

NOONAN SENDROMU'NUN PRENATAL TANISINDA *PTPN11* GEN ANALİZLERİNİN ETKİNLİĞİ

THE EFFECTIVENESS OF *PTPN11* GENE ANALYSIS IN THE PRENATAL DIAGNOSIS OF NOONAN SYNDROME

Güven TOKSOY^{1*}, Fatih TEPGEÇ^{1,2*}, Tuğba SARAÇ SİVRİKOZ³, İbrahim Halil KALELİOĞLU³, Selma DEMİR⁴, Recep HAS³, Atıl YÜKSEL³, Zehra Oya UYGUNER¹, Seher BAŞARAN¹

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Premed Genetik Tanı Merkezi, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴Trakya Üniversitesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

**1. ve 2. yazar çalışmaya eşit katkıda bulunmuşlardır.

ORCID IDs of the authors: G.T. 0000-0002-8103-9980; F.T. 0000-0001-8413-6949; T.S.S. 0000-0001-5482-9429; İ.H.K. 0000-0002-5504-2166; S.D. 0000-0002-0964-5513; R.H. 0000-0002-1372-8506; A.Y. 0000-0002-6487-0860; Z.O. U.0000-0002-2035-4338; S.B. 0000-0001-8668-4746

Cite this article as: Toksoy G, Tepgec F, Sarac Sivrikoz T, Kalelioglu IH, Demir S, Has R, et al. The Effectiveness of *PTPN11* gene analysis in the prenatal diagnosis of Noonan syndrome. J Ist Faculty Med 2021;84(1):34-9. doi: 10.26650/IUITFD.2020.803356

ÖZET

Amaç: Hücre büyüme, farklılaşma, yaşlanma ve siklus düzenlenmesinde önemli rol oynayan RAS-MAPK (Rat-sarcoma-Mitogen-activated-protein-kinase) yolağında bulunan 29 gendeki dominant patojenik varyantların yol açtığı klinik grup "Rasopatiler" olarak adlandırılır. En sık gözlenen Noonan sendromu (NS)'dur. Olguların ~%50'sinde NS ilişkili *PTPN11* varyantları saptanır ve bu varyantların %90'ı peptidin N-önündeki ilk SH2 ve C-yönündeki katalitik domainini kodlayan bölgelerde ortaya çıkar. Prenatal evrede artmış nokal kalınlık (NT) ve ayrıca kistik higroma, plevral efüzyon ve asit gibi lenfatik sistem anomalilerinin yanı sıra kardiyak anomaliler, polihidramnios, ekstremitte kısalığı ve makrosefali NS'nin bulguları arasında sayılır. *PTPN11* ilişkisi, kromozom anomalisi dışlanmış NT bulgusu olan fetüslerin %2-3'ünde, ek NS bulgusu olanlarda ise >%10 olarak bildirilmektedir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, NS ilişkili Ultrasonografi (USG) bulgusu olan, kromozom anomalisi dışlanmış 246 prenatal olguda, farklı yaklaşımlarla çalışılan *PTPN11* gen analiz sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Olguların 200'ünde genin hedef ekzonları (ekzon 3, 4, 7, 8, 13 ve 14), 46 olguda ise tüm gen Sanger dizileme yöntemi ile incelendi.

Bulgular: Genel seride beş olguda (%2) ikisi *novel* olan (p.P107S ve p.M504T) beş farklı varyant hedeflenmiş ekzonlarda saptandı. Bu beş olgunun ikisinde izole NT ve üçünde çoklu USG bulguları mevcuttu. *PTPN11* varyantı saptanmayan altı olguda, Rasopati

ABSTRACT

Objective: Dominant pathogenic variants in 29 RAS-MAPK (Rat-sarcoma-Mitogen-activated-protein-kinase) pathway genes, important for the regulation of cell growth, differentiation, aging and cell-cycle, are responsible for RASopathies, Noonan syndrome (NS) is the most common form. *PTPN11* variants are detected in 50% of the cases, 90% being identified in the first SH2 and in the catalytic domain at the N- and C-terminals of the peptide, respectively. Increased nuchal translucency (NT), lymphatic system anomalies (cystic hygroma, pleural effusion, ascites), cardiac anomalies, polyhydramnios, short limb and macrocephaly are the NS-associated prenatal findings. *PTPN11* association is reported in 2-3% of normal karyotyped fetuses with NT and in >10% when other NS findings are included.

Material and Method: *PTPN11* analysis with different approaches in 246 normal karyotyped prenatal cases with NS-associated USG findings were retrospectively evaluated. The targeted *PTPN11* regions in 200 and the whole gene structure of 46 cases were examined by Sanger sequencing.

Results: Pathogenic variants, including two *novel* variants (p.P107S and p.M504T), were identified in two fetuses with isolated NT and in three fetuses with multiple USG findings, leading to a 2% of detection rate, all found in targeted exons. Two of six cases, further investigated for targets of four Rasopathy genes, had causative genes in *SOS1*. One of three terminated

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: toksoyg@gmail.com

Başvuru/Submitted: 06.10.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 04.12.2020 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 07.12.2020 • **Kabul/Accepted:** 08.12.2020 • **Online Yayın/Published Online:** 28.01.2021

©Telif Hakkı 2021 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2021 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

ilişkili diğer dört genin hedef bölge analizinde, iki olguda *SOS1* ve gebelik terminasyonu yapılan üç olgunun birinde hedeflenmiş gen panel testinde *RAF1* geninde ilişkili patojenik varyantlar saptandı. NS ilişkili patojenik varyant saptama oranı hem izole NT grubunda hem de çoklu USG bulgulu grupta %2,3 idi.

Tartışma: Rasopatilerin %50'sinden sorumlu olan *PTPN11* genindeki patojenik varyantların %90'ı hedef ekzonlarda yer almaktadır. Bu nedenle, ilk aşamada *PTPN11* hedef ekzon analizi yapılmasının, patogenezin açıklanamadığı olgularda ise genin diğer ekzonlarının ve Rasopati ilişkili diğer genlerin incelenmesinin fayda-maliyet açısından uygun bir yaklaşım olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *PTPN11*, Noonan sendromu, artmış nuchal kalınlık, kistik higroma, plevral efüzyon

fetuses, investigated for the targeted-gene panel, had a causative gene in *RAF1* genes. Both the isolated NT and multiple USG finding groups revealed an equal detection rate of 2.3%.

Discussion: *PTPN11* is responsible for 50% of RASopathies and 90% of the pathogenic variants are delineated in the targeted exons. The rational, cost-effective approach for the clarification of the genetic basis of RASopathies is screening the addressed exons of *PTPN11* followed by the other exons and other RASopathy related genes.

Keywords: *PTPN11*, Noonan syndrome, increased nuchal translucency, cystic hygroma, pleural effusion

GİRİŞ

Ras-mitogen-activated protein kinase (RAS-MAPK) yolunda yer alan genler, hücre siklusunun düzenlenmesinde, hücre farklılaşmasında, yaşlanma ve normal gelişimin tüm önemli basamaklarında etkindir (1). Bu genlerde dominant etkide gerçekleşen değişimler, genetik olduğu kadar klinik bulguların da heterojenliği nedeniyle, Noonan sendromu (NS), Lentijinli Noonan sendromu (LEOPARD-NSML), Costello sendromu (CS), Cardio-Faciocutaneous sendrom (CFCS), Legius sendromu (LS) gibi farklı isimlerle tanımlanır. RAS-MAPK yolak hastalıkları dünyada en sık görülen (1:1000–2500) grup hastalıklardan olup "Rasopatiler ya da Noonan spektrumu hastalıkları" olarak adlandırılmışlardır (2). Rasopatiler içinde de en sık gözlenen NS olup olguların %50'sinde *PTPN11* geni mutasyonları saptanır (3).

NS'da gözlenen fenotipik bulgular; geniş alın, dolgun dudak yapısı, epikantal kıvrım, göreceli makrosefali, aşağı eğimli palpebral fissürler, pulmoner valf stenozu, hipertrofik kardiyomyopati, büyüme ve gelişme geriliği, kansere yatkınlık, göğüs kafesi deformiteleri, kısa boy, saç anomalileri, cilt anomalileri, yutma güçlüğü olarak ve pıhtılaşma bozuklukları (uzamış kanama zamanı) sayılabilir (2). NS ve CFC sendromu'nda gözlenen ek bulgular ise derin oluklu filtrum, yukarı yerleşimli kulaklar, yüksek damak, hipertelorizm, pitoz, kardiak septal defektler, görme bozuklukları ve lenfatik sistem anomalileridir (4). Bulgular arasında lenfatik anomalilere bağlı olarak gelişen nuchal sıvı artışı (*nuchal translucency*=NT), kistik higroma, ödem ve plevral efüzyon, uzun kemiklerde kısalık (<5p), polihidramniyos, kardiyak anomaliler, makrozomi, makrosefali (>90 per) ve renal anomaliler farklı ilerleyen gebelik evrelerinde uygulanan fetal USG incelemeleri ile saptanabilmektedir. Trizomi 21 ve birçok kromozom anomalisinde de gözlenebilen bu anomalilerin varlığında, genetik tanı için invaziv girişim önerilerek karyotip analizi ve moleküler sitogenetik testler (mikroarray, aCGH) uygulanmakta, bu testlerde herhangi bir anomali saptanmayan olgularda, Rasopati spektrumu hastalıklarının araştırılması gerekmektedir (5-7). Klinik bulgulardan artmış NT, 11-14. hafta tarama testinin en önemli parametresi olup, ölçümü her

gebelikte önerilmektedir (8, 9). Gebeliklerin %1'inde, NT ölçümü >3,5 mm saptanmakta ve invaziv girişim ile fetal kromozom analizi, normal karyotip saptanan örneklerde ise NS ayırıcı tanıda yer aldığından, özgün moleküler analizler uygulanmaktadır. NS spektrumu ilişkili olabilecek diğer USG bulguların (asit, plevral efüzyon, kistik higroma, vd) varlığında da bu yaklaşım izlenmektedir (1, 10, 11).

Günümüzde, NS ile ilişkili bugüne kadar 29 gen (*A2ML1*, *BRAF*, *CBL*, *CDC42*, *HRAS*, *KAT6B*, *KRAS*, *LZTR1*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAP3K8*, *MRAS*, *NF1*, *NRAS*, *NSUN2*, *PPP1CB*, *PTPN11*, *RAF1*, *RALA*, *RASA2*, *RIT1*, *RRAS*, *RRAS2*, *SHOC2*, *SOS1*, *SOS2*, *SPRY1* ve *ZNF526*) tanımlanmıştır. İlerleyen genetik araştırmalar spektrum ilişkili bilinen gen sayısının zamanla artmasına, henüz tanımlanmamış genlerin de olabileceğine işaret etmekte, öte yandan prenatal tanı sürecini de güçleştirmektedir. Ancak, spektrum içinde NS'nun en sık gözlenen sendrom olması, mutasyonlarının yarısının *PTPN11* geninde gösterilmesi ve bu mutasyonların da özellikle belli ekzonlarda kümelenmiş bulunması, moleküler test algoritmasına hızlı ve maliyeti düşük aşamaların konmasına fırsat sağlamıştır. *PTPN11* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*) geni, 12q24.13 de lokalize, 593 aminoasit kodlayan 15 ekzonlu bir gendir. İnsan mutasyon veritabanı 2020.1 (HGMD®) verilerine göre, *PTPN 11* geninde saptanmış farklı mutasyonların ekzonlara göre dağılımları; ekzon 3'de %35, ekzon 13'de %19,6, ekzon 7'de %11,9, ekzon 8'de %8,4, ekzon 4, 12 ve 14'de %2,2, ekzon 2, 6, 10 ve 11'de %2,1, ekzon 5'de %1,4 ve ekzon 1 ve 9'da %0,7 olup ekzon 15 de mutasyon bildirilmemiştir (1, 12).

OMIM ve literatür bilgilerine göre patojenik varyantlar belirli ekzonlarda (ekzon 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 14) yığılım göstermekte, tüm mutasyonların %35-73'ü ekzon 3'de, %20-40'ı ekzon 8'de, %10-13'ü ise ekzon 13 de saptanmaktadır (11, 13, 14). Bu bilgiler, postnatal olgularda sadece ekzon 3, 7, 8, 13'ün incelenmesiyle mutasyon saptanma oranının %85-90'a ulaşabildiğini göstermektedir. Prenatal tanı yaklaşımında da benzer bir algoritmanın uygulanmasının test maliyeti ve hızlı sonuç eldesi için akılcı olduğu düşünülmektedir (1, 10, 11). Yeni nesil dizileme

(YND) teknolojilerinin uygulanması bu hastalık grubunda ilişkili bilinen tüm genlerin panel olarak incelenmesine olanak sağlamaktadır. Buna karşın büyük veriden elde edilen, ilişkili olup olmadığı bilinmeyen, çok sayıda nedensel ya da rastlantısal varyantların saptanması, analiz ve yorumlamada büyük sorunlar yaratabilmektedir (2).

Çalışmamızda, kromozom anomalisi dışlanmış, USG bulgusu/ları ile NS'nun ayırıcı tanıda yer aldığı 246 olgu farklı moleküler tanı yaklaşımıyla incelendi; 1) *PTPN11* geni hedef ekzon Sanger dizileme, 2) *PTPN11* geni tüm ekzon Sanger dizileme, 3) *PTPN11* geninde mutasyon saptanmayan olgularda diğer 4 genin (*RAF1*, *KRAS*, *SOS1*, *SHOC2*) hedef ekzonlarında Sanger dizileme. Ayrıca USG bulguları nedeniyle sonlandırılan üç post mortem olguda Rasopati ilişkili 16 gen içeren panel testi ile inceleme yapıldı. Bu çalışmada farklı moleküler genetik test yaklaşımlarının taniya katkısı irdelendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, 2011-2019 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD' na İTF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD ve PREMEDI Genetik Hastalıkları Tanı merkezinden yönlendirilen, ilk trimesterde NT ölçümü 3,1 mm ve üzerinde saptanan veya sendrom ilişkili USG bulgusu (lenfatik sistem anomalileri, kalp anomalileri gibi) bulunan, karotip analizi normal, bilgilendirilmiş onam formu alınmış 246 olgu dahil edildi.

Tüm prenatal olguların kazanılmış dokularından (amniyotik sıvı, fetal kordon kanı, koryon villus), ve üç post mortem olgudan alınan deri biyopsi örneğinden standart kolon pürifikasyon yöntemi (Qiagen) ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Sanger dizileme için özgün PCR primerleri tasarlandı. Literatür ve veritabanı incelemelerinden elde edilen bilgilerle Rasopati panelinde bulunması gereken genler tespit edildi ve bu genlerin

multipleks primer tasarımları Ion Ampliseq sisteminde gerçekleştirildi. Sanger dizilemede ABI 3500 kapiller elektroforez sistemi, YND çalışmaları IonTorrent S5XL dizileme platformunda gerçekleştirildi. Üç farklı yaklaşımın sonuçları değerlendirildi;

1. *PTPN11* geni (NM_002834.5; NP_002825.3) hedef ekzonlar (3, 4, 7, 8, 13, 14) için Sanger dizileme (n=200)
2. *PTPN11* geni tüm ekzonlar için Sanger dizileme (n=46)
3. *PTPN11* tüm gen dizi analizi normal sonuçlanan olgularda 4 genin (*RAF1* (NM_002880), *KRAS* (NM_033360), *SOS1* (NM_005633), *SHOC2* (NM_007373)) hedef ekzonları için Sanger dizileme (n=6)

PTPN11 geni hedef ekzon analizinde patojenik varyant saptanmayan ve USG bulguları nedeniyle sonlandırılan üç gebeliğe ait DNA örneği, mutasyon saptanma sıklığı diğerlerine göre daha yüksek olan 16 gen (*BRAF*, *CBL*, *HRAS*, *KAT6B*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *NRAS*, *PTPN11*, *RAF1*, *SHOC2*, *SOS1*, *RIT1*, *NF1*, *SPRED1*, *RRAS*) için hedef panel yaklaşımıyla YND tekniği kullanılarak incelendi.

Çalışma, retrospektif arşiv çalışması olduğu için, etik komite başvurusu yapılmamıştır.

BULGULAR

Olguların anne ve baba yaşı ortalamaları sırası ile 31 (18-45) ve 34,5 (23-57) idi. Olgu grubunda invaziv girişimlerin 147'si (%59,8) 10-14 gebelik haftası (GH), 86'sı (%34,9) 15-24 GH, 16 'sı 25 ve üstü GH'da uygulandı (ortalama 16,7 GH). İnvaziv girişimlerin 68'i amniyosentez, 154'ü koryon villus biyopsisi, 24'ü ise kordosentez ile gerçekleşti.

Seride, *PTPN11* geni hedef ekzon analizi ile incelenen 200 olgunun ikisinde ve genin tüm ekzonlarının analiz edildiği 46 olgunun üçünde mutasyon saptandı ancak bu mutasyonlar da hedef ekzonlarda yer almakta idi (Tablo 1).

Tablo 1: Patojenik varyant saptanan olguların klinik ve USG bulguları ile ilişkili varyantların listesi.

Olgu no	GH	NT (mm)	USG bulguları	Gen	Ekzon; nükleotid; peptid	Literatür
	22	7	Artmış EP	<i>PTPN11</i>	Ex 13; c.1529A>C; p.Q510P	(15)
2	13	3,7	Artmış NT	<i>PTPN11</i>	Ex 13; c.1511T>C; p.M504T	Novel
3	13	18	Artmış NT, kistik higroma, generalize ödem, hipoplastik sol kalp, pelvis renalis dilatasyonu, uni. polidaktili (ayakta)	<i>PTPN11</i>	Ex 3; c.218C>T; p.T73I	(6)
4	29	N	PE, sol hidrotoraks, polihidramniyos	<i>PTPN11</i>	Ex 3; c.319C>T; p.P107S	Novel
5	19	N	PE, kısa femur ve ulna, çilek kafa görünümü, TUA	<i>PTPN11</i>	Ex 4; c.417G>C; p.E139D	(16)
6	20	>3,5	Artmış NT	<i>SOS1</i>	Ex 6; c.755T>C; p.I252T	(17)
7	15	12	Artmış NT, kistik higroma, yaygın asit, sağ aortik ark, piyelektazi	<i>SOS1</i>	Ex 6; c.755T>C; p.I252T	(17)
8	20		Kistik higroma	<i>RAF1</i>	Ex 7; c.775T>C; p.S259P	(18)

GH: gebelik haftası, PE: plevral efüzyon, EP: ense plisi, NT: nukal kalınlık (nuchal translucency), TUA: tek umbilikal arter, uni.: unilateral, ex: ekzon

Böylece, *PTPN11* geninde mutasyon saptama oranı %2,03 olarak belirlendi.

PTPN11 geninde mutasyon saptanmayan, 6 olgunun *RAF1*, *KRAS*, *SOS1*, *SHOC2* genleri için hedef ekzon incelemeleri ile olguların ikisinde *SOS1* geninde mutasyon saptandı.

PTPN11 geni hedef ekzon analizinde patojenik varyant saptanmayan ve YND yöntemi ile 16 gen için incelenen postmortem üç olgunun birinde *RAF1* geninde mutasyon saptandı.

TARTIŞMA

Noonan spektrumu hastalıklarının sık (1:1000-1:2500) görülmesi, postnatal olguların yaklaşık yarısında tek bir gendeki değişimlerin sorumlu tutulması, bazı bulguların erken dönem fetal USG incelemelerinde dahi saptanabilmesi, ilişkili USG bulgularının varlığında, kromozom analizleri normal sonuçlanan olgularda invaziv girişimden kazanılan materyal kullanılarak moleküler analizlerin yapılmasının prenatal tanıya önemli katkılar getirdiğini göstermektedir (6, 18, 19). Lee ve ark. (2009) prenatal USG bulgularına (NT ve kistik higroma) dayanarak 134 fetusta *PTPN11* geni analiz sonuçlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, mutasyon prevalansının kistik higroma için %16 ve NT için %2 olduğunu bildirmiştir (20). Tüm çalışma grubumuzda da *PTPN11* gen mutasyon oranı %2 iken, bu oran kistik higroma olgularında %13,3'e (2/15) ulaşmaktaydı. *PTPN11* gen mutasyon oranını USG bulgusuna göre değerlendirdiğimizde izole NT/ense pilisi artışı bulunan 88 olgudan ikisinde (%2,3) ve multipl USG bulgusu olan 132 olgudan üçünde mutasyon (%2,3) saptanması literatür ile uyumlu olarak değerlendirildi. Myers ve ark. (2014) normal karyotip saptanan, US bulgulu 75 fetusta en sıklıkla mutasyon gözlenen 4 gen için moleküler analiz yaparak %17,3 oranına (13/75) ulaşmışlardır (21). Leach ve ark. (2019) ise 845 fetusta 10 gen için yaptıkları YND çalışmasında, olguların %8,5'unda (72 olgu) patojenik/olası patojenik varyant saptamışlardır. *PTPN11* gen mutasyonları bu seride tüm mutasyonların %37,8'sini oluşturmuş, bunu %27'lik oranla *SOS1* geni izlemiştir (22). Serimizde de *PTPN11* gen mutasyonları dışlanmış olgularda *SOS1* geni 2 olgu ve *RAF1* geni ilişkisi tek olguda gösterilerek literatürle uyumlu bulunmuştur. Hakami ve ark. (2016), prenatal ve postnatal bulgular ile NS düşünülen 212 yenidoğanda 13 gen içeren bir panel uygulamasında 31'i *PTPN11* geninde (%67,4) olmak üzere olguların 46'sında mutasyon saptamışlardır. Bu çalışmada, mutasyon saptanan 46 olgunun 31'inde izole USG bulgusu olduğu bildirilmişti. Mutasyon oranı izole kistik higroma bulgulu olgularda %64,5 iken artmış NT olgularında %19,3 idi. Bu sonuçlara dayanarak prenatal olgularda *PTPN11*, *RAF1* ve *KRAS* genlerinin mümkünse *BRAF* ve *MAP2K1* genlerinin de incelenmesi önerilmişti (6).

Literatür taramalarında *PTPN11* geni ekzon 3, 4, 7, 8, 13 ve 14'ü içeren hedef ekzon analizlerinde post-natal olguların ~%90'nında patojenik varyant saptanabileceği ön görülmektedir (11-14, 23). Çalışmamızda da gerek hedef ekzon analizi gerekse tüm gen dizileme ile *PTPN11* geninde saptanan mutasyonların tümünün hedef ekzonlarda bulunması, prenatal tanıda ilk aşamada *PTPN11* geninin hedeflenmiş 6 ekzonunun Sanger dizileme ile analizinin doğru bir yaklaşım olduğu görüşünü desteklemektedir.

PTPN11 mutasyonu saptanan beş olgunun ikisi izole olmak üzere üçünde artmış NT/ense pilisi, ikisinde plevral efüzyon ve birinde kistik higroma gibi lenfatik sistem bulguları, birer olguda kardiyak, renal ve ekstremitte bulguları mevcuttu. İzole NT/ense pilisi olan iki olguda 13. ekzon-da farklı değişimler saptandı. Bu değişimlerden p.Q510P değişimi daha önce postnatal NS olgularında bildirilmiş olmakla beraber prenatal olgularda bildirilmemişti. İzole NT/ense pilisi olgularının diğerinde 13. ekzon saptanan p.M504T değişiminin novel varyantın paternal kalıtmı olduğu anlaşıldı. Babanın fenotipik olarak normal olduğu görüldü. Bu değişim Varsome (*The Human Genomics Community*) açık veri tabanının ACMG-2015 (American Journal of Medical Genetics) kriterlerinden; (PM1-strong) mutasyonların sık saptandığı bölgede (*hot spot*) yer alması (24), (PM2-moderate) saptanan varyantın Genome-Ad veritabanında bulunmaması, (PM5-moderate) aynı pozisyonda valin ve lösin değişimlerinin klinikle ilişkisinin bildirilmiş olması (3, 11), (PP2-supporting) *PTPN11*'deki hastalık ilişkili varyantların %95,5'inin patojenik ve patojenik varyantların da %51'inin yanlış anlamlı olması, (PP3-supporting) 21 farklı tahmin programının tümünün patojenik tahmin vermesi hastalık ilişkisi vermiş olması kriterleri nedeni ile patojenik olarak sınıflanmıştır (25, 26). Diğer otozomal dominant (OD) geçişli hastalıklarda olduğu gibi aynı aileden ya da farklı aileden aynı *PTPN11* mutasyonu taşıyan bireylerin ekspresyon farklılıklarının ortaya çıkardığı klinik heterojenite bilinen bir durumdur (27, 28). Bu ailede de doğum sonrası ve adölesan süreçte yapılacak klinik takip saptanan varyantın fenotipik etkisinin daha iyi değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda saptadığımız diğer novel değişim (c.319C>T, p.P107S) çoklu USG bulguları gözlenen bir olguda saptanmış olup kodladığı SH2 domaininde prolin amino asitinin serine dönüşümüne neden olmaktadır. Fetusun anne ve babasında saptanmayan ve gonadal mozaisizm dışlanamamakla birlikte *de novo* kalıtıldığı düşünülen bu varyant ACMG-2015 kriterlerinden (25); (PM2-moderate) saptanan varyantın GenomeAd veritabanında bulunmaması, (PP2-supporting) *PTPN11*'deki hastalık ilişkili varyantların %95,5'inin patojenik ve patojenik varyantların da %51'inin yanlış anlamlı olması, (PP3-supporting) 21 farklı tahmin programından FTHMM, MVP, MutPred ve REVEL hariç 17 sinin patojenik tahmin vermiş olması kriterleri nedeni ile klinik önemi bilinmeyen varyasyon (VUS:*variant of uncertain significance*) statüsünde sınıflanmıştır (25, 26).

Prolin-Serin değişimleri fosforilasyon olasılığı taşıdığından, NetPhos 3.1 Server fosforilasyon tahmin aracı kullanıldığında 107. pozisyonda bulunan serin için 0,797 skorla spesifik olmayan kinaz aktivitesi ve 0,541 skorla (olasılık; düşük 0→1 yüksek) Casein kinaz fosforilasyonu tahmini alınmıştır. Yanlış anlamalı değişim bulunan aminoasit pozisyonunun protein lokasyonuna bakıldığında 103 ile 111. aminoasitler aralığının iki SH domaininin katlanmasında işlev gördüğü (N-SH2/C-SH2 linker) bildirilmektedir (29, 30). Daha önce bu bölgede 106. ve 110. pozisyonda saptanan p.D106A, p.D106G, p.E110A, p.E110K değişimleri Noonan sendromu ile ilişkilendirilmiştir (13, 28, 31-33). Tahmin programlarının patojenik özelliğine işaret etmesi, klinik ve USG bulguların *PTPN11* patolojileri ile uyumlu görülmesi ve değişimin *de novo* oluşması p.P107S'nin hastalık ilişkili olma olasılığını desteklemiştir.

Çoklu USG patolojisi olan bir olguda saptanan p.T73I değişimi, izole hidrops fetalis bulgulu bir prenatal olguda bildirilmişti. Çoklu ultrason patolojili olguda saptanan p.E139D değişimi ise birisi izole hidrops bulgulu ve diğeri çoklu USG bulgusu taşıyan iki prenatal olguda bildirilmişti (18). Literatürdeki *PTPN11* mutasyonu saptanan prenatal olguların mutasyonu ile USG bulguları incelendiğinde aynı mutasyonun hem izole hem de çoklu bulgu ile birlikteliği gösterdiği gözlenmektedir. USG bulgusu açısından yaklaşıldığında spesifik bir genotip fenotip ilişkisi bildirilmemiştir (6, 16, 18, 20).

SOS1 geninde aynı patojenik varyantın gösterildiği iki olgunun USG bulguları birbirinden farklı idi. Olgulardan birinde izole NT artışı (>3,5 mm), diğesinde NT artışına (12 mm) ek olarak kistik higroma, asit, sağ aortik ark, piyelektazi bulguları bulunmaktaydı. Bu durum OD hastalıkların ekspresivite farkı ile ortaya çıkan formlarla uyumludur. Ayrıca *PTPN11*'in olduğu kadar *SOS1* patojenik varyantlarının da benzer klinik tablodan sorumlu olması, OD hastalıklarda lokus heterojenitesi olarak açıklanan ve belli bir klinik spektrumdan farklı kromozomal lokusta yerleşik genlerin aynı ya da farklı kalıtım modelleri ile ortaya çıkabilmesi durumu ile de uyumludur.

Çalışma sonuçlarına göre, artmış NT bulgusu olan ve invaziv girişim yapılan gebeliklerde fetal kromozom analizinde anomali saptanmayan tüm olgularda Rasopati *PTPN11* geninin seçilmiş ekzonların incelenmesi, bu incelemenin normal sonuçlananlarda literatür bilgileri ışığında belirli genlerin seçilmiş ekzonlarının dizilenmesi USG bulgularına da bağlı olarak taniya en az %2 katkı sağlamaktadır. Bir sonraki aşamada ise YND yöntemi ile bilinen diğer genlerin incelenmesi, moleküler tanı alamayan olgularda yeni genlerin tanımlanması için tüm ekzom, tüm genom analizlerinin yapılması, olası kopya sayısı değişiklikleri için genomun büyük delesyon, duplikasyon ve yeniden düzenlenmeler açısından incelenmesi taniya yönelik araştırmalara katkı sağlayacaktır.

Etik Komite Onayı: Retrospektif çalışma olduğundan etik komite onayı alınmamıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- G.T., F.T., S.D., O.Z.U., İ.H.K., S.B.; Veri Toplama- G.T., F.T., T.S.S.; Veri Analizi/Yorumlama- G.T., F.T., İ.H.K., S.D., R.H., A.Y., O.Z.U.; Yazı Taslağı- G.T., S.B., O.Z.U., F.T., T.S.S., S.D.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- G.T., F.T., İ.H.K., R.H., S.B., O.Z.U.; Son Onay ve Sorumluluk- G.T., F.T., T.S.S., İ.H.K., S.D., R.H., A.Y., Z.O.U., S.B.; Malzeme ve Teknik Destek- G.T., F.T., S.D.; Süpervizyon- G.T., F.T., R.H., A.Y., S.B., O.Z.U.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was not received due to the retrospective nature of the study.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- G.T., F.T., S.D., O.Z.U., İ.H.K., S.B.; Data Acquisition- G.T., F.T., T.S.S.; Data Analysis/Interpretation- G.T., F.T., İ.H.K., S.D., R.H., A.Y., O.Z.U.; Drafting Manuscript- G.T., S.B., O.Z.U., F.T., T.S.S., S.D.; Critical Revision of Manuscript- G.T., F.T., İ.H.K., R.H., S.B., O.Z.U.; Final Approval and Accountability- G.T., F.T., T.S.S., İ.H.K., S.D., R.H., A.Y., Z.O.U., S.B.; Technical or Material Support- G.T., F.T., S.D.; Supervision- G.T., F.T., R.H., A.Y., S.B., O.Z.U.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: Novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum Mutat* 2008;29(8):992-1006. [CrossRef]
2. Rauen KA. The RASopathies. *Annu Rev Genom Hum G.* 2013;14:355-69. [CrossRef]
3. Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in *PTPN11*, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001;29(4):465-8. [CrossRef]
4. Jindal GA, Goyal Y, Burdine RD, Rauen KA, Shvartsman SY. RASopathies: unraveling mechanisms with animal models. *Dis Model Mech* 2015;8(8):769-82. [CrossRef]
5. Lin AE, O'Brien B, Demmer LA, Almeda KK, Blanco CL, Glasow PF, et al. Prenatal features of Costello syndrome: ultrasonographic findings and atrial tachycardia. *Prenat Diagn* 2009;29(7):682-90. [CrossRef]

6. Hakami F, Dillon MW, Lebo M, Mason-Suares H. Retrospective study of prenatal ultrasound findings in newborns with a Noonan spectrum disorder. *Prenat Diagn* 2016;36(5):418-23. [\[CrossRef\]](#)
7. Renna MD, Pisani P, Conversano F, Perrone E, Casciaro E, Renzo GC, et al. Sonographic markers for early diagnosis of fetal malformations. *World J Radiol* 2013;5(10):356-71. [\[CrossRef\]](#)
8. Jackson M, Rose NC. Diagnosis and management of fetal nuchal translucency. *Semin Roentgenol* 1998;33(4):333-8. [\[CrossRef\]](#)
9. Hyett J, Thilaganathan B. First trimester screening for fetal abnormalities. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;11(6):563-9. [\[CrossRef\]](#)
10. Hung CS, Lin JL, Lee YJ, Lin SP, Chao MC, Lo FS. Mutational analysis of *PTPN11* gene in Taiwanese children with Noonan syndrome. *J Formos Med Assoc* 2007;106(2):169-72. [\[CrossRef\]](#)
11. Athota JP, Bhat M, Nampoothiri S, Gowrishankar K, Narayanachar SG, Puttamalles V, et al. Molecular and clinical studies in 107 Noonan syndrome affected individuals with *PTPN11* mutations. *BMC Med Genet* 2020;21(1):50. [\[CrossRef\]](#)
12. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet* 2014;133(1):1-9. [\[CrossRef\]](#)
13. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, et al. *PTPN11* mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2002;70(6):1555-63. [\[CrossRef\]](#)
14. Musante L, Kehl HG, Majewski F, Meinecke P, Schweiger S, Gillissen-Kaesbach G, et al. Spectrum of mutations in *PTPN11* and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* 2003;11(2):201-6. [\[CrossRef\]](#)
15. Keren B, Hadchouel A, Saba S, Sznajer Y, Bonneau D, Leheup B, et al. *PTPN11* mutations in patients with LEOPARD syndrome: a French multicentric experience. *J Med Genet* 2004;41(11):e117. [\[CrossRef\]](#)
16. Baldassarre G, Mussa A, Dotta A, Banaudi E, Forzano S, Marinosci A, et al. Prenatal features of Noonan syndrome: prevalence and prognostic value. *Prenat Diagn* 2011;31(10):949-54. [\[CrossRef\]](#)
17. Lepri F, De Luca A, Stella L, Rossi C, Baldassarre G, Pantaleoni F, et al. *SOS1* mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 2011;32(7):760-72. [\[CrossRef\]](#)
18. Croonen EA, Nillesen WM, Stuurman KE, Oudesluijs G, van de Laar IM, Martens L, et al. Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Eur J Hum Genet* 2013;21(9):936-42. [\[CrossRef\]](#)
19. Schluter G, Steckel M, Schiffmann H, Harms K, Viereck V, Emons G, et al. Prenatal DNA diagnosis of Noonan syndrome in a fetus with massive hygroma colli, pleural effusion and ascites. *Prenat Diagn* 2005;25(7):574-6. [\[CrossRef\]](#)
20. Lee KA, Williams B, Roza K, Ferguson H, David K, Eddleman K, et al. *PTPN11* analysis for the prenatal diagnosis of Noonan syndrome in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Clin Genet* 2009;75(2):190-4. [\[CrossRef\]](#)
21. Myers A, Bernstein JA, Brennan ML, Curry C, Esplin ED, Fisher J, et al. Perinatal features of the RASopathies: Noonan syndrome, cardiofaciocutaneous syndrome and Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 2014;164A(11):2814-21. [\[CrossRef\]](#)
22. Leach NT, Wilson Mathews DR, Rosenblum LS, Zhou Z, Zhu H, Heim RA. Comparative assessment of gene-specific variant distribution in prenatal and postnatal cohorts tested for Noonan syndrome and related conditions. *Genet Med* 2019;21(2):417-25. [\[CrossRef\]](#)
23. Sarkozy A, Conti E, Seripa D, Digilio MC, Grifone N, Tandoi C, et al. Correlation between *PTPN11* gene mutations and congenital heart defects in Noonan and LEOPARD syndromes. *J Med Genet* 2003;40(9):704-8. [\[CrossRef\]](#)
24. Narayanan DL, Pandey H, Moirangthem A, Mandal K, Gupta R, Puri RD, et al. Hotspots in *PTPN11* Gene Among Indian Children With Noonan Syndrome. *Indian Pediatr* 2017;54(8):638-43. [\[CrossRef\]](#)
25. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-24. [\[CrossRef\]](#)
26. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2019;35(11):1978-80. [\[CrossRef\]](#)
27. Kosaki K, Suzuki T, Muroya K, Hasegawa T, Sato S, Matsuo N, et al. *PTPN11* (protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11) mutations in seven Japanese patients with Noonan syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(8):3529-33. [\[CrossRef\]](#)
28. Zenker M, Voss E, Reis A. Mild variable Noonan syndrome in a family with a novel *PTPN11* mutation. *Eur J Med Genet* 2007;50(1):43-7. [\[CrossRef\]](#)
29. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999;294(5):1351-62. [\[CrossRef\]](#)
30. Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 2004;4(6):1633-49. [\[CrossRef\]](#)
31. Bertelloni S, Baroncelli GI, Dati E, Ghione S, Baldinotti F, Toschi B, et al. IGF-I generation test in prepubertal children with Noonan syndrome due to mutations in the *PTPN11* gene. *Hormones (Athens)* 2013;12(1):86-92. [\[CrossRef\]](#)
32. Ezquieta B, Santome JL, Carcavilla A, Guillen-Navarro E, Perez-Aytes A, Sanchez del Pozo J, et al. Alterations in RAS-MAPK genes in 200 Spanish patients with Noonan and other neuro-cardio-facio-cutaneous syndromes. Genotype and cardiopathy. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2012;65(5):447-55. [\[CrossRef\]](#)
33. Tajan M, de Rocca Serra A, Valet P, Edouard T, Yart A. SHP2 sails from physiology to pathology. *Eur J Med Genet* 2015;58(10):509-25. [\[CrossRef\]](#)