artışı, Bilateral Renal Pelviektazi
AS49	AS	22	G1P0A0	23+3	NF: 5,9 mm
AS50	AS	38	G2P1A0	20+3	NF: 5,3 mm, Bilateral Koroid Pleksus Kisti
C22	AS	29	G1P0A0	11+1	NT:5 mm, KH, CRL 42 mm
A51	AS	28	G1P0A0	16+2	Kistik Higroma

[1] AS: Amniyonsez, CVS: Koryon Villus Biyopsisi [2] G: Gravida, P: Parite, A: Abort [3] NT: Ense Kalınlığı, NF: Nukal Fold, CRL: Fetus Baş-Popo Mesafesi

Çalışmaya dâhil edilen 73 gebelik spontan olarak, 2 gebelik IVF yöntemi ile gerçekleşmiştir. Gebelerin eşleri ile akrabalık ilişkileri değerlendirilmiş olup 3 adet birinci derece kuzen evliliği saptanırken (A21, A30, C11), diğer gebelerin eşleri ile aralarında akrabalık ilişkisi bulunmamaktadır. Çalışmamıza dahil edilen 2 adet spontan ikiz gebelikte, her iki ikiz eşi de değerlendirilmeye alındı. A03 ve C15 kodlu gebelerde, önceki gebeliklerinde Trizomi 21 öyküsü vardı.

1.Trimester ultrasonografide NT ≥ 3 mm büyük saptanan fetuslar NT artışı olarak değerlendirildi. 2. Trimester ultrasonografide NF ≥ 5 mm üzerinde ölçüldüğü fetuslar NF artış olarak değerlendirildi.

NT artışı, KH veya NF artışı saptanan ve çalışmaya dahil edilen 75 gebe RASopati ilişkili *BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1, MAP2K21, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RASA2, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1* genlerini kapsayan özgün amplikon temelli Qiaseq panel kullanılarak dizilendi. Çalışmamızda hedeflenen genler için ortalama okuma ≥%99'dur. Hedef genlerin ortalama ≥%99'u çift taraflı 150bp okuma ile en az 20 okumaya sahiptir. Bundan dolayı NGS verileri değerlendirilirken okuma derinliği en az 20 olarak kabul edildi.

Çalışmamızda 3 fetusda patojenik varyant, 5 fetusda VUS saptandı. Varyantların saptandığı fetusların kodları, varyantların pozisyonları, fenotip kalıtım özelliği, yer aldığı ekzon, nükleotid değişiminin neden olduğu mutasyon tipi ve amino asit değişikliği ile görülen genotip bilgileri Çizelge 4.3'de verildi.

Çizelge 4.3. Çalışmada saptanan (patojenik / VUS) varyantlar

Hasta	Gen	Kalıtım[1]	Transkript	HGVSc[2]	HGVSp[3]	Mutasyon Tipi	Genotip	Ekzon
C05	*CBL*	OD	NM_00518.4	c.121_129dupCACCACCTC	p.His41_Leu43dup	İnsersiyon (İnframe)	Duplikasyon	Ekzon 1
C08	*PTPN11*	OD	NM_002834.5	c.1517A>C	p.Gln506Pro	Yanlış Anlamlı	Heterozigot	Ekzon 13
A24 / A25	*LZTR1*	OD, OR	NM_006767.4	c.2247C>A (p.Tyr749Ter)	p.Tyr749Ter	Anlamsız (Nonsense)	Heterozigot	Ekzon 19
A32	*RIT1*	OD	NM_006912.6	c.284G>C	p.Gly95Ala	Yanlış Anlamlı	Heterozigot	Ekzon 5
A33	*MAP2K2*	OD	NM_030662.3	c.1112G>A	p.Arg371Gln	Yanlış Anlamlı	Heterozigot	Ekzon 11
A42	*SOS2*	OR	NM_006939.4	c.3937G>T	p.Glu1313Ter	Anlamsız (Nonsense)	Heterozigot	Ekzon 23
C18	*BRAF*	OD	NM_004333.6	c.905A>G	p.Gln302Arg	Yanlış Anlamlı	Heterozigot	Ekzon 7
A43	*RAF1*	OD	NM_0002880.4	c.770C>T	p.Ser257Leu	Yanlış Anlamlı	Heterozigot	Ekzon 7

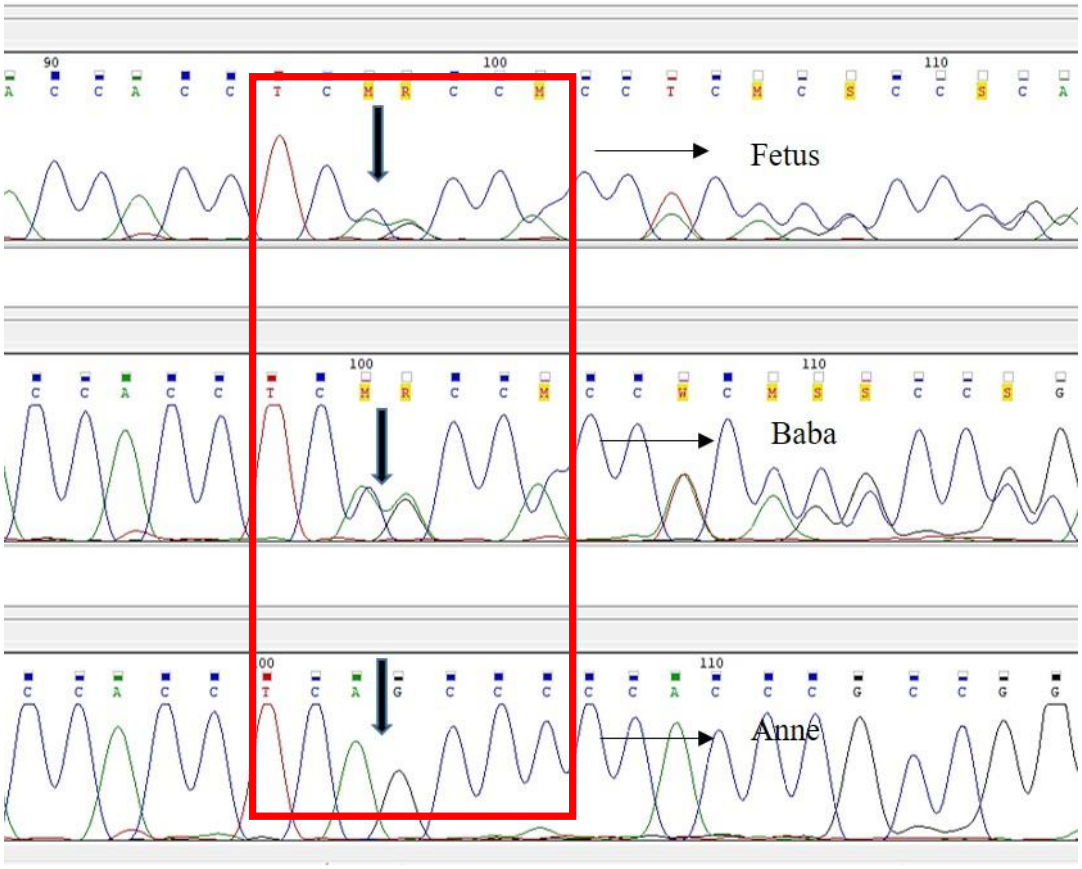
([1]OD: Otozomal Dominant Kalıtım, OR: Otozomal Resesef Kalıtım; [2] HGVSc: İnsan Genom Varyasyon Topluluğu veri tabanında bir varyantın kodon pozisyonu, [3] HGVSp: İnsan Genom Varyasyon Topluluğu veri tabanında bir varyantın protein pozisyonu).

Varyasyonların ACMG-2015 kriterlerine göre patojenitesi, daha önce ClinVar açık erişimli veri tabanlarında tanımlanıp, tanımlanmadıkları ve Franklin ve Varsome gibi in-siliko analiz programları değerlendirme bilgileri Çizelge 4.4'da verildi.

Çizelge 4.4. Varyantların ACMG-2015, ClinVar, Franklin ve Varsome in-siliko analiz programları patojenite bilgileri

Hastalar	**Gen**	**HGVSc**	**dbSNP**	**ACMG**	**ClinVar**	**Franklin**	**Varsome**
C05	*CBL*	c.121_129dupCACCACCTC	-	PM2, BP3	-	VUS	VUS
C08	*PTPN11*	c.1517A>C	rs397507548	PP5, PP2, PM1, PP3, PM2	Patojenik	Patojenik	Patojenik
A24 /A25	*LZTR1*	c.2247C>A (p.Tyr749Ter)	rs779077819	PVS1,PP5,PM2	Patojenik	Patojenik	Patojenik
A32	*RIT1*	c.284G>C	rs672601335	PM1, PP2, PM2, PP3, PP5	Patojenik	Patojenik	Patojenik
A33	*MAP2K2*	c.1112G>A	rs730880514	BS1,BS2,PM2	VUS	VUS	VUS
A42	*SOS2*	c.3937G>T	-	PVS1,PM2	-	VUS	VUS
C18	*BRAF*	c.905A>G	-	PM2,PP2,BP4	-	VUS	VUS
A43	*RAF1*	c.770C>T	rs80338796	PS3, PM1, PM5, PP5, PP2,PP3	Patojenik	Patojenik	Patojenik

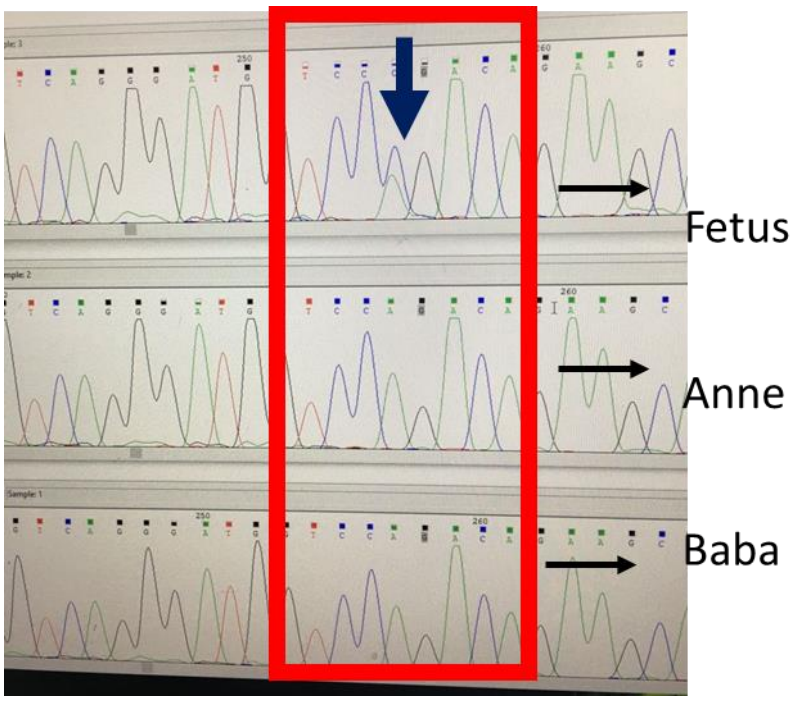
CO5 kodlu fetusta *CBL* geninde saptanan NM_00518.4:c.121_129dupCACCACCTC varyantı in siliko analiz programları olan *Qiagen Clinical Insight,* Varsome ve Franklin'de VUS olarak ön görülmektedir. Bu varyantın ClinVar girişi bulunmamaktadır. Literatürde bu varyantla ilgili bir patojenitesi ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Örneğimizin prenatal tanı amacı taşıması, *CBL* geni ile ilişkili fenotipin OD kalıtım özelliği göstermesi durumu dikkate alınarak aile segregasyon analizi yapıldı. Segregasyon analizi sonucunda paternal kalıtıldığı saptandı. Şekil 4.3.de segragasyon analizi sonucu gösterildi.



Şekil 4.3. C05 kodlu fetusun *CBL* geni aile segregasyonu sonucu

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde NSLL tanısı klinik ön tanısı açısından değerlendirilen babada, NSLL fenotipi ile ilişkili bir bulgu saptanmadı. Saptanan varyant VUS olarak değerlendirilerek, aileye takip önerildi. Gebeliğin spontan düşük ile dış merkezde sonlandırılmış olması nedeniyle fetal muayene yapılamadı.

CO8 kodlu fetusda *PTPN11* geninde saptanan NM_002834.5:c.1517A>C varyantı *Qiagen Clinical Insight,* Varsome ve Franklin in siliko analiz programlarında patojenik olarak saptandı. NM_002834.5:c.1517A>C varyantı ClinVar veri tabanında patojenik olarak rapor edilmiştir. *PTPN11* geni patojenik, olası patojenik varyantları OMIM veri tabanında NS1 ve LPRD1 fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. CO8 kodlu fetusa sahip olan gebe 24 yaşındaydı, eşler arasında akrabalık ilişkisi yoktu, spontan ilk gebelik (G1P0A0) öyküsüydü ve aile öykülerinde belirgin bir özellik yoktu. Örneğimizin prenatal tanı amacı taşıması, *PTPN11* geni ile ilişkili fenotipin OD kalıtım özelliği göstermesi ve NGS verisinin doğrulanması amacı ile aile segregasyon analizi yapıldı. Segregasyon analizi sonucunda varyantın *de novo* olduğu gösterildi. Şekil 4.4.de CO8 kodlu fetusun *PTPN11* geni aile segregasyonu analizi sonucu yer almaktadır.



Şekil 4.4. C08 kodlu fetusun *PTPN11* geni aile segregasyonu sonucu

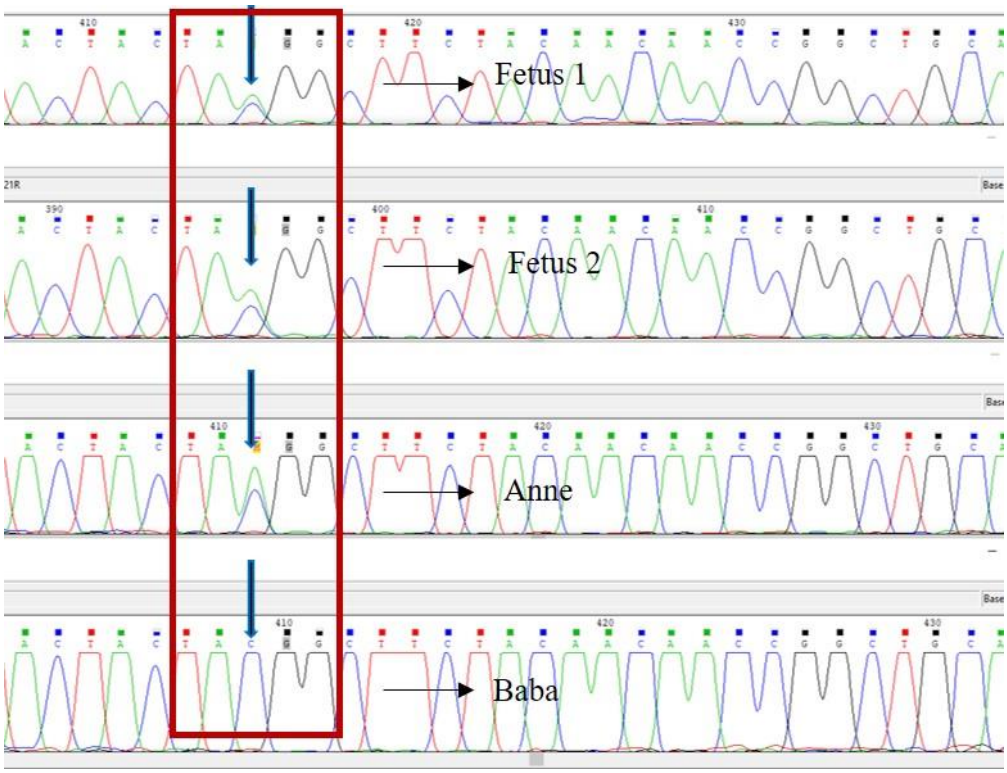
Aileye Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde NS1 ve LPRD1 tanıları ile ilgili aileye genetik danışma verildi. Aile genetik danışma sonrası gebeliği sonlandırma kararı aldı. 21. gebelik haftasında gebelik sonlandırıldı. Terminasyon sonrası yapılan fetal muayenede; makrosefeli, hipertelorizm, basık burun kökü, düşük displastik kulak, makroglossi, mikrognati, kısa geniş boyun,

geniş karın çevresi, hipertrofik labium, sol ayakta pes ekinovarus bulguları saptandı. Şekil 4.5.de fetusun terminasyon sonrası fotoğrafları yer almaktadır.



Şekil 4.5. C08 kodlu fetusun terminasyon sonrası görüntüleri

A24 ve A25 kodlu fetuslarda *LZTR1* geninde saptanan NM_006767.4:c.2247C>A (p.Tyr749Ter) varyantı Varsome ve Franklin in siliko analiz programlarında patojenik olarak saptandı. NM_006767.4:c.2247C>A (p.Tyr749Ter) ClinVar veri tabanında da patojenik olarak bildirilmiştir. *Qiagen Clinical Insight* in siliko analiz programı ilgili varyantı VUS olarak değerlendirdi. A24 ve A25 kodlu fetuslara sahip gebe 40 yaşında olup, eşler arasında akrabalık ilikisi yoktu, sağlıklı bir çocukları vardı, ikinci gebelik (G2P1A0), spontan MKDA ikiz gebelik, aile öykülerinde belirgin bir bulgu yoktu. Örneğimizin prenatal tanı amacı taşıması, *LZTR1* geni ile ilişkili fenotipin OD ve OR kalıtım özelliği göstermesi dikkate alınarak aile segregasyon analizi yapıldı. Segregasyon analizi sonucunda varyantın maternal kalıtıldığı saptandı. Şekil 4.6.da A24 ve A25 kodlu MKDA fetusların *LZTR1* geni segragasyon analizi sonuçları yer almaktadır.

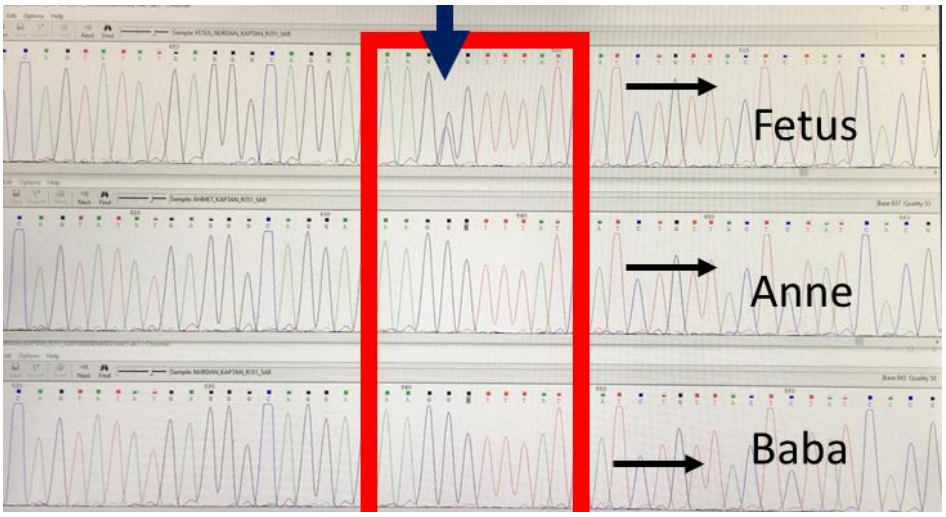


Şekil 4.6. A24 ve A25 kodlu MKDA fetusların *LZTR1* geni aile segregasyonu sonucu

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde anne NS2 ve NS10 fenotipi açısından değerlendirildi. NS tanısı ile ilişkilendiren bir bulgu saptanmadı. Saptanılan varyant VUS olarak değerlendirildi, aileye takip önerildi. Aile gebeliğin devamı doğrultusunda karar aldı. Doğum dış merkezde gerçekleştirilmiş olup, aile doğum sonrası kontrole gelmediğinden bebek postnatal olarak değerlendirilemedi.

A32 kodlu fetusta *RIT1* geninde saptanan NM_006912.6:c.284G>C varyantı *Qiagen Clinical Insight*, Varsome ve Franklin in siliko analiz programlarında patojenik olarak saptandı. NM_006912.6:c.284G>C varyantı ClinVar veri tabanında da patojenik olarak bildirilmiştir. *RIT1* geni patojenik, olası patojenik varyantları OMIM veri tabanında NS8 fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. A32 kodlu fetusa sahip gebe 37 yaşındaydı, eşler arasında akrabalık ilişkisi yoktu, ikinci spontan gebelikti (G2P1A0), ilk gebelikte anomali öyküsü yoktu, aile öykülerinde belirgin bir özellik yoktu. Örneğimizin prenatal tanı amacı taşıması, *RIT1* geni ile ilişkili fenotipin OD kalıtım özelliği göstermesi ve NGS verisinin doğrulanması amacı ile aile segregasyon analizi yapıldı. Segregasyon analizi

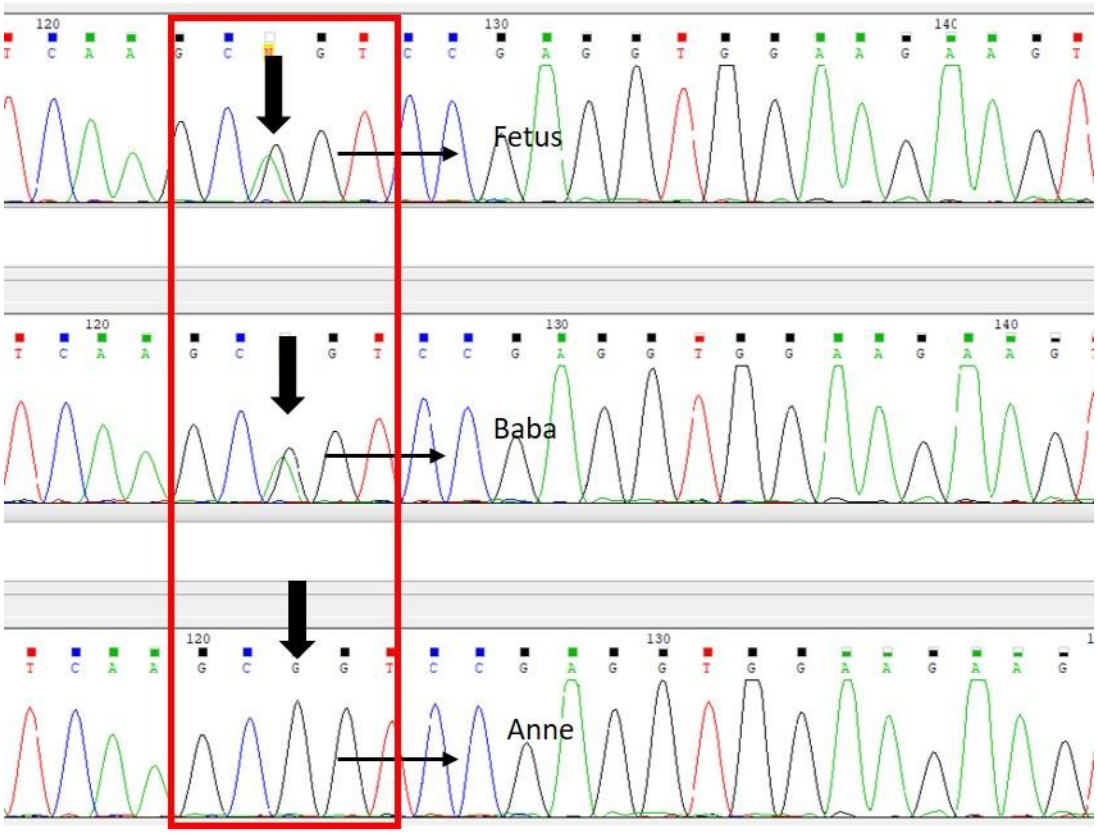
sonucunda varyantın *de novo* olduğu saptandı. Şekil 4.7.de A32 kodlu fetus *RIT1* geni aile segragasyon analizi sonucu gösterildi.



Şekil 4.7. A32 kodlu fetusun *RIT1* geni aile segregasyonu sonucu

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde NS8 klinik özellikleri açısından aileye genetik danışma verildi. Aile genetik danışma sonrası gebeliği sonlandırma kararı aldı. 20. gebelik haftasında gebelik dış merkezde sonlandırıldı. Gebeliğin dış merkezde sonlandırılmış olması nedeniyle fetal muayene yapılamadı.

A33 kodlu fetusta *MAP2K2* geninde saptanan NM_030662.3:c.1112G>A varyantı *Qiagen Clinical Insight*, Varsome ve Franklin in siliko analiz programlarında ve ClinVar veri tabanında VUS olarak saptandı. Örneğimizin prenatal tanı amacı taşıması, *MAP2K2* geni ile ilişkili fenotipin OD kalıtım özelliği göstermesi durumu dikkate alınarak aile segregasyon analizi yapıldı. Segregasyon analizi sonucunda varyantın paternal kalıtıldığı saptandı. Şekil 4.8.'de A33 kodlu fetusun *MAP2K2* geni aile segragasyon analizi sonucu gösterildi.

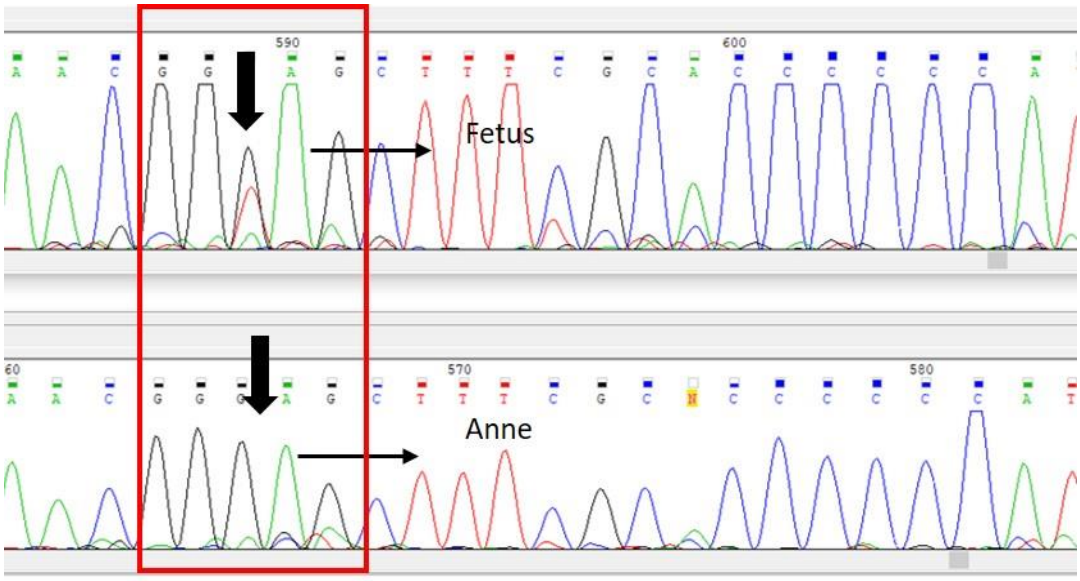


Şekil 4.8. A33 kodlu fetusun *MAP2K2* geni aile segregasyonu sonucu

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde baba, CFC4 fenotipik özellikleri açısından değerlendirildi ve sendrom ile ilişkili bir bulgu saptanmadı, aileye takip önerildi. Aile gebeliğin devamı doğrultusunda karar aldı. Doğum dış merkezde gerçekleştirilmiş olup, aile doğum sonrası kontrole gelmediğinden bebek postnatal olarak değerlendirilemedi.

A42 kodlu fetusta *SOS2* geninde saptanan NM_006939.4:c.3937G>T varyantı *Qiagen Clinical Insight,* Varsome ve Franklinde in siliko analiz programlarında VUS olarak saptandı. NM_006939.4:c.3937G>T varyantı ClinVar veri tabanında rapor edilmemiştir. Literatürde bu varyantın patojenitesi ile ilişkili veri bulunmamaktadır. Örneğimizin prenatal tanı amacı taşıması, *SOS2* geni ile ilişkili fenotipin OD kalıtım özelliği göstermesi durumu dikkate alınarak aile segregasyon analizi planlandı. Segregasyon analizi için sadece anneye ait kan örneği mevcut olduğundan, sadece anne çalışılabildi ve normal (wild tip) olarak saptandı. Babaya ait kan örneğine ulaşılamadığından babada segregasyon analizi yapılamadı. Dolayısı ile fetusda saptanmış

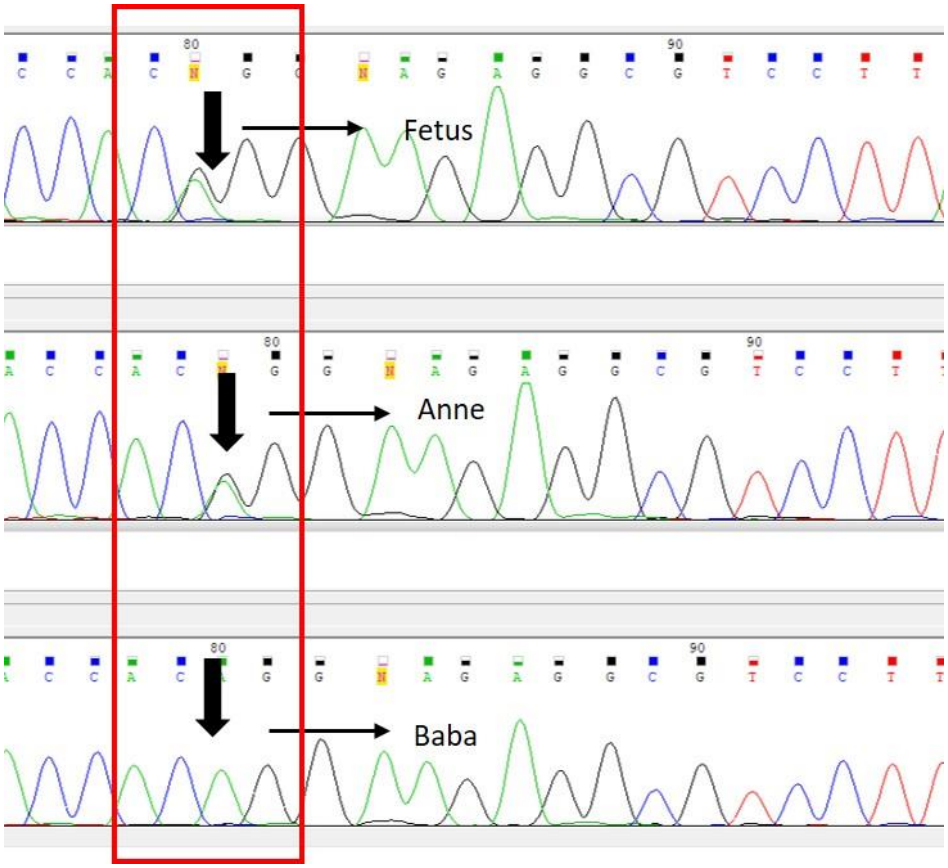
olan varyantın babadan mı kalıtıldığı yoksa *de novo* mu olduğu durumu açıklığa kavuşturulamadı. Segregasyon analizi sonucu Şekil 4.9.de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. A42 kodlu fetusun *SOS2* geni aile segregasyonu sonucu

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde anneye saptanan varyant ve NS9 fenotipi ile ilgili genetik danışma verildi. AS işlemi gebeye 26+3 gebelik haftasında yapıldı. Çalışmamız tamamlandığında gebe 31. gebelik haftasını tamamlamıştı. Aileden fetal hidrops nedeniyle dış merkezde erken doğum indüklenerek doğum sağlandığı bilgisi edinildi. Aile sonrasında kontrole gelmedi.

C18 kodlu fetusta *BRAF* geninde saptanan NM_004333.6:c.905A>G varyantı *Qiagen Clinical Insight*, Varsome ve Franklin in siliko analiz programlarında VUS olarak değerlendirildi. NM_004333.6:c.905A>G varyantı ClinVar veri tabanında bildirilmemiştir. Literatürde NM_004333.6:c.905A>G varyantının patojenitesi ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Örneğimizin prenatal tanı amacı taşıması, *BRAF* geni ile ilişkili fenotipin OD kalıtım özelliği göstermesi durumu dikkate alınarak aileye segregasyon analizi yapıldı. Segregasyon analizi sonucunda ilgili varyantın maternal kalıtıldığı saptandı. Şekil 4.10.de C18 kodlu fetusun *BRAF* geni aile segragasyon analizi sonucu yer almaktadır.

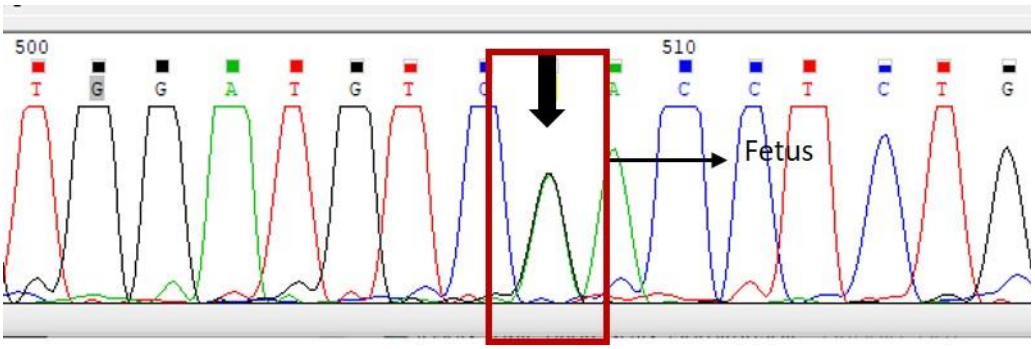


Şekil 4.10. C18 kodlu fetusun *BRAF* geni aile segregasyonu sonucu

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde anne NS7, CFC1 ve LPRD3 ile ilişkili fenotiplerin klinik özellikleri açısından değerlendirildi. Annede ilgili sendromların fenotipik özellikleri ile ilişkili bir bulgu saptanmadı ve aileye takip önerildi. Gebeliğin spontan düşük ile dış merkezde sonlanmış olması nedeniyle, düşük materyalinde fetal muayene yapılamadı.

A43 kodlu fetusta *RAF1* geninde saptanan NM_0002880.4:c.770C>T varyantı *Qiagen Clinical Insight,* Varsome ve Franklin in siliko analiz programlarında patojenik olarak saptandı. NM_0002880.4:c.770C>T varyantı ClinVar veri tabanında da patojenik olarak rapor edilmiştir. *RAF1* geni patojenik, olası patojenik varyantları OMIM veri tabanında NS5 ve LPRD1 fenotipleri ile ilişkilendirilmiştir. A43 kodlu fetusa sahip gebe 44 yaşındaydı, eşler arasında akrabalık ilişkisi yoktu, hastanın altıncı gebeliği (G6P4A1) olup, dört çocuğu sağlıklıydı ve aile öykülerinde belirgin bir özellik yoktu. Örneğimizin prenatal tanı amacı taşıması, *RAF1* geni ile ilişkili fenotipin OD kalıtım özelliği

göstermesi durumu dikkate alınarak aile segregasyon analizi planlandı. Segregasyon analizi yapılması ve genetik danışma verilmesi amacıyla aile Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğine davet edildi. Aile ile telefonda yapılan görüşmede, gebeliğin spontan olarak dış merkezde sonlandırıldığı bilgisi alındı. Aile genetik danışma almayı ve segregasyon analizi yapılmasını kabul etmedi. NM_0002880.4:c.770C>T varyantı ile ilişkili fetusta segregasyon analizi yapılamamış olup sadece varyant doğrulama yapıldı, (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. A43 kodlu fetusun *RAF1* genindeki varyant

Sonuç olarak NT artışı, KH veya NF artışı saptanan 75 fetusa ait girişimsel işlemler sonucu elde edilen örnek gDNA'larının RASopati ilişkili özgün tasarlanmış *BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1, MAP2K21, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RASA2, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1* genlerini kapsayan amplikon temelli Qiaseq panel kullanılarak dizilenmesi tanıya % 4 oranında katkı sağlamış oldu.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Gebelik takibinde tarama testleri ve ultrasongrafi bulguları aracılığıyla yüksek riskli gebelerin belirlenmesi amaçlanmaktadır (Bardi, Smith, Kuilman, Snijders & Bilardo, 2019). 2'li tarama testinde ultrasonografi aracılığıyla NT ölçümü, birinci trimesterde anöploidilerin spesifik bir belirteci olarak kullanılmaktadır (Ellestad, Wells & Kuller, 2005). NT artışının anöploidiler ile ilişkisinin yanı sıra yapısal anomaliler ve çeşitli genetik sendromlarla da ilişkisi olduğu bilinmektedir (Shiefa vd., 2013). NT artışı, NT'nin $\geq$ 3 mm olduğu ölçümler olarak tanımlanır (Maya vd., 2017). Literatürde farklı çalışmalarda bu değer $\geq$ 3.5 mm veya 99^{th} persentil olarak bildirilmiştir (Souka, Von Kaisenberg, Hyett, Sonek & Nicolaides, 2005). Petersen ve arkadaşları (2020) çalışmalarında, NT $\geq$ 3.0 mm olarak belirlenmesinin kromozomal anomalilerin tanı oranını arttıracağını bildirmiştir. Çalışmamızda NT artışını ACOG ve SMFM kriterlerini referans alarak $\geq$ 3.0 mm veya 99^{th} persentil olarak değerlendirdik.

NT artışının patofizyolojisi bilinmemekle birlikte gelişimine yönelik çeşitli teoriler mevcuttur (Bakker, Pajkrt & Bilardo, 2014). Konjenital kalp anomalilerin NT artışına sebep olabileceğine yönelik teoriler bulunurken, bu hipotezi destekleyen yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır (Haak, Twisk, Bartelings, Gittenberger-de Groot, & van Vugt, 2005). Diğer bir olasılık, lenfatik sistemin gelişimsel gecikmesidir (Bakker, Pajkrt & Bilardo, 2014). Lenfatik juguler keselerin gelişimindeki gecikme, sıvı birikimi nedeniyle ense saydamlığının artmasına neden olabilir (Bekker vd., 2006). NT artışı ile birlikte ya da izole olarak da görülebilen KH, anatomik olarak dilate lenfatik kanallarla karakterize vasküler/lenfatik bir malformasyondur (Noia vd., 2019). Birinci trimesterde NT artışı, genişlemiş juguler keseler, kistik higroma veya hidrops arasındaki ayrımlar

belirsiz olabilir fakat klinik yönetim benzer bir yaklaşımı takip eder (Kelley, McGillivray, Meagher & Hui, 2021). Birinci trimesterde NT artışı ve KH olgularının ayrımında belirsizlik yaşanabilmesi, iki bulgunun da lenfatik sistem anomalilerinden köken aldığına yönelik teoriler nedeniyle, çalışma grubumuzu NT artışı ve/veya KH saptanan olgular olarak belirledik.

İlk trimesterde NT artışı ve/veya KH saptanan olgularda klinik yaklaşım CVS işlemi sonrasında hızlı test ile 13., 18., 21., X ve Y kromozomlarının sayısal anomalilerin değerlendirilmesi ve uzun süreli hücre kültürü sonrası kromozom analizi yapılması şeklindedir (Su vd., 2021). Hızlı test ve kromozom analizi sonucunda NT artışı saptanan fetuslara %20 oranında tanı konulabildiği, en sık saptanan sayısal anomalinin T21 olduğu bildirilmiştir (Socolov vd., 2017). Çalışmamızda FISH ve kromozom analizi sonuçları ile olgularımızın %30'una tanı konuldu. En sık görülen sayısal anomali %58 ile T21'di. Çalışmamızda literatüre göre tanı oranında artmış bir yüzde saptanmış olmasının, çalışmamıza NT artışı ile birlikte veya izole KH saptanan olguların da dahil edilmiş olması olduğu öngörüsündeyiz.

Literatürde kromozom analizinin normal saptandığı olgularda arrayCGH analizi yapılması önerilir (Levy & Stosic, 2019). ArrayCGH analizinin tanıya %5 oranında katkı sağladığı bildirilmiştir (Grande vd., 2015). Çalışmamızda da literatürle benzer olarak arrayCGH analizi sonucunda olguların %4'üne tanı konuldu.

NT artışı ile ilişkili en sık rapor edilen genetik sendrom Noonan Sendromudur (Pergament, Alamillo, Sak & Fiddler, 2011). Houweling ve arkadaşları (2010), NT artışı saptanan ve kromozom analizi normal olan olgularda ek anomalilere bakılmaksızın tüm olguların genetik danışmanlık ve Noonan Sendromu açısından değerlendirilmesi önerir. Noonan Sendromu, RASopatiler olarak adlandırılan Ras/MAPK yolağında görev alan ya da düzenleyen genlerde meydana gelen germline patojenik varyasyonların neden olduğu genetik sendromlar grubunda yer alır (Hebron, Hernandez & Yone, 2011). RASopatilerin prenatal USG bulguları olarak NT artışı, KH, NF artışı, hidrops fetalis, fetal asit veya torasik efüzyonlar, konjenital kalp anomalisi, polihidramnios ve böbrek anomalileri bildirilmiştir (Sturman vd., 2019). Prenatal tanı sendroma spesifik bulguların olmaması

sebebi ile zordur (Leach vd., 2019). Bu durum moleküler analiz yöntemi ile ayrıcı tanının önemini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda arrayCGH analizi sonucunda patojenik CNV saptanmayan 75 olguda RASopati ilişkili *BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1, MAP2K21, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RASA2, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1* genlerini kapsayan özgün tasarlanmış amplikon temelli Qiaseq panel kullanılarak 18 gen dizilendi. Çalışmamızda 3 olguda patojenik varyant, 5 olguda VUS varyant saptandı.

NT ölçümünü yapan kişinin bu konuda eğitim almış ve tecrübe sahibi olması büyük öneme sahiptir (Salomon vd., 2013). NT değeri ölçüm yapıldığı gebelik haftasına göre farklılık gösterir ve 14. gebelik haftasından sonra kaybolur. Bu nedenle NT geçici bir fenomendir (Shiefa vd., 2013). NT ölçümünün geçici bir fenomen olması ve ölçümü gerçekleştiren kişinin tecrübesinin büyük öneme sahip olması bazı olgularda birinci trimesterde NT artışının doğru bir şekilde değerlendirilememesine sebep olur. Literatürde birinci trimester NT artışı ile ikinci trimesterde NF artışının benzer patofizyolojiye sahip olduğu ve aralarında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Miguelez, 2012). Çalışmamızda NT artışı ile ilişkili olabileceği öngörüsü ile ikinci trimesterde NF artışı saptanan olgular da değerlendirildi.

Çalışmamızda patojenik varyant saptanan 3 olguda da (C08, A32, A43) NF artışının olması, ikinci trimesterde NF artışı saptanan olguların RASopatiler açısından değerlendirilmesi gerektiği literatür bilgisini desteklemektedir. Scott ve arkadaşları (2021), NF artışı saptanan olgularda patojenik varyant saptanma oranının, negatif saptanma oranından daha yüksek olduğunu ve NF artışına ek KH, plevral efüzyon, polihidramnios, böbrek anomalileri bulgularından birinin eklenmesinin tanı oranını arttırdığını bildirmiştir. Çalışmamızda patojenik varyant saptanan üç olguda (C08, A32, A43) NF artışına ek olarak KH, plevral efüzyon, bilateral pelviektazi gibi bulguların olması literatürü desteklemektedir.

Prenatal tanı, gebelik süreci ve sonrasındaki takip sürecine katkı sağlamakla birlikte gerekli görülen olgularda terminasyon seçeneği ile ailelere seçim hakkı tanımaktadır (Levy & Stosic, 2019). VUS varyant saptanan olguların değerlendirilmesi

ve varyantın sonraki gebelikler açısından risk analizi genetik danışmada güçlük yaşatmaktadır. Çalışmamızda 5 olguda VUS varyant saptanmıştır.

CO5 kodlu olguda *CBL* geninde saptanan NM_00518.4:c.121_129dupCACCACCTC varyantı in siliko analiz programlarında VUS olarak saptandı. *CBL* geni ile ilişkili NSLL (#613563) OD kalıtım özelliği gösterir. Yapılan segregasyon analizi sonucunda varyantın paternal kalıtıldığı saptandı. Literatürde *CBL* geninde inframe insersiyon ile ilişkili patojenik bir varyant bildirilmemiştir. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde değerlendirilen babada NSLL fenotipi ile ilişkili bir fizik muayene bulgusu saptanmadı. NSLL ile ilişkili bildirilen prenatal bulgular fetal hidrops ve polihidramniozdur (Bülow vd., 2015). Olgumuzda fetal hidrops ve polihidramnioz bulguları yoktu. NSLL kliniğinde fenotipik heterojenite ve değişken ekspresyon bildirilmiştir (Martinelli vd., 2010). Segregasyon analizi sonucu ve babanın fizik muayene bulguları dikkate alınarak NM_00518.4:c.121_129dupCACCACCTC varyantı VUS olarak değerlendirildi.

A33 kodlu fetusta *MAP2K2* geninde saptanan heterozigot, NM_030662.3:c.1112G>A varyantı in siliko analiz programlarında VUS olarak değerlendirildi. *MAP2K2* geni ile ilişki CFC4 (#615280) fenotipi OD kalıtım özelliği gösterir. A33 kodlu fetusta saptanan varyantın segregasyon analizi sonucunda paternal kalıtıldığı saptandı. Literatürde de ilgili varyant VUS olarak bildirilmiştir (Mei, Dai, Zhang, Wong & Magoulas, 2017). Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde CFC4 fenotipi ile ilişkili fizik muayene bulguları açısından değerlendirilen baba normal olarak değerlendirildi. CFC sendromunda penetransın tam olduğu bilgisi (Rauen, 2007) dikkate alındığında, ilgili varyant benign olarak değerlendirilebilir. CFC4 olgularında prenatal olarak polihidramnioz bildirilmiştir (Rauen, 2007). Olgumuzda ise polihidramnioz USG bulgusu yoktu.

A42 kodlu fetusta *SOS2* geninde saptanan heterozigot, NM_006939.4:c.3937G>T varyantı in siliko analiz programlarında VUS olarak saptandı. *SOS2* geni ile ilişki NS9 (#601247) OD kalıtım özelliği gösterir. İlgili varyantın segregasyon analizi babadan kan örneği alınamaması nedeniyle sadece annede gerçekleştirildi ve annede varyant

saptanmadı. Varyantın kalıtım paterni babanın değerlendirilememiş olması nedeniyle belirsizdir. *SOS2* geninin son ekzonu olan 23. ekzonda saptanan NM_006939.4:c.3937G>T varyantı bir terminasyon varyantıdır. Genin son ekzonunda saptanan terminasyon varyantlarının tolere edilebileceği literatürde bildirilmiştir (Fujikura, 2016). SOS2 proteinindeki patojenik varyantların SOS1'e benzer şekilde Dbl homoloji domainine yakın bölgede kümelendiği bildirilmiştir (El Bouchikhi vd., 2016). Olgumuzda saptamış olduğumuz NM_006939.4:c.3937G>T varyantı da Ras guanin-nükleotit değişim faktörleri katalitik domaininde yer almaktadır. NS9 olgularında prenatal olarak polihidramnios, KH ve hidrops fetalis, bir vakada kardiyovasküler anomali bildirilmiştir (Lissewski, 2021). Olgumuz 26+2 gebelik haftasında NF Artışı, hidrotoroks, sol renal pelviektazi ve polihidramnioz bulguları mevcuttu. 31. gebelik haftasında hidrops sebebi ile doğum indüklendiği bilgisi tarafımıza aile tarafından ulaştırıldı. NS9 olgularındaki prenatal bulgular ile olan benzerlik varyantın patojenik etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

C18 kodlu fetusta *BRAF* geninde saptanan heterozigot, NM_004333.6:c.905A>G varyantı in siliko analiz programlarında VUS olarak saptandı. *BRAF* geni ile ilişkilendirilen CFC1 (#115150), NS7 (#613706) ve LPRD3 (#613707) sendromları OD kalıtım özelliği gösterir. NM_004333.6:c.905A>G varyantının segregasyon analizi sonucunda maternal kalıtıldığı saptandı. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi polikliniğinde anne NS7, CFC1 ve LPRD3 sendromları fenotipik özellikleri açısından değerlendirildi ancak ilişkili bir bulgu saptanmadı. CFC1 sendromunda penetransının tam olduğu literatür (Rauen, 2007) bilgisi dikkate alındığında, ilgili varyant CFC1 fenotipi ile ilişkili olmayabilir. Literatürde NS7 ve LPRD3 ile ilişkili bildirilen prenatal bulgu bulunmamaktadır.

VUS saptanan tüm olgulara doğum sonrası kontrol ve yeni gebelik öncesi genetik danışma önerildi. Ayrıca ACMG 2015 kriterlerine göre VUS olarak saptanan varyantların, 6 ay ara ile tekrar değerlendirilmesi de önerildi (Richards vd., 2015).

NGS yöntemi ile elde edilen varyantların in siliko analiz programları aracılığıyla patojenik etkileri tahmin edilir. Her program varyantları değerlendirirken 1000 genom, OMIM, dbSNP gibi ortak veri tabanlarından faydalansa da programa özgü bir algoritma

vardır. Çalışmamızda A24 ve A25 kodlu MKDA ikiz fetuslarda *LZTR1* geninde heterozigot, NM_006767.4:c.2247C>A (p.Tyr749Ter) varyantı saptandı. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz Varsome ve Franklin in siliko analiz programları ilgili varyantı patojenik olarak değerlendirirken, *Qiagen Clinical Insight* in siliko analiz programı ilgili varyantı VUS olarak saptadı. Piotrowski vd. (2014) çalışmalarında LZTR1:c.2348_2351delCGCA varyantı sonucu oluşan turunkat protein ile Schwannomatosis 2 (#615670) fenotipini ilişkilendirmiştir. Çalışmamızda saptamış olduğumuz NM_006767.4:c.2247C>A (p.Tyr749Ter) varyantı da bir terminasyon varyantı olup ve Schwannomatosis 2 ile ilişkilendirilen varyantın 1 bp önünde yer almaktadır. Bu bulgular saptadığımız varyantın Schwannomatosis 2 ile ilişkili patojenik bir varyant olabileceğini düşündürmektedir. Chinton vd. (2020) NS olgularda yapmış oldukları çalışmada NM_006767.4:c.2247C>A (p.Tyr749Ter) varyantını VUS olarak bildirmiştir. A24 ve A25 kodlu olgularımızda da görüldüğü üzere in siliko analiz programlarının varyant değerlendirme sonuçları arasında çelişkiler olabilmektedir. Bu nedenle varyant değerlendirmesinde sadece in siliko analiz program sonuçlarına bağlı kalınmaması, açık erişimli veri tabanlarından, literatür taramalarından ve segregasyon analizleri sonuçlarından mutlaka yararlanılması gerektiği öngörüsündeyiz.

A32 kodlu fetusta *RIT1* geninde saptanan *de novo* heterozigot, NM_006912.6:c.284G>C (p.Gly95Ala) varyantı in siliko analiz programlarında patojenik olarak değerlendirildi. *RIT1* geni ile ilişkili NS8 (#615355) OD kalıtım özelliği gösterir. NM_006912.6:c.284G>C (p.Gly95Ala) varyantı literatürde patojenik olarak bildirilmiştir (Aoki vd., 2013). Bertola vd. (2014) p.Gly95Ala varyantını saptadıkları prenatal olguda polihidramnioz bulgusunu bildirmiştir. Bizim olgumuzda ise polihidramnioz bulgusu yoktu ancak bilateral plevral efüzyon, KH, NF artışı mevcuttu.

A43 kodlu fetusta *RAF1* geninde saptanan heterozigot, NM_0002880.4:c.770C>T (p.Ser257Leu) varyantı, in siliko analiz programlarında patojenik olarak saptandı. Literatürde NM_0002880.4:c.770C>T (p.Ser257Leu) varyantı patojenik olarak bildirilmiştir (Hopper, Feinstein, Manning, Beniztz & Hudgins, 2015). Pandit vd. (2007) çalışmalarında p.Ser257Leu varyantı saptanan NS5 ve LPRD2 tanılı olguları klinik bulguları açısından karşılaştırmış ve her iki olguda prenatal polihidramnioz saptadıklarını bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca p.Ser257Leu varyantının hipertrofik kardiyomiyopati

riskini de arttırdığını bildirmiştir. NM_0002880.4:c.770C>T (p.Ser257Leu) varyantını saptamış olduğumuz olgumuzda polihidramnioz yoktu, ancak prenatal olarak NF: 9,22 mm ve bilateral renal pelviektazi mevcuttu.

CO8 kodlu fetusda *PTPN11* geninde saptanan *de novo* heterozigot, NM_002834.5:c.1517A>C (p.Gln506Pro) varyantı in siliko analiz programlarında patojenik olarak değerlendirildi. Literatürde NM_002834.5:c.1517A>C (p.Gln506Pro) varyantı patojenik olarak bildirilmiştir (Conti vd., 2003). Li, Zhang & Sun (2020) yapmış oldukları vaka bildiriminde aynı varyantı taşıyan olgunun prental bulgularında NT artışı ve polihidramnioz bildirmiştir. Olgumuzda ise KH ve NF artışı (7,2 mm) mevcutken, polihidramnioz saptanmadı.

Türkiye popülasyonunda RASopatilerin prenatal tanısına yönelik Toksoy vd. (2021) çalışmalarında USG'de NT artışı olan ve kromozom analizi normal saptanan olgularda *PTPN11* geninin belli ekzonlarının dizilenmesinin tanıya en az %2 oranında katkı sağlayacağını bildirmiştir. Literatürde arrayCGH analizinde patojenik varyant saptanmayan olguların RASopatiler açısından değerlendirilmesinin tanıya %4-22 aralığında katkı sağlayacağı bildirilmektedir (Scott vd., 2021). Çalışmamızda saptanan tanı katkı oranının %4 olduğu dikkate alındığında, RASopati ilişkili çoklu gen panelinin NGS teknolojisi ile çalışılmasının tanıya %2 oranında katkı sağladığını söyleyebiliriz.

Çalışmamız içerisinde tanı oranları değerlendirildiğinde hızlı test ve kromozom analizi %30, arrayCGH analizi %4 ve RASopati ilişkili genlerin analizinin %4 oranında tanıya katkı sağladığı saptandı. Çalışmamızda arrayCGH ve RASopati ilişkili genlerin analizinin tanı katkı oranlarının eşit olarak saptanması, RASopati ilişkili genlerin analizinin önemini destekler niteliktedir.

Yang vd. (2020) izole NT artışı olan ve arrayCGH analizini sonucunda patojenik varyant saptanmayan olgularda yaptıkları WES analizi sonucunda tanı oranını %5,5 (4/73) olarak bildirmiştir. Patojenik varyant saptadıkları 4 olgudan 2'sinin RASopatiler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Pauta, Martinez & Borrell (2022) yaptıkları meta analizde izole NT artışı olan ve arrayCGH analizi sonucunda patojenik varyant saptanmayan olgularda WES ve WGS analizleri sonucunda tanı oranını %4 (15/309) olarak

bildirmiştir. Patojenik varyant saptadıkları 15 olgudan 4 tanesinin RASopati ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu bulgular NT artışı saptanan ve arrayCGH analizinde patojenik CNV saptanmayan olgularda RASopati ile ilişkili genlerin yer aldığı hedefli çoklu gen panellerinin çalışılmasının uygun maliyetli ve tanı oranı yüksek bir seçenek olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda takip etmiş olduğumuz 113 gebede tanı oranımız %38 (45/113) olarak saptandı. Tanı konulamayan gebelerde (%62) WES/WGS analizi yapılmasının tanıya %2-4 oranında katkı sağlayabilir (Yang vd., 2020; Pauta, Martinez & Borrell, 2022). Nedeni açıklanamayan NT artışı, NF artışı, KH, plevral efüzyon ve polihidramnios olgularının transkriptom, epigenomik ve proteomiks temelli yaklaşımlar ile araştırılmasının genetik etiyolojinin anlaşılmasına katkı sağlayacağı öngörüsündeyiz.

BÖLÜM 6

SONUÇ

Çalışmamızda prenatal dönemde 1. ve 2. trimester ense kalınlığı artışında RASopati ilişkili genetik varyantların araştırılması hedeflendi.

Çalışmamızda 1 Temmuz 2019 – 1 Ekim 2022 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Perinatoloji Bilim Dalı polikliniğinde NT artışı ve/veya KH, NF artışı saptanan ve girişimsel işlem uygulanan 113 gebe değerlendirildi. 113 gebede rutin olarak yapılan FISH analizi sonucunda 32 fetusta sayısal anomali, kromozom analizi sonucunda 2 fetusta yapısal anomali saptandı. FISH ve kromozom analizleri sonucunda anomali saptanmayan 79 gebeye rutin olarak yapılan arrayCGH analizi sonucunda 4 fetusta patolojik CNV saptandı. Sonuç olarak rutin analiz yöntemleri ile NT artışı ve/veya KH saptanan fetusların 38'inine tanı konuldu.

Girişimsel işlem sonrası rutin olarak yapılan anöploidi FISH, kromozom analizi, arrayCGH analizlerinde patojenite saptanmayan 75 gebe çalışmaya dahil edildi. NGS yöntemi kullanılarak RASopati ile ilişkili *BRAF, CBL, HRAS, KAT6B, KRAS, LZTR1, MAP2K21, MAP2K2, NF1, NRAS, PTPN11, RAF1, RASA2, RIT1, SHOC2, SOS1, SOS2, SPRED1* genleri dizilendi. Çalışmızda 3 gebede patojenik varyant, 5 gebede de VUS varyant saptandı.

Çalışmamızda tanı katkı oranları değerlendirildiğinde; hızlı test ve kromozom analizi %30, arrayCGH analizi %4 ve RASopati ile ilişkili genlerin değerlendirilmesi %4 oranında tanıya katkı sağladığı saptandı. Çalışmamızda arrayCGH analizi ile RASopati ilişkili genlerin NGS yöntemi kullanılarak değerlendirilmesinin tanıya eşit oranda katkı

sağlaması, RASopatiler ile ilişkili genlerin değerlendirilmesinin önemini gösterir niteliktedir.

KAYNAKLAR

Abe, T., Umeki, I., Kanno, S. I., Inoue, S. I., Niihori, T., & Aoki, Y. (2020). LZTR1 facilitates polyubiquitination and degradation of RAS-GTPases. Cell death and differentiation, 27(3), 1023–1035. https://doi.org/10.1038/s41418-019-0395-5

Abe, Y., Aoki, Y., Kuriyama, S., Kawame, H., Okamoto, N., Kurosawa, K., Ohashi, H., Mizuno, S., Ogata, T., Kure, S., Niihori, T., Matsubara, Y., & Costello and CFC syndrome study group in Japan (2012). Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. American journal of medical genetics. Part A, 158A(5), 1083–1094. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35292

ACOG Committee on Practice Bulletins (2004). ACOG Practice Bulletin No. 58. Ultrasonography in pregnancy. *Obstetrics and gynecology*, *104*(6), 1449–1458. https://doi.org/10.1097/00006250-200412000-00045

Agathokleous, M., Chaveeva, P., Poon, L. C., Kosinski, P., & Nicolaides, K. H. (2013). Meta-analysis of second-trimester markers for trisomy 21. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *41*(3), 247–261. https://doi.org/10.1002/uog.12364

AIUM-ACR-ACOG-SMFM-SRU Practice Parameter 80çta80he Performance of Standard Diagnostic Obstetric Ultrasound Examinations. (2018). *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, *37*(11), E13–E24. https://doi.org/10.1002/jum.14831

Alberry, M. S., Aziz, E., Ahmed, S. R., & Abdel-Fattah, S. (2021). Non invasive prenatal testing (NIPT) for common aneuploidies and beyond. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, *258*, 424–429. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.01.008

Alfirevic, Z., Navaratnam, K., & Mujezinovic, F. (2017). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, *9*(9), CD003252. https://doi.org/10.1002/14651858.CD003252.pub2

Alfirevic, Z., Sundberg, K., & Brigham, S. (2003). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, (3), CD003252. https://doi.org/10.1002/14651858.CD003252

Alfthan, H., Schröder, J., Fraser, R., Koskimies, A., Halila, H., & Stenman, U. H. (1988). Choriogonadotropin and its beta subunit separated by hydrophobic-interaction chromatography and quantified in serum during pregnancy by time-resolved immunofluorometric assays. *Clinical chemistry*, *34*(9), 1758–1762.

Allanson J. E. (2007). Noonan syndrome. American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics, 145C(3), 274–279. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30138

American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Committee on Genetics, & Society for Maternal-Fetal Medicine (2020). Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226. *Obstetrics and gynecology*, *136*(4), e48–e69. https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000004084

Aoki, Y., Niihori, T., Banjo, T., Okamoto, N., Mizuno, S., Kurosawa, K., Ogata, T., Takada, F., Yano, M., Ando, T., Hoshika, T., Barnett, C., Ohashi, H., Kawame, H., Hasegawa, T., Okutani, T., Nagashima, T., Hasegawa, S., Funayama, R., Nagashima, T., … Matsubara, Y. (2013). Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *American journal of human genetics*, *93*(1), 173–180. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.05.021

Aoki, Y., Niihori, T., Kawame, H., Kurosawa, K., Ohashi, H., Tanaka, Y., Filocamo, M., Kato, K., Suzuki, Y., Kure, S., & Matsubara, Y. (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. Nature genetics, 37(10), 1038–1040. https://doi.org/10.1038/ng1641

Athota, J. P., Bhat, M., Nampoothiri, S., Gowrishankar, K., Narayanachar, S. G., Puttamallesh, V., Farooque, M. O., & Shetty, S. (2020). Molecular and clinical studies in 107 Noonan syndrome affected individuals with PTPN11 mutations. BMC medical genetics, 21(1), 50. https://doi.org/10.1186/s12881-020-0986-5

Bakker, M., Pajkrt, E., & Bilardo, C. M. (2014). Increased nuchal translucency with normal karyotype and anomaly scan: what next?. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, *28*(3), 355–366. https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.10.004

Bakker, M., Pajkrt, E., Mathijssen, I. B., & Bilardo, C. M. (2011). Targeted ultrasound examination and DNA testing for Noonan syndrome, in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenatal diagnosis*, *31*(9), 833–840. https://doi.org/10.1002/pd.2782

Bardi, F., Smith, E., Kuilman, M., Snijders, R., & Bilardo, C. M. (2019). Early Detection of Structural Anomalies in a Primary Care Setting in the Netherlands. *Fetal diagnosis and therapy*, *46*(1), 12–19. https://doi.org/10.1159/000490723

Barjaktarovic, M., Korevaar, T. I., Jaddoe, V. W., de Rijke, Y. B., Visser, T. J., Peeters, R. P., & Steegers, E. A. (2017). Human chorionic gonadotropin (hCG) concentrations during the late first trimester are associated with fetal growth in a fetal sex-specific manner. *European journal of epidemiology*, *32*(2), 135–144. https://doi.org/10.1007/s10654-016-0201-3

Bartkute, K., Balsyte, D., Wisser, J., & Kurmanavicius, J. (2017). Pregnancy outcomes regarding maternal serum AFP value in second trimester screening. *Journal of perinatal medicine*, *45*(7), 817–820. https://doi.org/10.1515/jpm-2016-0101

Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, *98*(6), 236–238. https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340

Bekker, M. N., van den Akker, N. M., Bartelings, M. M., Arkesteijn, J. B., Fischer, S. G., Polman, J. A., Haak, M. C., Webb, S., Poelmann, R. E., van Vugt, J. M., & Gittenberger-de Groot, A. C. (2006). Nuchal edema and venous-lymphatic phenotype disturbance in human fetuses and 82çta82 embryos with aneuploidy. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, *13*(3), 209–216. https://doi.org/10.1016/j.jsgi.2006.02.003

Benacerraf B. R. (2005). The role of the second trimester genetic sonogram in screening for fetal Down syndrome. *Seminars in perinatology*, *29*(6), 386–394. https://doi.org/10.1053/j.semperi.2005.12.003

Benacerraf, B. R., Gelman, R., & Frigoletto, F. D., Jr (1987). Sonographic identification of second-trimester fetuses with Down's syndrome. *The New England journal of medicine*, *317*(22), 1371–1376. https://doi.org/10.1056/NEJM198711263172203

Bergoug, M., Doudeau, M., Godin, F., Mosrin, C., Vallée, B., & Bénédetti, H. (2020). Neurofibromin Structure, Functions and Regulation. Cells, 9(11), 2365. https://doi.org/10.3390/cells9112365

Bertola, D. R., Castro, M. A. A., Yamamoto, G. L., Honjo, R. S., Ceroni, J. R., Buscarilli, M. M., Freitas, A. B., Malaquias, A. C., Pereira, A. C., Jorge, A. A. L., Passos-Bueno, M. R., & Kim, C. A. (2020). Phenotype-genotype analysis of 242 individuals with RASopathies: 18-year experience of a tertiary center in Brazil. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, *184*(4), 896–911. https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31851

Bertola, D. R., Yamamoto, G. L., Almeida, T. F., Buscarilli, M., Jorge, A. A., Malaquias, A. C., Kim, C. A., Takahashi, V. N., Passos-Bueno, M. R., & Pereira, A. C. (2014). Further evidence of the importance of RIT1 in Noonan syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, *164A*(11), 2952–2957. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36722

Bhambhani, V., & Muenke, M. (2014). Noonan syndrome. American family physician, 89(1), 37–43.

Brems, H., & Legius, E. (2013). Legius syndrome, an Update. Molecular pathology of mutations in SPRED1. The Keio journal of medicine, 62(4), 107–112. https://doi.org/10.2302/kjm.2013-0002-re

Briggs, G. G., Freeman, R. K., & Yaffe, S. J. (2012). *Drugs in pregnancy and lactation: a reference guide to fetal and neonatal risk*. Lippincott Williams & Wilkins.

Brock J. H. (1976). Alphafetoprotein and neural tube defects. *Journal of clinical pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*, *10*, 157–164.

Bülow, L., Lissewski, C., Bressel, R., Rauch, A., Stark, Z., Zenker, M., & Bartsch, O. (2015). Hydrops, fetal pleural effusions and chylothorax in three patients with CBL mutations. *American journal of medical genetics. Part A*, *167A*(2), 394–399. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36838

Cargill, Y., & Morin, L. (2017). No. 223-Content of a Complete Routine Second Trimester Obstetrical Ultrasound Examination and Report. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*, *39*(8), e144–e149. https://doi.org/10.1016/j.jogc.2017.04.022

Carlson, L. M., & Vora, N. L. (2017). Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, *44*(2), 245–256. https://doi.org/10.1016/j.ogc.2017.02.004

Carta, C., Pantaleoni, F., Bocchinfuso, G., Stella, L., Vasta, I., Sarkozy, A., Digilio, C., Palleschi, A., Pizzuti, A., Grammatico, P., Zampino, G., Dallapiccola, B., Gelb, B. D., & Tartaglia, M. (2006). Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *American journal of human genetics*, *79*(1), 129–135. https://doi.org/10.1086/504394

Champagne, N., Bertos, N. R., Pelletier, N., Wang, A. H., Vezmar, M., Yang, Y., Heng, H. H., & Yang, X. J. (1999). Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *The Journal of biological chemistry*, *274*(40), 28528–28536. https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28528

Chandra, P. C., Schiavello, H. J., Ravi, B., Weinstein, A. G., & Hook, F. B. (2002). Pregnancy outcomes in urban teenagers. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, *79*(2), 117–122. https://doi.org/10.1016/s0020-7292(02)00240-0

Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M. H., & Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide 83çta83he83 factor for 83çta83he83 binds to GRB2. *Science (New York, N.Y.)*, *260*(5112), 1338–1343. https://doi.org/10.1126/science.8493579

Chen, J., Che, L., Xu, C., Zhao, S., Yang, J., Li, M., Li, G., & Shen, Y. (2020). Cardio-facio-cutaneous syndrome-associated pathogenic MAP2K1 variants activate autophagy. Gene, 733, 144369. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144369

Chen, P. C., Yin, J., Yu, H. W., Yuan, T., Fernandez, M., Yung, C. K., Trinh, Q. M., Peltekova, V. D., Reid, J. G., Tworog-Dube, E., Morgan, M. B., Muzny, D. M., Stein, L., McPherson, J. D., Roberts, A. E., Gibbs, R. A., Neel, B. G., & Kucherlapati, R. (2014). Next-generation sequencing identifies rare variants associated with Noonan syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(31), 11473–11478. https://doi.org/10.1073/pnas.1324128111

Chinton, J., Huckstadt, V., Mucciolo, M., Lepri, F., Novelli, A., Gravina, L. P., & Obregon, M. G. (2020). Providing more evidence on LZTR1 variants in Noonan syndrome patients. *American journal of medical genetics. Part A*, *182*(2), 409–414. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61445

Chung, C. C. Y., Chan, K. Y. K., Hui, P. W., Au, P. K. C., Tam, W. K., Li, S. K. M., Leung, G. K. C., Fung, J. L. F., Chan, M. C. Y., Luk, H. M., Mak, A. S. L., Leung, K. Y., Tang, M. H. Y., Chung, B. H. Y., & Kan, A. S. Y. (2020). Cost-effectiveness analysis of chromosomal microarray as a primary test for prenatal diagnosis in Hong Kong. *BMC pregnancy and childbirth*, *20*(1), 109. https://doi.org/10.1186/s12884-020-2772-y

Cimino, P. J., & Gutmann, D. H. (2018). Neurofibromatosis type 1. *Handbook of clinical neurology*, *148*, 799–811. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00051-X

Cirstea, I. C., Kutsche, K., Dvorsky, R., Gremer, L., Carta, C., Horn, D., Roberts, A. E., Lepri, F., Merbitz-Zahradnik, T., König, R., Kratz, C. P., Pantaleoni, F., Dentici, M. L., Joshi, V. A., Kucherlapati, R. S., Mazzanti, L., Mundlos, S., Patton, M. A., Silengo, M. C., Rossi, C., … Zenker, M. (2010). A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nature genetics*, *42*(1), 27–29. https://doi.org/10.1038/ng.497

Clur, S. A., Ottenkamp, J., & Bilardo, C. M. (2009). The nuchal translucency and the fetal heart: a literature review. *Prenatal diagnosis*, *29*(8), 739–748. https://doi.org/10.1002/pd.2281

Conrad, B., Bena, F., & Dahoun-Hadorn, S. (2005). Le diagnostic 84çta84he84 rapide des anomalies chromosomiques: du FISH à la QF-PCR [Rapid prenatal diagnosis of chromosome abnormalities: from FISH to QF-PCR]. *Revue medicale suisse*, *1*(11), 785–788.

Conti, E., Dottorini, T., Sarkozy, A., Tiller, G. E., Esposito, G., Pizzuti, A., & Dallapiccola, B. (2003). A novel PTPN11 mutation in LEOPARD syndrome. *Human mutation*, *21*(6), 654. https://doi.org/10.1002/humu.9149

Costello J. M. (1977). A new syndrome: mental subnormality and nasal papillomata. Australian paediatric journal, 13(2), 114–118. https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.1977.tb01135.x

Crews, C. M., Alessandrini, A., & Erikson, R. L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. Science (New York, N.Y.), 258(5081), 478–480. https://doi.org/10.1126/science.1411546

Cruz-Lemini, M., Parra-Saavedra, M., Borobio, V., Bennasar, M., Goncé, A., Martínez, J. M., & Borrell, A. (2014). How to perform an amniocentesis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *44*(6), 727–731. https://doi.org/10.1002/uog.14680

Cuckle, H., & Maymon, R. (2016). Development of prenatal screening—A historical overview. *Seminars in perinatology*, *40*(1), 12–22. https://doi.org/10.1053/j.semperi.2015.11.003

Çiçek, M.N, & Mungan, M.T. (2007). Klinikte Obstetrik ve Jinekoloji. Ankara: Güneş Tıp.

Dashe J. S. (2016). Aneuploidy Screening in Pregnancy. *Obstetrics and gynecology*, *128*(1), 181–194. https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001385

Daum, H., Ben David, A., Nadjari, M., Zenvirt, S., Helman, S., Yanai, N., Meiner, V., Yagel, S., Frumkin, A., Shkedi Rafid, S., & collaborating authors (2019). Role of late amniocentesis in the era of modern genomic 85çta85he85gies. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *53*(5), 676–685. https://doi.org/10.1002/uog.20113

de Leng, W. W., Gadellaa-van Hooijdonk, C. G., Barendregt-Smouter, F. A., Koudijs, M. J., Nijman, I., Hinrichs, J. W., Cuppen, E., van Lieshout, S., Loberg, R. D., de Jonge, M., Voest, E. E., de Weger, R. A., Steeghs, N., Langenberg, M. H., Sleijfer, S., Willems, S. M., & Lolkema, M. P. (2016). Targeted Next Generation Sequencing as a Reliable Diagnostic Assay 85çta85he Detection of Somatic Mutations in Tumours Using Minimal DNA Amounts from Formalin Fixed Paraffin Embedded Material. *PloS one*, *11*(2), e0149405. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149405

Degirmenci, U., Wang, M., & Hu, J. (2020). Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*, *9*(1), 198. https://doi.org/10.3390/cells9010198

Donald I. (1962). Clinical application of ultrasonic techniques in obstetrical and gynaecological diagnosis. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Empire*, *69*, 1036.

Donovan, S., Shannon, K. M., & Bollag, G. (2002). GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochimica et biophysica 85çta*, *1602*(1), 23–45. https://doi.org/10.1016/s0304-419x(01)00041-5

Ekvall, S., Wilbe, M., Dahlgren, J., Legius, E., van Haeringen, A., Westphal, O., Annerén, G., & Bondeson, M. L. (2015). Mutation in NRAS in familial Noonan syndrome—case report and review of the literature. *BMC medical genetics*, *16*, 95. https://doi.org/10.1186/s12881-015-0239-1

El Bouchikhi, I., Belhassan, K., Moufid, F. Z., Iraqui Houssaini, M., Bouguenouch, L., Samri, I., Atmani, S., & Ouldim, K. (2016). Noonan syndrome-causing genes: Molecular update and an assessment of the mutation rate. *International journal of pediatrics & adolescent medicine*, *3*(4), 133–142. https://doi.org/10.1016/j.ijpam.2016.06.003

Ellestad, S. C., Wells, S. R., & Kuller, J. A. (2005). First trimester screening. *Gynecologic and obstetric investigation*, *60*(1), 58–62. https://doi.org/10.1159/000083485

Emanuel P. D. (2004). Juvenile myelomonocytic leukemia. Current hematology reports, 3(3), 203–209.

Evans, D. G., Howard, E., Giblin, C., Clancy, T., Spencer, H., Huson, S. M., & Lalloo, F. (2010). Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *American journal of medical genetics. Part A*, *152A*(2), 327–332. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33139

Eychène, A., Barnier, J. V., Apiou, F., Dutrillaux, B., & Calothy, G. (1992). Chromosomal assignment of two human B-raf(Rmil) proto-oncogene loci: B-raf-1

encoding the p94Braf/Rmil and B-raf-2, a processed pseudogene. Oncogene, 7(8), 1657–1660.

Fetal sex pridiction by sex chromatin of chorionic villi cells during early pregnancy. (1975). *Chinese medical journal*, *1*(2), 117–126

Franceschi, S., Lessi, F., Aretini, P., Mazzanti, C. M., Menicagli, M., La Ferla, M., De Gregorio, V., Caramella, D., Naccarato, A. G., Bevilacqua, G., Bonadio, A. G., & Pasqualetti, F. (2016). Molecular portrait of a rare case of metastatic glioblastoma: somatic and germline mutations using whole-exome sequencing. *Neuro-oncology*, *18*(2), 298–300. https://doi.org/10.1093/neuonc/nov314

Frederiksen, L. E., Ernst, A., Brix, N., Braskhøj Lauridsen, L. L., Roos, L., Ramlau-Hansen, C. H., & Ekelund, C. K. (2018). Risk of Adverse Pregnancy Outcomes at Advanced Maternal Age. *Obstetrics and gynecology*, *131*(3), 457–463. https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002504

Frick A. P. (2021). Advanced maternal age and adverse pregnancy outcomes. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, *70*, 92–100. https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.07.005

Fu, J. F., Hsu, J. J., Tang, T. C., & Shih, L. Y. (2003). Identification of CBL, a proto-oncogene at 11q23.3, as a novel MLL fusion partner in a patient with de novo acute myeloid leukemia. *Genes, chromosomes & cancer*, *37*(2), 214–219. https://doi.org/10.1002/gcc.10204

Fuchs, F. & Riis, P. (1956). Antenatal Sex Determination. *Nature*, **177,** 330. https://doi.org/10.1038/177330a0

Fujikura K. (2016). Premature termination codons in modern human genomes. *Scientific reports*, *6*, 22468. https://doi.org/10.1038/srep22468

Gelb, B. D., & Tartaglia, M. (2007). Noonan Syndrome with Multiple Lentigines. In M. P. Adam (Eds.) et. Al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle.

Ghi, T., Sotiriadis, A., Calda, P., Da Silva Costa, F., Raine-Fenning, N., Alfirevic, Z., McGillivray, G., & International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG) (2016). ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *48*(2), 256–268. https://doi.org/10.1002/uog.15945

Gil, M. M., Quezada, M. S., Revello, R., Akolekar, R., & Nicolaides, K. H. (2015). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *45*(3), 249–266. https://doi.org/10.1002/uog.14791

Goetzinger, K. R., & Odibo, A. O. (2014). Screening for abnormal placentation and adverse pregnancy outcomes with maternal serum biomarkers in the second trimester. *Prenatal diagnosis*, *34*(7), 635–641. https://doi.org/10.1002/pd.4370

Gorlin, R. J., Anderson, R. C., & Blaw, M. (1969). Multiple lentigenes syndrome. American journal of diseases of children (1960), 117(6), 652–662. https://doi.org/10.1001/archpedi.1969.02100030654006

Grande, M., Jansen, F. A., Blumenfeld, Y. J., Fisher, A., Odibo, A. O., Haak, M. C., & Borrell, A. (2015). Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *46*(6), 650–658. https://doi.org/10.1002/uog.14880

Gregg, A. R., Gross, S. J., Best, R. G., Monaghan, K. G., Bajaj, K., Skotko, B. G., Thompson, B. H., & Watson, M. S. (2013). ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, *15*(5), 395–398. https://doi.org/10.1038/gim.2013.29

Gripp, K. W., & Lin, A. E. (2012). Costello syndrome: a Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 14(3), 285–292. https://doi.org/10.1038/gim.0b013e31822dd91f

Gripp, K. W., & Rauen, K. A. (2006). Costello Syndrome. In M. P. Adam (Eds.) et. Al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle.

Gripp, K. W., Morse, L. A., Axelrad, M., Chatfield, K. C., Chidekel, A., Dobyns, W., Doyle, D., Kerr, B., Lin, A. E., Schwartz, D. D., Sibbles, B. J., Siegel, D., Shankar, S. P., Stevenson, D. A., Thacker, M. M., Weaver, K. N., White, S. M., & Rauen, K. A. (2019). Costello syndrome: Clinical phenotype, genotype, and management guidelines. American journal of medical genetics. Part A, 179(9), 1725–1744. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61270

Haak, M. C., Twisk, J. W., Bartelings, M. M., Gittenberger-de Groot, A. C., & van Vugt, J. M. (2005). First-trimester fetuses with increased nuchal translucency do not 87çta altered intracardiac flow velocities. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *25*(3), 246–252. https://doi.org/10.1002/uog.1810

Hahnemann, J. M., & Vejerslev, L. O. (1997). European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC)—fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy. *American journal of medical genetics*, *70*(2), 179–187. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19970516)70:2<179::aid-ajmg15>3.0.co;2-g

Harraway J. (2017). Non-invasive prenatal testing. *Australian family physician*, *46*(10), 735–739.

Hart, T. C., Zhang, Y., Gorry, M. C., Hart, P. S., Cooper, M., Marazita, M. L., Marks, J. M., Cortelli, J. R., & Pallos, D. (2002). A mutation in the SOS1 gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. *American journal of human genetics*, *70*(4), 943–954. https://doi.org/10.1086/339689

Hebron, K. E., Hernandez, E. R., & Yohe, M. E. (2022). The RASopathies: from pathogenetics to therapeutics. *Disease models & mechanisms*, *15*(2), dmm049107. https://doi.org/10.1242/dmm.049107

Hopper, R. K., Feinstein, J. A., Manning, M. A., Benitz, W., & Hudgins, L. (2015). Neonatal pulmonary arterial hypertension and Noonan syndrome: two fatal cases with a specific RAF1 mutation. *American journal of medical genetics. Part A*, *167A*(4), 882–885. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37024

Houweling, A. C., de Mooij, Y. M., van der Burgt, I., Yntema, H. G., Lachmeijer, A. M., & Go, A. T. (2010). Prenatal detection of Noonan syndrome by mutation analysis of the PTPN11 and the KRAS genes. *Prenatal diagnosis*, *30*(3), 284–286. https://doi.org/10.1002/pd.2458

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000133703;r=12:25205246-25250936;t=ENST00000311936
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000169032;r=15:66386837-66491656;t=ENST00000307102
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000126934;r=19:4090321-4124122;t=ENST00000262948

Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing 88çta88he88gies: An overview. *Human immunology*, *82*(11), 801–811. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012

Huang, X., Zhang, Q., Zheng, S., Wang, J., Han, L., Lin, H., Ke, P., Zhuang, J., & Cao, Z. T. (2018). Measurement of human serum unconjugated estriol without derivatization using liquid chromatography-tandem mass spectrometry candidate reference method and compared with two immunoassays. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *410*(24), 6257–6267. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1236-y

Hussain, M. R., Baig, M., Mohamoud, H. S., Ulhaq, Z., Hoessli, D. C., Khogeer, G. S., Al-Sayed, R. R., & Al-Aama, J. Y. (2015). BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. Saudi journal of biological sciences, 22(4), 359–373. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.10.002

Hynds, D. L., Spencer, M. L., Andres, D. A., & Snow, D. M. (2003). Rit promotes MEK-independent neurite branching in human neuroblastoma cells. *Journal of cell science*, *116*(Pt 10), 1925–1935. https://doi.org/10.1242/jcs.00401

International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, *431*(7011), 931–945. https://doi.org/10.1038/nature03001

J., Breg, W. R., Hobbins, J. C., Berkowitz, R. L., Tortora, M., Mayden, K., & Mahoney, M. J. (1983). Fetal cystic hygroma. Cause and natural history. *The New England journal of medicine*, *309*(14), 822–825. https://doi.org/10.1056/NEJM198310063091403

Jacob, H. J., Abrams, K., Bick, D. P., Brodie, K., Dimmock, D. P., Farrell, M., Geurts, J., Harris, J., Helbling, D., Joers, B. J., Kliegman, R., Kowalski, G., Lazar, J., Margolis, D. A., North, P., Northup, J., Roquemore-Goins, A., Scharer, G., Shimoyama, M., Strong, K., … Worthey, E. A. (2013). Genomics in clinical practice: lessons from the

front lines. *Science translational medicine*, *5*(194), 194cm5. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006468

Jang, H., Oakley, E., Forbes-Osborne, M., Kesler, M. V., Norcross, R., Morris, A. C., & Galperin, E. (2019). Hematopoietic and neural crest defects in zebrafish shoc2 mutants: a novel vertebrate model for Noonan-like syndrome. *Human molecular genetics*, *28*(3), 501–514. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy366

Jindal, A., Sharma, M., & Chaudhary, C. (2021). Amniocentesis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Jindal, A., Sharma, M., Karena, Z. V., & Chaudhary, C. (2022). Amniocentesis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Johnston, J. J., van der Smagt, J. J., Rosenfeld, J. A., Pagnamenta, A. T., Alswaid, A., Baker, E. H., Blair, E., Borck, G., Brinkmann, J., Craigen, W., Dung, V. C., Emrick, L., Everman, D. B., van Gassen, K. L., Gulsuner, S., Harr, M. H., Jain, M., Kuechler, A., Leppig, K. A., McDonald-McGinn, D. M., … Biesecker, L. G. (2018). Autosomal recessive Noonan syndrome associated with biallelic LZTR1 variants. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, *20*(10), 1175–1185. https://doi.org/10.1038/gim.2017.249

Jukic, A. M., Baird, D. D., Weinberg, C. R., McConnaughey, D. R., & Wilcox, A. J. (2013). Length of human pregnancy and contributors to its natural variation. *Human reproduction* (Oxford, England), 28(10), 2848–2855. https://doi.org/10.1093/humrep/det297

Jurcă, M. C., Iuhas, O. A., Puiu, M., Chiriţă-Emandi, A., Andreescu, N. I., Petcheşi, C. D., Jurcă, A. D., Magyar, I., Jurcă, S. I., Kozma, K., Severin, E. M., & Bembea, M. (2021). Cardiofaciocutaneous syndrome — a longitudinal study of a case over 33 years: case report and review of the literature. Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie, 62(2), 563–568. https://doi.org/10.47162/RJME.62.2.23

Kagan, K. O., Wright, D., Spencer, K., Molina, F. S., & Nicolaides, K. H. (2008). First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *31*(5), 493–502. https://doi.org/10.1002/uog.5332

Kauffman, H., Ahrens-Nicklas, R. C., Calderon-Anyosa, R., Ritter, A. L., Lin, K. Y., Rossano, J. W., Quartermain, M. D., & Banerjee, A. (2021). Genotype-phenotype association by echocardiography offers incremental value in patients with Noonan Syndrome with Multiple Lentigines. Pediatric research, 90(2), 444–451. https://doi.org/10.1038/s41390-020-01292-7

Kelley, J., McGillivray, G., Meagher, S., & Hui, L. (2021). Increased nuchal translucency after low-risk noninvasive prenatal testing: What should we tell prospective parents?. *Prenatal diagnosis*, *41*(10), 1305–1315. https://doi.org/10.1002/pd.6024

Kitchen , F. L., & Jack, B. W. (2022). Prenatal Screening. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Kolch W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *6*(11), 827–837. https://doi.org/10.1038/nrm1743

Komatsuzaki, S., Aoki, Y., Niihori, T., Okamoto, N., Hennekam, R. C., Hopman, S., Ohashi, H., Mizuno, S., Watanabe, Y., Kamasaki, H., Kondo, I., Moriyama, N., Kurosawa, K., Kawame, H., Okuyama, R., Imaizumi, M., Rikiishi, T., Tsuchiya, S., Kure, S., & Matsubara, Y. (2010). Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. *Journal of human genetics*, *55*(12), 801–809. https://doi.org/10.1038/jhg.2010.116

Kranenburg O. (2005). The KRAS oncogene: past, present, and future. Biochimica et biophysica acta, 1756(2), 81–82. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.10.001

Kwon, J. J., & Hahn, W. C. (2021). A Leucine-Rich Repeat Protein Provides a SHOC2 the RAS Circuit: a Structure-Function Perspective. *Molecular and cellular biology*, *41*(4), e00627-20. https://doi.org/10.1128/MCB.00627-20

Lalonde, E., Wertheim, G., & Li, M. M. (2017). Clinical Impact of Genomic Information in Pediatric Leukemia. *Frontiers in pediatrics*, *5*, 263. https://doi.org/10.3389/fped.2017.00263

Leach, N. T., Wilson Mathews, D. R., Rosenblum, L. S., Zhou, Z., Zhu, H., & Heim, R. A. (2019). Comparative assessment of gene-specific variant distribution in prenatal and postnatal cohorts tested for Noonan syndrome and related conditions. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, *21*(2), 417–425. https://doi.org/10.1038/s41436-018-0062-0

Lee, B. H., Kim, J. M., Jin, H. Y., Kim, G. H., Choi, J. H., & Yoo, H. W. (2011). Spectrum of mutations in Noonan syndrome and their correlation with phenotypes. *The Journal of pediatrics*, *159*(6), 1029–1035. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.05.024

Leftwich, H. K., & Alves, M. V. (2017). Adolescent Pregnancy. *Pediatric clinics of North America*, *64*(2), 381–388. https://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.11.007.

Legius, E., & Stevenson, D. (2010). Legius Syndrome. In M. P. Adam (Eds.) et. Al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle.

Lepri, F., De Luca, A., Stella, L., Rossi, C., Baldassarre, G., Pantaleoni, F., Cordeddu, V., Williams, B. J., Dentici, M. L., Caputo, V., Venanzi, S., Bonaguro, M., Kavamura, I., Faienza, M. F., Pilotta, A., Stanzial, F., Faravelli, F., Gabrielli, O., Marino, B., Neri, G., … Tartaglia, M. (2011). SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations. *Human mutation*, *32*(7), 760–772. https://doi.org/10.1002/humu.21492

Levy, B., & Stosic, M. (2019). Traditional Prenatal Diagnosis: Past to Present. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1885*, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8889-1_1

Li, L., Fu, F., Li, R., Liu, Z., & Liao, C. (2018). Prenatal diagnosis and pregnancy outcome analysis of thickened nuchal fold in the second trimester. *Medicine*, *97*(46), e13334. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000013334

Li, M., Zhang, J., & Sun, N. (2020). Prolonged thrombocytopenia in a neonate with Noonan syndrome: a case report. *The Journal of international medical research*, *48*(8), 300060520936445. https://doi.org/10.1177/0300060520936445

Li, N., Cai, Q., Miao, Q., Song, Z., Fang, Y., & Hu, B. (2021). High-Throughput Metagenomics for Identification of Pathogens in the Clinical Settings. *Small methods*, *5*(1), 2000792. https://doi.org/10.1002/smtd.202000792

Li, S., Satoh, H., Watanabe, T., Nakamura, S., & Hattori, S. (1996). cDNA cloning and chromosomal mapping of a novel human GAP (GAP1M), a GTPase-activating protein of Ras. *Genomics*, *35*(3), 625–627. https://doi.org/10.1006/geno.1996.0412

Likar, I. P., Jere, K. S., Možina, T., Verdenik, I., & Tul, N. (2020). Pregnancy Loss After Amniocentesis and Chorionic Villus Sampling: Cohort Study. *Zdravstveno varstvo*, *60*(1), 25–29. https://doi.org/10.2478/sjph-2021-0005

Lissewski, C., Chune, V., Pantaleoni, F., De Luca, A., Capri, Y., Brinkmann, J., Lepri, F., Daniele, P., Leenders, E., Mazzanti, L., Scarano, E., Radio, F. C., Kutsche, K., Kuechler, A., Gérard, M., Ranguin, K., Legendre, M., Vial, Y., van der Burgt, I., Rinne, T., … Zenker, M. (2021). Variants of SOS2 are a rare cause of Noonan syndrome with particular predisposition for lymphatic complications. *European journal of human genetics : EJHG*, *29*(1), 51–60. https://doi.org/10.1038/s41431-020-00708-6

Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet (London, England)*, *350*(9076), 485–487. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0

Louvrier, C., Pasmant, E., Briand-Suleau, A., Cohen, J., Nitschké, P., Nectoux, J., Orhant, L., Zordan, C., Goizet, C., Goutagny, S., Lallemand, D., Vidaud, M., Vidaud, D., Kalamarides, M., & Parfait, B. (2018). Targeted next-generation sequencing for differential diagnosis of neurofibromatosis type 2, schwannomatosis, and meningiomatosis. Neuro-oncology, 20(7), 917–929. https://doi.org/10.1093/neuonc/noy009.

Malone, F. D., Ball, R. H., Nyberg, D. A., Comstock, C. H., Saade, G. R., Berkowitz, R. L., Gross, S. J., Dugoff, L., Craigo, S. D., Timor-Tritsch, I. E., Carr, S. R., Wolfe, H. M., Dukes, K., Canick, J. A., Bianchi, D. W., D'Alton, M. E., & FASTER Trial Research Consortium (2005). First-trimester septated cystic hygroma: prevalence, natural history, and pediatric outcome. *Obstetrics and gynecology*, *106*(2), 288–294. https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000173318.54978.1f

Mangels, R., Blumenfeld, Y. J., Homeyer, M., Mrazek-Pugh, B., Hintz, S. R., & Hudgins, L. (2021). RASopathies: A significant cause of polyhydramnios?. *Prenatal diagnosis*, *41*(3), 362–367. https://doi.org/10.1002/pd.5862

Martinelli, S., De Luca, A., Stellacci, E., Rossi, C., Checquolo, S., Lepri, F., Caputo, V., Silvano, M., Buscherini, F., Consoli, F., Ferrara, G., Digilio, M. C., Cavaliere, M. L., van Hagen, J. M., Zampino, G., van der Burgt, I., Ferrero, G. B., Mazzanti, L., Screpanti, I., Yntema, H. G., … Tartaglia, M. (2010). Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *American journal of human genetics*, *87*(2), 250–257. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.06.015

Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(2), 560–564. https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560

Maya, I., Yacobson, S., Kahana, S., Yeshaya, J., Tenne, T., Agmon-Fishman, I., Cohen-Vig, L., Shohat, M., Basel-Vanagaite, L., & Sharony, R. (2017). Cut-off value of nuchal translucency as indication for chromosomal microarray analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *50*(3), 332–335. https://doi.org/10.1002/uog.17421

Maymon, R., Zimerman, A. L., Weinraub, Z., Herman, A., & Cuckle, H. (2008). Correlation between nuchal translucency and nuchal skin-fold measurements in Down syndrome and unaffected fetuses. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *32*(4), 501–505. https://doi.org/10.1002/uog.5307

Mei H., Dai H., Zhang J., Wong LJ. & Magoulas P.L. (2017). Application of Next-Generation Sequencing in Noonan Spectrum Disorders. In: Wong, LJ. (eds) Next Generation Sequencing Based Clinical Molecular Diagnosis of Human Genetic Disorders. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56418-0_9

Miguelez, J., De Lourdes Brizot, M., Liao, A. W., De Carvalho, M. H., & Zugaib, M. (2012). Second-trimester soft markers: relation to first-trimester nuchal translucency in unaffected pregnancies. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *39*(3), 274–278. https://doi.org/10.1002/uog.9024

Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., Carter, N. P., Church, D. M., Crolla, J. A., Eichler, E. E., Epstein, C. J., Faucett, W. A., Feuk, L., Friedman, J. M., Hamosh, A., Jackson, L., Kaminsky, E. B., Kok, K., Krantz, I. D., Kuhn, R. M., Lee, C., … Ledbetter, D. H. (2010). Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American journal of human genetics*, *86*(5), 749–764. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.006

Minear, M. A., Lewis, C., Pradhan, S., & Chandrasekharan, S. (2015). Global perspectives on clinical adoption of NIPT. *Prenatal diagnosis*, *35*(10), 959–967. https://doi.org/10.1002/pd.4637

Minsart, A. F., Van Onderbergen, A., Jacques, F., Kurt, C., & Gillerot, Y. (2008). Indication of prenatal diagnosis in pregnancies complicated by undetectable second-trimester maternal serum estriol levels. *Journal of prenatal medicine*, *2*(3), 27–30.

Mizejewski, G. J. (2004). Biological Roles of Alpha-Fetoprotein During Pregnancy and Perinatal Development. *Experimental Biology and Medicine*, *229*(6), 439–463. https://doi.org/10.1177/153537020422900602

Moore, K.L., & Persaud, T.V.N. (2002). İnsan Embriyolojisi (6. Baskı). İstanbul: Nobel.

Morris, R. K., Bilagi, A., Devani, P., & Kilby, M. D. (2017). Association of serum PAPP-A levels in first trimester with small for gestational age and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *Prenatal diagnosis*, *37*(3), 253–265. https://doi.org/10.1002/pd.5001

Motta, M., Fidan, M., Bellacchio, E., Pantaleoni, F., Schneider-Heieck, K., Coppola, S., Borck, G., Salviati, L., Zenker, M., Cirstea, I. C., & Tartaglia, M. (2019). Dominant Noonan syndrome-causing LZTR1 mutations specifically affect the Kelch domain substrate-recognition surface and enhance RAS-MAPK signaling. *Human molecular genetics*, *28*(6), 1007–1022. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy412

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Gene Summary for Gene 3265, HRAS — Hras proto-oncogene, GTPase (human). Retrieved July 6, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/HRAS/human.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Gene Summary for Gene 161742. Retrieved July 6, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/161742.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Gene Summary for Gene 673. Retrieved July 7, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Gene Summary for Gene 3845, KRAS — KRAS proto-oncogene, GTPase (human). Retrieved July 7, 2022 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845.

Navaratnam, K., Alfirevic, Z., & Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (2021). Amniocentesis and chorionic villus sampling: Green-top Guideline No. 8. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 10.1111/1471-0528.16821. Advance online publication. https://doi.org/10.1111/1471-0528.16821

Nguyen, R., Jett, K., Harris, G. J., Cai, W., Friedman, J. M., & Mautner, V. F. (2014). Benign whole body tumor 93çta93h is a risk factor for malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis type 1. Journal of neuro-oncology, 116(2), 307–313. https://doi.org/10.1007/s11060-013-1293-1

Nicolaides, K. H., Azar, G., Snijders, R. J., & Gosden, C. M. (1992). Fetal nuchal oedema: associated malformations and chromosomal defects. *Fetal diagnosis and therapy*, *7*(2), 123–131. https://doi.org/10.1159/000263659

Niihori, T., Aoki, Y., Narumi, Y., Neri, G., Cavé, H., Verloes, A., Okamoto, N., Hennekam, R. C., Gillessen-Kaesbach, G., Wieczorek, D., Kavamura, M. I., Kurosawa, K., Ohashi, H., Wilson, L., Heron, D., Bonneau, D., Corona, G., Kaname, T., Naritomi, K., Baumann, C., … Matsubara, Y. (2006). Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. Nature genetics, 38(3), 294–296. https://doi.org/10.1038/ng1749

Nikiforova, M. N., Lynch, R. A., Biddinger, P. W., Alexander, E. K., Dorn, G. W., 2nd, Tallini, G., Kroll, T. G., & Nikiforov, Y. E. (2003). RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *88*(5), 2318–2326. https://doi.org/10.1210/jc.2002-021907

Nizard J. (2010). Amniocentesis: technique and education. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, *22*(2), 152–154. https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32833723a0

Noia, G., Maltese, P. E., Zampino, G., D'Errico, M., Cammalleri, V., Convertini, P., Marceddu, G., Mueller, M., Guerri, G., & Bertelli, M. (2019). Cystic Hygroma: A Preliminary Genetic Study and a Short Review from the Literature. *Lymphatic research and biology*, *17*(1), 30–39. https://doi.org/10.1089/lrb.2017.0084

Noonan, J. A., & Ehmke, D. A. (1963). Complications of ventriculovenous shunts for control of hydrocephalus. Report of three cases with thromboemboli to the lungs. The New England journal of medicine, 269, 70–74. https://doi.org/10.1056/NEJM196307112690203

Nowaczyk, M. J., Thompson, B. A., Zeesman, S., Moog, U., Sanchez-Lara, P. A., Magoulas, P. L., Falk, R. E., Hoover-Fong, J. E., Batista, D. A., Amudhavalli, S. M., White, S. M., Graham, G. E., & Rauen, K. A. (2014). Deletion of MAP2K2/MEK2: a novel mechanism for a RASopathy?. Clinical genetics, 85(2), 138–146. https://doi.org/10.1111/cge.12116

Onyeacholem, I., Kleiner, B., Hull, A. D., Chibuk, J., Romine, L., Anton, T., & Pretorius, D. H. (2016). Setting up a Nuchal Translucency Clinic: What Radiologists Need to Know. *Ultrasound quarterly*, *32*(1), 3–14. https://doi.org/10.1097/RUQ.0000000000000161

O'Rahilly, R., & Müller, F. (2000). Prenatal ages and stages-measures and errors. *Teratology*, 61(5), 382–384. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9926(200005)61:5<382::AID-TERA10>3.0.CO;2-5

O'Rahilly, R., & Müller, F. (2010). Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells, tissues, organs*, 192(2), 73–84. https://doi.org/10.1159/000289817

Pandit, B., Sarkozy, A., Pennacchio, L. A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., Pogna, E. A., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Landstrom, A., Bos, J. M., Ommen, S. R., Esposito, G., Lepri, F., Faul, C., Mundel, P., López Siguero, J. P., Tenconi, R., Selicorni, A., Rossi, C., … Gelb, B. D. (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics*, *39*(8), 1007–1012. https://doi.org/10.1038/ng2073

Patil, M., Panchanadikar, T. M., & Wagh, G. (2014). Variation of papp-a level in the first trimester of pregnancy and its clinical outcome. *Journal of obstetrics and gynaecology of India*, *64*(2), 116–119. https://doi.org/10.1007/s13224-013-0481-4

Pauta, M., Martinez-Portilla, R. J., & Borrell, A. (2022). Diagnostic yield of next-generation sequencing in fetuses with isolated increased nuchal translucency: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *59*(1), 26–32. https://doi.org/10.1002/uog.23746

Pergament, E., Alamillo, C., Sak, K., & Fiddler, M. (2011). Genetic assessment following increased nuchal translucency and normal karyotype. *Prenatal diagnosis*, *31*(3), 307–310. https://doi.org/10.1002/pd.2718

Petersen, O. B., Smith, E., Van Opstal, D., Polak, M., Knapen, M. F. C. M., Diderich, K. E. M., Bilardo, C. M., Arends, L. R., Vogel, I., & Srebniak, M. I. (2020). Nuchal translucency of 3.0-3.4 mm an indication for NIPT or microarray? Cohort analysis and literature review. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, *99*(6), 765–774. https://doi.org/10.1111/aogs.13877

Piantelli, G., Bedocchi, L., Cavicchioni, O., Verrotti, C., Cavallotti, D., Fieni, S., & Gramellini, D. (2004). Amnioreduction for treatment of severe polyhydramnios. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, *75 Suppl 1*, 56–58.

Pierpont, M. E., Magoulas, P. L., Adi, S., Kavamura, M. I., Neri, G., Noonan, J., Pierpont, E. I., Reinker, K., Roberts, A. E., Shankar, S., Sullivan, J., Wolford, M., Conger, B., Santa Cruz, M., & Rauen, K. A. (2014). Cardio-facio-cutaneous syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. Pediatrics, 134(4), e1149–e1162. https://doi.org/10.1542/peds.2013-3189

Piotrowski, A., Xie, J., Liu, Y. F., Poplawski, A. B., Gomes, A. R., Madanecki, P., Fu, C., Crowley, M. R., Crossman, D. K., Armstrong, L., Babovic-Vuksanovic, D., Bergner, A., Blakeley, J. O., Blumenthal, A. L., Daniels, M. S., Feit, H., Gardner, K., Hurst, S., Kobelka, C., Lee, C., … Messiaen, L. M. (2014). Germline loss-of-function mutations in LZTR1 predispose to an inherited disorder of multiple schwannomas. *Nature genetics*, *46*(2), 182–187. https://doi.org/10.1038/ng.2855

Popescu, N. C., Amsbaugh, S. C., DiPaolo, J. A., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., & Swan, D. C. (1985). Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. Somatic cell and molecular genetics, 11(2), 149–155. https://doi.org/10.1007/BF01534703

Puttagunta, R., Gordon, L. A., Meyer, G. E., Kapfhamer, D., Lamerdin, J. E., Kantheti, P., Portman, K. M., Chung, W. K., Jenne, D. E., Olsen, A. S., & Burmeister, M. (2000). Comparative maps of human 19p13.3 and 95çta95 chromosome 10 allow identification of sequences at evolutionary breakpoints. *Genome research*, *10*(9), 1369–1380. https://doi.org/10.1101/gr.145200

Rad, E., & Tee, A. R. (2016). Neurofibromatosis type 1: Fundamental insights into cell signalling and cancer. Seminars in cell & developmental biology, 52, 39–46. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.02.007

Rampoldi, L., Zimbello, R., Bortoluzzi, S., Tiso, N., Valle, G., Lanfranchi, G., & Danieli, G. A. (1997). Chromosomal localization of four MAPK signaling cascade genes: MEK1, MEK3, MEK4 and MEKK5. Cytogenetics and cell genetics, 78(3-4), 301–303. https://doi.org/10.1159/000134677

Ratner, N., & Miller, S. J. (2015). A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. Nature reviews. Cancer, 15(5), 290–301. https://doi.org/10.1038/nrc3911

Rauen K. A. (2013). The RASopathies. *Annual review of genomics and human genetics*, *14*, 355–369. https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153523

Rauen, K. A. (2007). Cardiofaciocutaneous Syndrome. In M. P. Adam (Eds.) et. Al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle.

Razzaque, M. A., Nishizawa, T., Komoike, Y., Yagi, H., Furutani, M., Amo, R., Kamisago, M., Momma, K., Katayama, H., Nakagawa, M., Fujiwara, Y., Matsushima, M., Mizuno, K., Tokuyama, M., Hirota, H., Muneuchi, J., Higashinakagawa, T., & Matsuoka, R. (2007). Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nature genetics*, *39*(8), 1013–1017. https://doi.org/10.1038/ng2078

Ree, P. H., Hahn, W. B., Chang, S. W., Jung, S. H., Kang, J. H., Cha, D. H., Kang, M. S., & Huh, J. Y. (2011). Early detection of preeclampsia using inhibin a and other second-trimester serum markers. *Fetal diagnosis and therapy*, *29*(4), 280–286. https://doi.org/10.1159/000322742

Reynolds T. (2010). The triple test as a screening technique for Down syndrome: reliability and relevance. *International journal of women's health*, *2*, 83–88. https://doi.org/10.2147/ijwh.s8548

Reynolds, J. F., Neri, G., Herrmann, J. P., Blumberg, B., Coldwell, J. G., Miles, P. V., & Opitz, J. M. (1986). New multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement—the CFC syndrome. American journal of medical genetics, 25(3), 413–427. https://doi.org/10.1002/ajmg.1320250303

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2015). Standards and guidelines 96çta96he interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, *17*(5), 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Riller, Q., & Rieux-Laucat, F. (2021). RASopathies: From germline mutations to somatic and multigenic diseases. *Biomedical journal*, *44*(4), 422–432. https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.06.004

Roberts A. E. (2001). Noonan Syndrome. Nov 15 [Updated 2022 Feb 17]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1124/

Roberts, A. E., Allanson, J. E., Tartaglia, M., & Gelb, B. D. (2013). Noonan syndrome. Lancet (London, England), 381(9863), 333–342. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61023-X

Roberts, A. E., Araki, T., Swanson, K. D., Montgomery, K. T., Schiripo, T. A., Joshi, V. A., Li, L., Yassin, Y., Tamburino, A. M., Neel, B. G., & Kucherlapati, R. S. (2007). Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nature genetics*, *39*(1), 70–74. https://doi.org/10.1038/ng1926

Rodriguez-Viciana, P., Tetsu, O., Tidyman, W. E., Estep, A. L., Conger, B. A., Cruz, M. S., McCormick, F., & Rauen, K. A. (2006). Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. Science (New York, N.Y.), 311(5765), 1287–1290. https://doi.org/10.1126/science.1124642

Saletra-Bielińska, A., Kosińska-Kaczyńska, K., Szymusik, I., Kaczyński, B., Brawura-Biskupski-Samaha, R., Kozłowski, S., Jarmużek, P., Walasik, I., & Wielgoś, M. (2020). Both Low and High PAPP-A Concentrations in the First Trimester of Pregnancy Are Associated with Increased Risk of Delivery before 32 Weeks in Twin Gestation. *Journal of clinical medicine*, *9*(7), 2099. https://doi.org/10.3390/jcm9072099

Salomon, L. J., Alfirevic, Z., Berghella, V., Bilardo, C. M., Chalouhi, G. E., Da Silva Costa, F., Hernandez-Andrade, E., Malinger, G., Munoz, H., Paladini, D., Prefumo, F., Sotiriadis, A., Toi, A., & Lee, W. (2022). ISUOG Practice Guidelines (updated): performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *59*(6), 840–856. https://doi.org/10.1002/uog.24888

Salomon, L. J., Alfirevic, Z., Bilardo, C. M., Chalouhi, G. E., Ghi, T., Kagan, K. O., Lau, T. K., Papageorghiou, A. T., Raine-Fenning, N. J., Stirnemann, J., Suresh, S., Tabor, A., Timor-Tritsch, I. E., Toi, A., & Yeo, G. (2013). ISUOG practice guidelines: performance of first-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *41*(1), 102–113. https://doi.org/10.1002/uog.12342

Salomon, L. J., Bernard, J. P., Taupin, P., Benard, C., & Ville, Y. (2001). Relationship between nuchal translucency at 11-14 weeks and nuchal fold at 20-24 weeks of gestation. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *18*(6), 636–637. https://doi.org/10.1046/j.0960-7692.2001.00582.x

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463–5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

Santorum, M., Wright, D., Syngelaki, A., Karagioti, N., & Nicolaides, K. H. (2017). Accuracy of first-trimester combined test in screening for trisomies 21, 18 and 13. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, *49*(6), 714–720. https://doi.org/10.1002/uog.17283

Sarkozy, A., Carta, C., Moretti, S., Zampino, G., Digilio, M. C., Pantaleoni, F., Scioletti, A. P., Esposito, G., Cordeddu, V., Lepri, F., Petrangeli, V., Dentici, M. L., Mancini, G. M., Selicorni, A., Rossi, C., Mazzanti, L., Marino, B., Ferrero, G. B., Silengo, M. C., Memo, L., … Tartaglia, M. (2009). Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. *Human mutation*, *30*(4), 695–702. https://doi.org/10.1002/humu.20955

Sarkozy, A., Digilio, M. C., & Dallapiccola, B. (2008). Leopard syndrome. Orphanet journal of rare diseases, 3, 13. https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-13

Sawyer, S. L., Hartley, T., Dyment, D. A., Beaulieu, C. L., Schwartzentruber, J., Smith, A., Bedford, H. M., Bernard, G., Bernier, F. P., Brais, B., Bulman, D. E., Warman Chardon, J., Chitayat, D., Deladoëy, J., Fernandez, B. A., Frosk, P., Geraghty, M. T., Gerull, B., Gibson, W., Gow, R. M., … Boycott, K. M. (2016). Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clinical genetics*, *89*(3), 275–284. https://doi.org/10.1111/cge.12654

Schloss J. A. (2008). How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nature biotechnology*, *26*(10), 1113–1115. https://doi.org/10.1038/nbt1008-1113

Scholl, J., Durfee, S. M., Russell, M. A., Heard, A. J., Iyer, C., Alammari, R., Coletta, J., Craigo, S. D., Fuchs, K. M., D'Alton, M., House, M., Jennings, R. W., Ecker, J., Panda, B., Tanner, C., Wolfberg, A., & Benson, C. B. (2012). First-trimester cystic hygroma: relationship of nuchal translucency thickness and outcomes. *Obstetrics and gynecology*, *120*(3), 551–559. https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318264f829

Schubbert, S., Zenker, M., Rowe, S. L., Böll, S., Klein, C., Bollag, G., van der Burgt, I., Musante, L., Kalscheuer, V., Wehner, L. E., Nguyen, H., West, B., Zhang, K. Y., Sistermans, E., Rauch, A., Niemeyer, C. M., Shannon, K., & Kratz, C. P. (2006). Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nature genetics*, *38*(3), 331–336. https://doi.org/10.1038/ng1748

Schulte-Vallentin, M., & Schindler, H. (1992). Non-echogenic nuchal oedema as a marker in trisomy 21 screening. *Lancet (London, England)*, *339*(8800), 1053. https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)90574-m

Schulz, A. L., Albrecht, B., Arici, C., van der Burgt, I., Buske, A., Gillessen-Kaesbach, G., Heller, R., Horn, D., Hübner, C. A., Korenke, G. C., König, R., Kress, W., Krüger, G., Meinecke, P., Mücke, J., Plecko, B., Rossier, E., Schinzel, A., Schulze, A., Seemanova, E., … Zenker, M. (2008). Mutation and phenotypic spectrum in patients with

cardio-facio-cutaneous and Costello syndrome. Clinical genetics, 73(1), 62–70. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00931.x

Scott, A., Di Giosaffatte, N., Pinna, V., Daniele, P., Corno, S., D'Ambrosio, V., Andreucci, E., Marozza, A., Sirchia, F., Tortora, G., Mangiameli, D., Di Marco, C., Romagnoli, M., Donati, I., Zonta, A., Grosso, E., Naretto, V. G., Mastromoro, G., Versacci, P., Pantaleoni, F., … De Luca, A. (2021). When to test fetuses for RASopathies? Proposition from a systematic analysis of 352 multicenter cases and a postnatal cohort. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, *23*(6), 1116–1124. https://doi.org/10.1038/s41436-020-01093-7

Selfors, L. M., Schutzman, J. L., Borland, C. Z., & Stern, M. J. (1998). Soc-2 encodes a leucine-rich repeat protein implicated in fibroblast growth factor receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(12), 6903–6908. https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6903

Shakoor, S., Dileep, D., Tirmizi, S., Rashid, S., Amin, Y., & Munim, S. (2017). Increased nuchal translucency and adverse pregnancy outcomes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, *30*(14), 1760–1763. https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1224836

Shamshirsaz, A. A., Benn, P., & Egan, J. F. (2010). The role of second-trimester serum screening in the post-first-trimester screening era. *Clinics in laboratory medicine*, *30*(3), 667–676. https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.04.013

Shaw, A. C., Kalidas, K., Crosby, A. H., Jeffery, S., & Patton, M. A. (2007). The natural history of Noonan syndrome: a long-term follow-up study. Archives of disease in childhood, 92(2), 128–132. https://doi.org/10.1136/adc.2006.104547

Shen, M. H., Harper, P. S., & Upadhyaya, M. (1996). Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *Journal of medical genetics*, *33*(1), 2–17. https://doi.org/10.1136/jmg.33.1.2

Shiefa, S., Amargandhi, M., Bhupendra, J., Moulali, S., & Kristine, T. (2013). First Trimester Maternal Serum Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and Free β-hCG for Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, *28*(1), 3–12. https://doi.org/10.1007/s12291-012-0269-9

Shipp, T. D., & Benacerraf, B. R. (2002). Second trimester ultrasound screening for chromosomal abnormalities. *Prenatal diagnosis*, *22*(4), 296–307. https://doi.org/10.1002/pd.307

Shofty, B., Constantini, S., & Ben-Shachar, S. (2015). Advances in Molecular Diagnosis of Neurofibromatosis Type 1. Seminars in pediatric neurology, 22(4), 234–239. https://doi.org/10.1016/j.spen.2015.10.007.

Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, *170*(1), 17–33. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009

Sirikunalai, P., Wanapirak, C., Sirichotiyakul, S., Tongprasert, F., Srisupundit, K., Luewan, S., Traisrisilp, K., & Tongsong, T. (2016). Associations between maternal serum free beta human chorionic gonadotropin (β-hCG) levels and adverse pregnancy outcomes. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, *36*(2), 178–182. https://doi.org/10.3109/01443615.2015.1036400

Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current protocols in molecular biology*, *122*(1), e59. https://doi.org/10.1002/cpmb.59

Snijders, R. J., Sebire, N. J., & Nicolaides, K. H. (1995). Maternal age and gestational age-specific risk for chromosomal defects. *Fetal diagnosis and therapy*, *10*(6), 356–367. https://doi.org/10.1159/000264259

Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). Electronic address: pubs@smfm.org, Prabhu, M., Kuller, J. A., & Biggio, J. R. (2021). Society for Maternal-Fetal Medicine Consult Series #57: Evaluation and management of isolated soft ultrasound markers for aneuploidy in the second trimester: (Replaces Consults #10, Single umbilical artery, October 2010; #16, Isolated echogenic bowel diagnosed on second-trimester ultrasound, August 2011; #17, Evaluation and management of isolated renal pelviectasis on second-trimester ultrasound, December 2011; #25, Isolated fetal choroid plexus cysts, April 2013; #27, Isolated echogenic intracardiac focus, August 2013). *American journal of obstetrics and gynecology*, *225*(4), B2–B15. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.06.079

Socolov, D., Socolov, R., Gorduza, V. E., Butureanu, T., Stanculescu, R., Carauleanu, A., & Pavaleanu, I. (2017). Increased nuchal translucency in fetuses with a normal karyotype-diagnosis and management: An observational study. *Medicine*, *96*(29), e7521. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007521

Souka, A. P., Von Kaisenberg, C. S., Hyett, J. A., Sonek, J. D., & Nicolaides, K. H. (2005). Increased nuchal translucency with normal karyotype. *American journal of obstetrics and gynecology*, *192*(4), 1005–1021. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.12.093

Steele, M. W., & Breg, W. R., Jr (1966). Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet (London, England)*, *1*(7434), 383–385. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)91387-0

Stuurman, K. E., Joosten, M., van der Burgt, I., Elting, M., Yntema, H. G., Meijers-Heijboer, H., & Rinne, T. (2019). Prenatal ultrasound findings of rasopathies in a cohort of 424 fetuses: update on genetic testing in the NGS era. *Journal of medical genetics*, *56*(10), 654–661. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105746

Su, L., Wu, X., Lin, N., Xie, X., Cai, M., Wang, M., Zheng, L., & Xu, L. (2021). Different Cutoff Values for Increased Nuchal Translucency in First-Trimester Screening to Predict Fetal Chromosomal Abnormalities. *International journal of general medicine*, *14*, 8437–8443. https://doi.org/10.2147/IJGM.S330960

Süt, H., Şeker, E., Coskun, U., Koçar, M., Özkavukçu, E., & Acar, K. (2022). İkinci Trimester Nukal Fold Kalınlık Artışı Saptanan Gebeliklerin Sonuçları. *Türk Kadın Sağlığı ve Neonatoloji Dergisi*, *4*(1), 18-23.

Tajan, M., de Rocca Serra, A., Valet, P., Edouard, T., & Yart, A. (2015). SHP2 sails from physiology to pathology. European journal of medical genetics, 58(10), 509–525. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.08.005

Tajan, M., Paccoud, R., Branka, S., Edouard, T., & Yart, A. (2018). The RASopathy Family: Consequences of Germline Activation of the RAS/MAPK Pathway. *Endocrine reviews*, *39*(5), 676–700. https://doi.org/10.1210/er.2017-00232

Tartaglia, M., Kalidas, K., Shaw, A., Song, X., Musat, D. L., van der Burgt, I., Brunner, H. G., Bertola, D. R., Crosby, A., Ion, A., Kucherlapati, R. S., Jeffery, S., Patton, M. A., & Gelb, B. D. (2002). PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. American journal of human genetics, 70(6), 1555–1563. https://doi.org/10.1086/340847

Thien, C. B., Walker, F., & Langdon, W. Y. (2001). RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. *Molecular cell*, *7*(2), 355–365. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00183-6

Tidyman, W. E., & Rauen, K. A. (2008). Noonan, Costello and cardio-facio-cutaneous syndromes: dysregulation of the Ras-MAPK pathway. *Expert reviews in molecular medicine*, *10*, e37. https://doi.org/10.1017/S1462399408000902

Tidyman, W. E., & Rauen, K. A. (2009). The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current opinion in genetics & development*, *19*(3), 230–236. https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.04.001

Tidyman, W. E., & Rauen, K. A. (2016). Pathogenetics of the RASopathies. *Human molecular genetics*, *25*(R2), R123–R132. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw191

Toksoy, G., Tepgeç, F., Saraç Sivrikoz, T., Kalelioğlu, İ.H., Demir, S., Has, R., 101çta101he, A., Uyguner, Z.O., & Başaran, S. (2021). The Effectıveness Of Ptpn1 1 Gene Analysıs In The Prenatal Dıagnosıs Of Noonan Syndrom E. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 84(1), 34-39. https://doi.org/10.26 650/IUITFD.2020.803356

Tosti, A., Misciali, C., Borrello, P., Fanti, P. A., Bardazzi, F., & Patrizi, A. (1991). Loose anagen hair in a child with Noonan's syndrome. *Dermatologica*, *182*(4), 247–249. https://doi.org/10.1159/000247806

Tosti, A., Peluso, A. M., Misciali, C., Venturo, N., Patrizi, A., & Fanti, P. A. (1997). Loose anagen hair. *Archives of dermatology*, *133*(9), 1089–1093.

Upadhyaya, M., Cheryson, A., Broadhead, W., Fryer, A., Shaw, D. J., Huson, S., Wallace, M. R., Andersen, L. B., Marchuk, D. A., & Viskochil, D. (1990). A 90 kb DNA deletion associated with neurofibromatosis type 1. *Journal of medical genetics*, *27*(12), 738–741. https://doi.org/10.1136/jmg.27.12.738

Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., Banks, E., Garimella, K. V., Altshuler, D., Gabriel, S., & DePristo, M. A. (2013). From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Current protocols in bioinformatics*, *43*(1110), 11.10.1–11.10.33. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43

van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics : TIG*, *30*(9), 418–426. https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001

Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome Sequencing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1525*, 3–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1

Villani, A., Greer, M. C., Kalish, J. M., Nakagawara, A., Nathanson, K. L., Pajtler, K. W., Pfister, S. M., Walsh, M. F., Wasserman, J. D., Zelley, K., & Kratz, C. P. (2017). Recommendations for Cancer Surveillance in Individuals with RASopathies and Other Rare Genetic Conditions with Increased Cancer Risk. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 23(12), e83–e90. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0631

Vink, J. & Ouinn, M. (2018). Chorionic villus sampling, *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care (Second Edition*) (pp.479-481). https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44548-1.00113-3. (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323445481001133)

Wald, N. J., Cuckle, H., Brock, J. H., Peto, R., Polani, P. E., & Woodford, F. P. (1977). Maternal serum-alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. Report of U.K. collaborative study on alpha-fetoprotein in relation to neural-tube defects. *Lancet (London, England)*, *1*(8026), 1323–1332.

Wakioka, T., Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R., & Yoshimura, A. (2001). Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature*, *412*(6847), 647–651. https://doi.org/10.1038/35088082

Wellbrock, C., Karasarides, M., & Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *5*(11), 875–885. https://doi.org/10.1038/nrm1498

Wieacker, P., & Steinhard, J. (2010). The prenatal diagnosis of genetic diseases. *Deutsches Arzteblatt international*, *107*(48), 857–862. https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0857

Wilson, B. N., John, A. M., Handler, M. Z., & Schwartz, R. A. (2021). Neurofibromatosis type 1: New developments in genetics and treatment. Journal of the American Academy of Dermatology, 84(6), 1667–1676. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2020.07.105

Wong-Staal, F., Dalla-Favera, R., Franchini, G., Gelmann, E. P., & Gallo, R. C. (1981). Three distinct genes in human DNA related to the transforming genes of mammalian sarcoma retroviruses. *Science (New York, N.Y.)*, *213*(4504), 226–228. https://doi.org/10.1126/science.6264598

Yamamoto, G. L., Aguena, M., Gos, M., Hung, C., Pilch, J., Fahiminiya, S., Abramowicz, A., Cristian, I., Buscarilli, M., Naslavsky, M. S., Malaquias, A. C., Zatz, M., Bodamer, O., Majewski, J., Jorge, A. A., Pereira, A. C., Kim, C. A., Passos-Bueno, M. R., & Bertola, D. R. (2015). Rare variants in SOS2 and LZTR1 are associated with Noonan syndrome. *Journal of medical genetics*, *52*(6), 413–421. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103018

Yang, X., Huang, L. Y., Pan, M., Xu, L. L., Zhen, L., Han, J., & Li, D. Z. (2020). Exome sequencing improves genetic diagnosis of fetal increased nuchal translucency. *Prenatal diagnosis*, *40*(11), 1426–1431. https://doi.org/10.1002/pd.5789

Yang, Y., Muzny, D. M., Reid, J. G., Bainbridge, M. N., Willis, A., Ward, P. A., Braxton, A., Beuten, J., Xia, F., Niu, Z., Hardison, M., Person, R., Bekheirnia, M. R., Leduc, M. S., Kirby, A., Pham, P., Scull, J., Wang, M., Ding, Y., Plon, S. E., … Eng, C. M. (2013). Clinical whole-exome sequencing 103çta103he diagnosis of mendelian disorders. *The New England journal of medicine*, *369*(16), 1502–1511. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306555

Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, *141*(11), 1544–1557. https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA

Yoon, S., & Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, *24*(1), 21–44. https://doi.org/10.1080/02699050500284218

Yoshizato, T., Kozuma, Y., Horinouchi, T., Shinagawa, T., Yokomine, M., & Ushijima, K. (2021). Diagnosis of Fetal Abnormalities during the First Trimester. *The Kurume medical journal*, *66*(2), 85–92. https://doi.org/10.2739/kurumemedj.MS662002

Yuan, J., Dong, X., Yap, J., & Hu, J. (2020). The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, *13*(1), 113. https://doi.org/10.1186/s13045-020-00949-4

Yue, C. Y., Zhang, C. Y., & Ying, C. M. (2020). Serum markers in quadruple screening associated with adverse pregnancy outcomes: A case-control study in China. *Clinica chimica 103çta; international journal of clinical chemistry*, *511*, 278–281. https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.10.029

Zalud, I., & Janas, S. (2008). Risks of third-trimester amniocentesis. *The Journal of reproductive medicine*, *53*(1), 45–48.

Zhang, H., He, L., & Cai, L. (2018). Transcriptome Sequencing: RNA-Seq. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1754*, 15–27. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7717-8_2

Zhang, J., Tang, X., Hu, J., He, G., Wang, J., Zhu, Y., & Zhu, B. (2021). Investigation on combined copy number variation sequencing and cytogenetic karyotyping for prenatal diagnosis. *BMC pregnancy and childbirth*, *21*(1), 496. https://doi.org/10.1186/s12884-021-03918-y

Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J., & Li, M. M. (2021). Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Annals of laboratory medicine*, *41*(1), 25–43. https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.1.25

Zhu, G., Xie, J., Kong, W., Xie, J., Li, Y., Du, L., Zheng, Q., Sun, L., Guan, M., Li, H., Zhu, T., He, H., Liu, Z., Xia, X., Kan, C., Tao, Y., Shen, H. C., Li, D., Wang, S., Yu, Y., … Zhu, J. (2020). Phase Separation of Disease-Associated SHP2 Mutants Underlies MAPK Hyperactivation. *Cell*, 183(2), 490–502.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.002

EKLER

Ek-1 Bilgilendirilmiş Onam Formu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Universitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (Trakya Universitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi-TUBAP) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** Prenatal dönemde 1. ve 2. trimester ense kalınlığı artışında Rasopati ilişkili genetik varyasyonların araştırılması.
- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Gebelik takibinde ilk üç ay ve/veya ikinci üç aylık dönemde ense kalınlığı artışı saptanan gebelerde Rasopati hastalık grubunun araştırılması
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Doç. Dr. Hakan GÜRKAN / Trakya Üniv. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
- **Araştırmanın amacı:** Ense kalınlığındaki artış ile Rasopati hastalık grubunun arasındaki ilişki
- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Klinik ve Laboratuvar Çalışması
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** 02.09.2019 / 24 ay
- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** Eylül 2019- Eylül 2021 tarihleri arasında Trakya Universitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi polikliniğine NT artışı ve/veya kistik higroma ile müraccat eden ve rutin olarak yapılan anöploidi FISH, kromozom analizi ve array-CGH analizi normal çıkan gebeler dahil edilecektir.
- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Araştırma kapsamında gebelere invaziv bir yöntem uygulanmayacaktır.
- **Araştırmanın deneysel kısımları:** Rasopatiler ile ilişkisi bilinen genlerdeki olası hastalık yapıcı kodlama hataları araştırılacaktır.

Gönüllünün/Vasisinin imzası:

- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Bulunmamaktadır.
- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Gebelik takibi sürecinde fetüste ense kalınlığında artış ve/veya kistik higroma saptanması ve bu bulgulara yönelik yapılan rutin genetik testlerinin (anöploidi FISH, kromozom analizi, array-CGH analizi) normal saptanmış olması
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Fetüsün Rasopatiler olarak adlandırılan hastalık grubu açısından erken tanı konulması
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Herhangi bir sorumluluğu bulunmamaktadır.
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Bulunmamaktadır.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Yapılması planlanan çalışmada gönüllüler için herhangi bir risk bulunmamaktadır.
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Bulunmamaktadır.
- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Bulunmamaktadır.
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Bulunmamaktadır.
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Gönüllü çalışmanın her aşamasında kendi isteği ile çalışmadan ayrılabilir.
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** Gönüllü gebelere araştırma sonucu genetik danışma verilerek açıklanacaktır.
- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:** Doç. Dr. Hakan GURKAN- 0.533.2188005 Çisem Mail-05413238294
- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** Rasopatiler ile ilişkisi bilinen genlerdeki olası hastalık yapıcı değişikliklerin araştırılması amacı ile kullanılacak.

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmalim nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Universitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

Ilgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

- ***Gönüllünün; (El yazısı ile)***

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- ***Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)***

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- ***Açıklamaları yapan araştırmacının***

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih:

Ek-2 Etik Kurul Formu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2019/265	
	PROTOKOL ADI	Prenatal Dönemde Birinci ve İkinci Trimester Ense Kalınlığı Artışında RASopati İlişkili Genetik Varyasyonların Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Hakan GÜRKAN	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:12/09** **Tarih:01.07.2019**
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hakan GÜRKAN'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Doktora Öğrencisi Çisem MAİL'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.
ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr.Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E H	E H	
Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E H	E H	Mazeretli
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Öğr. Gör. Dr. Sinan ATEŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	Mazeretli
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	Mazeretli

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Doğum Yeri:	EDİRNE
Doğum Tarihi:	13.10.1990
Uyrucu:	TC
Yabancı Dil:	İngilizce
Tel:	05413238294
E-Posta Adresi:	cisemakurut@hotmail.com
Medeni Hali:	Evli

Eğitim:

Derece	Fakülte / Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2008-2012
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2012-2014
Doktora	Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Trakya Üniversitesi	2017 – devam ediyor

Uzmanlık Alanları: Tıbbi Genetik, Prenatal Tanı, Sitogenetik, Moleküler Sitogenetik, Doku Kültürü, Hücre Kültürü

YAYINLAR

Uluslararası Hakemli Dergi Makaleleri

1- Atlı Emine İkbal, Yalçıntepe Sinem, Atlı Engin, Demir Selma, **Mail Çisem**, Eker Damla, Kalkan Rasime, Gürkan Hakan (2021). A Pilot Study Of Identification Genetic Background Of Craniosynostosis Cases. Journal Of Craniofacial Surgery, 32(3), 1059-1062., Doi: 10.1097/SCS.0000000000007285

2- Yalçıntepe Sinem, Görker Işık, Demir Selma, Atlı Emine İkbal, Atlı Engin, Tozkır Hilmi, Süt Necdet, Özen Yasemin, Eker Damla, **Mail Çisem**, Sezginer Güler Hazal, Zhurı Drenushe, Gürkan Hakan (2021). Investigation The Relationship Of Autism

Spectrum Disorder And FOXP2, GRIN2B, KATNAL2 And GABRA4 Genes. Noropsikiyatri Arsivi-Archives Of Neuropsychiatry, 58(3), 171-175., Doi: 10.29399/Npa.27407

3- Atlı Emine İkbal, Gürkan Hakan, Atlı Engin, Kırkızlar Hakkı Onur, Yalçıntepe Sinem, Demir Selma, Demirci Ufuk, Eker Damla, **Mail Çisem**, Kalkan Rasime, Demir Ahmet Muzaffer (2021). The Importance Of Targeted Next-Generation Sequencing Usage İn Cytogenetically Normal Myeloid Malignancies. Mediterranean Journal Of Hematology And Infectious Diseases, 13(1), 1-10., Doi: 10.4084/Mjhıd.2021.013

4- Gürkan Hakan, Atlı Emine İkbal, Atlı Engin, Bozatlı Leyla, Araz Altay Mengühan, Yalçıntepe Sinem, Özen Yasemin, Eker Damla, **Mail Çisem**, Demir Selma, Görker Işık (2020). Chromosomal Microarray Analysis İn Turkish Patients With Unexplained Developmental Delay And Intellectual Developmental Disorders. Noropsikiyatri Arsivi-Archives Of Neuropsychiatry, 57(3), 177-191

5- Mehmet Baysal, Ufuk Demirci, Elif Umit, Hakki Onur Kirkizlar, Emine Ikbal Atli, Hakan Gurkan, Sedanur Karaman Gulsaran, Volkan Bas, **Cisem Mail** & Ahmet Muzaffer Demir.Concepts of Double Hit and Triple Hit Disease in Multiple Myeloma, Entity and Prognostic Significance. Scientific Reports (2020) 10:5991 https://doi.org/10.1038/s41598-020-62885-0

6- Emine Ikbal Atli, Hakan Gurkan, Engin Atli, Ulfet Vatansever, Betul Acunas, **Cisem Mail** (2020). De Novo Subtelomeric 6p25.3 Deletion with Duplication of 6q23.3-q27: Genotype–Phenotype Correlation. Journal of Pediatric Genetics. Mar;9(1):32-39.doi: 10.1055/s-0039-1694703.

7- Akurut Çisem, Sılan Fatma, Yalçıntepe Sinem, Özdemir Öztürk (2019). The Diagnostic Accuracy Of Non-Invasive Fetal Rhd Genotyping By Using Cell-Free Fetal DNA in Maternal Plasma. Family Practice And Palliative Care, 4(1), 1-6., Doi: 10.22391/Fppc.418647

8- Yalçıntepe Sinem, Özdemir Öztürk, Hacıvelıoglu Servet Ozden, **Akurut Cisem,** Koc Evrim, Uludag Ahmet, Cosar Emıne, Sılan Fatma (2015). Multiple Inherited Thrombophilic Gene Polymorphisms İn Spontaneous Abortions İn Turkish Population. International Journal Of Molecular And Cellular Medicine, 4(2), 120- 127.

9- Djurovic J, Stojkovic O, Ozdemir O, Silan F, **Akurut C** (2015). Todorovic J, Savic K & Stamenkovic G. Association between FokI, ApaI and TaqI RFLP polymorphisms in VDR gene and Hashimoto's thyroiditis: preliminary data from female patients in Serbia. International Journal of Immunogentics. doi: 10.1111/iji.12199

10- Hacer Şen, Fatma Sılan, Emine Binnetoğlu, Fahri Güneş, **Çisem Akurut,** Ahmet Uludağ, Öztürk Özdemir. Hyperimmunoglobulin D Syndrome: Case Report. Arch Rheumatol. 2015;30(x):i-iii

11- Uludağ Ahmet, Sılan Coşkun, Yalçıntepe Sinem, **Akurut Çisem**, Uludağ Ayşegül, Sılan Fatma, Özdemir Öztürk (2014). Relationship Between Response To

Colchicine Treatment And MDR1 Polymorphism İn Familial Mediterranean Fever Patients. Genetic Testing And Molecular Biomarkers, 18(2), 73-76., Doi: 10.1089/Gtmb.2013.0293

12- Topaloglu N, Oguz S, Silan F, Uludag A, Isik S, **Akurut C.** Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Children With Atopic Diseases. Gene Ther Mol Biol.2014;16: 55-60.tli, E. I., Yalcintepe, S., Atli, E., Demir, S., Mail, C., Eker, D., Kalkan, R., & Gurkan, H. (2021). A Pilot Study of Identification Genetic Background of Craniosynostosis Cases. *The Journal of craniofacial surgery*, *32*(3), 1059–1062. https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000007285

Bildiriler

1. X Kromozomunun Sayısal Ve Yapısal Düzensizliğini Mozaik Olarak Taşıyan Olgu, Akurut Çisem, Atlı Emine İkbal, Gürkan Hakan, Atlı Engin, Özen Yasemin, Yalçıntepe Sinem, Demir Selma, Tozkır Hilmi, Tunalı Elif (2018), 13. Uluslararası Katılımlı Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, (Özet Bildiri)

2. 3q22.2-Q22.3 Deletıon And 16p11.2 Mıcroduplıcatıon Syndrome In A Patıent Wıth Blepharophımosıs, Ptosis, Epıcanthus Inversus Syndrome, Hakan Gürkan, Engin Atlı, Ülfet Vatansever, Emine İkbal Atlı, Yasemin Özen, Çisem Akurut, Hilmi Tozkır, Betül Acunaş (2017), Erciyes Medical Genetic Days. (Özet Bildiri)

3. A Novel Cytogenetic Abberation Is Extra Isochromosome 4q In Chronic Lymphocytic Leukemia Patient, Atlı E. I, Gürkan H, Pamuk G. E, Akurut C, Tozkır H, Demir A.M. (2016), European Human Genetics Conference (ESHG). (Özet Bildiri)

4. Evaluation Of Chromosomal And Thrombophilia Panel Of Recurrent Miscarriages, (Sözlü Sunum) Hakan Gürkan, Emine İkbal Atlı, Yasemin Özen, Beril Karabacak, Çisem Akurut, Cenk Sayın, Füsun Varol, Hilmi Tozkır (2016), Uluslararası Katkılı 'Gevher Nesibe Tıp Günleri ve Tıbbi Genetik Ve Klinik Uygulamaları Kongresi (Özet Bildiri)

5. Maternal Kandan Fetal DNA Izolasyonu ve Fetal Rhd Analizi, Akurut C., Sılan F., Güngör ANC, Ozdemir O. (2014), 11. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. (Özet Bildiri)

6. The Association Between Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Glu298Asp Polymorphism And Spontaneous Pregnancy Loss, Yalçıntepe Sinem, Özdemir Öztürk, Hacıvelioğlu Sö, Akurut Cisem, Kumcular T, Uysal Diğdem, Yücesoy K, Uludağ A, Coşar E, Sılan Fatma (2014), European Society Of Human Genetics 2014, (Özet Bildiri)

7. Is Apolipoprotien E Polymorphisms Associated With Spontaneous Pregnancy Loss?, Yalçıntepe Sinem, Hacıvelioğlu Servet, Sılan Coşkun, Akurut Çisem, Koç E, Sılan Fatma, Coşar E, Uludağ A, Özdemir Öztürk (2014), European Society Of Human Genetics 2014, (Özet Bildiri)

8. Parental Idendification Of Aborted Materials For Chimerism And Other Molecular Etiological Parameters By Microsatellite STR Profiling, Sılan Fatma, Uludağ

A, Akurut Çisem, Kankaya Duygu, Gencer M, Urfalı M, Yalçıntepe Sinem, Özdemir Öztürk (2014), European Society Of Human Genetics 2014, (Özet Bildiri)

9. Association Between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms And Hashimoto's Thyroiditis In Serbian Population: A Pilot Study Based On Foki, Apai And Taqi RFLP Technique, Djurovic J, Stojkovic O, Akurut C, Silan F, Todorovic J, Stamenkovic G, Ozdemir O. (2014), European Human Genetics Conference (ESHG). (Özet Bildiri)

10. Correlation Between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms And Atopic Dermatitis In Canakkale Population: A Study Based On, Foki And Taqi RFLP Technique. Oguz S, Silan F, Akurut C, Topaloglu N, Isik S, Sik E, Uludag A, Ogretmen Z, Ozdemir O. (2014), European Human Genetics Conference (ESHG) (Özet Bildiri)

11. Common MEFV Gene Mutation Profiles In Familial Mediterranean Fever Patients In Canakkale Population, Silan F, Topaloglu N, Urfali M, Akurut C, Kocak M.G.K, Kankaya D, Ari E, Ozdemir O (2014), European Human Genetics Conference (ESHG), (Özet Bildiri)

12. Maternal Fetal Enos Genotipleri ile Spontan Abortus İlişkisi, Yalçıntepe Sinem, Özdemir Öztürk, Hacıvelioğlu Sö, Akurut Cisem, Kumcular Tuncer (2013), Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu, (Özet Bildiri)

13. Abortus Etiyolojisinde Sayısal Kromozom Anomalilerinin ve Uniparental Disomi Olgularının Mikrosatellit Markerlarla Analizi, Akurut Cisem, Sılan Fatma, Yalçıntepe Sinem, Coşar E, Gencer M, Özdemir Öztürk (2013), Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu, (Özet Bildiri)

14. Relationship Between Response To Colchicine Treatment And MDR1 Polymorphism İn FMF Patients, Uludağ A, Sılan Coşkun, Yalçıntepe Sinem, Akurut Cisem, Uludağ A, Sılan Fatma, Özdemir Öztürk (2013), European Society Of Human Genetics (Özet Bildiri)

15. Kliniğimizde Herediter Trombofili Saptanan 5 Olgu, Sılan F, Urfalı M, Sık E, Akurut C, Özdemir Ö. (2013), Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, (Özet Bildiri)

16. Apo E Polimorfizmi Fetal Genotipler Anne Genotiplerine Karşı, Yalçıntepe Sinem, Hacıvelioğlu Sö, Akurut Cisem, Koç E, Sılan Fatma, Coşar E, Uludağ A, Özdemir Öztürk (2013), Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu, (Özet Bildiri)

17. FMF Hastalarının Kolşisine Yanıtında MDR1 C3435T Polimorfizmi Etkili Mi? , Uludağ A, Sılan Coşkun, Yalçıntepe Sinem, Akurut Çisem, Uludağ A, Sılan Fatma, Özdemir Öztürk (2012), 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, (Özet Bildiri)

Sözlu Bildiriler

1- Miyelodisplastik Sendrom Ön Tanılı Olgularda Sitogenetik ve Moleküler Analizlerin Değerlendirilmesi: Tek Merkez Tecrübesi (Sözlü Sunum), **Çisem Mail,** Ebru Göncü, Damla Eker, Ceyhan Ünlü, Hakan Gürkan (2021), 1. Ulusal Hematoonkogenetik Kongresi, (Özet Bildiri)

2- Trakya Üniversitesi Hastanesi Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinin Prenatal Olgularda Arraycgh Analizi Tecrübesi Ve Sonuçları (Sözlü Sunum), **Mail Çisem,** Atlı Emine İkbal, Atlı Engin, Yalçıntepe Sinem, Özen Yasemin, Demir Selma, Sayın Niyazi Cenk, Gürkan Hakan (2020), 14. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi (E-Kongre), 31(4a), (Özet Bildiri)

Ödüller

1. Emine İkbal Atlı, Elif Gülsüm Ümit, **Çisem Akurut**, Mehmet Baysal, Hakan Gürkan, Ahmet Muzaffer Demir. Interpretation Of Cytogenetic/Fish Results İn Multiple Myeloma. 3. Hematolojik Genetik Sempozyumu. 14-16 Şubat 2018, İzmır, Poster Bırıncılık Ödülü

2. Hakan Gürkan, Emine İkbal Atlı, Yasemin Özen, Beril Karabacak, **Çisem Akurut,** Cenk Sayın, Füsun Varol, Hilmi Tozkır. Evaluation Of Chromosomal And Thrombophilia Panel Of Recurrent Miscarriages. Uluslararası Katkılı 'Gevher Nesibe Tıp Günleri 2016' ve Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları Kongresi. 11-13 Şubat, Kayseri. Sözlü Sunum Üçüncülük Ödülü (Şubat 2016)