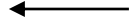


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BENZER KLİNİK BULGULAR GÖSTEREN BİRDEN
FAZLA ETKİLENMİŞ OLGU BULUNAN AİLELERDE
GENETİK ETİYOLOJİNİN TÜM EKZOM DİZİLEME
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

GÜLNİHAL BULUT

**DANIŞMAN
PROF. DR. BİRSEN KARAMAN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Sevgili aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren, desteğini her konuda hissettiğim, yardımlarını esirgemeyen, değerli danışman hocam Prof. Dr. Birsen Karaman'a,

Eğitimime olan katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Seher Başaran'a ve Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner'e,

Yeni nesil dizileme çalışmalarında yol gösteren, yardımcı olan Dr. Güven Toksoy'a,

Eğitimim sırasında kendisinden çok şey öğrendiğim Dr. Çağrı Güleç'e,

Tezimde vaka seçimi ve klinik bilgilerin oluşturulmasında yol gösteren ve öğretici olan Uzm. Dr. Umut Altunoğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bir aile gibi olduğumuz sevgi ve desteklerini her daim hissettiğim sevgili Bio. Havva Öztürk, Bio. Nuray Kırmızı ve Tek. Zuhale Kaplan'a,

ve tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Eğitimim boyunca bir ekip olduğumuz için çok şanslı hissettiğim ve her daim yanımda olup desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Somayyeh Heidargholizadeh, MSc. Adam Najaflı'ya,

Yükseklisans eğitimim boyunca motivasyon ve destekleriyle yanımda olan sevgili arkadaşlarım MSc. Selin Toprak, MSc. Buşra Kasap ve MSc.Cemal Çağır Koçana'ya,

Her anımda, kararında yanımda olan yoldaşım, canım dostum MSc.Bilgenur Bilge'ye,

Sonsuz sevgisini ve desteğini esirgemeyen en büyük şansım ve en değerli varlığım olan canım aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:32819

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Genetik Hastalıklar	3
2.1.1. Mendelyen Hastalıklar	3
2.2. Mendel Kalıtımı ile Uyumlu Hastalıklar	5
2.2.1. Kromozomal Hastalıklar	5
2.2.2. Tek Gen Hastalıkları	6
2.2.2.1. Tek Gen Hastalıklarında Kalıtım Modelleri	7
2.2.2.2. Otozomal Dominant Kalıtım.....	7
2.2.2.3. Otozomal Dominant Kalıtımda Tanı Güçlüğü Oluşturan Durumlar.....	8
2.2.2.4. Otozomal Resesif Kalıtım	12
2.2.2.5. X'e Bağlı Resesif Kalıtım	14
2.2.2.6. X'e Bağlı Dominant Kalıtım	17
2.2.2.7. Y-bağlı Kalıtım	18
2.3. Tek Gen Hastalıklarının Değerlendirilmesinde Zorluk Yaratan Durumlar	19
2.3.1. Genetik Heterojenite	19
2.3.2. Allelik heterojenite.....	19
2.3.3. Lokus Heterojenitesi	19
2.4. Genetik Hastalıkların Tanı Aşamaları	22
2.4.1. Klinik Tanının Aşamaları.....	22
2.4.2. Öykü alma ve Aile Ağacı Oluşturma	22
2.4.3. Klinik Muayene.....	24

2.4.4. Genetik Danışma.....	25
2.5. Genetik Hastalıkların Tanısında Kullanılan Yöntemler	26
2.5.1. Sitogenetik Teknikler.....	26
2.5.1.1. Klasik Sitogenetik Yöntemler	27
2.5.1.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler	31
2.5.2. Moleküler Yöntemler.....	40
2.5.2.1. DNA Dizileme Yöntemleri	41
2.6. YND Analizinde Varyantların Değerlendirilmesi	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Çalışma Grubu	49
3.2. Klinik Değerlendirmeler	49
3.3. Moleküler Yöntemler.....	49
3.3.1. DNA İzolasyonu	49
3.3.2. DNA Kalite Değerlendirme, Seyreltme ve DNA Yoğunluğunun Ölçümü.....	50
3.3.3. Tüm Ekzom Dizileme	50
3.4. YND ile Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme ile Doğrulanması ve Aile Segregasyon Çalışmaları.....	62
4. BULGULAR.....	66
4.1. Olgu 1.....	66
4.1.1. Aile Öyküsü	66
4.1.2. Moleküler Analiz Sonuçları	68
4.2. Olgu 2.....	70
4.2.1. Aile Öyküsü	70
4.2.2. Fizik Muayenesi	72
4.2.3. Moleküler Analiz Sonuçları	72
4.3. Olgu 3.....	79
4.3.1. Aile Öyküsü	79
4.3.2. Postmortem Muayene	80
4.3.3. Moleküler Analiz Sonuçları	81
5. TARTIŞMA	84
5.1. Olgu 1.....	85
5.2. Olgu 2.....	89
5.3. Olgu 3.....	97

KAYNAKLAR	103
-----------------	-----



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kalıtım ile ilgili temel kavramlar	5
Tablo 2-2: Bazı dismorfik bulgular	24
Tablo 2-3: Kromozom anomalilerinin tanısında kullanılan sitogenetik ve moleküler sitogenetik tekniklerin avantaj ve dezavantajları	40
Tablo 2-4: Mutasyon tipleri ve etkileri	47
Tablo 3-1: Hedef bölgelerin çoğaltılması için hazırlanan mix	50
Tablo 3-2: Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan termal döngü programı	51
Tablo 3-3: Amplikonların kesimi için kullanılan termal döngü programı	52
Tablo 3-4: Barkod-adaptör karışımı için hazırlanan mix	52
Tablo 3-5: Barkod-adaptör ligasyon karışımı için hazırlanan mix	53
Tablo 3-6: Ligasyon için uygulanan termal döngü programı	53
Tablo 3-7: Kütüphane amplifikasyonu için uygulanan termal döngü programı	54
Tablo 3-8: Ion Reporter 5.14.1.2 yazılımında yer alan bazı kolon başlıkları ve açıklamaları (42)	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Mor (B) ve beyaz (b) çiçek rengi genleri için heterozigot olan iki bezelye bitkisinin çaprazlanmasını gösteren bir Punnett karesi (2).	4
Şekil 2-2: OMIM’de tanımlanan fenotipler ve ilişkili genler (6)	7
Şekil 2-3: Ebeveynden çocuğa dominant (baskın) genlerin aktarılması (7)	8
Şekil 2-4: Otozomal dominant kalıtım aile ağacı örneği	8
Şekil 2-5: Penetrans eksikliğine örnek bir aile ağacı. II2 hastalık ilişkili gen için zorunlu taşıyıcı olmasına karşın semptom göstermemektedir. II3, III1, IV1 veya IV2 gibi etkilenmemiş diğer aile üyeleri de hastalık ilişkili semptom göstermeyen gen taşıyıcıları olabilir.	9
Şekil 2-6: : Yarık el deformitesi olan bir olgu örneği (8)	10
Şekil 2-7: Nörofibromatozisin klinik bulgularının çeşitliliği	11
Şekil 2-8: Ekspresivite değişkenliğine örnek bir aile ağacı. Ailenin farklı üyeleri Nörofibromatozisin farklı klinik bulgularını göstermektedir.	12
Şekil 2-9: Ebeveynden çocuğa resesif (çekinik) genlerin aktarılması (7)	13
Şekil 2-10: Otozomal resesif kalıtım için aile ağacı örneği	13
Şekil 2-11: X’e bağlı resesif kalıtım aile ağacı örneği	14
Şekil 2-12: X’e bağlı hastalıkların taşıyıcı anne tarafından çocuklarına aktarılması (7)	14
Şekil 2-13: X’e bağlı hastalıkların hasta bir erkek tarafından çocuklarına aktarılması (7)	15
Şekil 2-14: X inaktivasyon mekanizması (11)	16
Şekil 2-15: X’e bağlı dominant kalıtım aile ağacı örneği	18
Şekil 2-16: Y- bağlı kalıtım aile ağacı örneği	19
Şekil 2-17: Lokus heterojenitesi	20
Şekil 2-18: Kalıtımın kompleks modelleri (13)	21
Şekil 2-19: Hastalık ilişkili genlerin birden fazla Mendel koşuluyla ilişkisi (13)	22
Şekil 2-20: Aile ağacında kullanılan bazı semboller	23
Şekil 2-21: G-bantlama görüntüsü (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)	29
Şekil 2-22: C-bantlama görüntüsü (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)	30

Şekil 2-23: NOR-boyama görüntüsü (siyah oklar akrosentrik kromozomların satellitlerini, kırmızı ok bisatellit içeren bir marker kromozomu göstermektedir) (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)	31
Şekil 2-24: FISH çalışma prensibi (16)	32
Şekil 2-25: Lokus spesifik prob (PWS/AS) (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)	32
Şekil 2-26: 15. Kromozom kökenli alfa satellit prop örneği (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)	33
Şekil 2-27: Subtelomerik prob (ok p kolunda delesyonu gösteriyor) (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)	34
Şekil 2-28: 6. kromozoma özgü arm spesifik prob kullanılarak yapılan FISH çalışması görüntüsü (kırmızı ok parsiyel bir duplikasyonu göstermektedir.) (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)	35
Şekil 2-29: CGH çalışma prensibi	36
Şekil 2-30: a-CGH ve mikroarray çalışma prensibi (22)	38
Şekil 2-31: Bir olguya ait 15. kromozomdaki delesyon bölgesinin a-CGH görüntüsü (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)	39
Şekil 2-32: MLPA çalışma prensibi (25)	41
Şekil 2-33: Sanger dizilemenin aşamaları	42
Şekil 2-34: YND çalışma prensibi	43
Şekil 2-35: Nokta mutasyonu tipleri	47
Şekil 3-1: Her bir örneğin 12 kuyuda yer alan hedef amplifikasyon reaksiyonlarının, 1–5 ve 7–12 kuyulardan alınarak 6. kuyucuğa aktarılması.	51
Şekil 3-2: TED iş akış şeması	57
Şekil 3-3: Emülsiyon PCR (emPCR)	58
Şekil 3-4: Ion Torrent Ion Chef Sistemi	59
Şekil 3-5: Ion GeneStudio S5 System	60
Şekil 4-1: Olgu 1'e ait aile ağacı	67
Şekil 4-2: Olgu 1'e ait görüntü	68
Şekil 4-3: A.İndekste (IV-2) <i>CCDC88C</i> geninde saptanan c.1915C>T (p.Arg639Ter) homozigot varyantın IGV görüntüsü. B.Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü	69

Şekil 4-4: A. Annede (III-12) <i>CCDC88C</i> geninde saptanan c.1915C>T (p.Arg639Ter) heterozigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü.....	69
Şekil 4-5: A. Babada (III-13) <i>CCDC88C</i> geninde saptanan c.1915C>T (p.Arg639Ter) heterozigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü.....	70
Şekil 4-6: Olgu 2'ye ait aile ağacı	71
Şekil 4-7: Olgu 2'ye ait görüntüler	72
Şekil 4-8: A. İndekste (Şekil 4-5, III-4) <i>FLNA</i> geninde saptanan c.1829-1G>T hemizigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü.....	73
Şekil 4-9: A. Benzer etkilenmiş kardeşte (Şekil 4-5, III-5) <i>FLNA</i> geninde saptanan c.1829-1G>T hemizigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü	74
Şekil 4-10: A. Sağlıklı kardeşin (Şekil 4-5, III-3) normal olan IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü	74
Şekil 4-11: Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile segregasyon çalışmaları sonucunda sırasıyla, babanın (Şekil 4-5, II-5) normal elektroferogram görüntüsü, annenin (Şekil 4-5, II-4) <i>FLNA</i> geninde saptanan c.1829-1G>T heterozigot varyantın elektroferogram görüntüsü ve benzer etkilenmiş kardeşte saptanan (Şekil 4-5, III-2) c.1829-1G>T hemizigot varyantın elektroferogram görüntüsü.....	75
Şekil 4-12: A. Benzer etkilenmiş kardeşte (Şekil 4-5, III-5) <i>RP1L1</i> geninde saptanan c.455G>A (p.Arg152Gln) homozigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü.....	76
Şekil 4-13: A. İndekste (Şekil 4-5, III-4) <i>RP1L1</i> geninde saptanan c.455G>A (p.Arg152Gln) heterozigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü	77
Şekil 4-14: A.Sağlıklı kardeşin (Şekil 4-5, III-3) normal olan IGV görüntüsü. B.Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü	78
Şekil 4-15: Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile segregasyon çalışmaları sonucunda sırasıyla, babanın (Şekil 4-5, II-5) ve annenin (Şekil 4-5, II-4) <i>RP1L1</i> geninde saptanan c.455G>A (p.Arg152Gln) heterozigot varyantın elektroferogram görüntüsü ve benzer etkilenmiş kardeşin (Şekil 4-5, III-2) normal olan elektroferogram görüntüsü.....	79

Şekil 4-16: Olgu 3' ait aile ağacı	80
Şekil 4-17: Olgu 3'ün postmortem muayene sonrası görüntüleri	81
Şekil 4-18: A.İndekste (Şekil 4-16, V-3) NUP188 geninde saptanan c.124C>T (p.Arg42Ter) homozigot varyantın IGV görüntüsü. B.Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü	82
Şekil 4-19: A. Sağlıklı kardeşte (Şekil 4-16, V-2) NUP188 geninde saptanan c.124C>T (p.Arg42Ter) heterozigot varyantın IGV görüntüsü. B.Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü	82
Şekil 4-20: Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile segregasyon çalışmaları sonucunda sırasıyla, anne (Şekil 4-16, IV-4) ve babanın (Şekil 4-16, IV-5) NUP188 geninde saptanan c.124C>T (p.Arg42Ter) heterozigot varyantın elektroferogram görüntüsü. ...	83
Şekil 5-1: CCDC88C transkriptinde ekzon ve intronlar (ok ile gösterilen saptanan değişimin bulunduğu ekzonu göstermektedir.).....	86
Şekil 5-2: DAPLE proteininin, N-terminal Hook motifi, merkezi sarmal bölgeyi ve DVL1 proteinin bağlandığı PDZ alanı bulunan C-terminalini gösteren şematik görüntüsü (51).....	86
Şekil 5-3: FLNA transkriptinde ekzon ve intronlar (ok ile gösterilen saptanan değişimin bulunduğu ekzonu göstermektedir.)	90
Şekil 5-4: Flna'nın yapısı. FLNA dimerinin 24 tekrarlı Ig alanı (gri) ve aktin bağlanma domainin (ABD) (sarı) şematik görüntüsü (61).....	90
Şekil 5-5: RP1L1 transkriptinde ekzon ve intronlar (ok ile gösterilen saptanan değişimin bulunduğu ekzonu göstermektedir.)	94
Şekil 5-6: <i>RP1L1</i> ve <i>RP1</i> genlerinin şematik görüntüsü (74).....	94
Şekil 5-7: Literatürde bugüne kadar bildirilen OMD ilişkili varyantlar (79).	95
Şekil 5-8: Literatürde bildirilen <i>RP1L1</i> ile ilişkili RP varyantları (79).	96
Şekil 5-9: <i>NUP188</i> transkriptinde ekzon ve intronlar (ok ile gösterilen saptanan değişimin bulunduğu ekzonu göstermektedir.).....	97

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- DNA:** Deoksiribonükleik Asit
- RNA:** Ribonükleik Asit
- MKA:** Multiple Konjenital Anomali
- MR:** Mental Retardasyon
- EDTA:** Etilendiamin Tetraasedik Asit
- ExAC:** Exome Aggregation Consortium
- FISH:** Fluoresan In Situ Hibridizasyon
- OMIM:** Online Mendelian Inheritance in Man
- UPD:** Uniparental Dizomi
- OD:** Otozomal Dominant
- OR:** Otozomal Resesif
- BT:** Bilgisayarlı Tomografi
- MRI:** Magnetic Resonance Imaging
- USG:** Ultrasonografi
- ICSI:** Intra Cytoplasmic Sperm Injection
- HRBT:** High Resolution Banding Technique
- PWS:** Prader Willi Sendromu
- AS:** Angelman Sendromu
- WCP:** Whole Chromosome Painting
- CGH:** Comperative Genomic Hybridisation
- CNV:** Copy Number Variations
- SNP:** Single Nucleotide Polymorphisms
- MLPA:** Multiple Ligation - dependent Probe Amplification
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- µL:** Mikrolitre
- dk:** dakika
- dsDNA:** Double-stranded DNA (çift zincirli DNA)
- Kb:** Kilo baz

kDa: Kilo dalton
Mb: Megabaz
TE: Tris-EDTA
Tm: Temperature of Melting (Erime ısısı)
ddNTP: dideoksi nükleotid trifosfat
dNTP: deoksinükleotid trifosfat
YND: Yeni Nesil Dizileme
TED: Tüm Ekzom Dizileme
TGD: Tüm Genom Dizileme
KED: Klinik Ekzom Dizileme
HGMD: Human Gene Mutation Database
ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics
MAF: Minör Allel Frekansı
emPCR: Emülsiyon Temelli Polimeraz Zincir Reaksiyonu
BAM: Binary Alignment Map
VCF: Variant caller format
IRGV: Ion Reporter Genomic Viewer
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV: Ultraviyole
GH: Gebelik Haftası
TTN: Transient tachypnea of the newborn
CCA: Korpus Kallosum Agenezisi
EKO: Ekokardiyografi
VSD: Ventricular Septal Defect
VP: Ventrikülo-peritoneal
IGV: Integrative Genomics Viewer
dH₂O: Distile su
UTR: Untranslated region
EDTA: Etilendiamin tetraasedik asit
KKH: Konjenital Kalp Hastalığı

ToF: Fallot tetralojisi

YDYBÜ: Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi

İGP: İnsan Genom Projesi

PVNH1: Periventriküler Nodüler Heterotopi 1

PVNH4: Periventriküler Nodüler Heterotopi 4

OPD1: Otopalatodijital Sendrom 1

OPD2: Otopalatodijital Sendrom 2

FMD: Frontometafizer Displazi

MNS: Melnick-Needles sendromu

PDA: Patent Duktus Arteriyozus

EDS: Ehlers-Danlos sendromu

XCVD: X'e bağı kardiyak valvular distrofi

OMD: Occult Macular Distrofi

RP: Retinitis Pigmentosa

NPC: Nüklear por kompleksi

nup: nükleoporinler

AS: acceptor splice site

Aa: Aminoasit

Bç: Baz çifti

ÖZET

Bulut G. Benzer Klinik Bulgular Gösteren Birden Fazla Etkilenmiş Olgu Bulunan Ailelerde Genetik Etiyolojinin Tüm Ekzom Dizileme Yöntemi İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2021.

Genetik hastalıklar, Mendel ve non-Mendel hastalıklar olarak iki büyük grup altında incelenir. Nadir hastalıkların yaklaşık %80'inin genetik kökenli olduğu düşünülmekte olup birçoğunun monogenik Mendel kalıtım modeli ile uyumlu olduğu bildirilir. Klinik bulgular genetik etiyojisi bilinen bir sendroma yönlendirirse, bu olgularda hedefe yönelik genetik testler uygulanarak tanıya katkı sağlanmaktadır. Klinik bulgularla tanısal bir yaklaşım kurulamayan olgularda ise klasik genetik testler uygulanmakta ancak tüm bu uygulamalara karşın olguların yaklaşık yarısı tanı alabilmektedir. Böyle durumlarda 'reverse tanı' olarak nitelendirilen testten tanıya ulaşım sağlayan yeni nesil dizi teknolojilerinden yararlanılmaktadır. Bu tip teknolojilerin pratikte en sık kullanılanı tüm ekzom dizileme (TED)dir. Tez kapsamında, aynı ailede benzer klinik bulgulara sahip en az iki etkilenmiş olgu bulunan, klinik bulguları bilinen bir sendromla uyumlu olmayan, mikroskobik ve submikroskobik herhangi bir kromozomal değişim saptanmayan üç aileden üç indeks olgu ile beş aile bireyine TED uygulanarak etiyojide rol oynayan olası değişimler araştırıldı. Yapılan analizler sonucunda indeks olgularda klinik bulgularıyla olası ilişkili dört farklı gende (CCDC88C, FLNA, RP1L1, NUP188) varyantlar saptandı. Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanan ve aile çalışmaları yapılan bu varyantlardan ikisi herhangi bir hastalık ilişkisi daha önce bildirilmeyen yeni değişimlerdi (FLNA'da c.1829-1G>T (p.(?)) ve NUP188'de c.124C>T (p.Arg42Ter), ikisi ise daha önce bildirilmiş olan (CCDC88C'de c.1915C>T (p.Arg639Ter) ve RP1L1'de c.455G>A (p.Arg152Gln) varyantlardı. Çalışmaya dahil edilen olguların tümünde bir değişim saptanmış olsa da, örnek sayısının azlığı ve seçim kriterleri nedeniyle TED tekniğinin her olguda benzer tanı katkısı sağlayacağını iddia etmek fazla iyimser olacaktır, ancak çalışmamız 'yöntemden tanıya' giden yolda yaklaşımsal aşamaları sunması bakımından, tanıları kesinleşen ailelere genetik danışma verilmesi ve hastalığı önleyici stratejiler konusunda bilgilendirilmeleri bakımından önemli olmuştur. Sonuç olarak çalışmamız TED'in hastalık ilişkili bilinen genlerde olduğu kadar, yeni varyasyonları tespit etmek ve hastalık ilişkili yeni genleri araştırmaya yönelik katkısını da göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : mendelyen hastalıklar, tüm ekzom dizileme, yeni nesil dizileme, Ion Torrent

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:32819

ABSTRACT

Bulut G. Investigation of Genetic Etiology in Families with Multiple Affected Cases with Similar Clinical Findings by the Whole Exome Sequencing Method. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Master Thesis. İstanbul. 2021.

Genetic diseases are examined under two large groups as Mendelian and non-Mendelian diseases. Approximately 80% of rare diseases are thought to be of genetic origin, and many of them are reported to be compatible with the monogenic Mendelian inheritance model. If clinical findings lead to a syndrome with known genetic etiology, targeted genetic tests can be applied in these cases to contribute to the diagnosis or confirm the diagnosis. In cases where a diagnostic approach cannot be established with clinical findings, classical genetic tests are applied, but despite all these applications, approximately half of the cases can be diagnosed. In such cases, new generation sequencing technologies are used that provide access to diagnosis from the test described as "reverse diagnosis". The most commonly used type of these technologies is whole-exome sequencing (WES). In this thesis, 3 index cases and 5 individuals from three families with at least two affected cases with similar clinical findings, incompatible clinical findings with a known syndrome, and no microscopic and submicroscopic changes were investigated. Changes that may play a role in the etiology in these individuals were investigated using the WES method. As a result of the analyzes performed, variants in four different genes (CCDC88C, FLNA, RP1L1, NUP188) possibly related to clinical findings were detected in index cases. Two of these variants, which were confirmed by Sanger sequencing and family studies were conducted, were new changes whose association was not previously reported (FLNA c.1829-1G>T (p.(?)) and NUP188 c.124C>T (p.Arg42Ter), two of them were previously reported variants (CCDC88C c.1915C>T (p.Arg639Ter) and RP1L1 c.455G>A (p.Arg152Gln). Although a change was detected in all cases included in the study, it would be too optimistic to claim that the WES technique will provide a similar diagnostic contribution in each case due to the small number of patients and selection criteria. Our study shows the contribution of WES to identifying new variations and searching for new disease-related genes as well as in known disease-related genes.

Key Words: mendelian diseases, whole exome sequencing, next-generation sequencing, Ion Torrent

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 32819

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital anomalilerin ve bilişsel yetersizliğin etiyopatogenezindeki en önemli faktörler genetik kökenlidir. Epidemiyolojik çalışmalar toplumun yaklaşık % 8'inde genetik kökenli bir hastalığın yetişkinlik öncesi dönemde ortaya çıktığını göstermiştir (1). Genetik hastalıklar, DNA, RNA gibi kalıtım materyallerinin yapısında (mutasyon) ya da fonksiyonundaki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Genetik hastalıklara yol açan bu mutasyonlar, ailevi olarak kalıtılabildiği gibi germ hücrelerinin oluşumu sırasında (de novo) ya da yaşamın bir evresinde (somatik) ortaya çıkabilmektedir. Genotipte oluşan bu değişimlerin fenotipte kendini gösterebilme gücünde de farklılıklar bulunur. Tek bir alleldeki değişim (heterozigot) fenotipte kendini gösterebiliyorsa “dominant”, hastalığın ancak her iki allelin de mutasyon taşıması durumunda fenotipe yansması durumunda ise “resesif” olarak tanımlanır. Ancak bu etkide de farklılıklar gözlenebilmektedir. Örneğin; dominant bir mutasyonun varlığına rağmen kişi klinik bulgu vermeyebilir (penetrans yokluğu), ya da aynı bir mutasyon farklı klinik bulgulara yol açabilir (ekspresivite değişkenliği). Resesif gen mutasyonları ile oluşan hastalıklar da farklı klinik bulgular gösterebilmekte ve bu durum genin fonksiyonunu etkileyen diğer genlerle (enhancer, modifier genler gibi) açıklanmaktadır. Otozomal resesif hastalıklar için risk artırıcı önemli bir faktör akraba evliliğidir. Akrabalık ilişkisi, ebeveynlerin ortak atalarından aynı mutant geni kalıtma olasılıkları ve dolayısıyla hastalık riskinin artmasına neden olur. Bu durum aynı zamanda birden fazla gendeki resesif mutasyonların da birlikte kalıtılması ile daha kompleks bir fenotipe yol açabilmektedir. Kalıttaki tüm bu sapmalar konjenital anomali/bilişsel yetersizlik (Multiple Konjenital Anomali/Mental Retardasyon (MKA/MR)) sendromlarının genetik etiyolojisini aydınlatmada ciddi sorunlara yol açmaktadır. Türkiye’de de akraba evliliği oranının bölgeler arasında değişiklik göstermekle birlikte (Güneydoğu Anadolu Bölgesi % 43, Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi % 32, Doğu Karadeniz Bölgesi % 30 gibi) ortalama olarak % 21 gibi yüksek bir oranda olması MKA/MR olgularında otozomal resesif kalıtım gösteren hastalıkların oranını arttırmaktadır.

Genetik hastalıkların laboratuvar testleriyle kesin tanısı, hastalara klinik yönlendirme yapılabilmesi, var olan ve olması muhtemel klinik sorunlara uygun izleme yöntemiyle erken bir şekilde takip/tedavi edilebilmeiledaki riskli bireylerin

belirlenmesine, riskli bireylerin sağlıklı çocuk sahibi olabilmelerine olanak sağlar. Çiftlerin birçoğu hasta bir çocuk sahibi olana kadar, genetik hastalıklar için taşıyıcı olabileceklerinden habersizdir. Prenatal tanı ve preimplantasyon genetik tanı ile genetik hastalıklar için risk taşıyan çiftler sağlıklı çocuk sahibi olabilme imkânı elde ederler. Bunlara ek olarak, birçok diğer ailevi hastalıklarda (ailevi kanserler) genetik tanı, hastalıkların erken teşhisine ve erken tedavisine yardımcı olmaktadır.

Genetik hastalıklara yol açan mutasyonlar, kromozomlarda, tek bir gende, birçok gende ya da çevre faktörlerinin etkisi altında, mitokondriyal genomda ve genlerin genomik imprinting özelliklerine göre ortaya çıkabilmektedir. Mutasyonların özelliğine göre laboratuvar tanısında farklı testler kullanılmaktadır. Kromozomal anomalilerin tanısında karyotip analizi, floresan in situ hibridizasyon (FISH), array CGH/mikroarray analizleri, tek gen hastalıklarının tanısında ise moleküler analizler (RT-PCR, enzim kesim, MLPA, Sanger dizileme, yeni nesil dizileme ve diğer moleküler teknikler) kullanılmaktadır. Genetik hastalıkların etiyolojisinin araştırılmasında, birden fazla genin hatta genomun tüm genlerinin, birden fazla örnekte eş zamanlı tek bir test ile araştırılabilmesine olanak sağlayan yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri devrimsel bir aşama sağlayarak genetik varyasyonların hızlı bir şekilde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır.

Klinik değerlendirme bulguları genetik etiyolojisi bilinen bir sendroma yönlendiriyorsa hedefe yönelik genetik testler uygulanabilmekte ve hızlıca tanı konulabilmektedir. Ancak non-spesifik bulguları olan ve bir sendromla ilişkilendirilemeyen olgularda tüm bu testlerin uygulanmasına karşın hastaların yaklaşık yarısında tanıya gidilememektedir. Genetik etiyolojinin aydınlatılamaması, tekrarlama riskinin hesaplanması, hastalığın prognozu hakkında bilgi verilmesi ve potansiyel tedavilerin belirlenmesini, ailenin prenatal/preimplantasyon tanısını, geniş ailedeki taşıyıcıların belirlenmesini kısacası aileye verilecek etkin genetik danışmayı olanaksız kılmaktadır.

Bu çalışmada, aynı ailede benzer klinik bulgulara sahip en az 2 etkilenmiş olgu bulunan, klinik olarak bilinen bir sendrom ile ilişkilendirilemeyen, kromozom analizleri ve moleküler karyotipleme ile herhangi bir değişim saptanmayan olgular tüm ekzom dizileme (TED) yöntemi ile araştırılarak patogeneizde rol oynayan genlerin ve bu genlerdeki değişimlerin araştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genetik Hastalıklar

Genetik hastalıklar Mendelyen ve non-mendelyen hastalıklar olarak 2 büyük grup altında incelenmektedir. “Mendelyen” hastalıklar, Mendel kalıtım kurallarına göre kalıtılan hastalıklar olup, kromozomal ve tek gen hastalıkları bu grupta yer almaktadır. Multifaktöriyel, mitokondriyal, genomik imprinting ve mozaizizmle ilişkili hastalıklar ise Mendel kalıtım kurallarına uymadığından “Non-Mendel” hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır.

2.1.1. Mendelyen Hastalıklar

Avusturyalı bir papaz olan Gregor Mendel (1822-1884), 1857 yılında görev yaptığı kilisenin bahçesinde yetiştirdiği bezelyelerin farklı özelliklerde ürünler verdiğini gözlemiş ve bu gözlemlerini kaydetmiştir. Mendel’in bu gözlemleri, genetik materyalin kalıtımı ve özelliklerini anlamamızı sağlayan yasaların oluşmasına zemin hazırlamıştır. Bu yasalar günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır.

1. Mendel’in Ayrılma Yasası: Her gen için 2 allel bulunur. Bu alleller aynı genetik yapıda (homozigot) ya da farklı genetik yapıda (heterozigot) olabilir. Alleller gamet oluşumu sırasında (mayoz bölünmede) rastlantısal ve bağımsız ayrılarak gametlere dağılır.

2. Mendel’in Bağımsız Dağılım Yasası: Farklı özellikler gelecek kuşağa birbirinden bağımsız olarak aktarılmaktadır.

3. Mendel’in Baskınlık Yasası: Mutasyonların dominant veya resesif özelliğini açıklayan bu yasa, resesif özellikte değişimin fenotipte gözlenmemesine rağmen genotipte bulunabileceği ve gelecek kuşağa aktarılabilceğini anlatmaktadır. (Şekil 2-1)

		 pollen ♂	
		B	b
 pistil ♀	B	 BB	 Bb
	b	 Bb	 bb

Şekil 2-1: Mor (B) ve beyaz (b) çiçek rengi genleri için heterozigot olan iki bezelye bitkisinin çaprazlanmasını gösteren bir Punnett karesi (2).

Mendel'in bezelye bitkilerindeki kalıtım paternleri üzerindeki çalışmaları, insanlardaki kromozom ve tek gen hastalıklarının kalıtımı, mutasyonların fenotipe etkisi ile ilgili kavramları anlamamızı kolaylaştırmaktadır (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Kalıtım ile ilgili temel kavramlar

Kalıtım ile İlgili Temel Kavramlar	
Allel	Homolog kromozomlarda aynı lokusta ve aynı işlevden sorumlu genler. Bu genler farklı DNA dizilimi gösterebilir.
Lokus	Bir genin kromozom üzerindeki yerleşim yeri
Wild type	Toplumda sık olarak görülen normal varyant
Polimorfizm	Bir varyantın genel toplumda %1'den fazla bulunması
Varyant	Referans genom dizisine göre farklılık gösteren genetik değişiklikler
Karakter	Genler tarafından belirlenen herhangi bir özellik
Genotip	Bir organizmanın tüm lokuslarındaki genetik yapısını oluşturan alleller kümesi
Fenotip	Genotipin gözlemlenebilen özellikleri
Homozigot	Her iki allelin aynı DNA yapısında olması
Heterozigot	Her iki allelin farklı olması (allellerden biri normal (wild type) diğeri ise varyasyon göstermesi)
Birleşik Heterozigot	Her iki allelin farklı varyasyon göstermesi
Baskın karakter (dominant)	Tek bir allelin varlığında (heterozigot) dahi fenotipte kendini gösteren
Çekinik karakter (resesif)	Ancak her iki allelin de varyant taşınması (homozigot veya birleşik heterozigot) durumunda fenotipte kendini gösteren

2.2. Mendel Kalıtımı ile Uyumlu Hastalıklar

2.2.1. Kromozomal Hastalıklar

Flemming'in 1882 yılında nukleusta yer alan kromozomları tanımlamasının ardından 1903 yılında Sutton ve Boveri genlerin kromozomların üzerinde taşındığını keşfetmişlerdir. 1956 yılında Tjio ve Levan insan kromozom sayısının 46 olduğunu, 1959 yılında Lejeune ve arkadaşları ise daha önce fenotipik özellikleri tanımlanmış olan

Down sendromu'nun G grubu kromozomlardan birisinin fazlalığı ile ilişkili olduğunu göstererek genetik hastalık - kromozom ilişkisini ortaya koymuşlardır. 1970'li yıllara kadar 20'den fazla farklı insan kromozomal hastalığı tanımlanmıştır. 1968 yılında Q bantlamanın, 1970'te ise G bantlamanın kromozom analizlerinde kullanılması ile anomalinin hangi kromozom/kromozomlarda olduğu gösterilerek buna bağlı olarak kromozom sayı anomalilerinin yanı sıra yapısal anomalileri ve bunların fenotip-genotip ilişkisi belirlenmiştir. Daha sonraki yıllarda kromozom analiz tekniklerindeki gelişmelerin katkısı ile daha küçük boyuttaki kromozomal değişimlerin de tanısı olası hale gelmiştir. Klasik tekniklerin kullanılması ile 1990 yılına kadar normal varyantlara ek olarak 600'den fazla farklı kromozom anomalisi tanımlanmıştır (3).

Kromozom anomalileri, her 1000 canlı doğumun yaklaşık 7'sinde görülür ve gebeliğin ilk üç ayında meydana gelen tüm spontan düşüklerin yarıdan fazlasının nedenidir. Tekrarlayan gebelik kayıpları, konjenital malformasyonlar, zihinsel yetmezlik ve malignitelerin önemli bir bölümünün nedenidir. Kromozomal hastalıklar, bir kromozomun tamamının veya bir kromozom segmentinin artışı veya eksikliği sonucu ortaya çıkmaktadır. Sayısal kromozom anomalilerinin tanısı konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle nispeten kolay iken (anöploidiler ve poliploidiler) küçük kromozomal değişimlerin delesyon veya duplikasyonlar sonucunda ortaya çıkan mikrolelesyon/duplikasyon sendromları (örn. Williams sendromu, DiGeorge sendromu) moleküler sitogenetik (FISH ve mikroyarray/array CGH) gibi özel testlerin kullanımını gerektirmektedir (4).

2.2.2. Tek Gen Hastalıkları

Tek bir gende meydana gelen patolojik değişimler, tek gen hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Etkilenmiş birçok kişi bulunan büyük ailelerde soyağacı analizleri, hastalıkla ilişkili bir genin otozom ya da cinsiyet kromozomu ile olan ilişkisini ve ilgili hastalık fenotipinin baskın ya da çekinik karakterde olup olmadığını belirlemek için kullanılmaktadır.

Tek gen hastalıkları, otozomal ya da cinsiyet kromozomlarında yer alan tek bir genin bir veya her iki allelindeki patojenik varyantların varlığı ile ortaya çıkmaktadır. Mendelyen kalıtım, aile ağacında karakteristik kalıtım kalıpları ile gösterilmektedir (5). Her iki cinsiyetteki otozomal genler ve kadınlarda X'e bağlı karakterler baskın veya

çekinik olabilir. Erkekler X ve Y kromozomlarındaki genler için zorunlu olarak tek allel taşır bu nedenle “hemizigot” olarak tanımlanırlar.

Genler ve patolojik olan veya patolojik olmayan varyantların fenotip ilişkisi Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) veri tabanında kayıtlı bilgilerin kullanımı ile büyük oranda anlaşılmaktadır. OMIM verilerine göre (Ocak 2021) 10.000’den fazla bilinen tek gen hastalığından 6,799’nun moleküler temeli açıklanabilmiştir (6) (Şekil 2-2).

OMIM Morbid Map Scorecard (Updated January 14th, 2021) :

Total number of phenotypes* for which the molecular basis is known	6,799
Total number of genes with phenotype-causing mutation	4,370
* Phenotypes include (1) single-gene mendelian disorders and traits; (2) susceptibilities to cancer and complex disease (e.g., BRCA1 and familial breast-ovarian cancer susceptibility, 113705.0001, and CFH and macular degeneration, 134370.0008); (3) variations that lead to abnormal but benign laboratory test values ("nondiseases") and blood groups (e.g., lactate dehydrogenase B deficiency, 150100.0001 and ABO blood group system, 110300.0001); and (4) select somatic cell genetic disease (e.g., GNAS and McCune-Albright syndrome, 139320.0008 and IDH1 and glioblastoma multiforme, 147700.0001.)	

Şekil 2-2: OMIM’de tanımlanan fenotipler ve ilişkili genler (6)

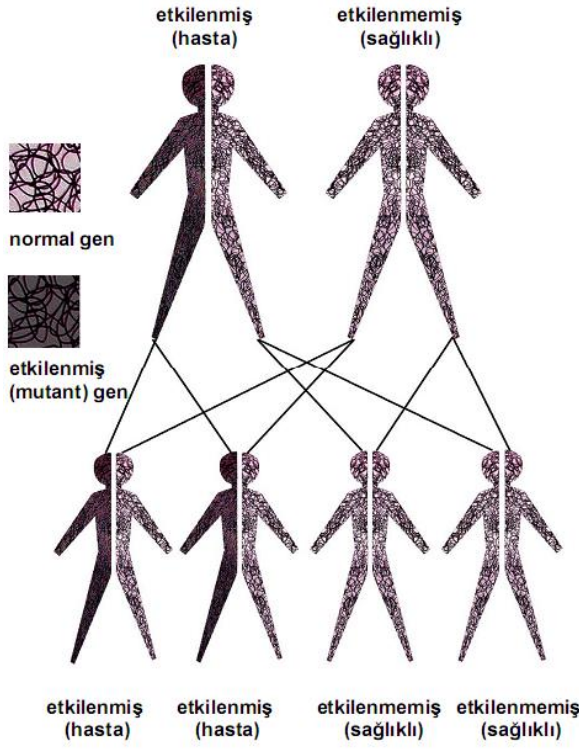
2.2.2.1. Tek Gen Hastalıklarında Kalıtım Modelleri

Beş temel Mendel kalıtım kalıbı bulunmaktadır. Bunlar;

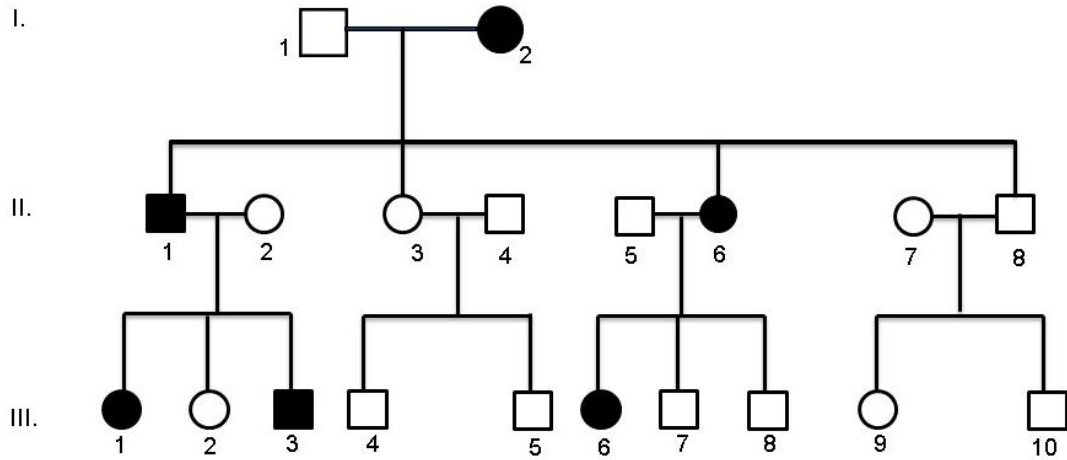
1. Otozomal dominant (OD) kalıtım
2. Otozomal resesif (OR) kalıtım
3. X'e bağlı resesif (XLR) kalıtım
4. X'e bağlı dominant (XLD) kalıtım
5. Y'ye bağlı kalıtım

2.2.2.2. Otozomal Dominant Kalıtım

- Hastalık, heterozigot bireylerde ifade bulur.
- Her iki ebeveynden de kalıtılabilir ve her iki cinsiyet eşit olarak etkilenir.
- Etkilenmiş bireyin ebeveynleri normal ise dominant hastalıklar için mutasyonun de novo oluşması söz konusudur.
- Etkilenmiş bireyin her çocuğunun etkilenme olasılığı %50 dir (Şekil 2-3).
- Dikey bir kalıtım gözlenir (Şekil 2-4).



Şekil 2-3: Ebeveynden çocuğa dominant (baskın) genlerin aktarılması (7)



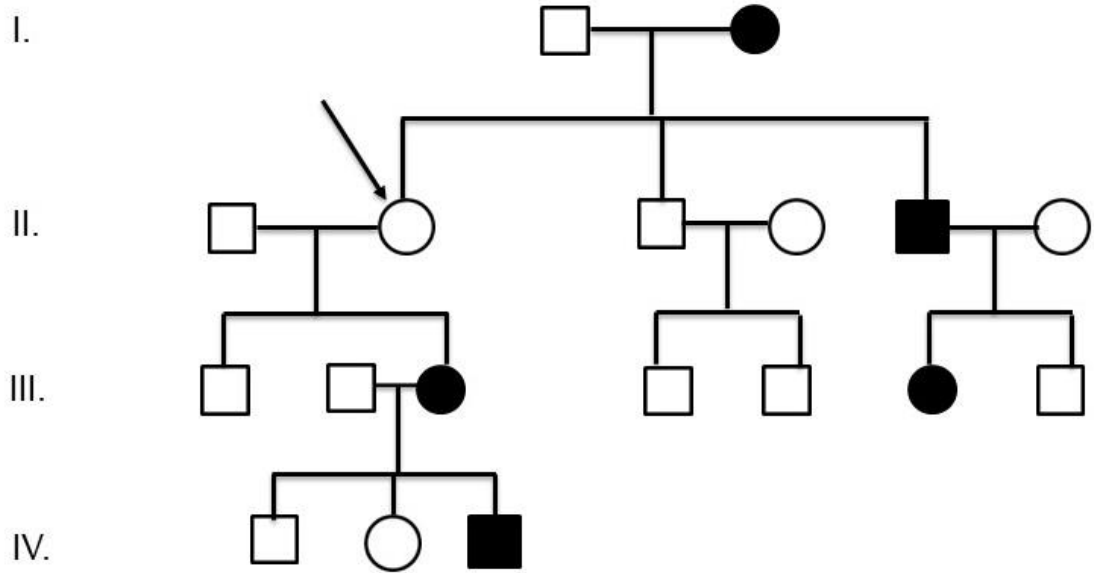
Şekil 2-4: Otozomal dominant kalıtım aile ağacı örneği

2.2.2.3. Otozomal Dominant Kalıtımda Tanı Güçlüğü Oluşturan Durumlar

Tek gen hastalıklarında aile ağacının dikkatlice değerlendirilmesi ile kalıtım kalıbı otozomal veya X'e bağlı, dominant veya resesif olarak tanımlanabilse de, özellikle otozomal dominant kalıtımında bazı durumlar hastalığın kalıtım kalıbını anlamamızı güçleştirmektedir. Bunlar, penetrans eksikliği ve ekspresivite değişkenliğidir.

Penetrans Eksikliği

Bazı dominant kalıtılan genetik hastalıklarda, genotipik olarak hastalık ilişkili mutasyonu taşımasına rağmen kişinin fenotipte bulgu göstermemesi penetrans eksikliği olarak tanımlanmaktadır. Bu durum, aile ağacı incelemelerinde aynı dominant bir hastalık/özelliğin kuşak atlamış gibi gözlenmesine yol açmaktadır (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Penetrans eksikliğine örnek bir aile ağacı. II2 hastalık ilişkili gen için zorunlu taşıyıcı olmasına karşın semptom göstermemektedir. II3, III1, IV1 veya IV2 gibi etkilenmemiş diğer aile üyeleri de hastalık ilişkili semptom göstermeyen gen taşıyıcıları olabilir.

Bu duruma örnek olarak OD bir malformasyon olan ektrodaktilinin bir türü olan yarı el deformitesi verilebilir (Şekil 2-6).

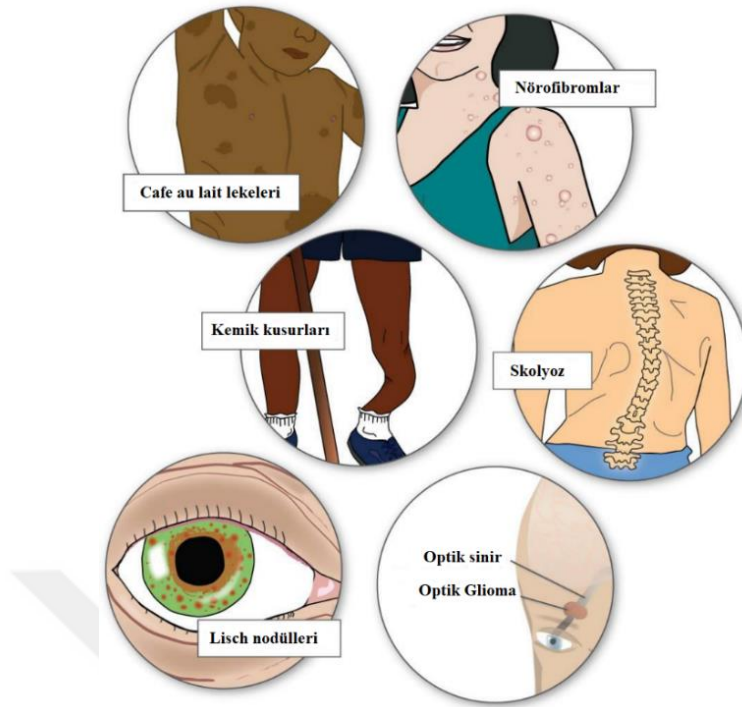


Şekil 2-6: : Yarık el deformitesi olan bir olgu örneği (8)

Malformasyonun görüldüğü büyük aile ağacında penetrans eksikliğine bağlı olarak kuşak atlamış gibi görülebilmektedir. Bu nedenle, mutasyonu taşıyan ancak normal ellere sahip bir kişi bu geni gelecek kuşaklarına aktarabilir ve etkilenmiş bir çocuğunun olma riski söz konusudur. Literatürde bu hastalığın penetransının yaklaşık %70 olduğu bildirilmektedir (9). Bir gendeki mutasyonu taşıyan bireylerin tümünde fenotipik etki ortaya çıkıyorsa penetrans tam olarak tanımlanır veya %100 olarak ifade edilir ve Akondroplazi penetransı tam olan hastalıklara iyi bir örnektir.

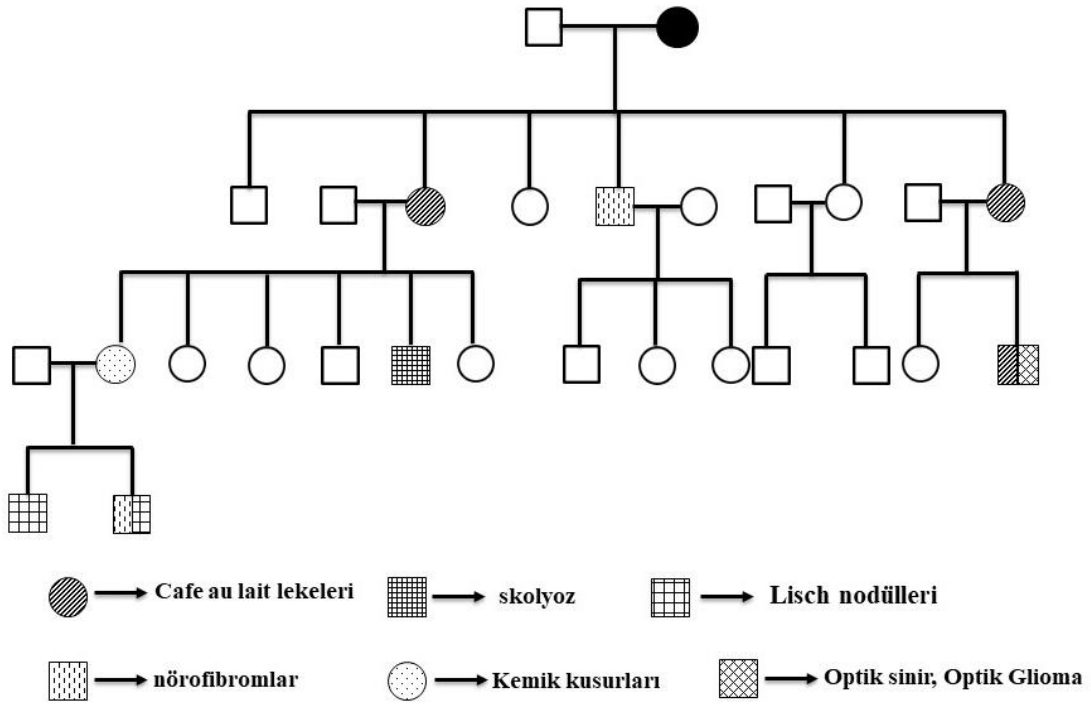
Ekspresivite değişkenliği

Aynı mutant genin aynı aile içindeki bireylerde dahi farklı klinik bulgular ya da farklı ortaya çıkış süreleri göstermesi ekspresivite değişkenliği olarak tanımlanır. Penetrasyonun aksine, ekspresivite, bir fenotipin varlığına veya yokluğuna değil, aynı fenotipin aynı hastalığa neden olan genotipe sahip kişiler arasındaki klinik bulguların farklı olmasına yol açar. Bu duruma örnek olarak, OD kalıtımla geçen Nörofibromatozis1 (NF1) verilebilir. Sendrom, deride çok sayıda benign tümörler, nörofibromların büyümesi, cafe-au-lait lekeleri olarak bilinen çok sayıda düzensiz pigmentasyon gösteren deri lezyonları, gözün iris yapısındaki Lisch nodülleri adı verilen küçük benign tümörlerin bulunması ve daha az sıklıkla zihinsel yetmezlik, santral sinir sistemi tümörleri gibi klinik bulgular gösterir (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Nörofibromatozisin klinik bulgularının çeşitliliği

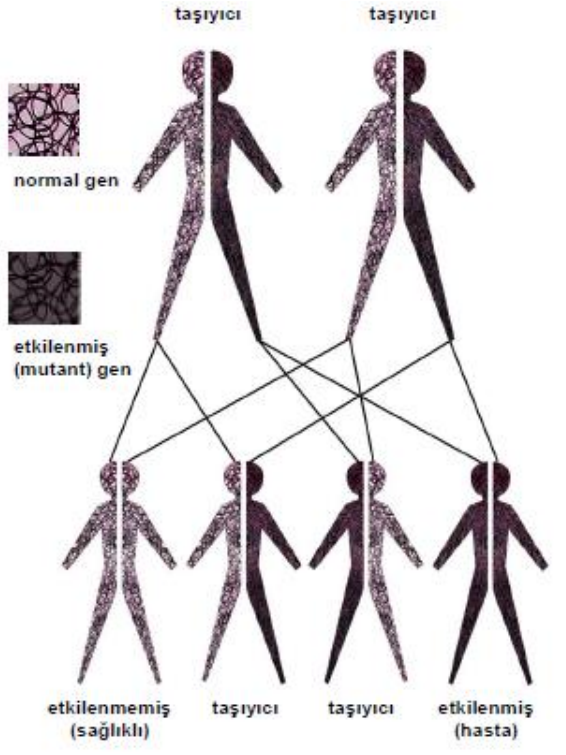
Aynı aile içinde dahi bu bulguların dağılımı farklılıklar gösterebilir (Şekil 2-8). Anormal bir genotipin ekspresyonu, farklı lokuslardaki modifiye edici genler (supresör ve enhansırların genlerin varlığı) ve çevresel faktörlerin etkisiyle değişebilmektedir. Hastalık durumunun şiddetini artırabilir (enhancer) veya azaltabilirler (supressor). Modifier genler, diğer genlerin fenotipik ve / veya moleküler ekspresyonunu etkileyen genler olarak tanımlanır. Başka bir genin veya ürününün ekspresyonunu veya fonksiyonunu değiştirebilen ürünleri kodlar. Bu nedenle, transkripsiyonel verimliliği, translasyonu veya protein fonksiyonunu değiştirerek birçok seviyede çalışabilirler. İnsanlarda hastalıkların başlangıcını, semptom aralığını ve hastalığın şiddetini değiştirebilmektedirler (10).



Şekil 2-8: Ekspresivite değişkenliğine örnek bir aile ağacı. Ailenin farklı üyeleri Nörofibromatozisin farklı klinik bulgularını göstermektedir.

2.2.2.4. Otozomal Resesif Kalıtım

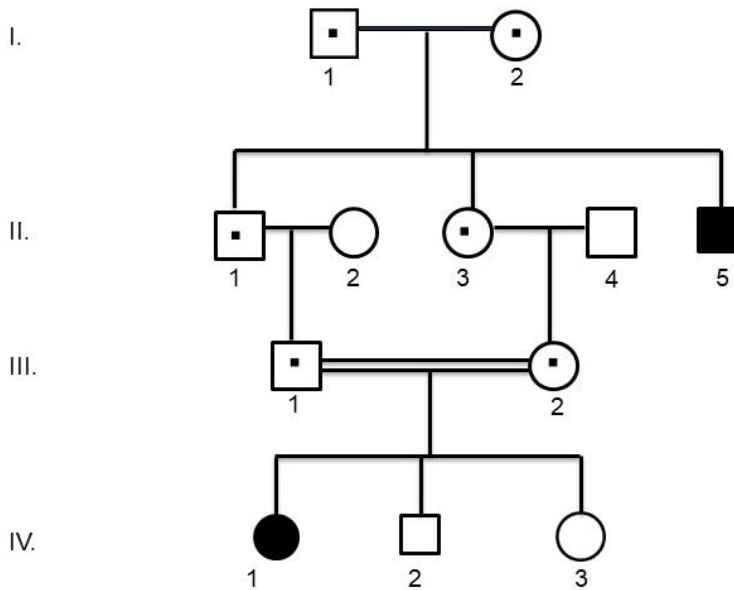
- Hastalık, her iki allel de mutasyon taşıyorsa ortaya çıkar.
- Her iki cinsiyeti de eşit olarak etkiler.
- Etkilenen bireyler, genellikle klinik bulgu vermeyen, genotipik olarak heterozigot yani taşıyıcı ebeveynlerden doğarlar.
- Etkilenmiş bir çocuğu olan bir taşıyıcı çiftin tüm çocuklarının etkilenme olasılığı % 25'dir (her iki ebeveynin de genotipik olarak heterozigot olduğu varsayılarak, nadir olarak homozigot bir ebeveyn ile heterozigot diğer ebeveynin çocuklarındaki risk ise %50 dir) (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: Ebeveynden çocuğa resesif (çekinik) genlerin aktarılması (7)

• Akrabalık ilişkisi bulunan ebeveynlerin ortak atalarının bulunması ve bu ortak atalardan aynı mutant geni kalıtma olasılığının yüksek oluşu hastalık riskinin artmasına neden olur.

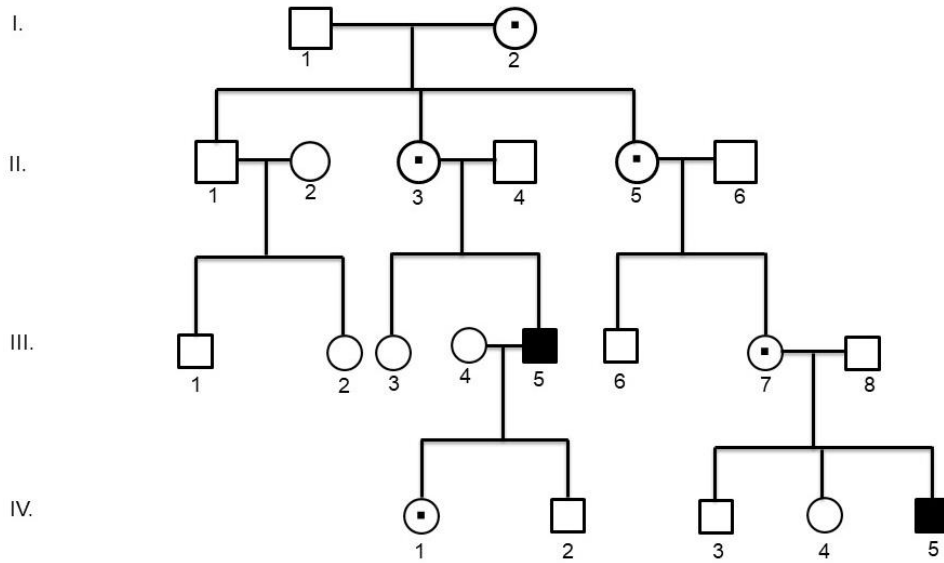
• Aile ağacında yatay kalıtım görülür (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: Otozomal resesif kalıtım için aile ağacı örneği

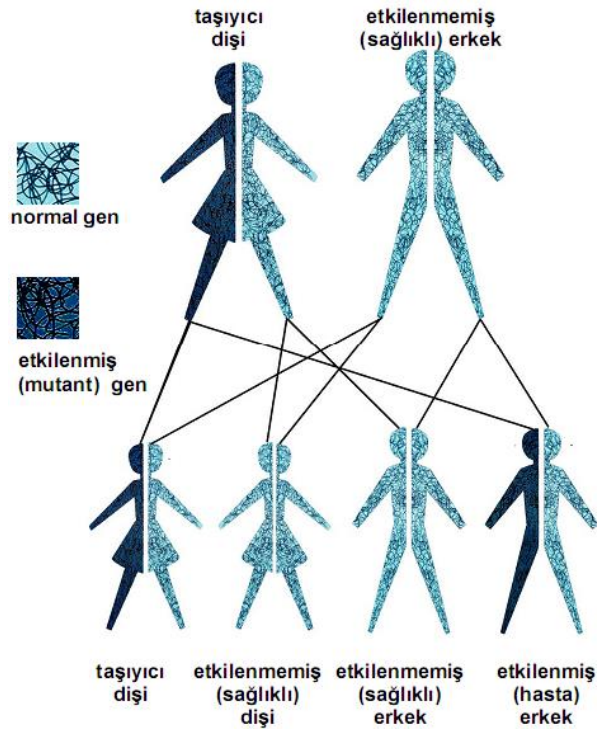
2.2.2.5. X'e Bağlı Resesif Kalıtım

- Bu kalıtımda mutant geni taşıyan erkekler hastalığı gösterir (Şekil 2-11).



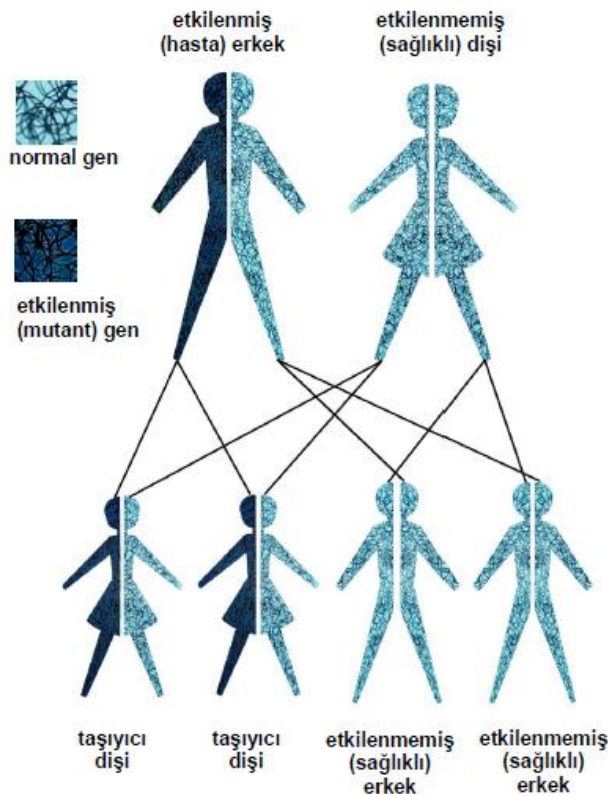
Şekil 2-11: X'e bağlı resesif kalıtım aile ağacı örneği

• Heterozigot dişiler klinik olarak genellikle etkilenmemişlerdir, ancak hastalığı bir sonraki nesile geçirebilirler ve erkek çocuklar %50 olasılıkla hasta, kız çocuklar ise taşıyıcı olurlar (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: X'e bağlı hastalıkların taşıyıcı anne tarafından çocuklarına aktarılması (7)

- Mutasyon erkek çocukta “de novo” da oluşabilir.
- Sağlıklı bir annenin hem çocuğu hem de erkek kardeşi etkilenmişse veya birden fazla etkilenmiş erkek çocuğu varsa bu bireyin zorunlu taşıyıcı olması beklenir.
- Soy ağacında erkek-erkek aktarımı yoktur (ancak etkilenmiş bir erkek ve taşıyıcı dişinin çocuklarında hastalık kızlarda da görülebilir). Etkilenmiş erkeğin tüm kız çocukları kesin taşıyıcıdır (Şekil 2-13).



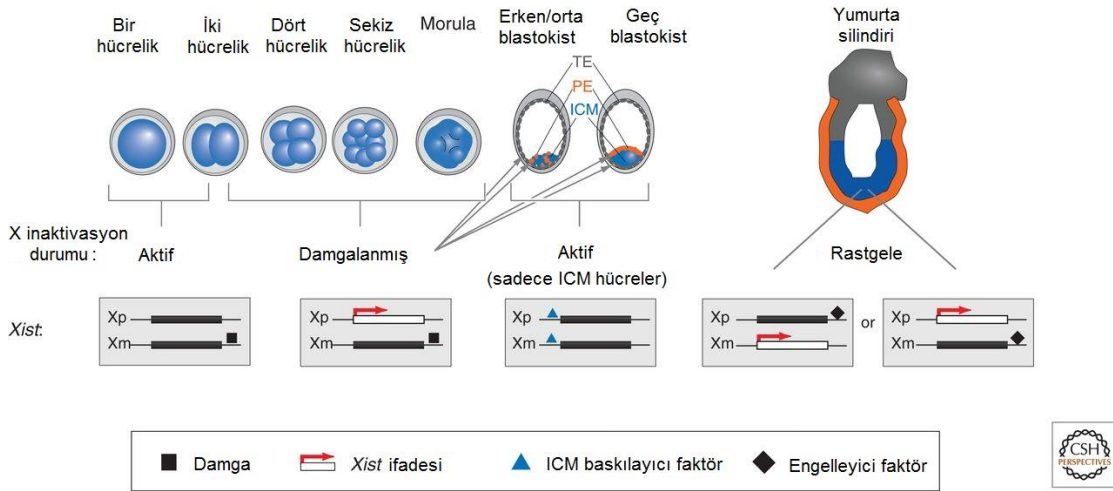
Şekil 2-13: X'e bağlı hastalıkların hasta bir erkek tarafından çocuklarına aktarılması (7)

- Heterozigot (taşıyıcı) kız çocukların fenotipik bulgu vermesi özel koşullarda gerçekleşebilir.

Taşıyıcı dişilerde hastalığın ortaya çıkmasına sebep olan mekanizmalar;

Bu mekanizmalardan en önemlisi X inaktivasyonu ile ilgilidir; X inaktivasyonu kısaca, dişi cinsiyette memeli hücrelerinde bulunan iki X kromozomundan birisinin inaktivasyona uğraması durumudur. İnaktivasyona uğrayan X kromozomu heterokromatin ile paketlenerek üzerinde bulunan genlerin ifade edilmesi önlenir. Bu mekanizma ile aynı zamanda erkek ve dişiler arası X kromozomu üzerindeki genler

açısından denge de sağlanmış olur (dozaj kompensasyonu) (Şekil 2-14). Normal şartlarda bu işlem rastgele olmaktadır; gelişmiş memelilerde bazı hücrelerde anneden, bazı hücrelerde ise babadan gelen X inaktive olmakta (random-rastgele) ve bu hücreden oluşan tüm hücreler tüm yaşam boyunca inaktif kalmaktadır (11).



Şekil 2-14: X inaktivasyon mekanizması (11)

Ancak, bazı durumlarda X inaktivasyonu rastlantısal değil seçici hale gelmektedir. Bu durum özellikle, X kromozomu yapısal anomalilerinde ve X/otozom translokasyonlarında görülmektedir. Otozomlar üzerindeki genlerin korunması esasına dayanan bu mekanizma, X seçici olarak aktif ya da inaktif ederken X'e bağlı hastalıkların dişilerde de görülmesine yol açabilmektedir.

Non-random (seçici) X inaktivasyonu; Yapısal X kromozomu anomalileri: iki X kromozomundan birinde yapısal bir anomali olması durumunda (X kromozomundaki delesyonlar, duplikasyonlar, i(Xq), ring (X), vb. gibi) anomalili X seçici olarak inaktifleşir. Ancak buradaki en önemli koşul derivatif X kromozomunun XIST genini kaybetmemiş olmasıdır. X kromozomunun inaktivasyonundan sorumlu olan XIST geninde meydana gelebilecek bir delesyon ya da mutasyon, anomalili X kromozomunun aktif kalması ve normal X kromozomunun inaktivasyona uğraması ile sonuçlanır ki ağır malformasyonlardan letaliteye kadar geniş bir klinik spektruma neden olabilir. Özellikle ring (X) taşıyan bireylerde gözlenmektedir.

X/Otozom translokasyonu; bu tür yapısal kromozom anomalisi taşıyanlarda inaktivasyon mekanizması 2 şekilde işlemektedir: İlk mekanizma, dengeli X/otozom translokasyonuna sahip bir dişide, otozomal segmenti koruyabilmek amacıyla normal olan X kromozomu seçici olarak inaktive edilir. Bu durumda, translokasyonun

meydana geldiği bölgede bulunan bir genin işlevi bozulmuş olabilir ve normal X'in rastgele olmayan inaktivasyonu nedeniyle de genin normal kopyası, hücrelerin tümünde inaktive olacağı için hastalıkların dişilerde ortaya çıkmasına neden olur. İkinci mekanizmada ise, X ve otozomal kromozomlar arasındaki dengesiz bir translokasyon sonucu, dengesiz olan X kromozomu XIST genini taşıyor ise inaktivasyona uğrar, normal X ise aktif kalır. Rastgele olmayan bu inaktivasyon klinik etkileri tamamen ortadan kaldırmamakla birlikte, azaltıcı genel bir etkiye sahiptir.

Ayrıca, aşağıdaki mekanizmalar da X'e bağlı hastalıkların dişilerde görülmesine yol açabilir.

Normal X kromozomu üzerinde de novo bir mutasyon meydana gelmesi; X'e bağlı bir hastalık için taşıyıcı dişinin diğer normal X kromozomu üzerinde aynı bölgede yeni bir mutasyon oluşması sonucunda hastalığın ortaya çıkması mümkündür, bu durumda hastalık erkeklerde görüldüğü kadar dişilerde de ağır seyredebilir.

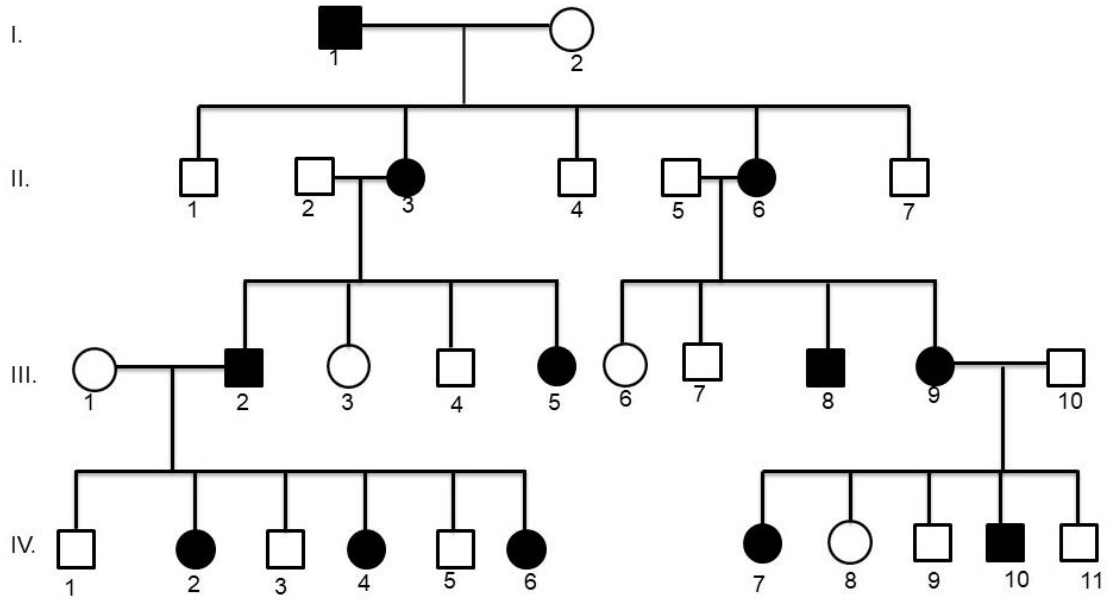
Taşıyıcının 45,X karyotipine sahip olması; 45,X (Turner sendromu) bir dişide tek X kromozomu mutant alleli taşıyorsa X'e bağlı hastalık dişilerde de görülür ve dişiler erkekler kadar ağır etkilenir.

Uniparental Dizomi (UPD), normal koşullarda bireyler kromozom çiftinin birini anneden diğerini ise babadan kalıtmaktadır (biparental kalıtım). Ancak kromozom çiftinin her iki kopyasının da ya anneden ya da babadan, yani ebeveynlerin sadece birinden kalıtması (uniparental) durumunda UPD oluşur. Bu durumda, ebeveynlerden annenin taşıyıcı veya babanın hasta olması durumunda, dişilerde homozigot olarak görülen X'e bağlı resesif hastalıkların bu mekanizmayla da ortaya çıkabileceği düşünülmelidir.

2.2.2.6. X'e Bağlı Dominant Kalıtım

- Her iki cinsiyeti de etkiler, ancak kadınlarda görülme olasılığı erkeklere oranla daha fazladır.
- Dişiler genellikle erkeklerden daha hafif ve X inaktivasyonu nedeniyle daha değişken şekilde etkilenir.
- Etkilenen bir dişinin çocukları cinsiyeten bağımsız % 50 etkilenme riski taşır.

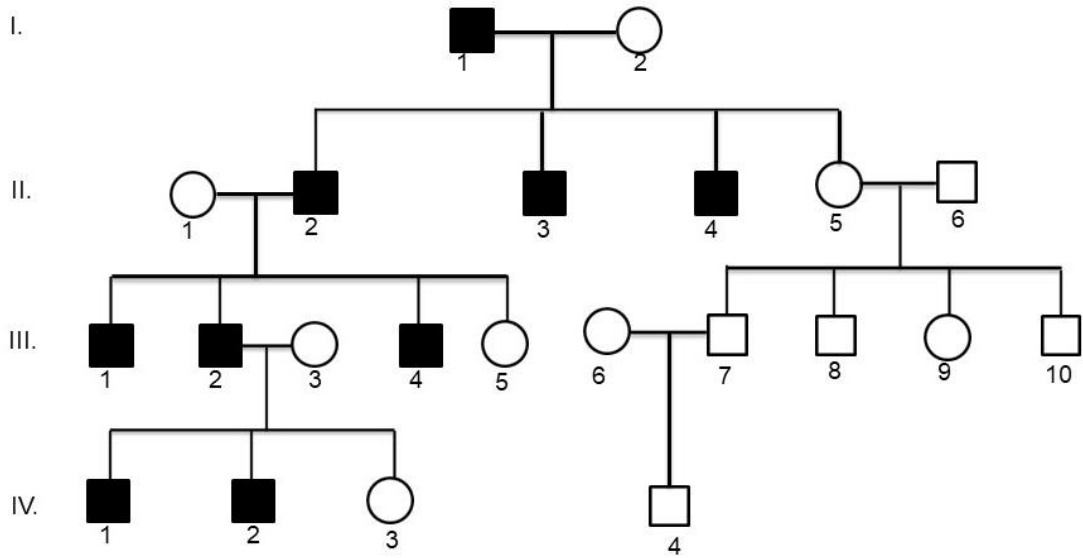
- Etkilenmiş bir erkeğin, tüm kızları etkilenir ancak oğullarının hiçbiri etkilenmez (Şekil 2-15).



Şekil 2-15: X'e bağlı dominant kalıtım aile ağacı örneği

2.2.2.7. Y-bağılı Kalıtım

- Sadece erkekleri etkiler, etkilenmiş bir erkeğin tüm oğulları etkilenir.
- Cinsiyetin erkek yönünde gelişiminde belirleyici rol oynayan Y kromozomunun p13.3 bölgesinde lokalize (SRY)/ testis belirleyici faktör (TDF) kalıtımı, Y'ye bağlı kalıtıma bir örnek oluşturur. Erkekler Y kromozomlarını dolayısıyla SRY/TDF bölgelerini tüm erkek çocuklarına geçirirler fakat kız çocuklarına geçiremezler (Şekil 2-16).



Şekil 2-16: Y- bağılı kalıtım aile ağacı örneği

2.3. Tek Gen Hastalıklarının Değerlendirilmesinde Zorluk Yaratan Durumlar

2.3.1. Genetik Heterojenite

Genetik heterojenite, aynı lokustaki farklı varyasyonların (allellik heterojenite), ya da farklı lokuslardaki gen varyantlarının (lokus heterojenitesi) veya her ikisinin sonucu olarak ortaya çıkabilir (12).

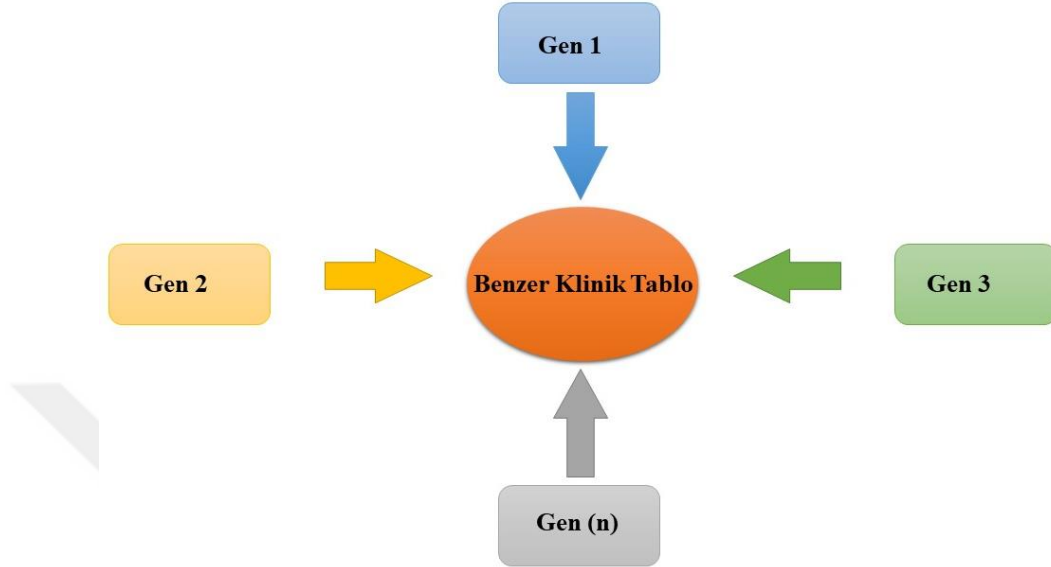
2.3.2. Allellik heterojenite

Aynı lokustaki allellerin farklı mutasyonları sonucunda farklı genetik hastalıkların/fenotiplerin ortaya çıkmasıdır. Klinik olarak benzer veya tamamen farklı hastalıklar oluşabilir. Gen işlevi bozulduğunda veya gen işlevi ortadan kalktığında birbirinden tamamen farklı fenotipler ortaya çıkmaktadır. Örneğin; reseptör tirozin kinazı kodlayan *RET* geninde meydana gelen varyasyonlar Hirschprung hastalığı veya MEN tip 2a (Multipl Endokrin Neoplazi Tip Ila) hastalıklarına yol açabilir.

2.3.3. Lokus Heterojenitesi

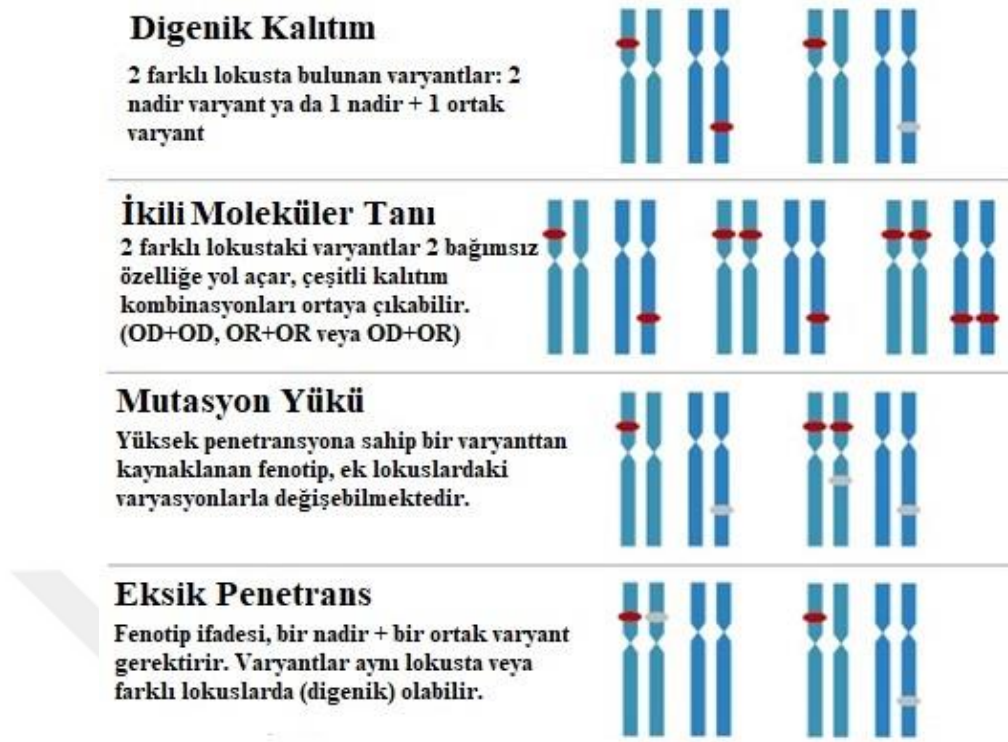
Farklı lokuslardaki genlerin mutasyonlarının benzer hastalık/fenotiplere yol açması durumudur (Şekil 2-17). Örnek olarak Noonan Sendromu verilebilir. Aynı biyolojik yolakta -Rasopati yolağı- görev alan birçok gendeki mutasyonlara bağlı, benzer bulgular gösteren farklı sendromlar olarak tanımlanmıştı. Ancak, günümüzde bu grup hastalık, Noonan spektrumu hastalıkları olarak adlandırılmaktadır. Lokus heterojenitesine bir diğer örnek olan, kollajen yapısındaki bir bozukluğa bağlı olarak

deri ve diğer bağ dokularda aşırı elastik ve kırılğan yapının oluştuğu Ehler Danlos sendromu'nda, OD, OR ve X'e bağlı kalıtımın olabildiği ve yapılan klinik, moleküler çalışmalarda hastalıkla ilişkili birçok lokusun bulunduğu gösterilmiştir (12).



Şekil 2-17: Lokus heterojenitesi

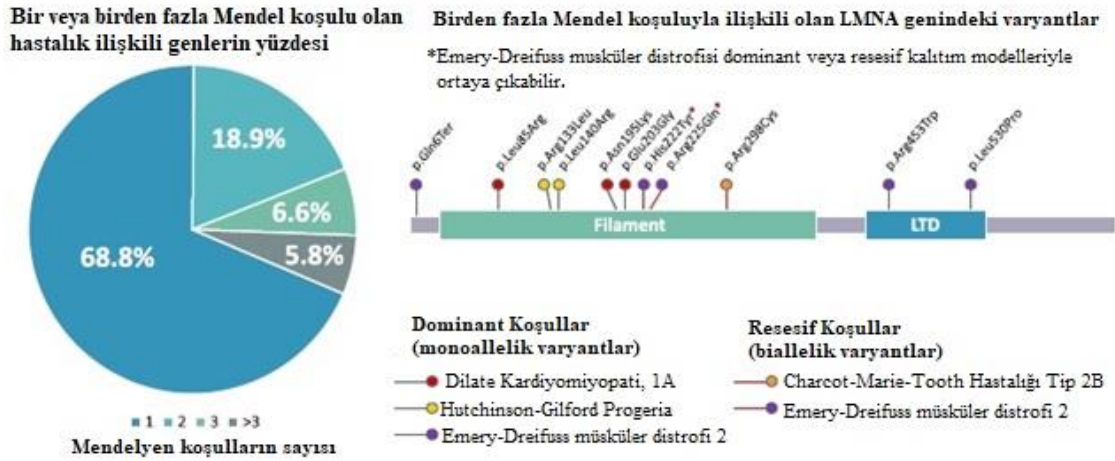
Klasik Mendel kalıtım, OD, OR, XL modelleri olarak kategorize edilse de, mendelyen kalıtımla ilgili yapılan çalışmalar, pek çok nadir hastalığın digenik kalıtım, ikili moleküler tanı, mutasyon yükü ve nadir ve yaygın varyantların bileşik kalıtımı ile ortaya çıkabileceğini de göstermiştir (Şekil 2-18).



Şekil 2-18: Kalıtımın kompleks modelleri (13)

İlk olarak 1994 yılında tanımlanan “digenik kalıtım”, bir hastadaki klinik fenotipten 2 farklı değişimin aynı oranda sorumlu olması olarak tanımlanır. İkili veya çoklu moleküler tanı, iki veya daha fazla lokustaki patojenik varyasyon, iki veya daha fazla Mendel koşulunun ekspresyonuna yol açtığına ortaya çıkar. Mutasyonel yük, hem aileler arasında hem de aile içinde hastalığın dışı vurumunu etkileyebilir. Nöropati ile ilgili genomik çalışmalar, hastalıkla ilişkili genlerdeki nadir varyantların bir araya gelmesinin (kümülatif etki) klinik şiddeti etkileyebileceği ve ortak karmaşık özelliklere katkıda bulunabileceği bir modeli desteklemektedir (13).

Bazı Mendel koşullarının klasik genetik beklentilerden ayrıldığı bir başka durum da, tek bir lokusla ilişkili hem baskın hem de çekinik kalıtımın ortaya çıkması veya tek bir lokusla ilişkili birden fazla Mendel kalıtım kalıbının gözlemlenmesidir. OMIM’de Mendelyen hastalıklar ile ilişkisi olan genlerin yaklaşık üçte birinin, 2 veya daha fazla Mendel hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *LMNA*’daki varyasyonlardan kaynaklanan bir dizi fenotipi olan laminopatiler, kardiyomiyopatiler, nöropatiler, iskelet miyopatileri, Hutchinson-Gilford progeria ve kısıtlayıcı dermati gibi çeşitli hastalıklar, ekspresyonu ve kalıtım modelleriyle bu kavramı iyi bir şekilde göstermektedir (Şekil 2-19) (13).



Şekil 2-19: Hastalık ilişkili genlerin birden fazla Mendel koşuluyla ilişkisi (13)

2.4. Genetik Hastalıkların Tanı Aşamaları

2.4.1. Klinik Tanının Aşamaları

1. Aile öyküsü alınması ve ayrıntılı aile ağacı çizimi
2. Hastanın varsa önceki klinik dosyasının incelenmesi (bulgular ve tanıları)
3. Gebelik ve doğum öyküsü
4. Hasta bireylerin ayrıntılı fizik muayenesi (fotoğraf ve ölçümler)

5. Eşlik edebilecek iç organ anomalileri üç boşluğu değerlendiren görüntüleme yöntemleri ile araştırılır. Bunlar; Serebral US, bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme, (MRI), Ekokardiyografi, (karaciğer, pankreas ve dalak patolojileri için), Pelvik US (ürogenital patolojiler için) ve iskelet grafileri (eşlik eden orantısız boy kısalığı veya kemik malformasyonları varlığında)

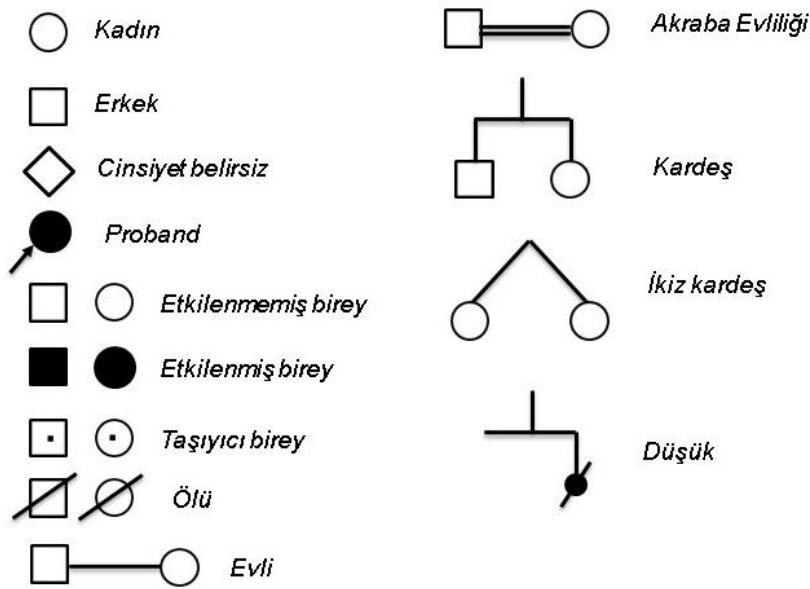
6. Hastalıkla ilgili literatür taraması, ön tanının oluşturulması
7. Uygun testler ile tanının doğrulanması
8. Genetik danışma
9. Hasta ve ailenin uzun süreli izlenmesi

2.4.2. Öykü alma ve Aile Ağacı Oluşturma

Genetik hastalıkların tanısında ilk aşama olan aile öyküsü ve klinik muayene çok önemlidir. Probandın ve ailedeki diğer kişilerin tıbbi öyküsünün alınması ve en az 3 kuşak aile ağacının çizilerek analiz edilmesi gereklidir. Aile ağacının incelenmesi, çoğu

kez kalıtım kalıbının, hastalığın doğal gidişatının ve prognozun anlaşılmasına ve hatta tanının konmasına yardımcı olur. Benzer fenotiplerin ortaya çıkmasının altında yatan mekanizmalar farklı olabilir. Örneğin, bazı kas distrofilerine neden olan genlerdeki değişimler dominant veya resesif olarak kalıtılabilmektedir. Bu gibi durumlarda aile ağacı hangi mekanizmanın daha olası olduğuna dair ipuçları verebilir ve belirli bir kalıtım kalıbını açıkça gösteriyorsa genetik risk hakkında bilgi verilebilir.

Aile ağacı oluşturulmasında standardize evrensel semboller kullanılır (14) (Şekil 2-20).



Şekil 2-20: Aile ağacında kullanılan bazı semboller

Aile ağacı çiziminde en az 3 kuşak ve aşağıdaki bilgiler özellikle sorgulanmalıdır:

- Akaraba evliliği var mı, var ise kaçınıcı derece,
- Yakınlarında benzer bulguların varlığı,
- Ölen kardeş var mı, ölüm nedeni?
- Fetal kayıp ve ölü doğum ve/veya anomalili çocuk varlığı,
- Akarabalarda benzer etkilenmiş birey var mı, bunlarla ilgili tıbbi bilgiler, var ise etkilenen akrabalarda başlangıç yaşı, cinsiyet ve belirtileri mutlaka belirtilmelidir.

2.4.3. Klinik Muayene

Probandın klinik muayenesinin tam olarak yapılması çok önemlidir. Bu muayene rutin bir muayeneden daha çok, probandın malformasyonları ve dismorfik bulgularının da tam olarak yapılmasını kapsamalıdır. Dismorfik özelliklerin tanısında kullanılan terimlere Tablo 2-2’de örnekler verilmiştir.

Tablo 2-2: Bazı dismorfik bulgular

Dismorfolojide kullanılan bazı terimler	
Terim	Anlamı
Hipertelorizm	Pupiller mesafenin normalin üstünde olması
Hipotelorizm	Pupiller mesafenin normalin altında olması
Brakisefali	Kısa ön-arka kafatası uzunluğu
Dolikossefali	Uzun ön-arka kafatası uzunluğu
Klinodaktili	Beşinci parmaklarda orta falanks displazisi
Polidaktili	Fazla el veya ayak parmakları
Sindaktili	Yapışık el veya ayak parmakları
Brakidaktili	Anormal kısa parmaklar
Simian çizgisi	Tek enine palmar (aya) çizgilenme

Klinik izlemler hastalık hakkında bilgi verebileceğinden kişideki dismorfik özelliklerin belirlenmesi sırasında kesin ölçümler yapmak çok önemlidir. Her bir normal aralık ırka, yaşa ve cinsiyete göre değişmektedir. Bazı dismorfik özellikler yaşa göre değişebileceğinden hasta ileri bir tarihte tekrar muayeneye çağrılmalıdır (14).

Genetik danışmada kesin tanının önemi büyüktür. Öykü ve fiziksel muayene güvenli bir tanı sağlayabilir veya daha fazla araştırma yapılması gerektiğine işaret edebilir. Genetik hastalıkların geniş spektrumunu yansıtan çeşitli araştırmalar gerekebilir. Benzer etkilenmiş ve ölmüş olan bireylerin hastane veya diğer kayıtlarını, raporlarını elde etmek kesin tanıya yardımcı olabilmesi açısından önemlidir. Aile ağacı ve klinik muayenenin tamamlanmasının ardından tanıya katkı sağlayabilecek, hastaya

ait görüntüleme (ultrason, radyolojik testler), biyokimyasal testler, göz muayenesi vs. gibi işlevsel araştırmalar istenebilir (14).

Klinik tanıda anomaliler etiyopatogeneze göre;

- deformasyon,
- disrupsiyon,
- displazi ve
- malformasyon olarak sınıflandırılır.

Deformasyon, genellikle gebeliğin son trimesterinde, fetal yapıların normal oluşumu tamamlandıktan sonra fetusun mekanik zorlanması (bası, sıkışma, hareketsizlik) sonucunda ortaya çıkan defektlerdir. Genellikle lokomotor sistemde (kemik, eklem) görülür (örneğin, doğumsal kalça çıkığı, pes ekinovarus gibi).

Disrupsiyon, fetal yapıların oluşumu normal olarak tamamlanan fetusun intrauterin yaşamının bir evresinde mekanik, vasküler veya enfeksiyöz nedenlere bağlı olarak hasara uğraması sonucu ortaya çıkan anomalilerdir (örneğin, amniyon zarının yırtılması sonucunda oluşan fibröz bantlar ve oligohidramniyos nedeniyle fetal doku ve organ gelişiminin bozulmasıyla oluşan amniyotik bant sekansı).

Displazi, hücre düzeyinde bozuk enzim yapımı ve yapısal protein sentezindeki anormal organizasyon sonucunda belirli dokularda anormal hücre organizasyonu ve bunun yapısal değişikliklere neden olmasından kaynaklanan morfolojik anomalilerdir. Displaziler kalıcıdır ve yaş ile birlikte klinik bulgular ağırlaşabilir (örneğin, iskelet displazileri, depo hastalıkları gibi).

Malformasyon; prenatal gelişim döneminde bir ya da daha fazla embriyonik sürecin tamamlanamaması, organogenez döneminde anatomik yapıların anormal oluşumu, erken gelişimdeki duraklama veya yanlış yönelme sonucu meydana gelen kalıcı özellikli yapısal/ fonksiyonel değişimlerdir (örneğin, nöral tüp defekti sekansı, potter sekansı, karın duvarı defektleri-omfalosel gibi).

2.4.4. Genetik Danışma

Genetik danışma, kalıtsal bir hastalığı olan bir hasta veya risk altındaki akrabalarının; bu hastalığın sonuçları, kalıtılma olasılığı, önlenebilirlik ve tedavi edilebilirliği açısından bilgilendirilmesi sürecidir. Genetik danışmayı veren kişiye

konsültan, üzerinden ailenin soruşturulduğu, bilgi alındığı ve genellikle etkilenmiş olan aile bireyine proband (indeks vaka) denir.

Walter Fuhrmann ve Friedrich Vogel genetik danışmayı şöyle tanımlamışlardır: "Gerçekte etkisi yıllarca sürebilen çok önemli bir tıbbi hizmettir. Danışmadan çıkan somut sonuçlar kişi veya çiftin tüm yaşam planlarını kökten değiştirebilir. Bireyin kişiliğinde yön kaybına neden olabildiği gibi aile ilişkilerini de sarsabilir" (15).

Genetik danışma, klasik hasta-danışman ilişkisinden farklı, karmaşık psikodinamik bir süreçtir. Danışmanın bu süreçteki görevi, başvuran kişi ve ailelere yeterli bilgi aktararak onları bilinçlendirmek ve "kendileri için en doğru olan" kararları vermelerine yardımcı olmaktır.

Hasta birey genetik danışma alabilecek yeterlilikte değil ise, her iki ebeveyne de mümkün olduğunca birlikte danışmanlık vermek gerekir ve uygun bir ortamda yeterli zaman ayrılmalıdır. Danışmanlık, durumun tüm yönlerini kapsamalı ve çift taraflı kolay anlaşılabilir şekilde yapılmalıdır. Klinik özellikler, komplikasyonlar, hastalığın prognozu ve hastalığın varsa etkin tedavi yöntemleri veya olası gebeliklerdeki riskler ve bu risklere yönelik yapılabilecekler (PT, PGD) ana hatlarıyla aktarılmalıdır. Danışmanlık yargılayıcı ve yönlendirici olmamalıdır. Amaç, danışanların kendi üreme geleceklerine ilişkin kendi kararlarını verebilmelerine olanak sağlayacak şekilde gerçekleri doğru bir şekilde sunmaktır. Özellikle, dengeli kromozomal anomaliler, OD, X'e bağlı resesif karakterler gösteren durumlarda genişletilmiş aile çalışmaları gereklidir ve risk altındaki diğer aile bireylerinde de gerekli genetik testlerin yapılarak tanının konulması ve önceden haberdar olmalarının sağlanması için danışan kişiden yardım almak gerekebilir.

2.5. Genetik Hastalıkların Tanısında Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Sitogenetik Teknikler

Kromozom analizlerinin hedefi kromozom setindeki olası sayısal ve yapısal dengesizliklerin/yeniden düzenlenmelerin araştırılmasıdır. Kromozom analizleri sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir. Sitogenetik yöntemlerle hem sayısal, hem de mikroskobik düzeydeki (8-10 Mb boyutunda) dengeli ve dengesiz yapısal anomaliler araştırılırken, moleküler sitogenetik yöntemlerle submikroskobik düzeyde hedefli dengeli ve dengesiz kromozom

anomalileri belirlenebilir. Genetik tanı testlerinin uygulanabilmesi için bireylerin genetik hastalıklar için topluma göre risklerinin artmış olması gözetilir. Bu durum kromozom anomalilerinde testin yapıldığı döneme göre farklılıklar gösterebilir.

Kromozom anomalileri için riskli popülasyonlar şunlardır:

Postnatal dönem;

- Bilinen kromozom anomali sendromları
- MKA
- Bilişsel Yetersizlik
- Büyüme gelişme gerilikleri
- Cinsiyet gelişim anomalileri
- Tekrarlayan gebelik kayıpları
- İnfertilite
- Maligniteler

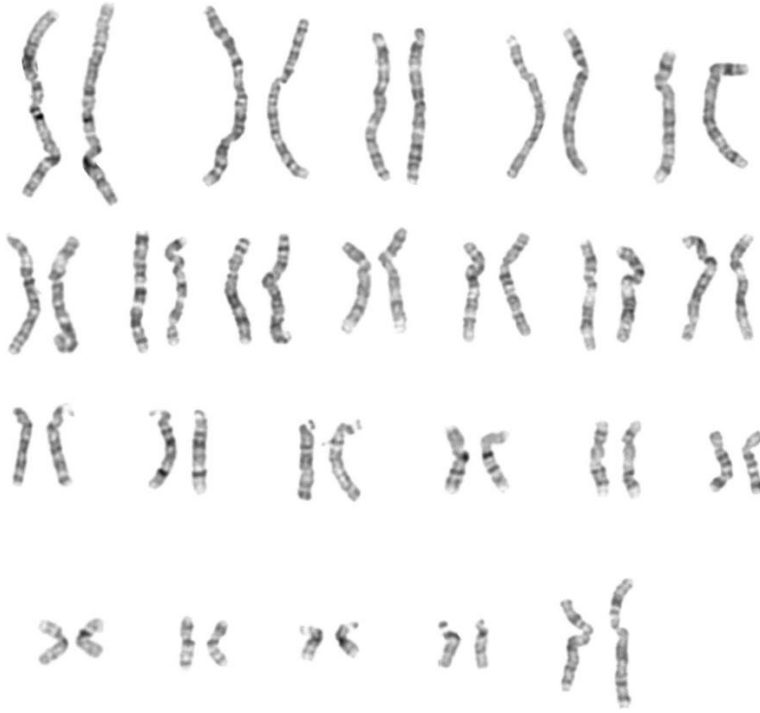
Prenatal dönem;

- İleri anne yaşı (35 yaş ve üzeri),
- Tarama testlerinde risk artışı (biyokimyasal, USG veya cell free-DNA (cf-DNA)),
- Patolojik ultrasonografi (USG) bulguları,
- Eşlerden birinde dengeli kromozom anomalisi taşıyıcılığı,
- Kromozom anomalili çocuk/fetus öyküsü,
- ICSI (Intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) ile oluşan gebelikler.

2.5.1.1. Klasik Sitogenetik Yöntemler

Mitoz bölünmenin prometafaz veya metafaz evresinde hücre bölünmesinin durdurularak kromozomların hücre dışına alınarak lamalar üzerinde metafaz plaklarının eldesi ve kromozomların farklı tekniklerle boyanarak mikroskop altında değerlendirilmesi en bilinen yöntemdir. Metafaz eldesinde, nukleusu olan ve mitotik aktivite özelliğini kaybetmemiş tüm hücreler/dokular kullanılabilir. İn vitro olarak laboratuvar koşullarında en çok kullanılan dokulara periferik kan, kemik iliği, koryon

villus dokusu, amniyositler ve deri fibroblastları vb. örnek verilebilir. Metafaz eldesi için temel olarak iki yöntem kullanılır. Bu yöntemlerden direkt yöntem, spontan mitotik aktiviteye sahip dokuların (kemik iliği, koryon villusları ve proliferatif dokular) metafaz eldesinde kullanılmasıdır. Kültür yöntemi, hücre proliferasyonunun görüldüğü durumlar hariç spontan mitotik aktiviteye sahip olmayan dokularda (periferik kan lenfositleri, amniyositler, deri fibroblastları, gonad dokusu) kromozom eldesi için hücrenin in vitro ortamda, hücrenin doğasına uygun koşullar oluşturularak kültür edilmesi ve mitotik aktivite kazandırılmasıdır. Dokuya uygun kültür süresinin sonunda mitoz bölünmenin metafaz/prometafaz evresinde inhibe edici bir ajanla (kolşemid) durdurularak hücre süspansiyonu hipotonik bir solüsyonla muamele edilir. Böylece hücrelerin hipertonic yapısı izotoniğe dönüştürülür ve kromozomların birbirlerinden ayrışması sağlanır. Ardından hücreler fikse edilir, lamalar üzerine yayılır ve her bir homolog kromozomu diğerlerinden ayırt edilmesini sağlayan özgün bantlama teknikleri ile boyanırlar. Bu aşamada sitogenetik laboratuvarlarında kromozom analizinde rutin olarak kullanılan bantlama tekniklerinden biri G bantlamadır. Tekniğin temeli, kromozomların yapısındaki histon ve non-histon proteinlerin bir proteaz (pankreatin, tripsin vb.) yardımı ile denatürasyonunun ardından DNA boyaları (Giemsa, Leishman vs.) kullanarak boyanmasına dayanır. DNA'nın Adenin (A) ve Timin (T) bazlarından zengin olan tekrar bölgeleri koyu boyanır ve bu bölgeler heterokromatin olarak adlandırılır. Boyanmayan ve açık renk gözüken bölgeler ise Guanin (G) ve Sitozin (C) bazlarından zengin olan yapısal genlerin bulunduğu ökromatin yapısındaki bölgelerdir. Kromozomlar, G bantlama ile metafaz evresinde yaklaşık 450-500 bant düzeyinde analiz edilebilir. Bant paterninin ayırt edici olduğu bölgelerde 8-10 Mb'dan daha büyük kromozomal değişimler tanımlanabilmektedir. High Resolution Banding Technique (HRBT) de ise farklı olarak hücre kültürüne bazı kimyasallar eklenerek (Timidin, EtBr, BrdU vb.) bölünmenin senkronize edilmesi ve kromozomların daha az kondanse oldukları prometafaz evresinde durdurularak analiz edebilmesine olanak sağlanır. HRBT ile kromozomlar >550 bant seviyesinde analiz edilerek, >3-5 Mb büyüklüğündeki yapısal anomaliler saptanabilmektedir (Şekil 2-21).



Şekil 2-21: G-bantlama görüntüsü (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)

Q-bantlama (Quinacrine-Bantlama), insan kromozomlarını tanımlamak için geliştirilen ilk bantlama yöntemidir. İlk geliştirildiği yıllarda ve Fransız ekolünde rutin kromozom analizinde de sıklıkla kullanılan Q bantlama, daha yaygın olarak heteromorfizmleri (1, 9 ve 16. kromozomların perisentromerik bölgeleri, akrosentrik kromozomların satellit bölgeleri ve Y kromozomunun uzun kolunun distalini) tanımlamada kullanılır.

C-bantlama ile esas olarak sentromerik heterokromatin, akrosentrik kromozomların kısa kollarındaki materyalin bir kısmı ve Y kromozomunun uzun kolunun distal kısmını oluşturan konstitütif heterokromatin boyanır. C bant pozitif görülen bölgeler çok tekrarlayan ve geç replike olan a-satellit DNA içerir. Bu yöntem polimorfizmlerin, marker kromozomların, disentrik kromozomların ve perisentrik inversiyonların tanısında kullanılmaktadır (Şekil 2-22).



Şekil 2-22: C-bantlama görüntüsü (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)

NOR boyama ile rRNA'yı kodlayan genlerin çok sayıda kopyalarını içeren ve akrosentrik kromozomların satellitleri yani nükleolus organize edici bölgeler (NOR) boyanmaktadır. Bu yöntem polimorfizmler, marker kromozomlar ve akrosentrik kromozomların yapısal anomalilerinin tanımlanmasında kullanılır (Şekil 2-23).



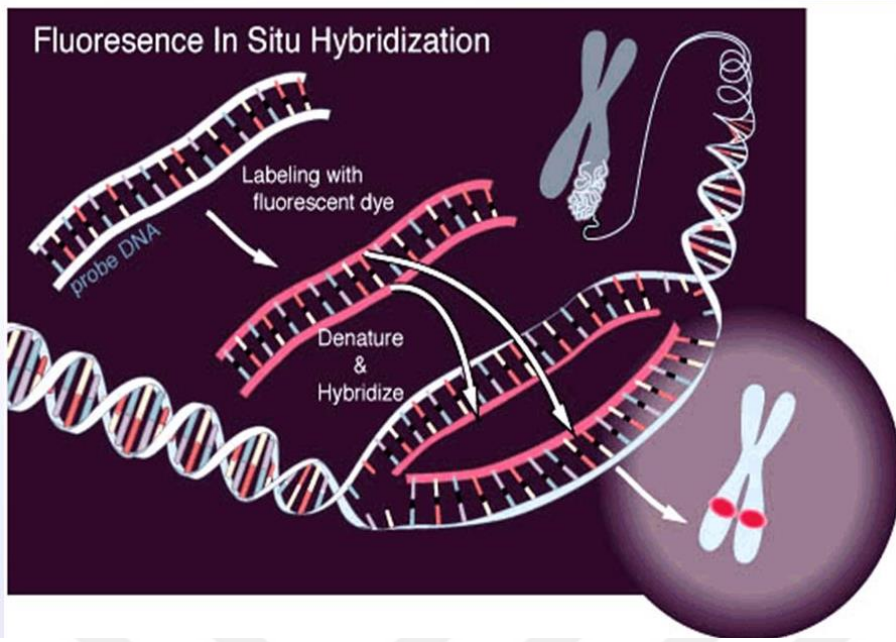
Şekil 2-23: NOR-boyama görüntüsü (siyah oklar akrosentrik kromozomların satellitlerini, kırmızı ok bisatellit içeren bir marker kromozomu göstermektedir) (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)

R-bantlama (Reverse- Bantlama) ile, G bantlamanın tam tersi bir bant kalıbı elde edilir. C-G'den zengin bölgeler koyu renk, A-T'den zengin bölgeler ise açık renk olarak boyanırlar. Bu yöntem G ve Q bantlama ile tanımlanması güç olan terminal kromozomal anomalilerin saptanmasında rol oynar.

2.5.1.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler

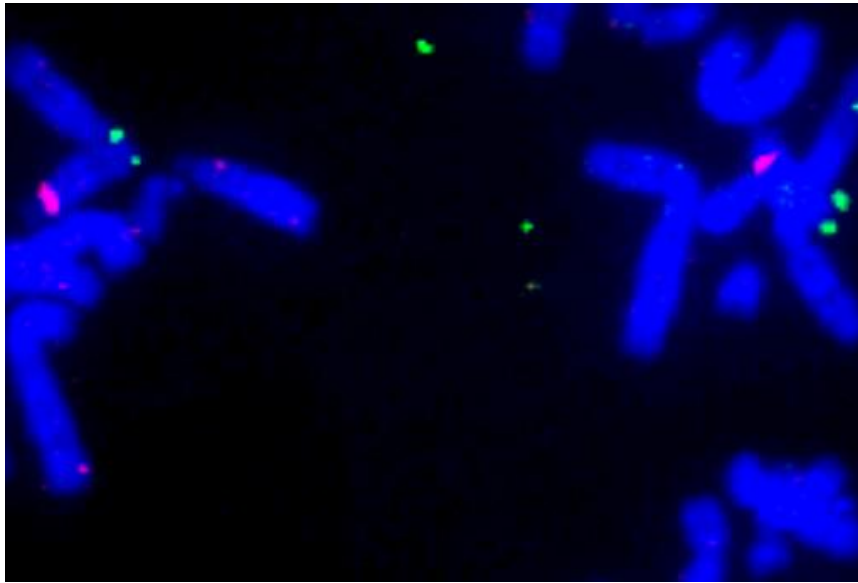
Fluoresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

1990'lı yıllarda sitogenetik alanındaki en önemli gelişme, işaretli problemlarla in situ hibridizasyon yoluyla, belirli kromozomları ve kromozom parçalarını tanımlamaya olanak sağlayan FISH tekniğinin kullanılmasıdır. FISH, bantlama yöntemleriyle tanımlanamayan çok sayıdaki submikroskopik delesyonu ve kromozom anomalilerini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2-24). Sitogenetik ile moleküler genetik arasında köprü oluşturan bu yöntem, klasik sitogenetiğin önemli bir tamamlayıcısıdır. Problemler, kromozomlardaki hedef bölgelerine göre lokusa özgü, tekrarlayan dizi ve kromozomun tümünü veya belirli bir kolunu işaretleyen problemler olarak sınıflandırılmaktadır.



Şekil 2-24: FISH çalışma prensibi (16)

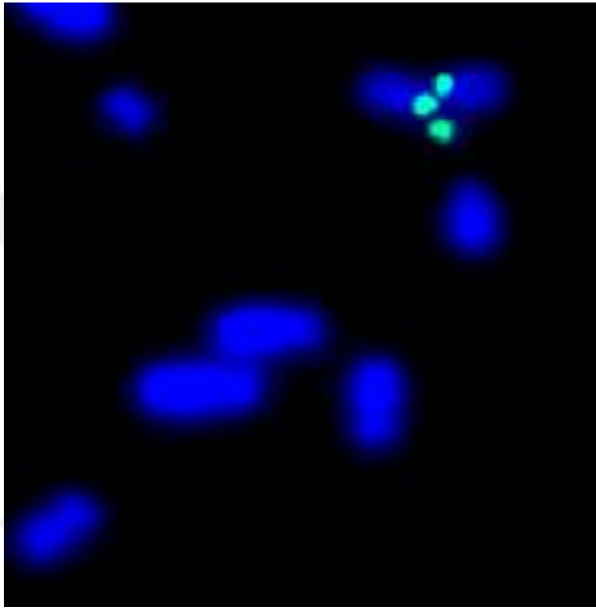
Lokusa özgü prob lar, metafaz kromozomlarında veya interfaz nukleusunda bir gene veya genin içindeki belirli bölgeye ait özgün DNA dizilerinden oluşan ortalama uzunlukları 15-500 kb büyüklüğünde olan problardır. Mikrodelesyon – duplikasyon sendromlarının tanısında (DiGeorge Sendromu, Prader Willi (PWS) /Angelman Sendromu (AS) gibi) ve kırık noktalarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (17). (Şekil 2-25)



Şekil 2-25: Lokus spesifik prob (PWS/AS) (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)

DNA'nın tekrar bölgelerine özgün hazırlanmış proplar da bulunmaktadır. Bunlar yer aldıkları bölgelere göre alfa satellit, beta satellit, klasik satellit ve telomerik proplar olarak adlandırılır.

Alfa satellit proplar, kromozomların sentromerlerine özgün tekrarlayan dizilerden oluşan ve ortalama 1-170 kb büyüklüğündeki proplardır. Bu proplar, sentromerik anomalilerin ve marker kromozomların kromozomal kökeninin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 2-26).



Şekil 2-26: 15. Kromozom kökenli alfa satellit prop örneği (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)

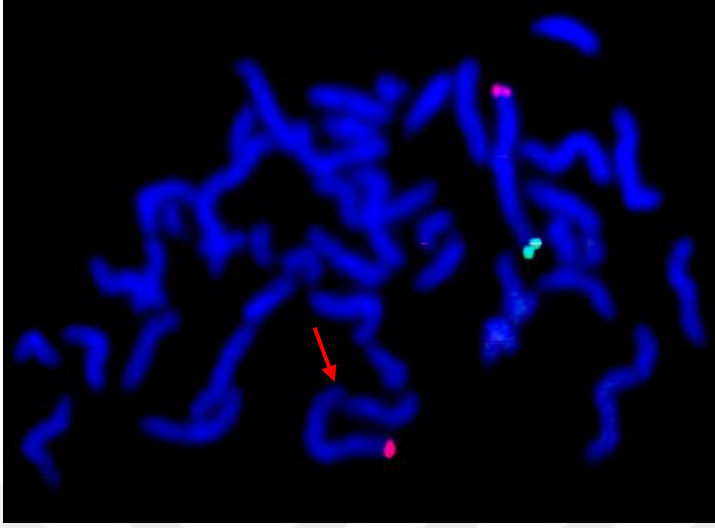
Beta satellit proplar, kromozomların perisentrik heterokromatin bölgeleri, akrosentrik kromozomların ve 9. kromozomun sentromerine özgün tasarlanan proplardır.

Klasik satellit proplar ise 1, 9, 15 ve 16. kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerine ve Y kromozomunun uzun koluna özgün DNA dizilerinden oluşan proplardır.

Telomerik proplar; 5'-TTAGGG-3' tekrarlarından oluşan ortalama 2-15 kb büyüklüğündeki proplardır.

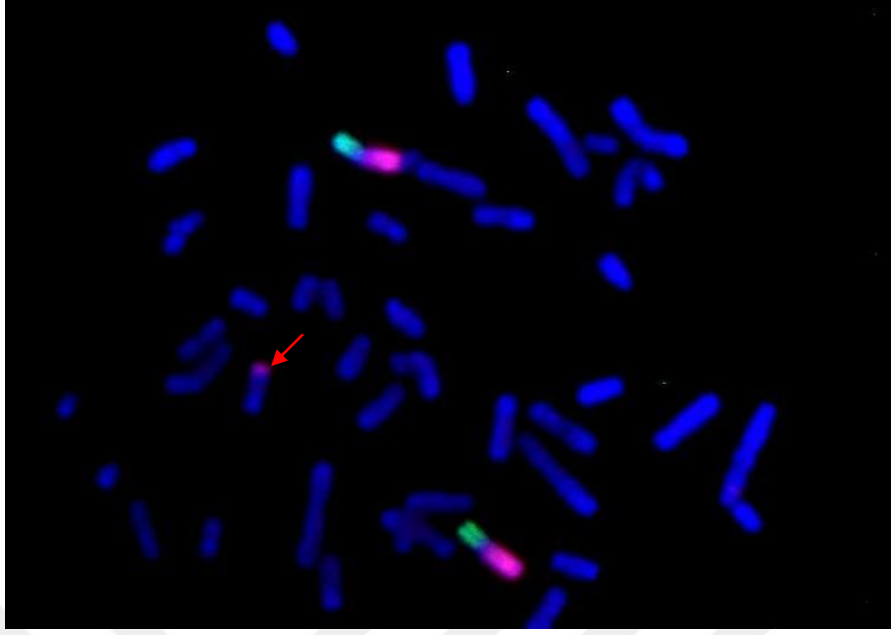
MKA/MR grubunda yapılan analizlerde değerlendirilen subtelomerik bölgeler genler açısından çok zengin olmasına karşın bant kalıpları özgün olmadığından klasik teknikler bu bölgedeki anomalilerin tanısında yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle

subtelomerik problemler kromozomların subtelomerik bölgelerindeki yeniden düzenlemelerin ve kriptik değişimlerin tespitinde kullanılmaktadır (Şekil 2-27).



Şekil 2-27: Subtelomerik prob (ok p kolunda delesyonu gösteriyor) (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)

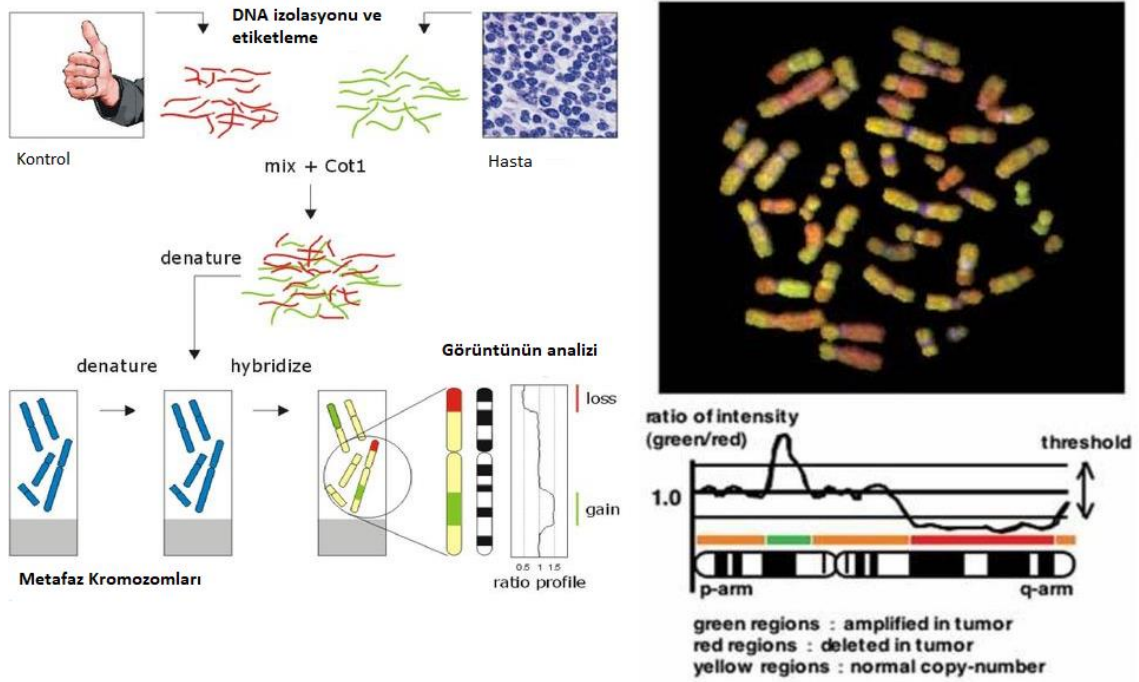
Ayrıca bir kromozomun kısa kolunun (p) terminalinden, uzun kolunun (q) terminaline kadar tamamını boyayan “whole chromosome painting (WCP)” ya da kromozomların her bir kolunu ayrı renklerde boyayan “arm spesifik” problemler mevcuttur (Şekil 2-28). Bu problemler yeniden düzenlenen kromozomların yapısının çözülmesinde kullanılır. Klasik sitogenetik analizde tanısı konamayan de novo yapısal anomalilerin kromozomal kökeninin aydınlatılması, kırık noktalarının belirlenmesinde çeşitli FISH problemleri (sentromerik, painting, sendromik vd.) kullanılmaktadır.



Şekil 2-28: 6. kromozoma özgü arm spesifik prob kullanılarak yapılan FISH çalışması görüntüsü (kırmızı ok parsiyel bir duplikasyonu göstermektedir.) (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)

CGH (Comperative Genomic Hybridisation)

Mikrodizin çalışmalarının öncüsü sayılan bu yöntem, test DNA'sı ile kontrol DNA'sının farklı floresan boyalar ile işaretlenerek metafaz kromozomlarına hibridizasyonu ve floresan sinyallerinin floresan mikroskopla görüntülenerek özgün yazılım tabanında sinyallerin birbirine oranının karşılaştırılması esasına dayanmaktadır (Şekil 2-29). Her iki floresan rengin kromozom üzerinde oluşturduğu dengenin bozulması ile delesyon/duplikasyon analizi yapılmaktadır. Bu tekniğin ilk zamanlarda tüm genomun incelenmesine olanak sağlaması bakımından kromozom anomalilerinin tanısında çığır açacağı düşünülmüş ancak, uygulama ve analiz zorluğu, kromozomların perisentromerik ve terminal bölgelerinde hassasiyetin düşük olması, rezolüsyonun kısıtlı olması nedeniyle rutin kullanıma geçememiştir (18,19).



Şekil 2-29: CGH çalışma prensibi

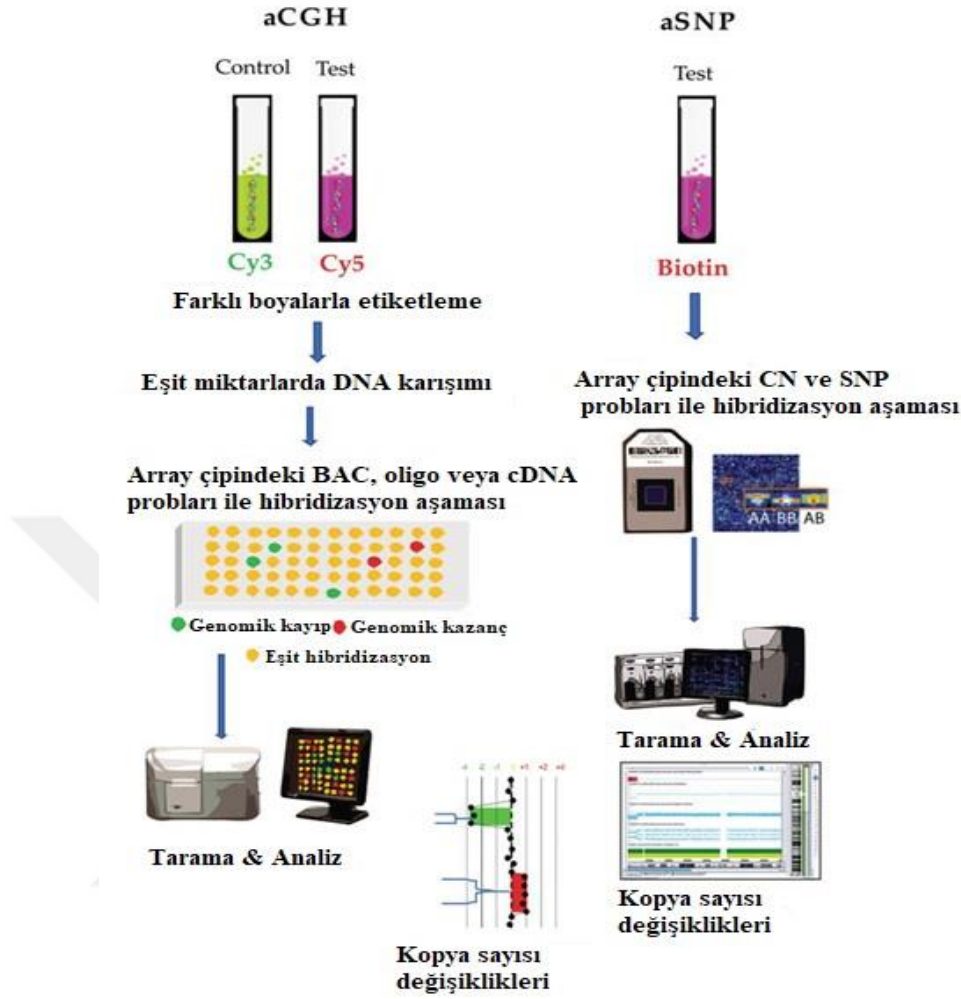
Array CGH (a-CGH)

DNA’da çok sayıda varyasyon bulunmaktadır ve bu varyasyonlar bireyler ve toplumlar arası genetik çeşitliliğin ortaya çıkmasını sağlar. İnsanlarda genomun %99.9’u benzerdir ve kalan %0,1’ lik bölüm bireyler arasında farklılıklar göstermektedir. Tek Nukleotid Polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphisms: SNP) ve Kopya Sayısı Farklılıkları (Copy Number Variations: CNV) bu varyasyonlardan bir kısmıdır. İnsan genomunda yer alan ve referans genom ile karşılaştırıldığında, DNA sekansında meydana gelen tek baz değişimi tek nükleotid polimorfizmi olarak tanımlanmaktadır. SNP’ler insanlarda en yaygın görülen genetik çeşitliliktir ve ortalama olarak her 300 baz çiftinde bir bulunurlar (20). Tüm genetik varyasyonların yaklaşık %90’ını oluştururlar. SNP’ler bir gen içinde veya bir genin yakınındaki düzenleyici bir bölgede meydana geldiğinde, genin işlevini etkileyerek hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynayabilirler. Referans genomla kıyaslandığında, farklı sayıda bulunan, 50 baz çiftinden daha büyük olan yapısal değişiklikler ise CNV olarak adlandırılır (21). Birçok gen ve gen anlatımını düzenleyen bölgelerde yer alan CNV’ler gen dozajının ve anlatımının olumsuz etkilenmesine neden olabilirken, genomun bazı bölgelerinde yer alan CNV’ler ise belirgin bir fenotipe yol açmayabilir. Fenotipik etkilenmede tek başına etkin rol oynayabildikleri gibi çevresel ya da diğer genetik faktörlerle birlikte hastalıkların ortaya çıkmasına da neden olabilirler.

Mikroarray (DNA array, array-CGH); sentetik üretilmiş hedef DNA fragmanlarının (30k-4M oligo/prob) katı bir yüzeye (cam, plastik, kompleks-çip) tespit edilmesi ile oluşturulmuş sistemdir. Çip tüm genom veya hedef bölge için tasarlanmış oligonukleotidler (problar) içermektedir ve hibridizasyon işlemi de probların bulunduğu bu çip yüzeyinde gerçekleşmektedir. Mikroarray uygulamaları, günümüzde yaygın olarak Illumina, Agilent ve Affymetrix veya özgün tasarım platformlarında gerçekleştirilmektedir.

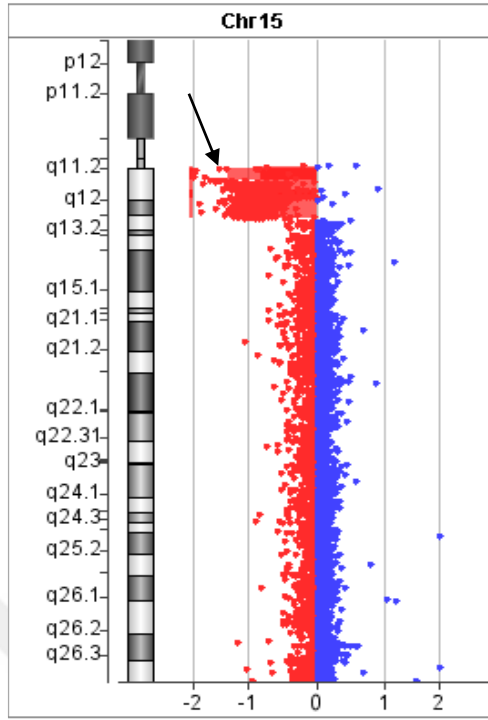
a-CGH yöntemi ile platforma ve kitin çözünürlüğüne bağlı olarak 50-70 kb büyüklüğünde oligonukleotid problar kullanarak genomik kopya sayısı değişikliklerini saptamaya yönelik dizayn edilmiş platformlar (Agilent) bulunmaktadır. Illumina ve Affymetrix platformları ise SNP genotiplemeye odaklanmıştır ancak bu platformlara eklenen CNV probları ile genomik kopya sayısı değişiklikleri de saptanabilmektedir (Şekil 2-30).

CMA



Şekil 2-30: a-CGH ve mikroarray çalışma prensibi (22)

a-CGH, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon analizlerini mikroarray teknolojisiyle birleştiren ve genomdaki dengesizlikleri DNA düzeyinde tanımlayan bir tekniktir. Yöntemin temeli iki farklı floresan boya ile etiketlenmiş hasta ve referans DNA'sının cam bir slayt üzerine immobilize edilmiş oligonükleotidler ile hibridizasyonuna dayanır. Böylece çok sayıda genomik lokusun DNA üzerinden kopya sayısı farklılıklarının (delesyon veya duplikasyon) karşılaştırmalı analizi mümkün olmaktadır (Şekil 2-31). Bu yöntemin avantajları, az miktarda DNA örneğinin çalışma için yeterli olması, hücre kültürüne gerek duyulmaması ve genomdaki kilobaz (Kb) düzeyindeki değişiklikleri bile saptayabilmesidir (23).



Şekil 2-31: Bir olguya ait 15. kromozomdaki delesyon bölgesinin a-CGH görüntüsü (İ.Ü. İ.T.F. Tıbbi Genetik ABD; Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik Laboratuvar arşivinden)

Tablo 2-3: Kromozom anomalilerinin tanısında kullanılan sitogenetik ve moleküler sitogenetik tekniklerin avantaj ve dezavantajları

Teknikler	Avantajlar	Dezavantajlar
Klasik Sitogenetik Yöntemler	-Sayısal ve mikroskobik düzeydeki yapısal kromozom anomalilerini saptanması, -Tüm genomun tek seferde analizine olanak sağlama, -Düşük oranlı mozaizizmlerin saptanabilmesi, -Seçici bantlama teknikleri ile özgün anomalilerin tanımlanabilmesi	-Düşük çözünürlükte olup, 5Mb'dan daha küçük kromozomal değişimlerin ve kompleks anomalilerin aydınlatılmasında yetersiz kalması, -Kromozomların subtelomerik bölgelerinin tanısında yetersiz kalması - Deneyime bağlı olması,
FISH Tekniği	-Pratik, hızlı ve maliyetinin uygun olması, -Subtelomerik bölgedeki anomalilerinin analizine olanak sağlama - 3-5 Mb'dan daha küçük yapısal kromozom anomalilerini tanıyabilmesi -Marker kromozomların detaylı olarak araştırılabilmesi	-Probun spesifik bağlanma bölgesi dışında diğer kromozomal değişimleri tanıyamaması, -Klinik ya da sitogenetik yönlendirme gerekliliği, -Bilinen hedef bölgelere özgün çalışılabilmesi.
CGH Tekniği	-Genetik materyaldeki artış ve kayıplar için tüm genomun analiz edilmesine olanak sağlama, -Pürifiye edilmiş hücrelerden az miktarda kullanımın yeterli olması	-Metafaz plağına ihtiyaç duyulması, -Rezölüsyonunun kısıtlı olması, -Uygulama ve analiz zorluğu.
a-CGH Tekniği	-Tüm genomun tek testle ve kısa sürede incelenebilmesi, -Submikroskobik delesyon ve duplikasyonların tanınabilmesi, -Yüksek çözünürlük, -Yaklaşık 1 kb'a kadar olan CNV'lerin tespit edebilmesi, -Çalışma için az miktarda DNA örneğinin yeterli olması,	-Dengeli yapısal yeniden düzenlenmeleri tespit edememesi, -Düşük oranlı mozaizizmlerin tanısında yetersiz olması (< %10) , -Poliploidileri saptayamaması -Pahalı olması, -Düşük oranda hata payının (hibridizasyon sorunları) olması

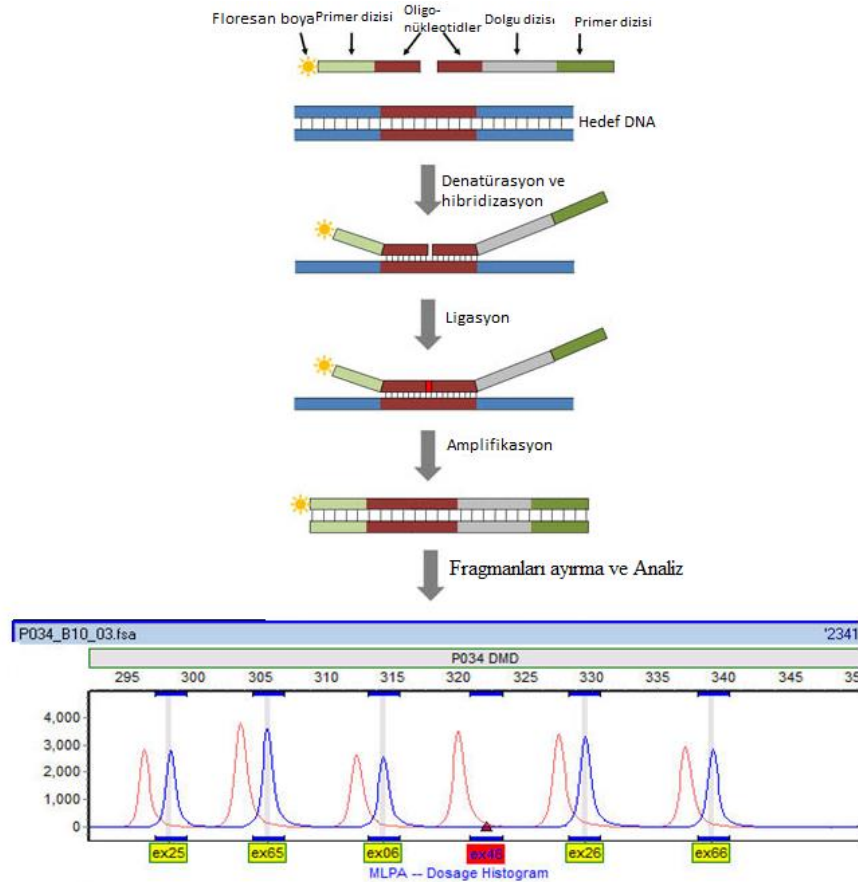
2.5.2. Moleküler Yöntemler

MLPA (Multiple Ligation - dependent Probe Amplification)

Tek gen hastalıklarının tanısında birçok moleküler yöntem kullanılmaktadır. Bunların birçoğu DNA dizisinde oluşan değişimleri saptamada kullanılır. MLPA tekniği ise moleküler bir teknik olmakla birlikte kromozomal delesyon ve duplikasyonların tanısında da kullanılmaktadır. Bu nedenle hem moleküler sitogenetik hem de moleküler teknik olarak da değerlendirilebilir.

Bu teknik, tek bir nükleotid değişimini dahi ayırt edebilir. Genomik DNA veya RNA dizisindeki 50'den fazla bölge için hedefe yönelik prob karışımları kullanılarak genomdaki doz değişimlerini, DNA'nın metilasyon durumunu, tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP'ler) ve nokta mutasyonlarını tespit etmek için kullanılır. mRNA'yı ölçmek için uygulanan ve genetik laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan multipleks PZR'a dayalı bir tekniktir (Şekil 2-32).

Tekniğin sınırlamaları ise, nokta mutasyonlarının ve dengeli translokasyonların saptanmasında yetersiz kalabilmesi, hedefe yönelik olup daha düşük çözünürlükte tarama yapabilmesidir (24).



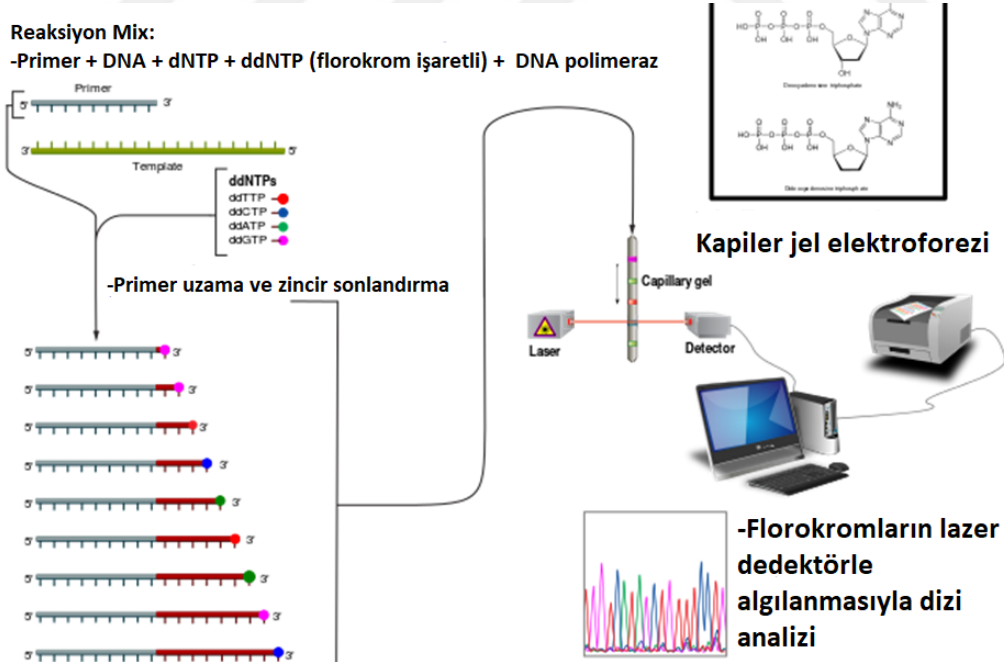
Şekil 2-32: MLPA çalışma prensibi (25)

2.5.2.1. DNA Dizileme Yöntemleri

Sanger Dizileme

1975 yılında Frederick Sanger tarafından geliştirilmiştir ve bu çalışma 1980 yılında Nobel Kimya Ödülüne layık görülmüştür. Günümüzde genetik tanı laboratuvarlarında en sık kullanılan DNA dizileme yöntemidir. DNA kalıbı

(safılaştırılmış PCR ürünü), ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz, tek yönlü oligonükleotid primer ve 4 çeşit deoksinükleotid trifosfat (dNTP) ve her biri farklı bir dalga boyunda ve farklı renkte ışıma yapan floresan boyalarla işaretlenmiş dideoksi nükleotid trifosfat (ddNTP) kullanılarak yeniden sentezlenmesi ve zincir uzama aşamasında yeni sentezlenen zincire floresan işaretli nükleotidlerin eklenmesiyle her basamakta uzaması ile sonlanan fragmanlar elde edilir. Bu işlem devam ederken rastgele olarak bazı nükleotidler için dNTP substrat molekülleri yerine ddNTP ipliğe katılır. Bu durumda ddNTP'lerin deoksiriboz şekerinde bir sonraki nükleotidin bağlanması için gerekli olan 3'OH grubu olmadığından yeni bir nükleotid eklenemez ve ipliğin uzaması durur. İşlem sonunda, ürün olarak her birinin 3'ucunda belli bir floresan ddNTP bulunan bir dizi zincir bulunur. Daha sonra, kapiller jel elektroforezinde uzunluklarına göre ayrılarak taşıdıkları floresan sinyallerine göre dizisi belirlenir (şekil 2-33) (26). DNA dizileme teknolojisi uygulaması ile genetik hastalıklara yol açan DNA baz değişimlerinin, topluma özgü gen polimorfizmlerinin, mikrobiyal hastalıklara neden olan mikroorganizmaların yol ağtığı hastalıkların belirlenmesinde ve adli tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır.

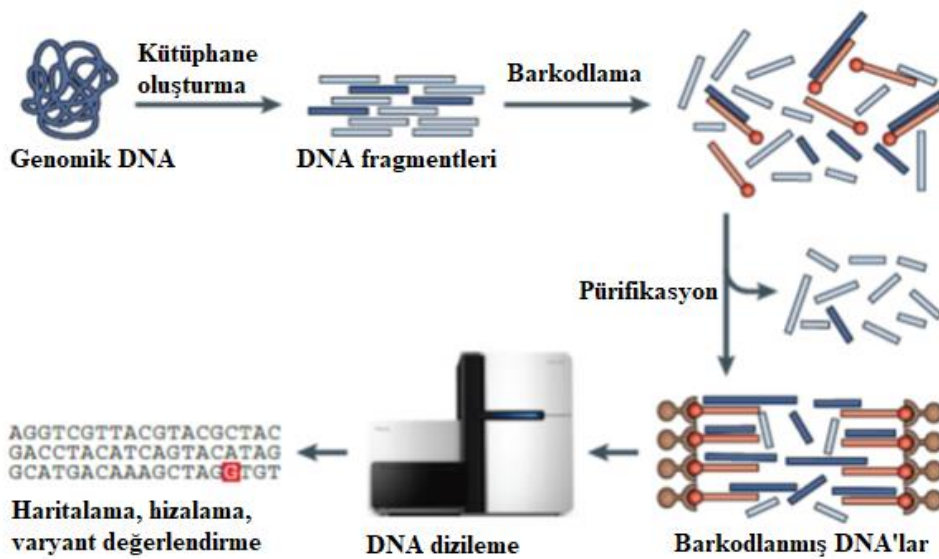


şekil 2-33: Sanger dizilemenin aşamaları

Yeni Nesil Dizileme

Sanger dizilemenin uygulanabilmesi için incelenecek gen hakkında önceden bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Genlerin büyüklüğü (örn. Distrofin geni), benzer bulgulara yol açan birden fazla genin varlığı tanıda Sanger dizilemenin uygulanmasını zorlaştırmakla, maliyet ve tanı süresi de artmaktadır. Bu yüzden, genetik hastalıkların etiyolojisinin araştırılmasında, birden fazla genin hatta genomun tüm genlerinin, birden fazla örnekte eş zamanlı tek bir test ile araştırılabilmesine olanak sağlayan YND teknolojileri devrimsel bir aşama sağlamıştır. YND teknolojilerinin daha yaygın uygulanmasıyla genetik varyasyonların tanımlanması hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Bu gelişmelerin hastalıkların etiyolojisinin anlaşılmasına, tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine, ailelerde daha doğru risk değerlendirmesine ve etkin genetik danışmanlığa katkı sağlaması beklenmektedir (27,28).

YND teknikleri, DNA'nın fragmente edilerek milyonlarca fragmanın eş zamanlı ve yüksek sayıda dizilenmesi esasına dayanır. YND teknolojilerinin hedefli gen panelleri ile hastalık ilişkili birçok genin eşzamanlı dizilenmesi, tüm ekzom dizileme (TED), tüm genom dizilemeyi (TGD) ve ekspresyon çalışmaları için RNA dizileme gibi çeşitli uygulama seçenekleri bulunmaktadır. Her bir yöntemin kendine özgü avantajları, dezavantajları, sınırlamaları ve tercih edildiği durumlar vardır. Tüm YND teknikleri, genel olarak kalıp (taslak) hazırlama, dizileme, görüntüleme ve verilerin analizi aşamalarından meydana gelmektedir (Şekil 2-34).



Şekil 2-34: YND çalışma prensibi

Panel-Gen Testleri: Paneller genellikle ilgilenilen hastalıkla ilgili genleri içerir. Hastalıkla ilişkili olduğu bilinen genlere odaklanıldığından tanı daha detaylı ve güvenilirdir. Bu uygulamalarda incelenen genlere ait fragmanların okuma derinlikleri, kapsanan bölgeleri önemlidir. Eğer testte kapsanmayan bölgeler varsa bu bölgeler Sanger dizileme ile incelenerek çalışma tamamlanır. Genetik heterojenite gösteren hastalık gruplarında panel gen uygulaması çoklu gen ve hasta incelemesine olanak sağladığından test maliyeti düşer ve tanı süresi kısalmır.

Bununla birlikte, panel-gen testlerinin uygulanabilmesi için öncelikli olarak klinik ön tanı gerekir. Özellikle prenatal tanıda, ayırıcı tanıyı daraltabilmek ultrasonografik bulgularla sınırlı olduğundan zordur (29).

Tüm Ekzom Dizileme (Whole Exom Sequencing): İnsan genomu 3,2 milyar baz çiftinden meydana gelmektedir. Genomun yarısı tekrar dizilerinden, %25'i genler arası (intergenik) bölgelerden, %23'ü intronik bölgelerden ve yaklaşık %1,5'luk kısmı protein kodlayan ve ekzon adı verilen DNA dizilerinden meydana gelmektedir. Nadir genetik hastalıkların büyük bir çoğunluğu %1,5'luk protein kodlayan dizilerde meydana gelen hatalardan kaynaklanmaktadır (30). Bu nedenle özellikle ayırıcı klinik tanısı yapılamayan hastalıkların tanısına yönelik bilinen genlerin (yaklaşık 20 000) ekzonlarının dizilenmesi yöntemine "tüm ekzom dizileme (TED)" adı verilmektedir. Bu yöntem ile incelemek için belirli bir geni ya da gen grubunu seçmek zorunda kalmadan, binlerce genin kodlayıcı bölgeleri aynı anda test edilebilmektedir. Özellikle, hasta bir kişinin ebeveynleri ile çalışılarak trio olarak yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler tüm kalıtım modellerine uygun olarak değerlendirilebilir ve tanıda önemli kazanımlar sağlar. YND yöntemlerinin pratikte en sık kullanılan türlerinden biri olan TED ile konjenital genetik hastalıkların yaklaşık %30'una tanı konabilmektedir (31). Bu çalışmalar, çeşitli kalıtım paternlerinde hastalık ilişkili genlerde hem bilinen hem de yeni mutasyonları saptamada klinik ve araştırmalarda önemli katkılar sağlamaktadır (1,32,33,34). Mendel hastalıkları ile ilişkili patojenik varyantların ~ %85'inin ekzon veya ekzon-intron birleşme bölgelerinde bulunduğundan TED yöntemi tek gen hastalıklarına neden olan genlerin/mutasyonların tespit edilmesinde ya da hastalıklara yatkınlık oluşturan tek nükleotid polimorfizmlerinin (single nucleotide polymorphism; SNP) tespitinde önemli bir seçenek oluşturmaktadır. Çeşitli olgu sunumları ve küçük çalışmalar, özellikle atipik bir fenotip veya poligenik bir hastalık gibi tanıyı zorlaştıran

durumlarda, TED'nin klinik yararını göstermiştir (35). Ayrıca, hastalık veya gen spesifik bir platform olmadığı ve potansiyel genlerle ilgili bir ön bilgi gerektirmediği için postnatal genetik değerlendirmedeki tanı zorluklarında çözüm olarak değerlendirilmiştir. Çeşitli kalıtım modellerinde hastalığa neden olan genlerde bilinen olduğu kadar yeni varyasyonları tespit etmek için de TED'nin hem klinik hem de hastalık ilişkili yeni gen araştırmalarına katkısını göstermiştir (36).

Klinik Ekzom Dizileme (Clinical Exome Sequencing): Klinik ekzom dizileme (KED) özellikle hedefe yönelik çok-gen panellerinin yerine tercih edilebilecek bir yöntemdir. Bu yöntemde, OMIM ve HGMD (Human Gene Mutation Database) gibi veritabanlarında genotip-fenotip ilişkisi kesinleşmiş hastalıklar hedeflenmektedir. Klinik ekzom panelleri içeriğindeki kullanılan platforma bağlı olarak 4000-6000 gen ve bu genlere özel tasarlanmış probalar sayesinde kısa sürede dizilenerek analiz edilebilmektedir.

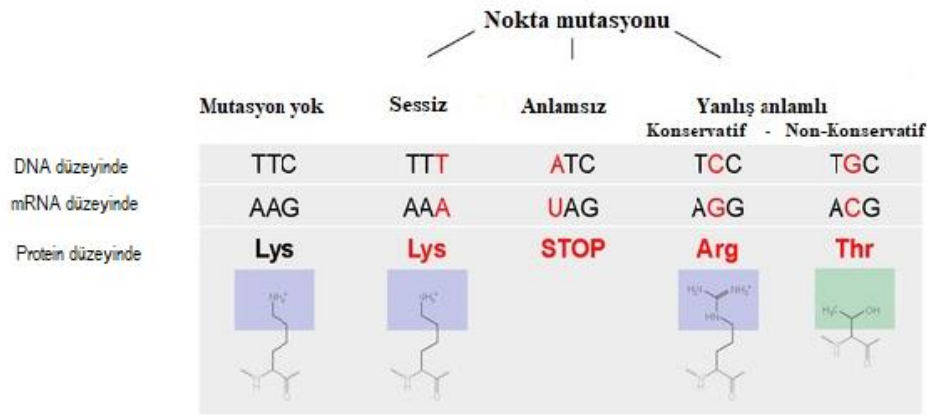
Tüm Genom Dizileme (Whole Genome Sequencing): Tüm genomun (ekzonik, intronik, tekrar bölgeleri dahil) dizilenmesi “tüm genom dizileme (TGD)” olarak adlandırılır. TGD'nin, TED'den farkı genlerin ekzonlarının yanı sıra intron bölgelerini ve ek olarak mitokondrial DNA'nın da incelenebilmesine olanak sağlamasıdır. TGD'nin diğer önemli farkları arasında; DNA'daki yapısal varyantların (örneğin translokasyon, inversiyon vb), kopya sayısı değişikliklerinin ve kontrol dizilerinin (örneğin microRNA'lar) da incelenebilmesidir. Bir organizmanın genomunda yer alan tüm genetik bilginin ve değişimlerin en kapsamlı şekilde araştırılabilmesi bu yöntem ile mümkündür. TGD'nin önemli katkılarından biri de, hedefteki ilgili genlerin incelenebilmesine ek olarak onların aktivitelerine etki edebilecek diğer tüm genetik değişikliklerin, yani genler arası olası etkileşimlerin de ortaya çıkarılabilmesidir.

Sanger dizileme ile araştırılması zor olan birçok genin eş zamanlı olarak, TED ve TGD yöntemleriyle (intron ve ekzonlar birlikte 3.2 milyar baz çifti) birçok kişide eş zamanlı araştırılma olanağı bu teknolojiler ile mümkün olmuştur. Son yıllarda TED ve TGD özellikle nadir hastalıklara yol açan mutasyonların, fenotipik ve genotipik olarak heterojenite gösteren hastalıkların tanısında ve yeni genlerin keşfinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (37,38,39).

2.6. YND Analizinde Varyantların Değerlendirilmesi

YND tekniklerinin uygulama sonrası verilerin incelenmesi ve değerlendirilmesi en önemli aşamayı oluşturmaktadır. Analiz sonuçlarının patojenik olup olmadığı, klinik bulgularla uyumu in silico veri tabanlarının yardımı ile yapılmaktadır. Öncelikle bu analizlerde minör allel frekansı (MAF) önemlidir. Bir toplumda belirli bir varyant için ikinci sık rastlanan allel MAF olarak tanımlanır. Nadir hastalıkların genetik etiyolojisinin aydınlatılması için en önemli değerlendirme kriterlerinden birisidir. Bir varyantın MAF değeri, %1'in altındaysa nadir hastalıklar için patojenik mutasyon adayı olarak değerlendirilebilir. Ancak, genetik çalışmaların artması ile birlikte popülasyon verilerinin sürekli güncellenmesi ve mutasyon tiplerinin de karakterize edilmesi ile nadir hastalıklar için %1 olarak belirlenen eşik değerin güncellenmesi önerilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda MAF eşik değeri, otozomal resesif geçişli nadir hastalıklar için 0,005; otozomal dominant geçişli nadir hastalıklar için ise 0,0005 olarak önerilmiştir (40).

Genetik materyaldeki değişiklikler, protein kodlayan-kodlamayan genler ve genler arası bölgeleri etkileyebilmektedir. Bu genetik değişiklikler arasında özellikle protein kodlayan genlerdeki değişikliklerin etkisini öngörmek daha kolaydır. Bir mutasyon, protein kodlayan gendeki yerine göre ekzonik, intronik, 5'UTR, 3'UTR mutasyonları olarak sınıflandırılabilir. Bir genin kodlayan dizisinin içinde veya dışında meydana gelen değişimler gen ürünü üzerinde geniş etkiye sahip olabilir veya transkripsiyonu direkt olarak engelleyebilir. Ekzonik bölgede meydana gelen mutasyonlar doğrudan amino asit yapısına etki edebilirken diğer bölgelerdeki mutasyonların etkileri dolaylı olabilmektedir. Dolaylı etkilere örnek olarak, özellikle intronun ilk iki ve son iki bazında meydana gelen değişikliklerin RNA splicing (uçbirleştirme) mekanizmasının düzenini değiştirerek amino asit dizisinde büyük ekleme (insersiyon), çıkarma (delesyon) ve çerçeve kaymalarına (frame –shift) sebep olması verilebilir. Ekzonik dizilerdeki değişiklikler nükleotid sayısını değiştirip değiştirmedikçe göre, nokta mutasyonları ve insersiyon/delesyon olarak ayrılabilir. Nokta mutasyonları, sinonim (sessiz), missense (yanlış anlamlı), nonsense (anlamsız) gibi farklı şekillerde olabilir (Şekil 2-35). İnsersiyon/delesyon için ise eklenen/eksilen nükleotid sayısı mutasyonun etkisini belirlemede önemlidir. Bu mutasyonlar ve etkileri hakkındaki bilgiler Tablo 2-4'te verilmiştir.



Şekil 2-35: Nokta mutasyonu tipleri

Tablo 2-4: Mutasyon tipleri ve etkileri

Mutasyon Tipleri	Etkileri
Nokta mutasyonları (baz değişimleri)	-Synonim (sessiz) mutasyon: DNA üçlü kodonunda bir nokta mutasyona rağmen kodondan sentezlenen amino asit değişmez. -Missense (yanlış anlamlı) mutasyon: DNA'nın üçlü kodonunda meydana gelen bir nokta mutasyonu sonrasında kodondan sentezlenen aminoasit değişir. -Nonsense (anlamsız) mutasyon: Üçlü kodonda meydana gelen bir nokta mutasyon sonrasında erken STOP kodon oluşturur.
İnseriyon/Delesyon	-Frame –Shift (çerçeve kayması): Üç nükleotid bir araya gelerek protein üzerinde bir amino asidi belirleyen kodon dizisini oluşturur, üçün katı halinde olan inseriyon/delesyon sadece amino asit inseriyon/delesyona neden olan çerçeve içi (in-frame) değişikliklere neden olurken; üçün katı olmayan sayıdaki değişiklikler çerçeve kaymasına (frame-shift) sebep olmaktadır.

Özellikle translasyon aşamasında proteinlerin erken sonlanmasına sebep olabilen çerçeve kayması ve anlamsız mutasyonların, protein işlevi üzerinde daha büyük etkilere neden oldukları bilinmektedir (41). Bir genetik değişikliğin mutasyon olarak değerlendirilmesi için MAF değeri, mutasyonun protein yapısı üzerine etkisi gibi birçok kriter bir arada değerlendirilmelidir.

Bu çalışmada, Tıbbi Genetik polikliniğine başvuran, aralarında akraba evliliği bulunan, aynı ailede benzer klinik bulgulara sahip en az 2 etkilenmiş olgu olan, klinik değerlendirmede bilinen bir sendrom ile ilişkilendirilemeyen, kromozom analizleri ve moleküler karyotipleme sonuçları normal saptanmış 3 aileden 3 indeks olgu ve 5 aile bireyi seçilerek TED yöntemi araştırıldı. Bu uygulamadan çıkan veriler değerlendirilerek klinik bulgularla uyumu ve segregasyonları araştırıldı. Çalışmanın

sonucunda TED yönteminin Mendel hastalıklarının tanısındaki etkinliği ve katkısı tartışıldı.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubumuzu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine aynı ailede klinik bulguları bilinen bir sendrom ile uyumlu olmayan ancak benzer klinik bulgulara sahip 2 veya daha fazla etkilenmiş olgu bulunan 3 aileden 3 indeks olgu ve 5 aile bireyi oluşturmaktadır. Olgularda kromozom analizleri ve moleküler karyotiplemede herhangi bir kromozom anomalisi saptanmamış olması bir diğer seçim kriteri idi.

Tez kapsamında seçilen 3 olgunun 2'sinde ebeveynler arasında 1. derece, 1'inde ise 1,5 derece kuzen evliliği mevcuttu. TED çalışmasına, 1. aileden anne- baba ve indeks olgu alınarak üçlü (trio) analizi uygulandı. İkinci ailede indeks olgu, benzer etkilenmiş kardeş ve sağlıklı kardeş çalışmaya alınarak ikili (paired) olarak analiz edildi. Üçüncü ailede indeks olgu ve sağlıklı kardeş dahil edilerek paired analiz gerçekleştirildi.

Çalışmanın etik uygunluğu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (26.10.2018 tarih ve 290153 sayı). Çalışmaya katılan ailelerden bilgilendirilmiş onam alındı.

3.2. Klinik Değerlendirmeler

Olguların öykü, fizik muayene ve laboratuvar bulguları (ek-3) muayene formuna kaydedildi. En az üç kuşak sorgulanarak pedigriler hazırlandı. Etkilenmiş bireylerin, görüntüleme (batın/pelvik ultrasonografi vb.) ve laboratuvar test sonuçları (biyokimya, sitogenetik ve moleküler genetik testleri vb.) dosyalarına işlendi.

3.3. Moleküler Yöntemler

3.3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları, steril 2 ml K3EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden solüsyon/manyetik boncuk bazlı sistemle özgün kitler (*MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200, Cat.Op02001-48*) kullanılarak, ürün protokollerine uygun olarak yapıldı.

3.3.2. DNA Kalite Değerlendirme, Seyreltme ve DNA Yoğunluğunun Ölçümü

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin yoğunlukları (ng/μl) ve absorpsiyon ölçümleri (A260/280 ~ 1,80-1,89) spektrofotometrede yapıldı (*Nanodrop 2000c*, *Thermo Scientific*). A260/280 değeri 1,80'den az olanlar protein kontaminasyonu nedeniyle sodyum asetatla manuel çöktürülerek saflaştırıldı. Saflaştırma aşamaları; final konsantrasyonu 3M'lık Sodyum asetat (C2H3NaO2), 3 hacim %100 etanol ve %2'lik glikojen ile DNA muamele edildikten sonra 3 saat oda ısısında bırakıldı. İnkübasyondan sonra 14.000 rcf'te 30 dakika santrifüj edildi. Çöktürme aşamasından sonra pellet %80'lik etanolde yıkandı ve tekrar 14.000 rcf'te 15 dakika santrifüj edildi. Pellet kurutularak, dH2O veya TE'de çözüldü. A260/280 değerleri 1.80-1.89'den fazla olan örnekler ise RNase ile muamele edilerek fazla ribonükleik asitler parçalandı. Her olgu için, DNA yoğunluğu 1,6-2.0 ng/μl olacak şekilde ultra distile ve de-iyonize su kullanılarak seyreltme işlemleri yapıldı.

3.3.3. Tüm Ekzom Dizileme

YND tabanlı TED çalışması için Ion AmpliSeq Exome Kit™ kullanılarak kütüphane hazırlandı, Ion GeneStudio S5 platformunda dizileme işlemi yapıldı. Kalite analizleri ve haritalama Torrent Server suit™ programında, Varyant belirleme anotasyon ve filtreleme işlemleri Ion Reporter™ programında gerçekleştirildi.

Kütüphane Hazırlama

- Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması

Her örnek için Tablo 3-1 de ayrıntısı verilen bir stok karışım hazırlandı.

Tablo 3-1: Hedef bölgelerin çoğaltılması için hazırlanan mix

Malzemeler	Miktar
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	14 μL
50–100 ng gDNA	≤ 56 μL
Nuclease-free Su	70 μL

Stok karışım vorteksenerek iyice karıştırıldı, ardından kısa süre santrifüj edildi. Ion AmpliSeq™ Exome RDY plakasından çıkartıldı. Her örnek için, stok karışımdan 5 μL alınarak plakanın tek bir yatay satırı (12 kuyu) içine dağıtıldı. Bir MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile plaka üzeri sıkı bir şekilde kapatılarak sızdırmazlık sağlandı ve

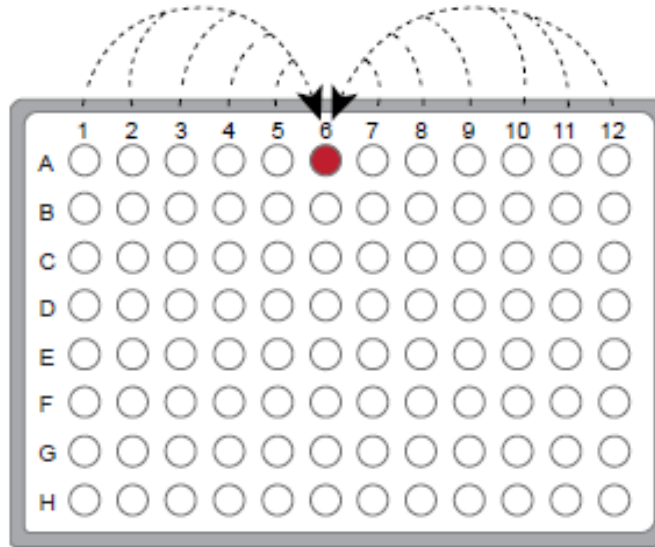
ardından plaka kısa süre santrifüj edildi. Termal Döngü Cihazı koşulları Tablo 3-2 'de gösterilen termal koşullarda ayarlanarak PCR işlemine geçildi.

Tablo 3-2: Hedef bölgelerin çoğaltılmasında kullanılan termal döngü programı

Basamak	Adım	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	Enzimi aktive etmek için	99°C	2 dakika
Döngü (10 döngü)	Denatürasyon	99°C	15 saniye
	Bağlanma ve Uzatma	60°C	16 dakika
Bekleme	-	10°C	Bekleme

- Hedefli olarak çoğaltılan reaksiyonların birleştirilmesi

Damlacıkları toplamak için plaka kısa süre santrifüj edilerek yapışkan film dikkatlice çıkarıldı. Her bir örnek (sıra) için 12 hedef amplifikasyon reaksiyonu, pipet ucu değiştirilmeden 1-5 ve 7-12 kuyularından sütunun 6 kuyucuğuna aktarılarak birleştirildi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Her bir örneğin 12 kuyuda yer alan hedef amplifikasyon reaksiyonlarının, 1-5 ve 7-12 kuyulardan alınarak 6. kuyucuğa aktarılması.

- Amplikonların kısmi olarak kesilmesi

Amplikonların primer, adaptör ve barkodlara bağlanmasını sağlamak amacıyla uçların yapışkan (Sticky end) haline gelmesi için her bir hedef amplifikasyon reaksiyonuna 6 µL FuPa Reaktif eklenerek toplam hacim 60 µL ye tamamlandı. Plaka kapatılmadan önce toplam hacmin yaklaşık yarısını alacak şekilde en az 5 kez

pipetleyerek karıştırıldı. Plaka MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatılarak vortekslendi ve ardından kısa süre santrifüj edildi. Termal döngü cihazı koşulları Tablo 3-3’de gösterilen termal koşullara ayarlanarak PCR cihazında enzimatik reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3-3: Amplikonların kesimi için kullanılan termal döngü programı

Sıcaklık	Zaman
50°C	20 dakika
55°C	20 dakika
60°C	20 dakika
10°C	Bekleme

- Adaptörlerin bağlanması, barkodlama ve pürifikasyon;

Her bir barkod için (Ion Express™ Barcode) mix hazırlanıp karıştırılarak 1:4 oranında seyreltildi (Tablo 3-4). Bir sonraki adımda ligasyon reaksiyonuna 6 µL bu barkod adaptör karışımı eklendi.

Tablo 3-4: Barkod-adaptör karışımı için hazırlanan mix

Malzemeler	Miktar
Ion P1 Adapter	2 µL
Ion Xpress™ Barcode X	2 µL
Nucleasedan arındırılmış su	4 µL
Toplam	8 µL

İçeriği toplamak için plaka kısa süre santrifüjlenerek plaka üzerindeki yapışkan film dikkatlice çıkartıldı. Amplikonları içeren her kuyuya Tablo 3-5 de belirtilen bileşenler eklendi ve toplam hacmin yarısına ayarlanarak en az 5 kez olacak şekilde pipetleyerek karıştırıldı.

Tablo 3-5: Barkod-adaptör ligasyon karışımı için hazırlanan mix

Malzemeler	Miktar
Switch Solution	12 µL
IonCode™ Barcode Adaptörleri veya seyretilmiş Ion Xpress™ Barcode Adapters mix (barkodlu kütüphaneler için)	6 µL
DNA Ligase	6 µL
Total miktar (kesilmiş ~60 µL ampikon dahil)	~84 µL

Plaka yeni bir MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatılarak iyice vortekslendi. Üzerine bir MicroAmp™ optik film sıkıştırma pedi yerleştirildi ve ardından damlacıkları toplamak için kısa süre santrifüj edildi. Plaka termal döngü cihazına yüklendi ve Tablo 3-6'de gösterilen termal koşullarda ayarlanarak PCR cihazında ligasyon işlemine geçildi.

Tablo 3-6: Ligasyon için uygulanan termal döngü programı

Sıcaklık	Zaman
22°C	30 dakika
68°C	5 dakika
72°C	5 dakika
10°C	Bekleme

- Barkodlanan ürünlerin pürifikasyonu;

1- Plaka üzerindeki sıkıştırma pedi dikkatlice çıkarıldı, ardından her kütüphaneye 80 µL (yaklaşık 1X numune hacmi) Agencourt™ AMPure™ XP reaktifi eklendi. Boncuk süspansiyon ile DNA'nın iyice karışması için en az 5 kez olacak şekilde pipetaj yapıldı.

2- Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

3. Plaka bir DynaMag™ –96 mıknatısa (Kat. No. 12331D) yerleştirildi ve en az 5 dakika olacak şekilde çözelti şeffaflaşmaya kadar inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde pellete zarar vermeden süpernatant atıldı.

4. Kuyucuklara %70'lik taze hazırlanmış etanolden 150 µL eklendi, boncukları yıkamak için plaka mıknatıs içinde yan yana hareket ettirildi ve en az 5 dakika olacak şekilde çözelti şeffaflaşmaya kadar inkübe edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

5. Etanol kalıntılarını ortadan kaldırmak için plakayı mıknatısta tutarak boncuklar oda sıcaklığında 5 dakika boyunca hava ile kurutuldu.

Kütüphaneti çoğaltma;

1. İon AmpliSeq™ kütüphanesini içeren plaka mıknatıstan çıkarıldı, daha sonra her bir boncuk peletine 50 µl 1X Kütüphane Amp karışımı ve 2 µL 25X Kütüphane Amp primeri eklendi ve 5 kez pipetaj yapıldı.

2. Plaka MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatıldı, vortekslendi ve ardından damlacıkları toplamak için santrifüj edildi.

Not: Kütüphane amplifikasyonu AMPure™ XP boncuklarının varlığında gerçekleşmektedir.

3. Plakaya bir MicroAmp™ optik film sıkıştırma pedi yerleştirildi, termal döngü cihazında Tablo 3-7'de verilen program ayarlanarak çalıştırıldı.

Tablo 3-7: Kütüphane amplifikasyonu için uygulanan termal döngü programı

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	98°C	2 dakika
5 döngü	98°C	15 saniye
	64°C	1 dakika
Bekleme	10°C	Bekleme

Çoğaltılan kütüphanenin pürifikasyonu;

- Agencourt™ AMPure™ XP reaktifini oda sıcaklığına getirildi ve kullanmadan önce boncukları dağıtmak için vortekslenerek çözelti yavaşça pipetlendi.

-230 µL etanol, örnek başına 100 µL Nükleaz içermeyen su ile birleştirildi.

NOT: Sonraki adımlar için taze hazırlanmış % 70 etanol kullanılmalıdır.

Birinci aşama pürifikasyon;

1. Plaka, kuyuların altındaki içerikleri toplamak için kısa süre santrifüj edildi, ardından plaka üzerindeki ped çıkarıldı.

2. ~ 50 µL örnek içeren her bir plaka kuyucuğuna 25 µL (0.5X numune hacmi) Agencourt™ AMPure™ XP reaktifi (oda sıcaklığında) eklendi, ardından boncuk süspansiyonunu DNA ile iyice karıştırmak için 5 kez pipetaj yapıldı.

3. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Plaka en az 5 dakika çözelti şeffaflaşana kadar bir DynaMag™ –96 mıknatısına yerleştirildi.

5. Her kuyucuktaki süpernatant, pelet bozulmadan alınarak yeni bir 96-yuvalı PCR plakasının tek bir kuyucuğuna dikkatlice aktararak pelet atıldı.

İkinci aşama pürifikasyon;

1. Önceki prosedürdeki 5. adımdaki süpernatanta, 60 µL (1.2X orijinal numune hacmi) Agencourt™ AMPure™ XP reaktifi eklendi. Boncuk süspansiyonunu DNA ile iyice karıştırmak için 5 kez pipetaj işlemi yapıldı.

2. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

3. Plaka en az 5 dakika olacak şekilde çözelti şeffaflaşmaya kadar mıknatısta inkübe edildi. Pellete zarar vermeden süpernatant atıldı.

4. Her kuyucuğa taze hazırlanmış % 70 etanolden 150 µL eklendi, daha sonra boncukları yıkamak için mıknatıs içinde plaka yan yana hareket ettirildi ve çözelti şeffaflaşmaya kadar inkübe edildi. Pellete zarar vermeden süpernatant atıldı.

5. Etanolün tamamen uzaklaştırıldığından emin olmak için plakayı mıknatısta tutarak, boncuklar oda sıcaklığında 5 dakika hava ile kurutuldu.

6. Mıknatıs plaka çıkarıldı ve 50 µL TE eklendi. Karışım en az 5 kez olacak şekilde pipetle karıştırıldı.

7. Plaka MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatıldı, vortekslendi ve damlacıkları toplamak için santrifüj edildi. Oda sıcaklığında en az 2 dakika inkübe edildi. Daha sonra plaka en az 2 dakika boyunca mıknatısa yerleştirildi. Bu aşamadan sonra artık süpernatant istenen amplikonları içermektedir. Qubit® 2.0 fluorometre ile kütüphane ölçülerek sulandırma faktörü hesaplandı.

Qubit™ Fluorometre: kütüphanenin miktarı belirlenir ve seyreltme faktörü hesaplanır:

Her amplifiye kütüphanenin 10 µL'si Qubit™ dsDNA HS test kiti (Kat.Nos. Q32851 veya Q32854) ve Qubit™ 2.0 fluorometre (Kat. No. Q33226) kullanarak analiz edildi. Exome kütüphaneleri genellikle 300–1,500 ng / mL verime sahiptir.

Amplifike edilmiş kütüphanenin konsantrasyonu şu şekilde belirlendi:

a. Qubit™ dsDNA HS tamponu, Qubit™ dsDNA HS reaktifi kullanılarak 1:200 oranında çalışma seyreltmesi yapıldı.

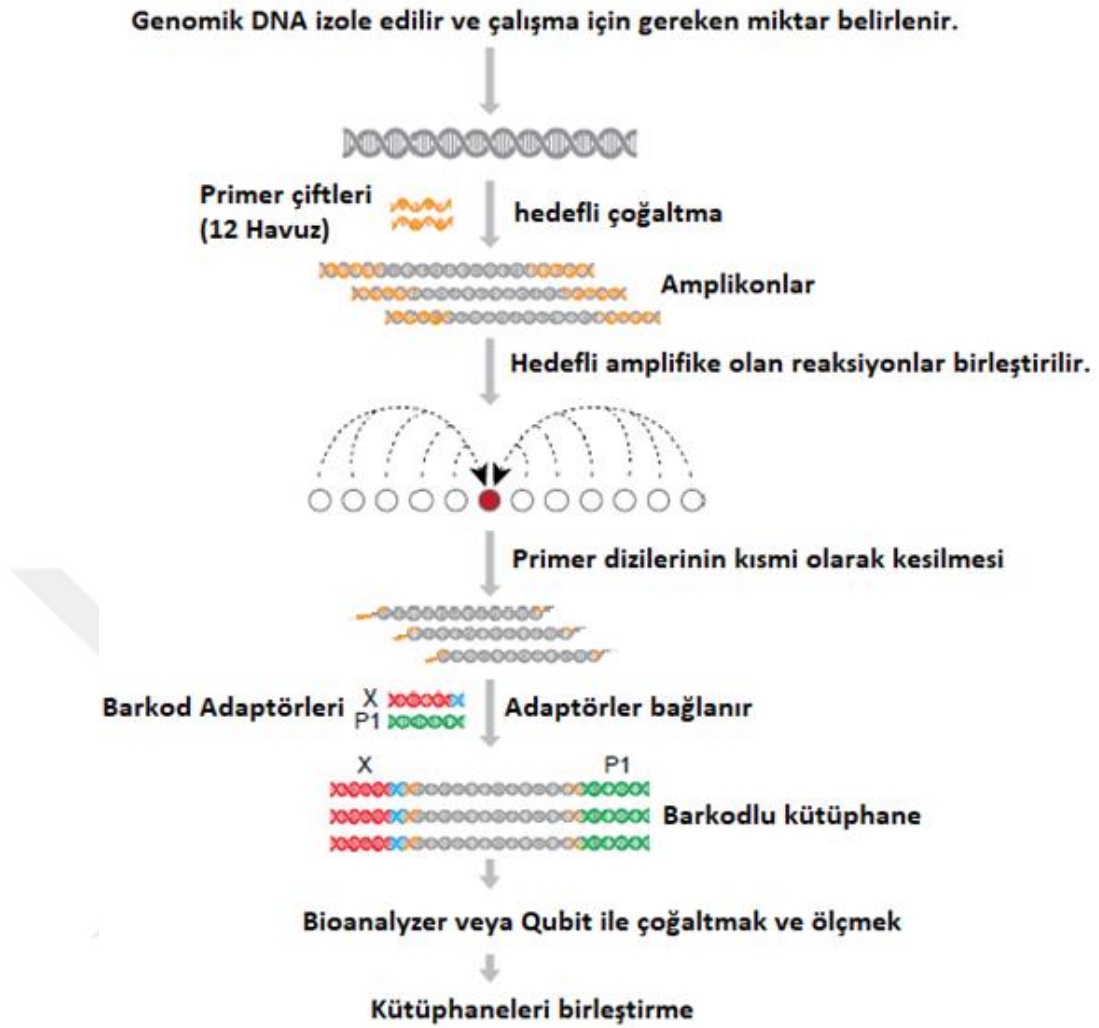
b. 190 µL seyreltilmiş Qubit™ dsDNA HS reaktifi ile 10 µL amplifike edilmiş Ion AmpliSeq™ exome kütüphanesi birleştirilerek iyice karıştırıldı ve en az 2 dakika inkübe edildi.

c. Qubit™ 2.0 Fluorometrede konsantrasyon ölçüldü.

NOT: Alternatif olarak, Qubit™ 2.0 Fluorometer cihazında "Calculate Stock Conc." butonu kullanılarak hesaplama yapılabilir.

Hesaplanan kütüphane konsantrasyonuna bağlı olarak, ~ 22 ng / mL (~ 100 pM'ye eşdeğer) konsantrasyona göre seyreltme belirlendi. Örneğin: Kütüphane konsantrasyonu 660 ng / mL ise, seyreltme oranı $660 \text{ ng/mL} \div 22 \text{ ng/mL} = 30$ olarak hesaplanır. Böylece 29 µL TE (1:30 seyreltme) ile karıştırılmış 1 µL kütüphane yaklaşık 22 ng / mL verir. Kütüphane ~ 22 ng / mL'ye (~ 100 pM) seyreltildi, ardından kütüphaneleri birleştirmeye ve taslak hazırlamaya geçildi.

Thermo Fisher Scientific (Ion Torrent/Ion Proton) platformunda kütüphane oluşturma aşamaları; DNA parçalarının ekzonik gen bölgelerini hedefleyen primerler ile multipleks olarak çoğaltılması, elde edilen fragmanların uçlarının enzimatik reaksiyonlarla kesilerek adaptörlerin bağlanması (Şekil 3-2) ve adaptör bağlı ürünlerin emülsiyon temelli polimeraz zincir reaksiyonu (emPCR) metodu kullanılarak nano boyuttaki küreler etrafında ve mikroyağ reaktörleri içerisinde çoğaltılmasından meydana gelir.

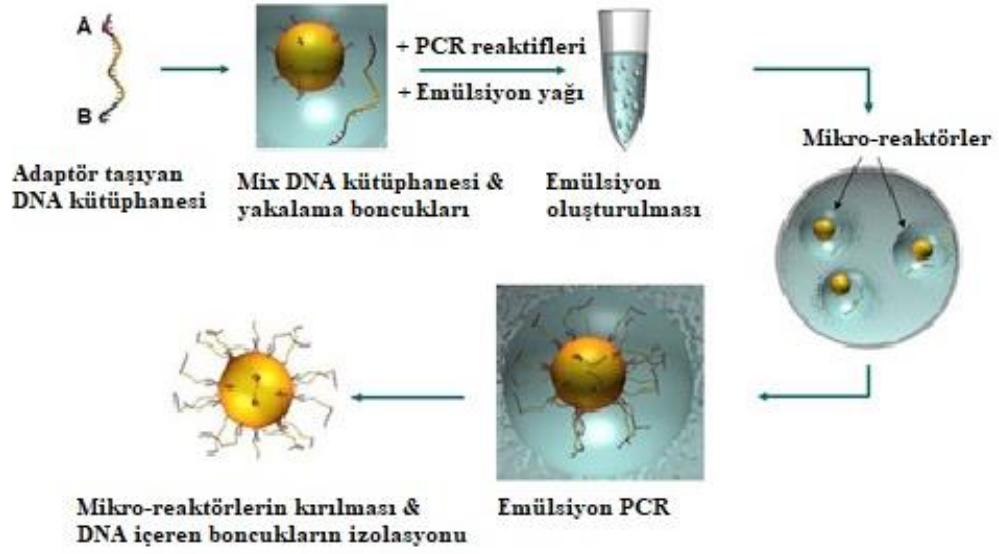


Şekil 3-2: TED iş akış şeması

Taslak oluşturma

Thermo Fisher Scientific (Ion Torrent/Ion Proton) platformunda taslak oluşturma işlemi için emPCR metodu kullanılmaktadır. Bu yöntemde kütüphane oluşturulduktan sonra elde edilen adaptör ve barkod bağlanmış ürünler barkodlara spesifik oligolar içeren manyetik kürecikler ile yakalanır. Bu küreler sonraki aşamada bir yağ süspansiyonunda karıştırılarak ortalama her bir yağ köpüğüne 1 küre düşecek şekilde hazırlanır ve bu yağ kürelerinin içerisinde PCR işlemi gerçekleşir (Şekil 3-3).

Emülsiyon Bazlı Klonal Amplifikasyon



Şekil 3-3: Emülsiyon PCR (emPCR)

Platform bu işlemi Ion OneTouch™ 2 System ya da daha otomatize olan ve aynı zamanda robotik library hazırlığı da yapabilen Ion Chef Sistemi ile gerçekleştirmektedir. Bu çalışmada template hazırlığı için Ion chef robotik sistem kullanılmış, taslak hazırlığı ve dizileme çipine yükleme işlemi bu sistemle gerçekleştirilmiştir. Ion Chef Sistemi Ion GeneStudio S5 Serisi, Ion PGM ve Ion Proton sistemleri için, Ion AmpliSeq kütüphane hazırlama, tekrarlanabilir taslak hazırlama ve çip yüklemesi için otomatik ve kolay bir iş akışı sağlamaktadır. Ion Chef Sistemi, herhangi bir deneyim düzeyindeki kullanıcılar için otomatik kütüphane hazırlama, şablon hazırlama ve çip yüklemeyi sağlar. Ön-bekleme süresi 15 dakikadan daha kısa bir sürede ve önceden paketlenmiş kütüphane hazırlama reaktif kitleri kullanılarak, rahat bir iş akışı sağlar. (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Ion Torrent Ion Chef Sistemi

Dizileme

Ion S5 sistemi ile tüm genom, ekzom, transkriptom, metagenom ve hedef gen panellerinin dizilemesi yapılabilmektedir. Dizileme işleminde, her biri pH değerindeki değişimleri ölçmek amacıyla iyon sensörüyle kaplanmış milyonlarca mikrokuyucuk içeren yarı iletken çip kullanılır. Boncuklara bağlanan kalıp DNA, her bir kuyuyu doldurur ve dNTP'lerin akışı gerçekleşir. Verilen nükleotid kalıp ipliğe komplementer olduğu durumda yeni oluşan ipliğin yapısına katılır ve hidrojen iyonu salınımı olur. Hidrojen iyonları iyon sensörleri tarafından algılanır. Okumaların çevrimi paralel olarak gerçekleşerek doğru ve yüksek çıktılı dizilemeye olanak sağlar. Ion GeneStudio S5 System ile yaklaşık 19 saat dizileme işlemi gerçekleştirilir (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: Ion GeneStudio S5 System

Veri Analizi

Laboratuvar uygulamalarını takiben dizileme cihazında torrent server programı altında dizileme ve dizileme sonrası işlemler gerçekleştirilmektedir. Buna göre; yapılan dizileme işleminden sonra elde edilen ionogramlardan BAM (binary alignment/map file) formatında dizi dosyaları elde edilmektedir. Bu işlem sonrası 3' uçlarından kalite değerlerine göre düşük okuma kalitesi düşük bazlar kırılarak (trimleme) optimum kalitede baz içeren diziler elde edilir. Elde edilen BAM formatlı dizileri, referans genoma göre hizalanarak BAM-BAI formatında haritalanmış dizi dosyaları haline getirilir. BAM uzantılı hizalanmış veriler torrent server içine yüklü olan varyant belirleme programı varyant caller kullanılarak, referans genoma göre ortaya çıkan varyantlar vcf (variant caller format) uzantılı dosyalar şeklinde kaydedilmektedir.

Hasta örnekleri, IonReporterUploader eklentisi kullanılarak Torrent Suite TM yazılımı aracılığıyla Ion Reporter TM yazılımına otomatik olarak aktarılır ya da BAM veya VCF dosyaları manuel olarak içe aktarılabilir. Dizileme çalışması sonrasında bir veya daha fazla örnek, Ion Reporter TM yazılımında otomatik olarak analiz edilebilir. Analiz sonuçları; tablo verileri, grafikler, etkileşimli çizelgeler ve histogramlarda görsel olarak görüntülenebilmektedir. Analiz sonuçlarını genomik düzeyde görüntülemek için

ise, Ion Reporter TM yazılımına dahil bir görselleştirme aracı olan Ion Reporter TM Genomic Viewer'ı (IRGV) kullanılmaktadır. Ion Reporter'da genel veya özel veritabanlarından aktarılan birçok kolon mevcuttur. Bu kolonlardaki bilgiler analiz sırasında varyantların değerlendirilmesine yardımcı olur. Ek açıklama kolonu ve bu kolonların açıklamaları Tablo 3-8'de verilmiştir.

Tablo 3-8: Ion Reporter 5.14.1.2 yazılımında yer alan bazı kolon başlıkları ve açıklamaları (42)

Kolon	Açıklama
Locus	Varyantın kromozomal lokasyon bilgisini içerir.
Genes	Varyantın bulunduğu gen/genleri belirtir.
Genotype	Varyantın genotip bilgisini içerir.
Ref	İlgili genomik lokalizasyondaki referans nükleotid bilgisini içerir.
Observed Allele	Referans allele göre değişiklik gösteren nükleotid bilgisini içerir.
Location	Genetik değişikliğin gen bölgesindeki karşılığını gösterir. Örneğin; ekzonik, intronik, intergenic (genler arası) ... vb.
Transcript	Varyantın bulunduğu genin NCBI transkript kodunu gösterir.
Coding	Varyantın cDNA düzeyindeki adlandırmasını belirtir.
AminoAcid Change	Varyantın protein düzeyindeki değişimini gösterir.
Type	Varyant türünü belirtir. Örneğin; SNV (Single Nucleotide Variation), INDEL (Küçük insersiyon/delesyon), CNV (Copy Number Variation) vb.
Variant Effect	İlgili genetik değişikliğin protein üzerindeki etkisini göstermektedir. Örneğin; synonymous (sessiz), missense (yanlış anlamlı), nonsense (anlamsız), stoploss (Stop kodonu kaybı)
DRA	Varyantın bulunduğu genin “Disease Research Area” (DRA) veri tabanındaki karşılığını gösterir.
DGV	Database of Genomic Variants ; genomik düzeydeki yapısal anomalileri araştırmak için kullanılan veritabanıdır.
ClinVar	NCBI ClinVar veritabanından gözlemlenen varyantın etkisinin değerlendirilmesi. Örneğin; Uncertain significance (önemi belirsiz), Likely benign, Benign, Pathogenic, Likely pathogenic şeklinde veriler bulunmaktadır.
UCSC common SNPs	Varyantın UCSC veri tabanındaki “UCSC Common SNPs” sekmesindeki karşılığını belirtir.
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
SIFT	Bir varyantın bir protein üzerindeki fonksiyonel etkisinin tahmini.
Allele Coverage	Gözlemlenen her allel için ayrı ayrı okuma derinliğinin sayısal değerini verir.
Allele Ratio	Gözlemlenen her allel için ayrı ayrı okuma derinliğinin yüzdesini verir.

Çalışılan örneklerde saptanan değişimler, Ion reporter sisteminde değerlendirildi. UCSC’de bulunan yaygın SNP’lerin dışlanması, minör allel frekansı (MAF) <0.05 olarak belirlenmesi, varyant tipleri ve zigosite gibi parametreler değerlendirildi. Ayrıca varyantlar ‘in-house data’ olarak adlandırılan kurum içindeki varyantların bulunduğu datalar ile karşılaştırılarak sık görülen varyantların elenmesi sağlandı. Varyantlar, protein etkisi, ekspresyon paternleri, türler arası korunmuşluk gibi veriler göz önüne alınarak değerlendirildi. Varyantlar çeşitlerine göre, stop kodon, çerçeve kayması, kırılma hatası ve missense olmak üzere öncelik sırasına göre değerlendirildi. Aday genler OMIM, HGMD, Genecards, ClinVar ve UCSC Genome vb. portallar kullanılarak incelendi. Değişimlerin toplum sıklığı ExAC, dbSNP gibi veritabanlarından da kontrol edildi. Daha önce dbSNP’de tanımlanmamış veya tanımlı ancak hastalık ilişkisi bildirilmemiş çok nadir ve yeni varyantların patojenitesi American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kriterlerine uygun olarak değerlendirildi (43). Varyantlar, in silico tahmin araçlarının değerlendirmeleri, sıklıkları ve gelişim yolları ile etkileşimleri, üzerinde bulundukları genin anlatımı ve işlevi gibi kriterlerle yorumlandı. Çeşitli veritabanları (MutationTaster, Varsome vb.) kullanılarak tanımlanmamış değişimlerin in silico olarak patolojik olup olmadığı değerlendirildi. Fenotip ve kalıtım kalıbı ile uyumlu bulunan varyantlar için aile segregasyon çalışmaları planlandı.

3.4. YND ile Saptanan Değişimlerin Sanger Dizileme ile Doğrulanması ve Aile Segregasyon Çalışmaları

Olgularda saptanan değişimlerin doğrulanması ve aile segregasyon çalışmaları özgün primerler tasarlanarak Sanger dizileme yöntemi ile tarandı.

Sanger Dizileme İçin Primerlerin Tasarlanması

Segregasyon çalışmalarında kullanılacak olan primerleri tasarlama sürecinde seçilen ileri ve geri primerlerin bağlanma ısıları arasında en fazla 2-3°C fark olmasına, eşit dağılımlı A-T ve C-G nükleotidleri içermesine, boyut olarak 18-25 nükleotid uzunluğunda olmasına, hedeflenen bölgeyi kapsamasına (dizi analizinde ilk ~50-60 bazın iyi okunamayabileceği göz önünde tutularak) ve dbSNP’de bildirilen herhangi bir SNP veya tekrarlı dizi içermemesine dikkat edildi. Primerlerin özgünlüğü UCSC Genome Bioinformatics (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), in silico PZR, NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ile test edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her PZR reaksiyonu için 1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific), 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 200 µM dNTP (Thermo Scientific), 0,2/0,5 µM ileri ve geri primerler ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi ve 100 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH₂O) ile 25 µl'ye tamamlanacak şekilde hazırlandı. Amplifiye edilecek her bölge, DNA içermeyen kontrol PZR'ı (negatif kontrol) ile birlikte çalışıldı. Çalışmalar soğuk tüp mahfazası üzerinde gerçekleştirildi.

PZR; 94°C'de 5 dk, ardından 94°C de 30 sn denatürasyon, primerlerin T_m (Temperature of Melting)'e göre 64°C den 58°C ye kadar değişen 30 sn'lik primer bağlanma ısılarında, ve 72°C de 1-1,5 dakika arasında değişen uzama basamaklarını içeren 38 döngü ve son olarak 72°C de 10 dk'lık uzama aşamalarından oluşup termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrasında PZR örneklerinden 5 µl alınarak, 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda, 160 V da, 30 dk yürütülerek beklenen baz çifti (bç) uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Elde edilen bantlar ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenerek kaydedildi.

PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırması enzimatik yöntem ile gerçekleştirildi. Saflaştırma için Exonuclease-I (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898133001-Roche) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazında 37°C'de 30 dk, 85°C'de 15 dk protokolü ayarlanarak PZR ürünleri cihaza koyuldu. Program bitiminde cihazdan alınan saflaştırılmış ürünler bir sonraki işlem için +4°C'de ve karanlıkta saklandı.

Dizi PZR Reaksiyonu

5X tampon solüsyonu BigDye buffer (PZR için gerekli kimyasalları içermektedir), BigDye v3.1 (ddNTP ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), Primer (PZR da kullanılan primerlerden biri ya da ayrı yönlü olarak iki çifti), saflaştırılmış PZR ürünleri ve dH₂O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plate (plate - USA Scientific-800-522-8477) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Plate termal döngü cihazına alınarak protokol, 96°C de 1 dk denatürasyon ve

toplam 25 döngüde 96°C de 10 sn denatürasyon, 50°C de 5 sn bağlanma ve 60°C de 4 dk ile sonlanma basamaklarını içerecek şekilde ayarlandı. Cihaz 4°C'ye geldiğinde dizi reaksiyon ürünleri alındı.

Dizi PZR Reaksiyonu Ürünlerinin Saflaştırılması

Dizi PZR reaksiyonu ürünlerinin saflaştırılmasında alkolle çöktürme yöntemi kullanıldı. BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin kullanılmayan primer ve diğer reaktiflerden arındırılması için kuyuların her birine 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3M sodyum asetat, 1 µl %2'lik glikojen ve 25 µl %100 soğuk etanol eklendi. Plate koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika bekletildi. Ardından 3810 rpm'de 60 dk santrifüj edildi. Koruyucu bant çıkartıldı ve plate ters şekilde 1100 rpm'de 30 saniye kısa santrifüj yapıldı. Santrifüj bitiminden sonra her kuyucuğa 35 µl %70'lik soğuk etanol eklendi ve koruyucu bantla kapatılarak 3460 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Koruyucu bant çıkarılarak ve plate ters şekilde 1030 rpm'de 60 sn kısa santrifüj yapıldı. Her kuyucuğa 10 µl HiDi formamid (Highly Deionized Formamid) eklenerek örnekler termal döngü cihazında 97 °C de 5 dk denatüre edildi ve 2 dk buzda bekletildi.

Elektroforez Cihazına Yükleme

PZR ile çoğaltılıp saflaştırılan ampikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapillerli elektroforezinde (Applied Biosystem) gerçekleştirildi. Plate cihaza yerleştirilerek yürütme işlemi seçildi. Yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış olan boya seti Z Dyeset seçildi.

Yürütme voltajı: 13,4 kVolts, ön yürütme voltajı: 15 kVolts, injeksiyon voltajı:1,6 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn, ön yürütme süresi: 180 sn, injeksiyon zamanı: 8 sn ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiller Elektroforezden alınan ab1 dosyası ABI Sequencing Analysis v5.4 ve SeqScape v.3.0 programlarında analiz edildi. SeqScape v.3.0 programında analizden önce programa referans dizi ekzon ve intronları ile birlikte tanıtıldı. Dizilemeden sonra olgunun ab1 formatındaki dizi dosyaları programa yüklenerek analiz komutu verildi. Olgu dizisinin hedef bölge üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu saflaştırma kalitesi, pik kalitesi, dizilenen baz sayısı, pik yüksekliği ve arkaplan kirliliği kontrol edilerek değerlendirildi. Kontrollerden sonra bu ölçütlerin yeterli olmadığı

örnekler PZR aşamasından, yeterli örnek varsa dizi saflaştırmadan itibaren tekrarlandı. Sonuçlar YND ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.



4. BULGULAR

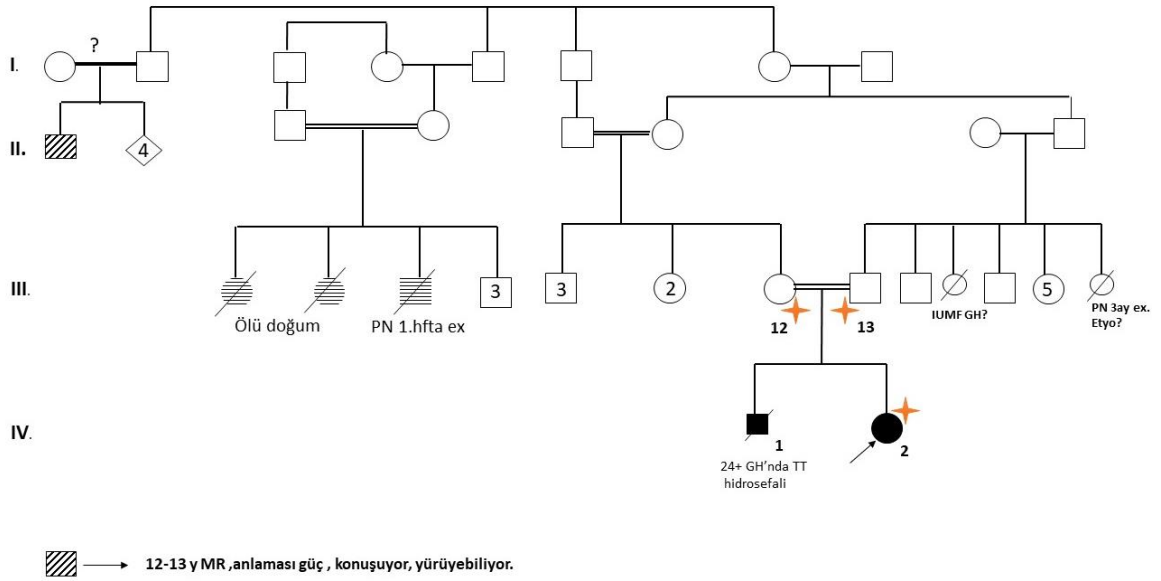
Bu çalışmada, aralarında akrabalık ilişkisi bulunan, klinik bulguları bilinen bir sendromla uyumlu bulunmayan ve aynı ailede benzer klinik bulgulara sahip iki veya daha fazla etkilenmiş olgu bulunan üç aileden üç indeks olgu ve bu ailelerden diğer beş bireye ait klinik bulgular, TED analiz sonuçları ve aile bazında yapılan segregasyon analiz sonuçları değerlendirildi.

4.1. Olgu 1

Genetik Değerlendirme Endikasyonu: Antenatal başlangıçlı hidrosefali, korpus kallozum agenezisi (CCA), miyoklonik epilepsi, psikomotor gerilik (PSMG), fasiyal dismorfik bulgular, benzer etkilenmiş eks kardeş öyküsü.

4.1.1. Aile Öyküsü

Aralarında 1. derece kuzen evliliği olan 24 yaşında sağlıklı anne ve 27 yaşında sağlıklı babanın 2. gebeliğinden doğan 13 aylık dişi olgu, antenatal USG’de saptanan hidrosefali, dismorfizm (rölatif makrosefal görünüm, skalpten başlayan enseden interskapular mesafeye uzanan nevus flammeus, düz oksiput, bitemporal basıklık, belirgin alın, basık/geniş burun kökü, antevort burun delikleri, kısa filtrum, aşağı çekik ağız komissürleri) nedeniyle genetik incelemeye alındı. Ailenin 1. gebeliği 24. gebelik haftasında fetal ultrasonda saptanan hidrosefali nedeniyle sonlandırılmıştı (G2P1TT1) (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Olgu 1'e ait aile ağacı

Olgumuzun antenatal takibinde 19. gebelik haftasında (GH) fetal USG'de bilateral ağır ventrikülomegali saptanarak invaziv girişim önerilmiş ancak ailenin kabul etmemesi üzerine izleme alınmıştı. Olgumuz, 39. GH'ında 4740 gram tartı, 55 cm baş çevresi ölçüsü ile c/s (sezaryen yol) ile doğmuş, postnatal TTN (transient tachypnea of the newborn, yenidoğanın geçici taşipnesi) ve hidrocefali ile 20 gün yenidoğan yoğun bakım ünitesinde (YDYBÜ) izlenmiş. Bu süreçte yapılan kraniyal manyetik rezonans (MR) görüntülemesinde triventriküler dilatasyon, korpus kallosum agenezisi (CCA), kardiyak intraventriküler septumda 94 mm çapında defekt ve EKO'da küçük ventriküler septal defekt (VSD) saptanmış. Postnatal 4. gün ventrikülo-peritoneal (VP) şant takılmış ve postnatal 20. günde oksipitofrontal çap (OFC): 48 cm ile taburcu olmuş. Olgunun 8 aylıkken 1 kez ateşsiz, miyoklonik karakterde, <30 dakika süren, gözlerde kaymanın eşlik ettiği nöbeti olmuş, ancak ilaç başlanmadığı ifade edildi. On bir aylıkken ateşsiz, miyoklonik karakterde, yaklaşık 5 dakika süren yeni bir nöbet geçiren olgunun her gün saniyelik miyoklonik nöbetlerinin olduğu anne tarafından ifade edilmektedir (Şekil 4-2).

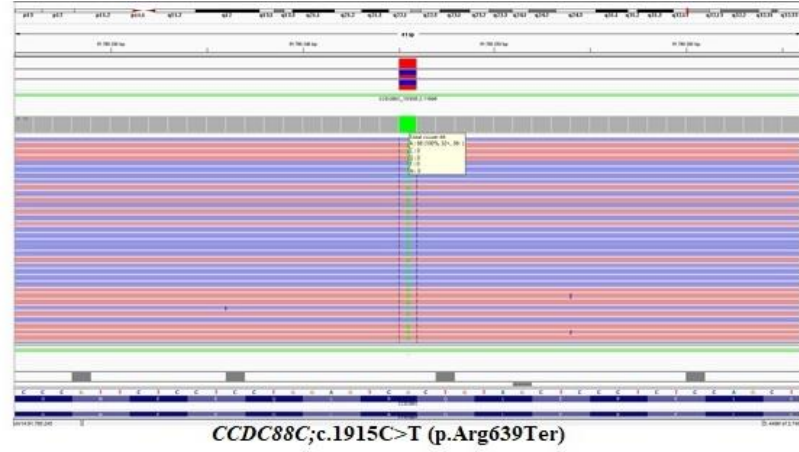


Şekil 4-2: Olgu 1'e ait görüntü

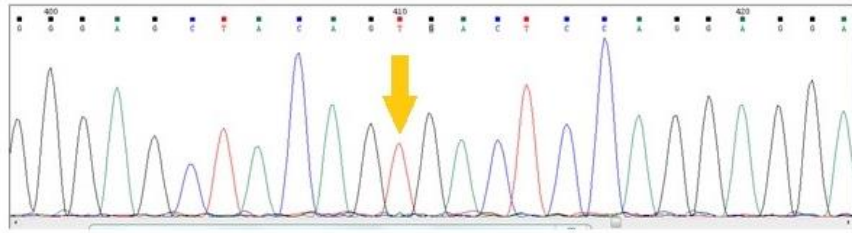
4.1.2. Moleküler Analiz Sonuçları

İndeks (Şekil 4-1, IV-2), anne (Şekil 4-1, III-12) ve babada (Şekil 4-1, III-13) yapılan TED analiz sonucunda, olguda **CCDC88C** (*coiled-coil domain containing 88C*, NM_001080414.3, NP_001073883) geninde 15. ekzonda homozigot c.1915C>T (p.Arg639Ter) değişimi saptandı (Şekil 4-3). Bu varyant için, anne ve babanın heterozigot taşıyıcı, olgunun homozigot olduğu Sanger dizileme yöntemi ile doğrulandı (Şekil 4-4, Şekil 4-5).

A.

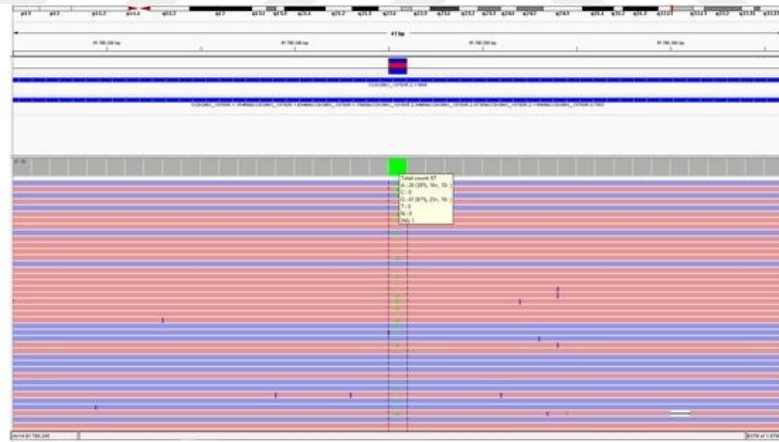


B.

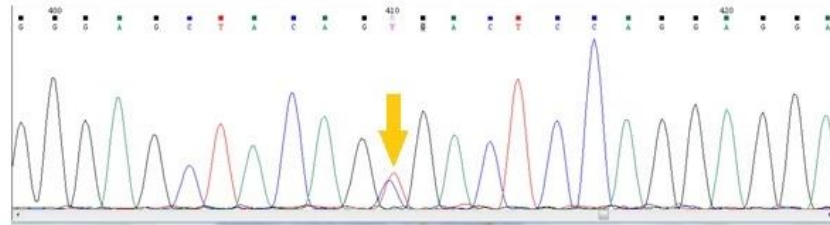


Şekil 4-3: A.İndeşte (IV-2) *CCDC88C* geninde saptanan c.1915C>T (p.Arg639Ter) homozigot varyantın IGV görüntüsü. B.Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü

A.

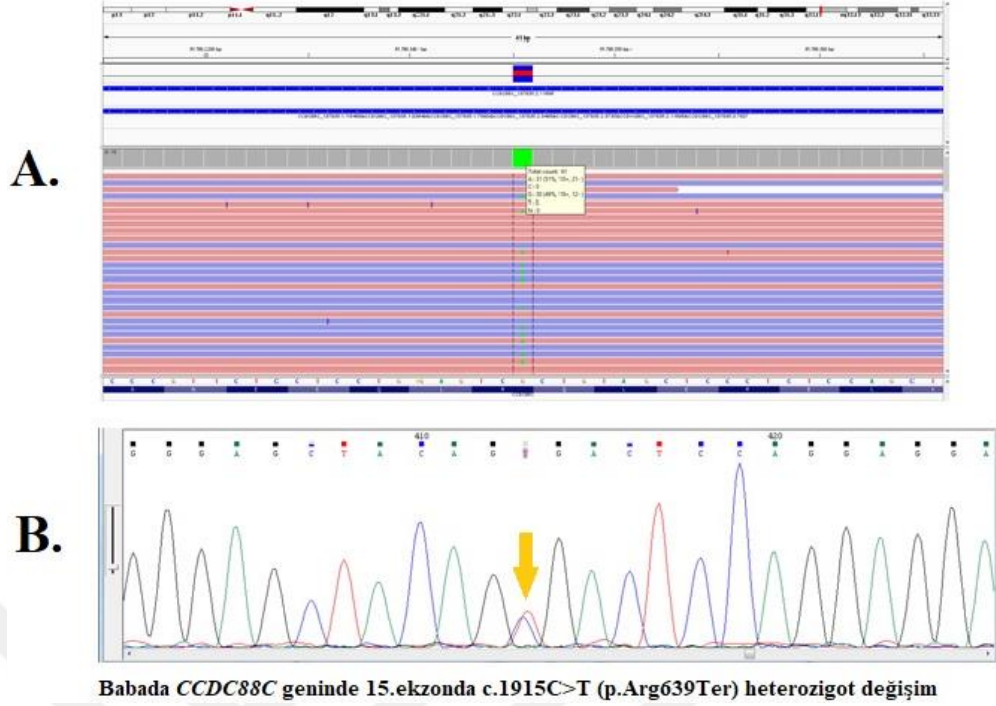


B.



Annede *CCDC88C* geninde 15.ekzonda c.1915C>T (p.Arg639Ter) heterozigot değişim

Şekil 4-4: A. Annede (III-12) *CCDC88C* geninde saptanan c.1915C>T (p.Arg639Ter) heterozigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü



Şekil 4-5: A. Babada (III-13) *CCDC88C* geninde saptanan c.1915C>T (p.Arg639Ter) heterozigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü

4.2. Olgu 2

Genetik Değerlendirme Endikasyonu: MKA [boy kısalığı, bilateral işitme kaybı, alt ekstremitelerde kalınlaşma (musküler vücut görünümü), distal hiperekstansibilite, hipoplazik ala naziler, konjenital kalp hastalığı (KKH) (mitral valf prolapsusu (MVP), mitral yetmezlik (MY), aort yetersizliği (AY) ve displastik triküspit kapak)] ve benzer etkilenmiş kardeş öyküsü.

4.2.1. Aile Öyküsü

Onaltı yaş 2 aylık erkek olgu; bilateral işitme kaybı, alt ekstremitelerde kalınlaşma, fasiyal dismorfizm (hafif üçgen yüz, yüzde lipodistrofi benzeri görünüm, dar palpebral aralık, belirgin kirpikler, hipoplazik ala naziler, geniş burun delikleri, prognatizm, yüksek damak) ve etkilenmiş kardeş öyküsü nedeniyle çocuk endokrinoloji polikliniğinden genetik konsültasyon amacıyla polikliniğimize yönlendirildi.

İndeks olgu, aralarında 1. derece kuzen evliliği olan 45 yaşındaki sağlıklı anne ile 52 yaşındaki sağlıklı babanın 4. gebeliğinden doğan olgudur (G5P5).

G1: Ailenin 1990 yılında miadında doğan erkek çocuğu, postnatal 2. günde bilinmeyen bir nedenle eks olmuş;

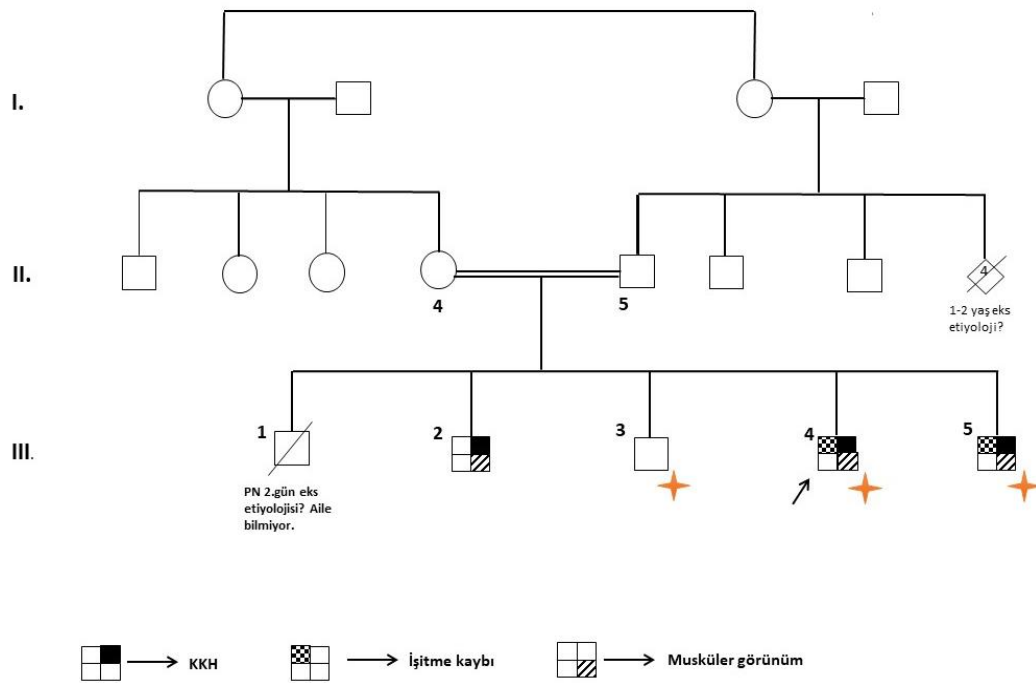
G2: 1993 yılında doğan, alt ekstremitelerde muskuler kalınlaşma ve KKH saptanan erkek olgu,

G3: 1999 yılında doğan sağlıklı erkek olgu,

G4: olgumuz,

G5: 2002 yılında doğan, alt ekstremitelerde kalınlaşma ve 2 kez operasyon gerektiren KKH öyküsü olan erkek olgu.

Olgunun babasının 4 kardeşi 1-2 yaşlarında eks olmuş, ancak özellik tariflenemiyor (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Olgu 2'ye ait aile ağacı

Olgumuzun sorunsuz geçen gebeliğinde herhangi bir ilaç kullanımı, radyasyon veya teratojen maruziyeti tariflenmiyordu. Kırkıncı GH'da normal spontan vajinal yol ile doğan olgumuzda doğum tartısı, boyu ve baş çevresi bilinmemekte; ancak tek natal diş rapor edilmişti. Emme güclüğü tariflenen olgunun 4 yaşına kadar herhangi bir sağlık sorunu olmamış. Olgu, 4 yaşında iken gastrointestinal sistem kanama tanısıyla 1 hafta süreyle yatarak tedavi almış.

Kulak ağrısı nedeniyle Bağcılar Eğitim Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz polikliniğine başvurulduğunda, olguda işitme kaybı olduğu saptanarak operasyon önerilmiş. Operasyon öncesi yapılan EKO'da aort yetmezliği saptanan olgu, İstanbul

Tıp Fakültesi, Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı'na yönlendirilmiş ve medikasyon ile düzelebileceği söylenerek ilaç başlanmış ve 3 ayda 1 poliklinik kontrolü planlanmış. Nisan 2018'de yapılan kontrolde EKO'da MVP, MY, hafif AY ve displastik triküspit kapak tanısı konulmuş.

4.2.2. Fizik Muayenesi

Onaltı yaş 2 aylık erkek olgunun boyu 152 cm (-3.32 SD), kilosu 44 kg (-2.86 SD) ve baş çevresi 53 cm (-2.87 SD) ölçüldü. Genel durumu iyi ve bilinci açıktı. Hafif üçgen yüz ve yüzde lipodistrofi benzeri görünüm izlendi. Dar palpebral aralık, belirgin kirpikler, hipoplazik ala naziler, geniş burun delikleri, prognatizm ve yüksek damak mevcuttu. Hafif yele boyun ve düşük ense saç çizgisi izlendi. Umblikus belirgin, batın rahat, palpabl organomegali yoktu. Musküler vücut yapısı, ellerde bilateral 5. parmaklarda klinobrakidaktili izlendi. Geniş – kısa ayaklar, kısa ayak parmakları ve pes planus izlendi. Haricen pubertal erkek ve testisler bilateral skrotumda (15cc/15cc) palpe edildi. Göz hareketleri her yöne serbestti. Serebellar muayene doğal ve mentali yaşıtlarıyla uyumluydu (Şekil 4-7).

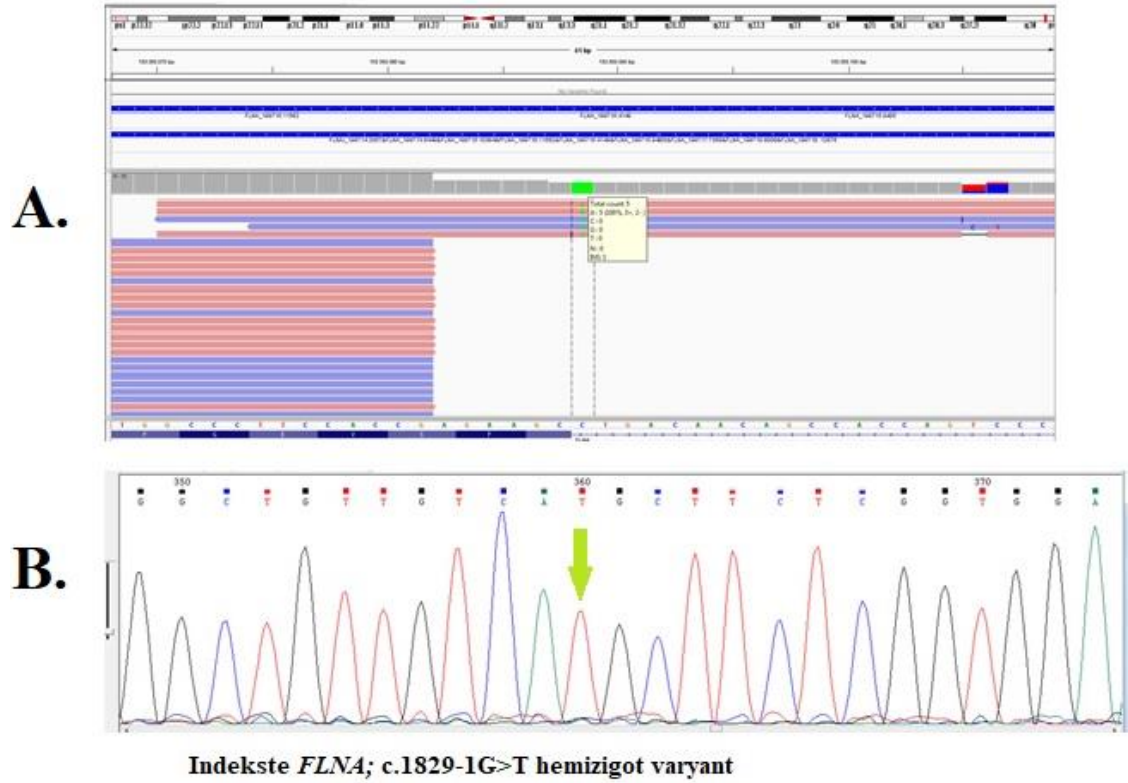


Şekil 4-7: Olgu 2'ye ait görüntüler

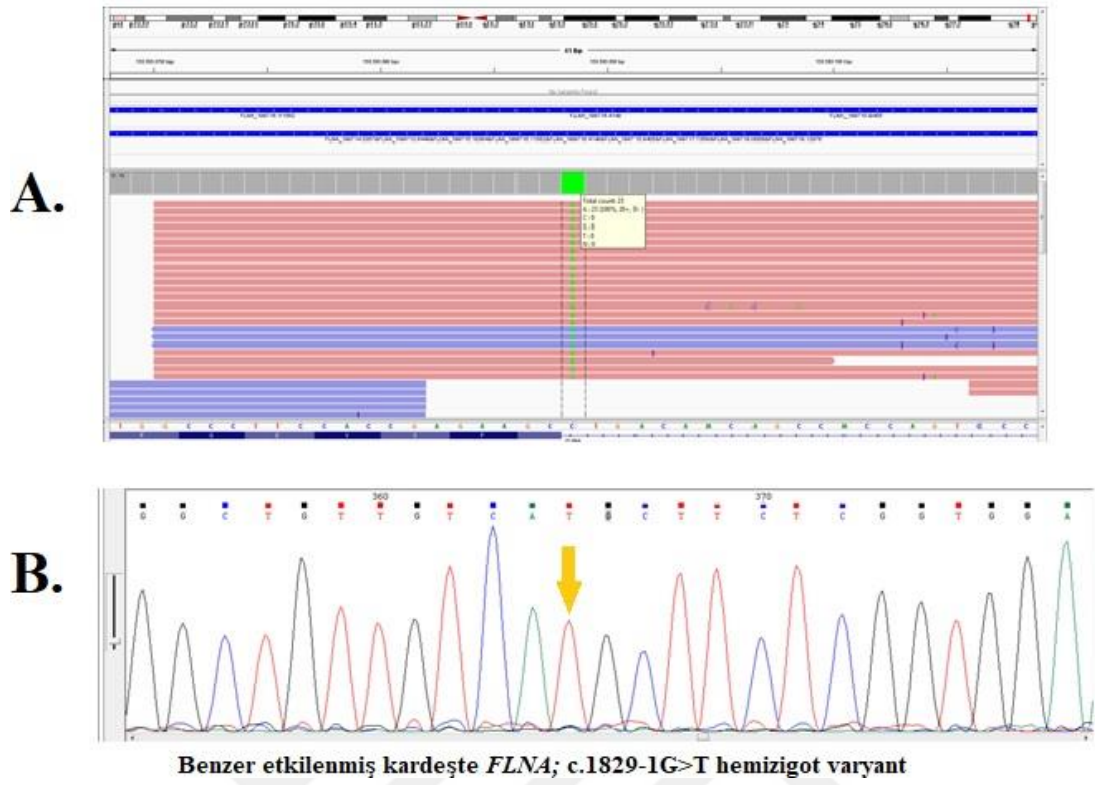
4.2.3. Moleküler Analiz Sonuçları

İndeks olgu (Şekil 4-6, III-4), benzer etkilenmiş kardeş (Şekil 4-6, III-5) ve sağlıklı kardeşte (Şekil 4-6, III-3) yapılan TED analizlerinin sonucunda ailede 2 farklı

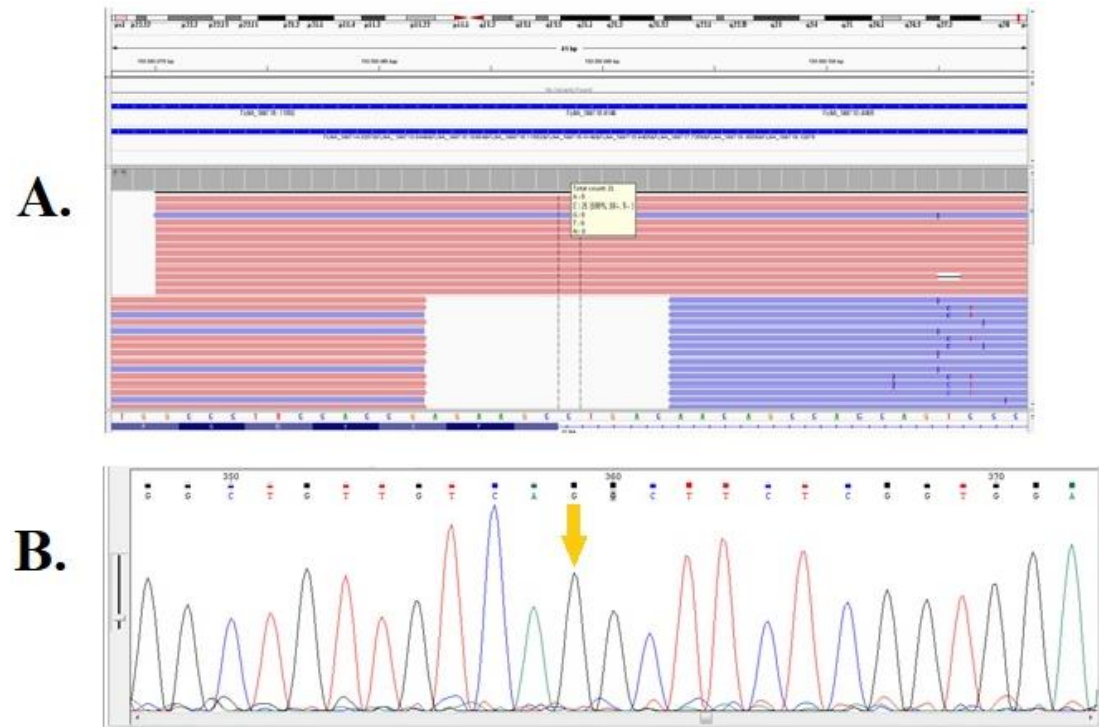
gende varyant saptandı. Varyantlardan biri indeks olguda ve benzer etkilenmiş kardeşte Xq28’de lokalize olan *FLNA* (*filamin A*, NM_001110556.1, NP_001104026) geninde *acceptor* splice (AS) site bölgesinde hemizigot c.1829-1G>T olarak saptandı. Sağlıklı kardeşte herhangi bir varyant saptanmadı. Saptanan varyant Sanger dizileme ile indeks ve benzer etkilenmiş kardeşte hemizigot, sağlıklı kardeşte ise normal olarak doğrulandı (Şekil 4-8, Şekil 4-9, Şekil 4-10).



Şekil 4-8: A. İndekste (Şekil 4-5, III-4) *FLNA* geninde saptanan c.1829-1G>T hemizigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan doğrulamanın elektroferogram görüntüsü

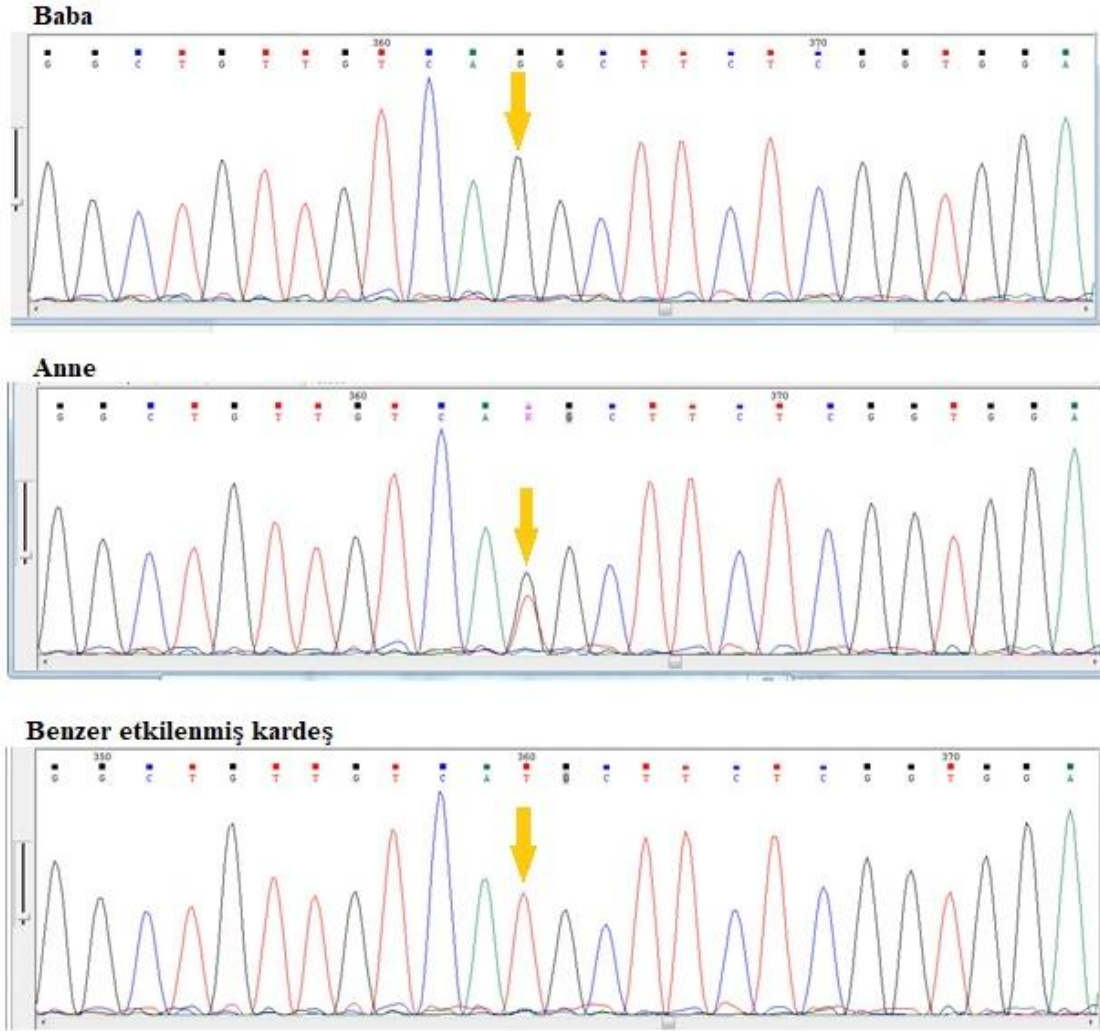


Şekil 4-9: A. Benzer etkilenmiş kardeşte (Şekil 4-5, III-5) *FLNA* geninde saptanan c.1829-1G>T hemizigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü



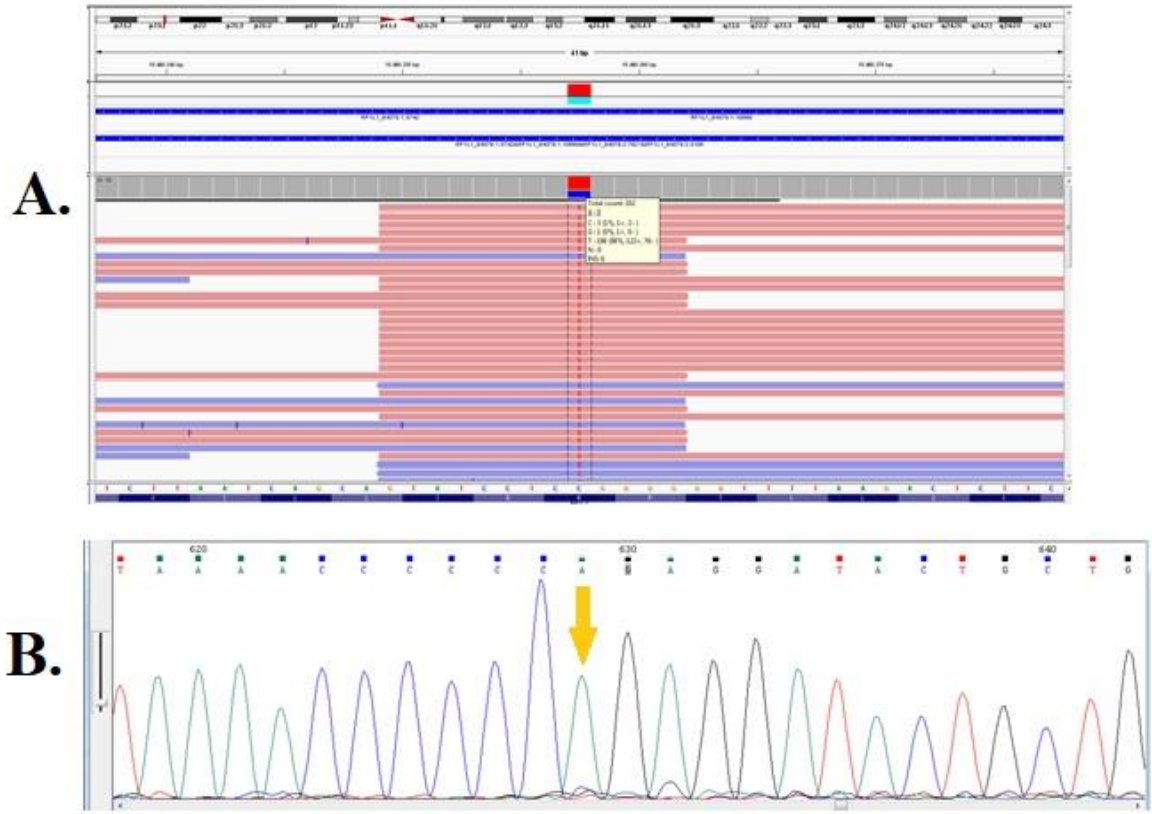
Şekil 4-10: A. Sağlıklı kardeşin (Şekil 4-5, III-3) normal olan IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü

Sanger dizileme ile yapılan aile çalışmasında annenin (Şekil 4-6, II-4) bu varyantı heterozigot, diğer benzer etkilenmiş kardeşin de (Şekil 4-6, III-2) hemizigot olarak taşıdığı, babanın (Şekil 4-6, II-5) ise bu varyant açısından normal olduğu belirlendi (Şekil 4-11).



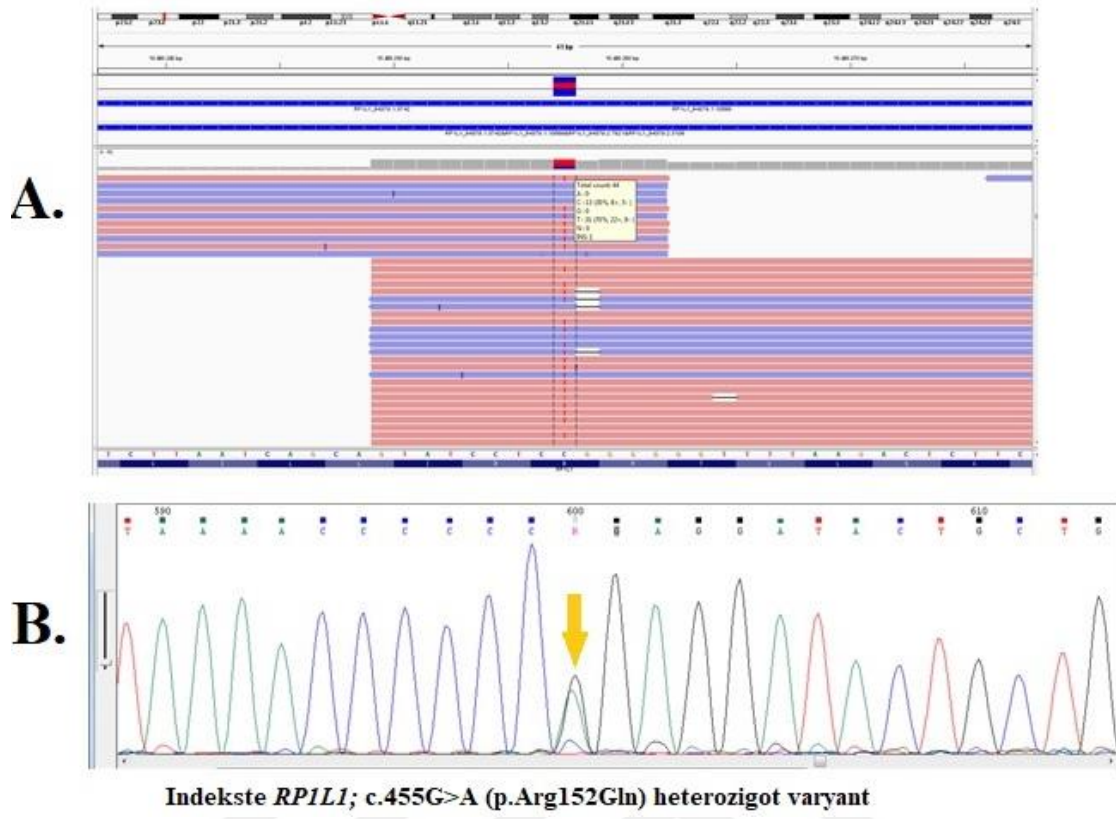
Şekil 4-11: Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile segregasyon çalışmaları sonucunda sırasıyla, babanın (Şekil 4-5, II-5) normal elektroferogram görüntüsü, annenin (Şekil 4-5, II-4) *FLNA* geninde saptanan c.1829-1G>T heterozigot varyantın elektroferogram görüntüsü ve benzer etkilenmiş kardeşte saptanan (Şekil 4-5, III-2) c.1829-1G>T hemizigot varyantın elektroferogram görüntüsü.

Ailede saptanan 2. varyant, RP1L1 (retinitis pigmentosa 1-like 1, NM_178857.5, NP_849188) geninde 2. ekzonda homozigot c.455G>A (p.Arg152Gln) değişimiydi. Varyant, indeks olguda heterozigot (Şekil 4-6, III-4) ve etkilenmiş kardeşinde (Şekil 4-6, III-5) homozigot olarak saptanırken sağlıklı kardeşte (Şekil 4-6, III-3) bu değişim gözlenmedi. Sanger dizileme ile bu değişim doğrulandı (Şekil 4-12, Şekil 4-13, Şekil 4-14).

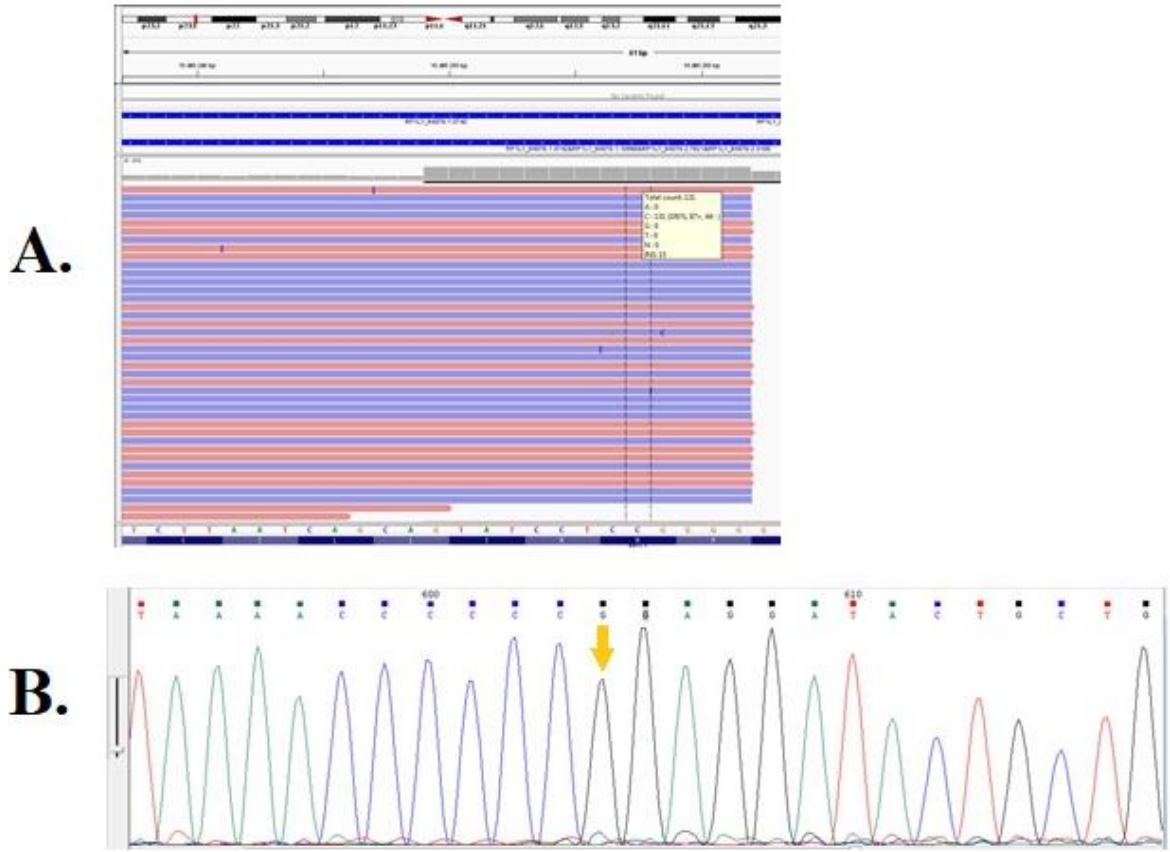


Benzer etkilenmiş kardeşte *RP1L1*; c.455G>A (p.Arg152Gln) homozigot varyant

Şekil 4-12: A. Benzer etkilenmiş kardeşte (Şekil 4-5, III-5) *RP1L1* geninde saptanan c.455G>A (p.Arg152Gln) homozigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü

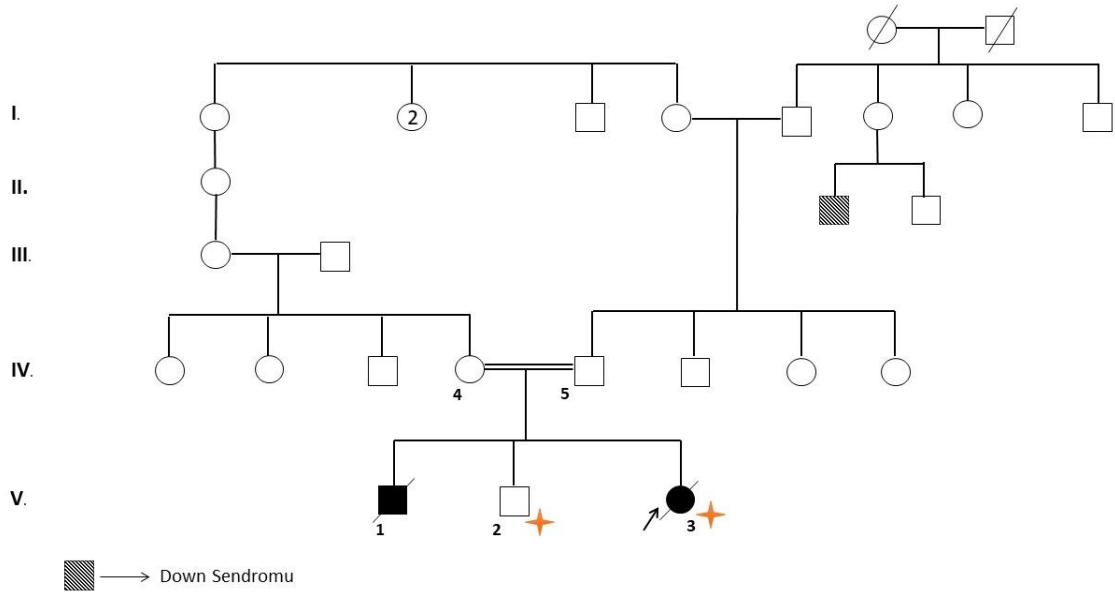


Şekil 4-13: A. Indekste (Şekil 4-5, III-4) *RP1L1* geninde saptanan c.455G>A (p.Arg152Gln) heterozigot varyantın IGV görüntüsü. B. Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü



Şekil 4-14: A.Sağlıklı kardeşin (Şekil 4-5, III-3) normal olan IGV görüntüsü. B.Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü

Sanger dizileme ile yapılan aile çalışmasında varyatın anne (Şekil 4-6, II-4) ve babada (Şekil 4-6, II-5) heterozigot formda olduğu, ekzom dizileme çalışmasına alınmayan ancak segregasyon çalışmasına dahil edilen diğer benzer etkilenmiş kardeşin ise (Şekil 4-6, III-2) bu varyant açısından normal olduğu gösterildi (Şekil 4-15).



Şekil 4-16: Olgu 3' ait aile ağacı

Fetal USG'de fallot tetralojisi, ventrikülomegali, pelvik sağ böbrek, hiperekojenik barsak (grade III), sol ventrikül içerisinde hiperekojen intrakardiyak odak saptanan olgu 36. GH da C/S ile 1900 g doğmuş. YDYBÜ'de takip edilen olguya postnatal 38. günde tetraventriküler hidrosefali nedeniyle şant takılmış. Genel durumu kötü olan olgu; solunum sıkıntısı, sepsis ve KKH nedeniyle tedavi almış. Göz muayenesinde bilateral katarakt, batın USG'de hepatomegali saptanan olgu postnatal 72. günde aspirasyon nedeniyle eks olmuş. Olgu; postmortem muayenesinde dismorfik özelliklere rastlanması, KKH, ventrikülomegali ve diğer sistemik bulguları nedeniyle MKA/MR grubunda değerlendirildi.

4.3.2. Postmortem Muayene

İki ay 11 günlük dişi olgunun boyu 53 cm (-0,04 SD), ağırlığı 3,900 g (-0,36 SD) ve baş çevresi 35 cm (-1,72 SD) olarak ölçüldü. Kraniyal sütürler kapalı, kaba yüz, düşük geriye yerleşimli kulaklar, alında kıllanma artışı, medialde dağınık kaşlar, basık burun kökü, kısa burun, bulböz burun ucu, kısa kolumella, uzun filtrum, balık ağzı görünümü, dar yüksek damak, sekonder alveolar kemer, üst gingivada birkaç adet abse ve bifid uvula mevcuttu. Kısa boyun, bilateral hipoplastik meme başları, batın sağ üst kadranda 3 adet ve sol inguinal bölgede 1 adet sutur (travmatik laserasyona sekonder) izlendi. Her iki kol distalinde aksesuar fleksiyon çizgisi ve bilateral proksimal yerleşimli başparmak mevcuttu. Sağ ayakta parmak pozisyon anomalisi (4. parmak altta yerleşimli) vardı. Bilateral ayak parmakları uca doğru genişliyor ve başparmaklar

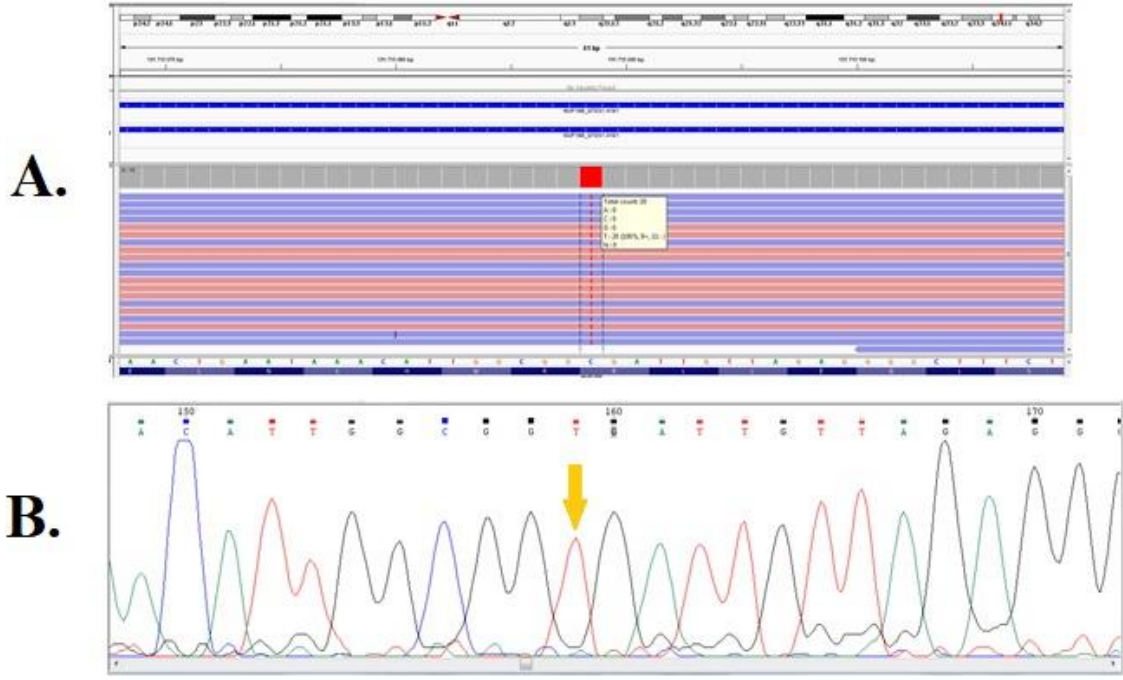
proksimal yerleşimliydi. Haricen dişi, labium majorlar ödemli ve anal açıklık mevcuttu (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: Olgu 3'ün postmortem muayene sonrası görüntüleri

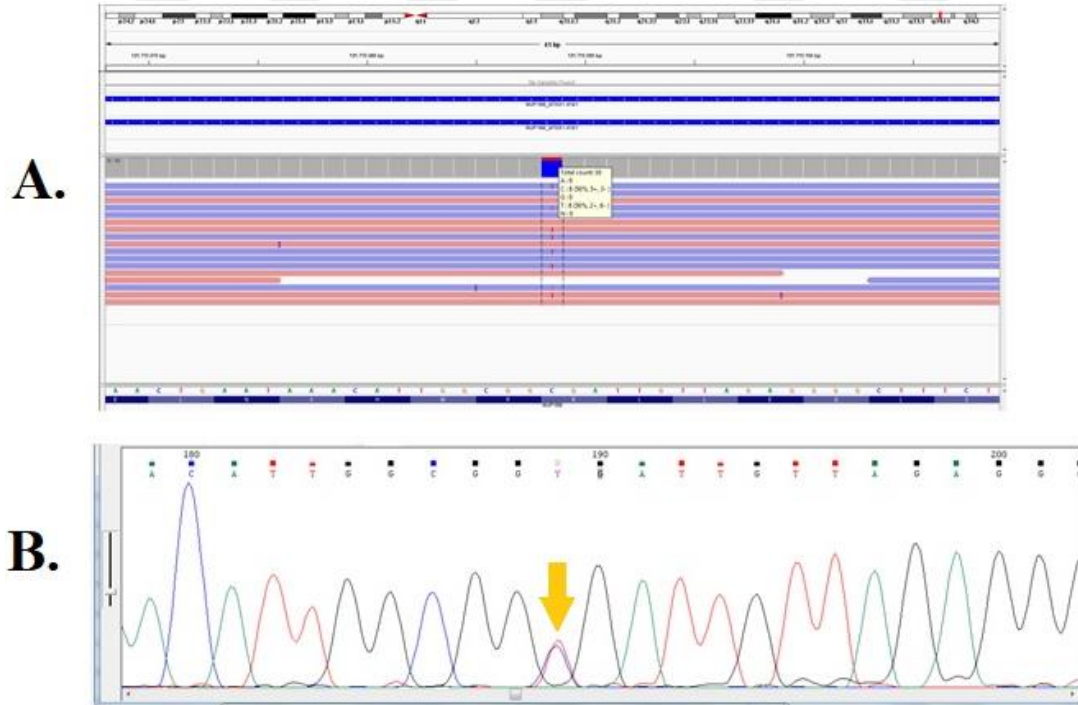
4.3.3. Moleküler Analiz Sonuçları

İndeks (Şekil 4-16, V-3) ve sağlıklı kardeşte (Şekil 4-16, V-2) yapılan TED analizi sonucunda *NUP188* (nucleoporin 188kDa, NM_015354.2, NP_056169) geninde 3. ekzonda c.124C>T (p.Arg42Ter) varyantı indekste homozigot, sağlıklı kardeşte ise heterozigot olarak saptandı. Saptanan varyant Sanger dizileme yöntemi ile doğrulandı (Şekil 4-18, Şekil 4-19). Sanger dizileme ile yapılan segregasyon çalışmasında c.124C>T varyantını anne (Şekil 4-16, IV-4) ve babanın (Şekil 4-16, IV-5) heterozigot olarak taşıdıkları belirlendi (Şekil 4-20).



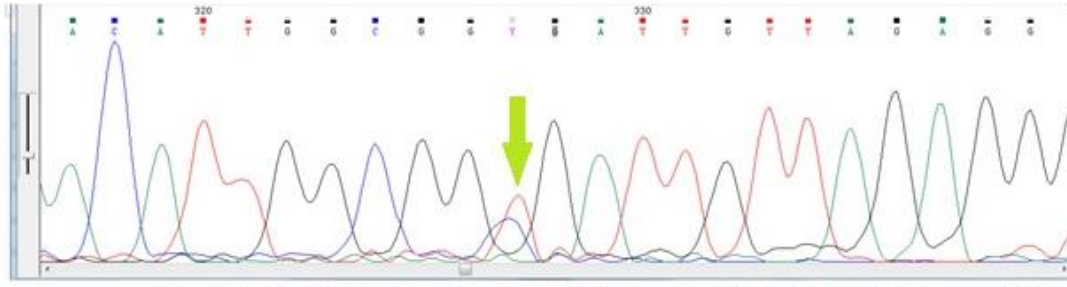
Indekste, *NUP188* geni 3. ekzonda c.124C>T (p.Arg42Ter) homozigot değişim

Şekil 4-18: A.Indekste (Şekil 4-16, V-3) *NUP188* geninde saptanan c.124C>T (p.Arg42Ter) homozigot varyantın IGV görüntüsü. B.Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü

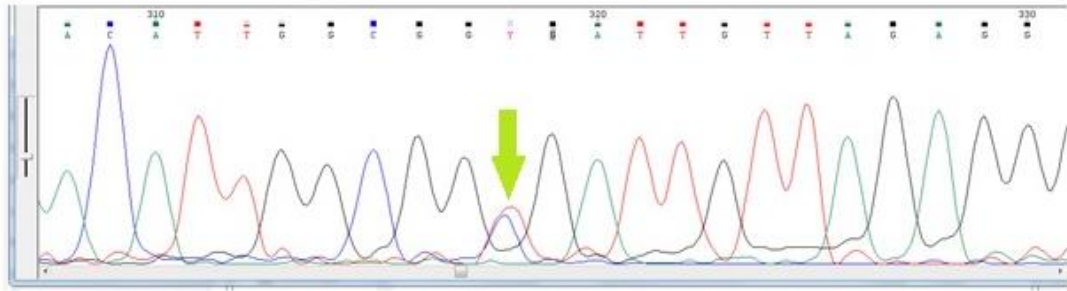


Sağlıklı kardeşte *NUP188* geni 3. ekzonda c.124C>T (p.Arg42Ter) heterozigot değişim

Şekil 4-19: A. Sağlıklı kardeşte (Şekil 4-16, V-2) *NUP188* geninde saptanan c.124C>T (p.Arg42Ter) heterozigot varyantın IGV görüntüsü. B.Sanger dizileme ile yapılan konfirmasyonun elektroferogram görüntüsü



Annede *NUP188* geni 3. ekzonda c.124C>T (p.Arg42Ter) heterozigot değişim



Babada *NUP188* geni 3. ekzonda c.124C>T (p.Arg42Ter) heterozigot değişim

şekil 4-20: Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile segregasyon çalışmaları sonucunda sırasıyla, anne (şekil 4-16, IV-4) ve babanın (şekil 4-16, IV-5) *NUP188* geninde saptanan c.124C>T (p.Arg42Ter) heterozigot varyantın elektroferogram görüntüsü.

5. TARTIŞMA

1953 yılında Watson ve Crick DNA'nın çift sarmal yapısını keşfetmesiyle beraber DNA'nın hastalıkların etiyolojisindeki rolünün araştırılmasına yönelik çalışmalar ve buna yönelik tanı testleri/teknikleri yıllar içinde teknolojik gelişmelere paralel olarak geliştirildi. Bu tekniklerin en önemlilerinden birisi 1977'de Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ve zincir sonlanma esasına dayalı floresan bazlı elektroforez teknolojileri kullanılarak insana ait DNA'nın dizilenmesine olanak sağlayan Sanger Dizileme tekniğidir. 1980'lerde Kary Mullis tarafından PZR yöntemin geliştirilmesi ile moleküler genetik alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (44, 45). Bu gelişmeleri takiben, 1990 yılında başlatılan İnsan Genom Projesi (İGP), insan genom dizisinin belirlenmesini sağlayarak yaklaşık 3.2 milyar nükleotidden oluşan referans dizinin ortaya çıkarılmasını ve nadir genetik hastalıkların etiyolojisinin aydınlatılması için büyük bir adım atılmasını sağlamıştır. İnsan genom projesinin tamamlanması ile insan genomu dizisinin belirlenmesinin yanı sıra genomun yarısının tekrar dizilerinden, %25'inin genler arası (intergenik) bölgelerden, %23'ünün intronik bölgelerden ve yaklaşık %1,5'luk kısmının ise protein kodlayan ve ekzon adı verilen DNA dizilerinden meydana geldiği de gösterilmiştir (30).

Genlerin ve işlevlerinin incelenmesi, hastalık ilişkilerinin aydınlatılması amacıyla yapılan araştırmalarda bugüne kadar birçok yeni teknik geliştirilmiş, araştırmaya ve tanıya yönelik olarak kullanılmıştır. Günümüzde, genetik hastalıkların etiyolojisini açıklamaya yönelik klasik tekniklere ek olarak yeni nesil teknolojiler de kullanıma girmiştir. Son yıllarda YND teknolojileri nadir hastalıklara yol açan varyasyonların, fenotipik ve genotipik olarak heterojenite gösteren hastalıkların tanısında ve yeni genlerin keşfinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknolojilerin geliştirilmesiyle birlikte, hastalıklara neden olan genetik varyantların kısa sürede belirlenmesine, hastalıktan etkilenmiş kişinin aile bireylerinin risk değerlendirmesine, genetik danışmasına, prenatal tanısına ve mevcut uygun bir tedavinin planlanmasına olanak sağlamaktadır (46).

YND teknolojisi; sadece belirli bir klinik durum ile ilişkisi bilinen genlerin kapsandığı KED, tanımlanmış tüm genlerin kapsandığı TED ve ekzonlarla sınırlı kalmayıp kodlayan ve kodlamayan tüm genomun kapsandığı TGD şeklinde

uygulanabilmektedir. YND yöntemlerinin pratikte en sık kullanılan türlerinden biri olan TED ile konjenital genetik hastalıkların yaklaşık %30'una tanı konabilmektedir (31). Bu yöntem ile belirli bir geni ya da gen grubunu seçmek zorunda kalmadan, binlerce genin kodlayan bölgeleri aynı anda incelenebilmektedir. Bu çalışmalar klinik tanı ve araştırma amacıyla, çeşitli kalıtım paternlerinde hastalık ilişkili genlerde hem bilinen hem de yeni mutasyonları saptamada önemli katkılar sağlamaktadır (34). Özellikle Mendel hastalıkları ile ilişkili patojenik varyantların ~%85'inin ekzon veya ekzon-intron birleşme bölgelerinde bulunduğundan TED yöntemi tek gen hastalıklarına neden olan genlerin/mutasyonların tespit edilmesinde olduğu kadar hastalıklara yatkınlık oluşturan SNP'lerin tespitinde önemli bir seçenek oluşturmaktadır. Çeşitli kalıtım modellerinde hastalığa neden olan genlerde bilinen olduğu kadar yeni varyasyonları tespit etmek için de TED'nin hem klinik hem de hastalık ilişkili yeni gen araştırmalarına katkısını göstermiştir (36). Bu tekniğin diğer bir katkısı klinik olarak etkilenmiş kişinin ebeveynleri ve/veya ailedeki diğer etkilenmiş bireylerle birlikte çalışarak (trio analizler) ortak allellerden yola çıkılarak patojenik varyantların tespit edilebilmesine olanak sağlamasıdır.

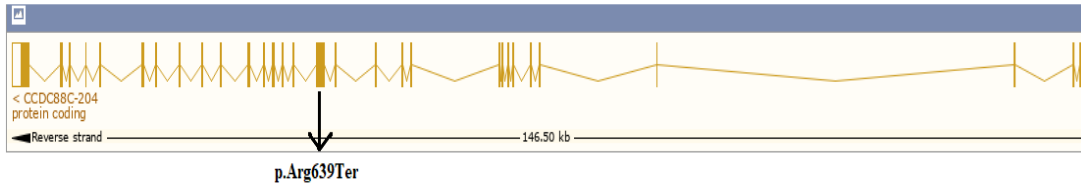
Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu tez kapsamında daha önce yapılan testlerde hastalık ilişkili herhangi bir değişim saptanmayan seçilmiş olgularda TED yönteminin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaca yönelik olarak üç olgu ve ailesi çalışma kapsamında değerlendirilerek saptanan değişimler aile bazında tartışılmıştır.

5.1. Olgu 1

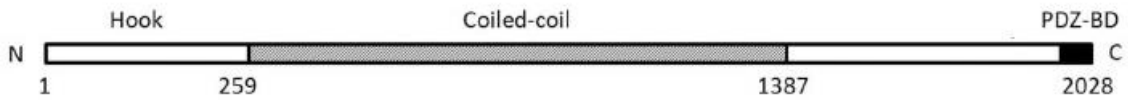
Olgu 1'de, TED analizi sonucunda *CCDC88C* (*coiled-coil domain containing 88C*, NM_001080414.3, NP_001073883) geninde 15. ekzonda homozigot c.1915C>T (p.Arg639Ter) saptandı. Saptanan bu varyantın anlamsız tipte erken dur kodonu oluşumuna neden olması beklenmektedir.

CCDC88C (MIM#611204) (NM_001080414.3, NP_001073883) geni 14q32.11-q32.12 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 30 ekzonlu bir gendir. 7,519 baz çifti (bç) uzunluğundadır ve 2028 aminoasitlik (aa) bir polipeptidi kodlar (Şekil 5-1) (47).



Şekil 5-1: CCDC88C transkriptinde ekzon ve intronlar (ok ile gösterilen saptanan değişimin bulunduğu ekzonu göstermektedir.)

CCDC88C geni, guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) ve çeşitli hücrel fonksiyonlar için hücre içi adaptör işlevi gören HOOK protein ailesinin bir üyesi olan DAPLE (*Dishevelled-associating protein with a high frequency of leucine residues*) proteinini kodlar. Hook proteinleri, mikrotübüllere bağlanan korunmuş N-terminal bölgesi ve organellere bağlanmaya aracılık eden çeşitli C-terminal bölgeleri içeren sitozolik sarmal bobin proteinlerdir (48). DAPLE proteini, C terminalinde dishevelled-1 (DVL1) proteini ile etkileşime girdiği bir PDZ-bağlanma domainine sahiptir. DVL1 proteini, Wnt sinyal yolunun düzenlenmesinde yer alan bir iskelet proteini olarak görev yapar. Wnt sinyal yolağı embriyonik gelişim ve normal yetişkin homeostasisi için çeşitli temel süreçlerde rol oynamaktadır (49). Oshita ve arkadaşları, DVL1 proteinin DAPLE da bulunan PDZ alanına bağlanabilmesi için C terminalinin gerekli olduğunu bulmuşlardır (48). Daple proteinin C terminalinde bulunan PDZ domaini Gly-Cys-Val motifi içerir ve bu domain sayesinde DVL1 proteinini bağlar (Şekil 5-2) (50).



Şekil 5-2: DAPLE proteininin, N-terminal Hook motifi, merkezi sarmal bölgeyi ve DVL1 proteinin bağlandığı PDZ alanı bulunan C-terminalini gösteren şematik görüntüsü (51).

DAPLE-DVL1 homodimeri, beta-kateninin yıkılmasını teşvik ederek, kanonik WNT sinyal yolağının (Wnt/ β -katenin sinyal yolu) negatif bir regülatörü olarak işlev görür (48). Aynı zamanda, trimerik G proteini aktivasyonunu kolaylaştırarak kanonik olmayan yolağı da güçlendirir. Kanonik olmayan Wnt sinyal yolu, ventriküler bölgeyi çevreleyen ependimal hücrelerde hücre polaritesi oluşturmada önemli bir role sahiptir. Takagishi tarafından yapılan son çalışmalar, ependimal siliaların translasyon ve rotasyonel polaritesi için DAPLE proteininin gerekli olduğunu doğrulamaktadır.

DAPLE proteini knockout edilen farelerin ependimal akışta bir bozulma yaşadıklarını ve bunun sonucunda hidrocefali geliştiğini göstermişlerdir (50).

DAPLE-DVL1 etkileşimi, nörogelişimsel süreç sırasında hücre iletişimini kolaylaştıran Frizzled (FZD) reseptörleri aracılığıyla hücre içi Wnt sinyal iletimine yardımcı olur. Bozulmuş Wnt sinyali ependim hücrelerinin anormal polaritesinde rol oynar. Bu durum *CCDC88C* ile ilişkili ve konjenital hidrocefali'nin genetik formlarında önemli bir etiyoloji olarak bilinmektedir. Kanonik olmayan Wnt/hücre polarite sinyal yolu, ependimal gelişimde ve hidrocefali patogeneğinde önemli olarak tanımlanmıştır (52).

Wnt sinyal yolu ve bu yolda görev yapan moleküllerdeki değişiklikler nedeni ile meydana gelen hastalıklarla ilgili çalışmalar çok geniş kapsamlı olarak literatürde yer almaktadır (53). β -kateninin birikimi, hedef genlerin kontrolsüz ifade edilmesine neden olmaktadır ve bu durum çeşitli hastalıklara neden olan genlerin transkripsiyonuna yol açar. Birçok hastalığın, sadece sinyal yolunun inaktif olduğu durumlarda meydana gelen mutasyonlarla değil, sinyal yolunun aktif olduğu durumda görev alan ve bu mekanizmayı kontrol eden biyomoleküllerde meydana gelen bozulmalarla oluştuğu da bilinmektedir (53).

Bu gende meydana gelen bi-allelilik mutasyonlar sonucunda, beyin ventriküllerinde aşırı beyin omurilik sıvısı birikimi ile karakterize bir durum olan otozomal resesif, primer sendromik olmayan konjenital hidrocefaliye neden olduğu bildirilmiştir (54). Hidrocefali, ilerleyen ventriküler dilatasyon ile sonuçlanan ve ventriküler beyin omurilik sıvısı birikmesine neden olan beyin omurilik sıvısı dolaşımının bozulması olarak tanımlanır. Normal koşullar altında, beyin omurilik sıvısı koroid pleksus tarafından üretilir ve vasküler ve lenfatik sistemlerce absorbe edilir. Beyin omurilik sıvısının (BOS) absorpsiyonunu primer veya sekonder olarak etkileyen herhangi bir nedenle gelişen konjenital hidrocefalinin tahmini prevalansı yaklaşık 1/1000'dir (52). Konjenital hidrocefali olan bireyler için nörogelişimsel sonuçlar uzun vadede oldukça değişkendir ve altta yatan etiyoloji, hidrocefali şiddeti, şant yerleşiminin zamanlaması ve ilişkili anomalilerin varlığı gibi birçok faktör tarafından belirlenir (55). Konjenital hidrocefalinin sendromik nedenleri arasında kromozomal anomaliler ve L1 sendromu, iskelet displazileri, metabolik bozukluklar, distroglikanopatiler, Meckel sendromu gibi birçok nadir sendrom bulunur. Ağır non-sendromik konjenital

hidrosefali, yüksek bir perinatal ölüm oranına ve kötü prognoza sahiptir ve hayatta kalan bebeklerin yaklaşık % 90'ında nörolojik ve fiziksel yetersizlik görülmektedir. Konjenital hidrosefali etiyolojisinde, yakın akrabalık ilişkileri bulunan ebeveynler ortak gen havuzu nedeniyle birincil etkenin genetik kökenli ve OR kalıtım gösteren bir etken olma olasılığını arttırmaktadır. Konjenital hidrosefali bulgusunda her etkilenmiş olguda doğru tanı, prognoz ve genetik danışma için, özgün ilişkili genetik mutasyonun belirlenmesi son derece önemlidir. Konjenital hidrosefali genetik ve genetik olmayan etiyolojilere sahip son derece heterojen bir hastalıktır. Hidrosefalinin en yaygın genetik nedeni *L1CAM* geni ile ilişkili X'e bağlı hidrosefalidir ve tüm erkek vakaların % 5-10'unu açıklamaktadır (52). Beynin aşırı büyümesi (megalensefali) ve diğer çoklu sistem bozukluklarında hidrosefalinin bir bileşen olabileceği düşünülen, *AKT3*, *PIK3R2*, *PIK3CA* ve *CCND2* gibi birkaç gende de novo/dominant mutasyonları tanımlanmıştır (56).

CCDC88C ile ilişkili OR sendromik olmayan hidrosefali nadir görülen bir durumdur. Hidrosefali ilişkili olduğu bilinen *CCDC88C* geninde kodlanan bölgedeki tüm resesif varyantların DVL1 proteinin bağlandığı C-terminal bölgesini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (52).

Literatürde konjenital hidrosefali ile ilişkili *CCDC88C* geni mutasyonların gösterildiği az sayıda yayın bulunmaktadır. Drielsma ve arkadaşları, konjenital hidrosefali öyküsü bulunan, aralarında akraba evliliği bulunmayan Yahudi Aşkenazi kökenli ebeveyne sahip dört etkilenmiş çocuk ve aralarında 1. derece kuzen evliliği olan Filistin kökenli ebeveyne sahip beş etkilenmiş fetüsü TED yöntemi ile incelemişler (51). Etkilenmiş dört çocuklu Yahudi Aşkenazi ailesinde *CCDC88C* geninde c.934C>T (p.Arg312Ter) erken dur kodonu oluşumuna neden olan varyantı, etkilenmiş bireylerde homozigot olarak, anne, baba ve etkilenmemiş iki kardeşle heterozigot olarak saptamışlardır. Filistin kökenli ailedeki beş etkilenmiş fetüste de çerçeve kaymasına ve erken dur kodonu oluşumuna neden olan p.E1949Gfs*26 varyantı etkilenmiş kardeşlerde homozigot olarak, anne, baba ve iki etkilenmemiş kardeşle heterozigot olarak göstermişlerdir (51).

Wallis ve ark. (2018), akraba evliliği bulunan Suudi bir ailenin konjenital hidrosefali bulgusu olan etkilenmiş üç çocuğu ile aralarında çift taraflı kuzen evliliği bulunan Faslı bir ailenin etkilenmiş iki çocuğunu TED analizi incelemişler. Suudi

ailenin etkilenmiş çocuğunda *CCDC88C* geninin 15. ekzonunda erken dur kodonu oluşumuna neden olan c.1702C>T (p.(Arg568Ter) değişimi homozigot olarak saptanmış ve aile segregasyon çalışmalarında anne ve babanın bu varyantı heterozigot olarak taşıdıkları gösterilmiştir. Faslı ailede etkilenmiş olguda genin 30. ekzonunda çerçeve kaymasına neden olan c.5265_5266delCA (p.Phe1755Leufs*4) değişimi homozigot olarak saptanmış, anne ve babanın bu varyantı heterozigot olarak taşıdıkları Sanger dizileme yöntemi ile gösterilmiştir (52).

Ruggeri ve arkadaşları konjenital hidrosefali bulgulu iki etkilenmiş çocuğu bulunan ve aralarında akraba evliliği olmayan bir ailede yaptıkları trio TED analizi (anne, baba ve ilk etkilenmiş çocuk) sonucunda indeks vakalarında *CCDC88C* geninde (NM_001080414.3) homozigot c.5553dupC (p.Ser1852Glnfs*4) saptamışlardır (57).

CCDC88C geninin mono-allelık patojenik varyantları Spinoserebellar Ataksi Tip 40 (MIM#616053), biallelik patojenik varyantları ise Konjenital Hidrosefali (MIM#236600) ile ilişkilendirilmektedir. Bu çalışmada saptanan *CCDC88C* gen varyantı daha önce tanımlanmamış olup, ACMG kriterlerine göre ‘patojenik’ olarak sınıflandırılmaktadır. Novel bu varyantın klinik ilişkisi açısından aile içi segregasyon analizinin genişletilmesi, fenotip-genotip korelasyonunun kurulması uygun olacaktır.

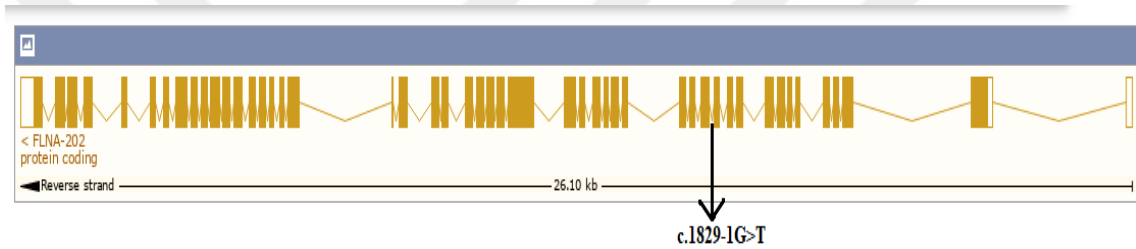
CCDC88C geni ilişkili konjenital hidrosefalinin klinik bulguları hidrosefali, genişlemiş ventriküller, mental retardasyon, zayıf motor gelişimi ve nöbetler bulunmaktadır (58). İndeks olgumuzun klinik özelliklerinde ise hidrosefali, triventriküler dilatasyon, korpus kallosum agenezisi, miyoklonik nöbetler bulunmaktadır. İndeks vakanın klinik bulgularının konjenital hidrosefali sendromunun klinik özellikleri kapsamında değerlendirilmesi ve aileye genetik danışma verilmesi önerilmiştir.

5.2. Olgu 2

İndeks olgumuz bilateral işitme kaybı, alt ekstremitelerde kalınlaşma, fasiyal dismorfik bulgular (hafif üçgen yüz, yüzde lipodistrofi benzeri görünüm, dar palpebral aralık, belirgin kirpikler, hipoplazik ala naziler, geniş burun delikleri, prognatizm ve yüksek damak), KKH (mitral kapak prolapsusu, mitral yetmezlik, hafif aort yetersizliği ve displastik triküspit kapak) ve etkilenmiş kardeş öyküsü nedeniyle çocuk endokrinoloji polikliniğinden genetik konsültasyon amacıyla polikliniğimize yönlendirilmiştir.

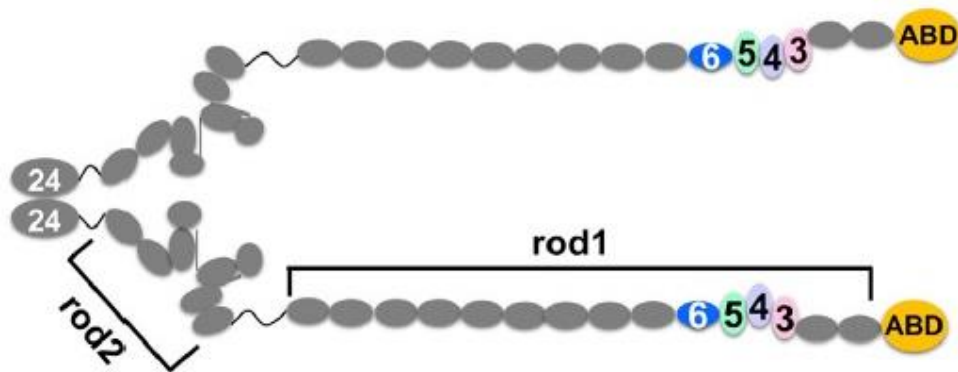
İndeks olgu, benzer etkilenmiş kardeş ve sağlıklı kardeşte yapılan TED analizi ile klinik olarak etkilenmiş olgu ve benzer etkilenmiş kardeşinde *FLNA* (Xq28, *filamin A*, NM_001110556.1, NP_001104026) geninde intron 12'de *acceptor* splice site (AS) bölgesinde hemizigot c.1829-1G>T saptandı. Bu varyantı sağlıklı kardeşin taşımadığı belirlendi. Sanger dizi ile ailede yapılan segregasyon analizinde; ekzom çalışmasına alınmayan etkilenmiş diğer erkek kardeşin c.1829-1G>T için de hemizigot, annenin heterozigot olduğu ve babanın ise taşımadığı gösterildi.

FLNA (MIM#300017) (NM_001110556.1, NP_001104026) geni Xq28 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 48 ekzonlu bir gendir. 8,507 bç. uzunluğundadır ve 2,647 aa'lık bir polipeptidi kodlar (Şekil 5-3) (59).



Şekil 5-3: FLNA transkriptinde ekzon ve intronlar (ok ile gösterilen saptanan değişimin bulunduğu ekzonu göstermektedir.)

FLNA geni, integrinler, transmembran reseptör kompleksleri ve ikincil habercilerle etkileşime girerek aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağlayan, aktin bağlayıcı bir protein olan filamin A'yı kodlar. Yapısal olarak *FLNA* korunmuş bir N-terminal aktin bağlanma bölgesi ve ardından 24 immüoglobulin benzeri (Igl) tekrar alanlarından oluşan 280 kDa homodimerik bir proteindir (Şekil 5-4) (60).



Şekil 5-4: Flna'nın yapısı. FLNA dimerinin 24 tekrarlı Ig alanı (gri) ve aktin bağlanma domainin (ABD) (sarı) şematik görüntüsü (61).

FLNA geni, hücre iskeleti protein filamentleri ağını oluşturmaya yardımcı olan filamin A proteinini kodlar. Hücrelere yapı kazandırır ve şekil değiştirebilme esnekliği sağlar. Filamin A, aktin proteinine bağlanarak hücre iskeletini oluşturan filamentler ağının oluşmasına yardımcı olur. Hücrelerin birbirine bağlanması (hücre adhezyonu), hücre hareketi (göç) ve hücrenin hayatta kalması gibi çeşitli işlevleri yerine getirmek üzere hücredeki yetmişten fazla farklı proteine bağlanarak birçok hücreyel sinyal yolağının düzenlenmesinde rol oynar (62).

Birçok işlevi bulunan Filamin A proteinin iskelet ve beyin gelişimi, kalp dokusu ve kan damarlarının oluşumunu ve kan pıhtılaşmasını düzenlemede rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca hücre dışı matriksin organizasyonunda da rol oynar. Filamin A, hücre zarını kapsayan ve hücreleri hücre dışı matrikse tutunmasını sağlayan integrinler adı verilen proteinlere bağlanır. Bu bağlanma yoluyla, hücreler doğru şekilde konumlandırılır ve hücre ile hücre dışı matriks arasında sinyallerin iletilmesine yardımcı olur (63).

Birçok hücreyel yolda görevi olan *FLNA* geninde meydana gelen mutasyonlar geniş bir yelpazede farklı klinik fenotiplerle ilişkilendirilmektedir. Bunlar; periventriküler nodüler heterotopiler (PVNH1, PVNH4), otopalatodijital sendromlar (OPD1, OPD2), frontometafizer displazi (FMD), Melnick-Needles sendromu (MNS) ve X'e bağlı konjenital kardiyak valvüler distrofilerdir (60).

Nöronal heterotopilerin en yaygın monogenik formlarından biri olan X'e bağlı PVNH1 de fonksiyon kaybına neden olan heterozigot mutasyonlar tanımlanmıştır. PVNH1, nöbetlerin sık görülen bir nedenidir ve patent duktus arteriyozus (PDA), biküspit aort kapağı ve torasik aort sinüslerinin dilatasyonu gibi çeşitli kardiyovasküler özelliklerle beraber ilişkilendirilmektedir (64).

Spesifik fonksiyon kazanımına neden olan mutasyonlar, OPD1 ve OPD2, MNS ve FMD dahil olmak üzere çeşitli kemik displazileriyle ilişkilendirilmiştir. Terminal kemik displazisinde pigment defekti olan veya olmayan hasta grubunda *FLNA* geninde tekrarlayan dominant c.5217G>A (NM_001110556) varyantı tanımlanmıştır (65). Bu varyant *FLNA* geninin NM_001456.4 transkriptine göre c.5193G>A (rs387907371) sessiz bir değişime (NP_001447.2; p.Thr1731=) yol açmaktadır.

Sheen ve arkadaşlarının çalışmasında, iki aile ve PVNH1'li 9 sporadik hastada eklem hiper mobilitesi, hafif kalp kapakçık hasarları ve aort kökü dilatasyonu bulunan

ve FLNA mutasyonları taşıyan bir grupta yumuşak bağ dokularında da beklenmedik bir sorun olduğuna dikkat çekilmiştir. Bu sonuç üzerine ilk başta periventriküler heterotopilerle (EDS-PH) Ehlers-Danlos sendromu (EDS) birlikteliğinin yeni bir klinik fenotip olarak tanımlanabileceği önerilmiştir (62). Ancak, sonraki çalışmalar EDS-PH'nin ayrı bir fenotip olarak değil, PVNH1'e ek olarak çeşitli spesifik olmayan yumuşak bağ doku belirtilerini geniş bir fenotipik spektrum olarak kabul etmeyi önermişlerdir (67). Yumuşak bağ dokusu tutulumunun klinik önemi FLNA'daki fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlara bağlı olarak tanımlanmış X'e bağlı kardiyak valvular distrofisine (XCVD) sahip birkaç ailenin varlığı ile vurgulanmıştır (68). *FLNA* genindeki fonksiyon kazanımı mutasyonları çeşitli kemik displazilerine neden olurken, fonksiyon kaybı varyantları, değişken yumuşak bağ dokusu tutulumu olan periventriküler nodüler heterotopilerin yanı sıra XCVD'nin en yaygın nedenlerinden biridir (62).

Varyantların bir kısmının Filamin A'nın C terminalinde kümелendiği gösterilmiş, ancak açık bir şekilde genotip-fenotip korelasyonu yapılamamıştır. Dikkat çekici bir şekilde, farklı anormal transkriptlere yol açan iki özgün FLNA nokta mutasyonu, bir vakada PVNH ve FMD'yi diğerinde ise PVNH, epilepsi ve MDS'nu birleştiren karmaşık fenotiplerle ilişkilendirilmiştir (69, 70).

Bugüne kadar, XCVD'de proteinin rod 1 domainini kodlayan ekzonlarda üç yanlış anlamlı değişim (p.Gly288Arg, p.Pro636Gln ve p.Val711Asp) ve bir intragenik delesyon (p.761_943del) hastalıkla ilişkilendirilmiş ve hipomorfik alleller olarak işlev gördükleri ön görülmüştür. Bu yanlış anlamlı varyantlar, sırasıyla filamin A'nın 1., 4. ve 5. Ig tekrarları içinde yer almaktadır ve "truncated" (güdüğü) protein, 5.-7. tekrarlarından yoksundur (68, 71, 72).

Filamin A'ya bağlanan moleküllerin çoğu, proteinin C-terminal tekrarları ile etkileşime girerken, XCVD ile ilişkili olanların N-terminal 1-8 tekrarlarında kümелendiği gösterilmiştir. Patolojik etkilerin bu alanlar aracılığıyla etkileşime giren özgün bağlanmadan kaynaklandığı düşünülmüştür (56). Bunların arasında küçük GTPaz R-Ras ve ara filaman proteini vimentin bulunmaktadır. Duval ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, endotel hücre-hücre adherens bağlantı noktasındaki kaderin organizasyonunda N-terminal tekrarları aracılığıyla, filamin A-R-Ras etkileşimlerinin rolünü göstermiştir (60). Bu durum hücre iskeletini düzenleyen aktin sinyal

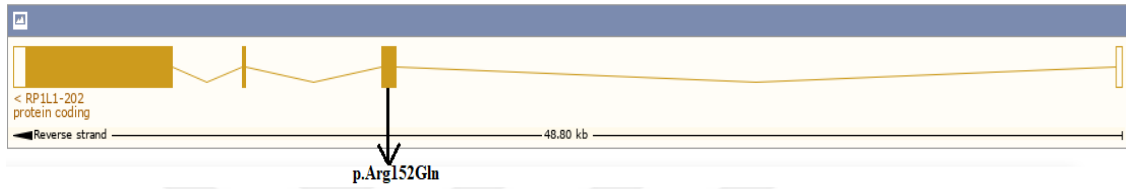
moleküllerini içeren kardiyak kapak hastalıklarında *FLNA* mutasyonlarının rolünün anlaşılmasını destekler niteliktedir. Kim ve arkadaşları filamin A-vimentin-protein kinaz C etkileşimini ve *FLNA*'nın N-terminal tekrarlarında (Ig tekrarları 1-8) bağlanma yerlerini tanımlamışlardır. Araştırmacılar, filamin A-vimentin etkileşimlerinin, $\beta 1$ integrin trafiğinin düzenlenmesi yoluyla hücrenin kollajene bağlanmasını düzenlediğini göstermişlerdir (73, 74).

FLNA'daki mutasyonlar geniş bir yelpazede farklı klinik fenotiplerle ilişkilendirilmektedir. 2017 yılında Ritelli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada konjenital kalp hastalığı bulunan iki erkek kuzende *FLNA* geninde 12. intronda splice site bölgesinde hemizigot c.1829-1G>C gösterilmiştir. Alamut tahmin aracı programında bu değişimin 13. ekzonun kanonik splice site bölgesini ortadan kaldırarak 4. Ig tekrarı içindeki 5 aminoasitin çerçeve içi silinmesi ile (Phe611_Gly615del) sonuçlanmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Splice site bölgesinin bozulmasıyla birlikte 13. ekzonun tamamen atlanması durumunda proteinde tamamen işlev kaybı olması ve bunun erkeklerde letal olması beklenmektedir. Ancak, olgularının 40'lı yaşlarda kaybedilmesi nedeniyle saptadıkları varyantın hipomorfik bir allel olarak işlev gördüğünü düşünmüşlerdir (60). *FLNA* mutasyonlarının kardiyovasküler fenotipi ve diğer bağ dokusu belirtileri, filamin A'nın TGF- β sinyal yolağındaki bileşenlerle olan etkileşimine bağlı olduğu düşünülmektedir (75).

Aktin- bağlayıcı proteini kodlayan *FLNA* genindeki patojenik varyantlar, bağ dokusunu, iskelet sistemini ve kardiyovasküler yapıları tutan, gastrointestinal bulguları da olan, erkeklerin kadınlardan daha ağır etkilendiği, X'e bağlı kalıtım modeli uyumlu geniş spektrumda izlenen klinik bulgularla ilişkilendirilmektedir. Bu çalışmada saptanan *FLNA* genindeki daha önce tanımlanmamış c.1829-1G>T değişiminin evolüsyonel olarak yüksek korunmuş bölgede oluşması, gen transkriptinde kırpılma hatasına yol açmasının beklenmesi nedeniyle ACMG kriterlerine göre 'patojenik' olarak değerlendirilmiştir. Literatürde, *FLNA* geninde aynı noktadaki nükleotidin farklı bir nükleik asite dönüşümü (c.1829-1G>C), flamin domainindeki 4. immunglobulin benzeri tekrar motifi içinde bulunan beş aminoasitin çerçeve içi silinmesine (Phe611_Gly615del) yol açtığı gösterilmiş ve bu değişimi taşıyan iki kuzendeki konjenital kalp hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (62).

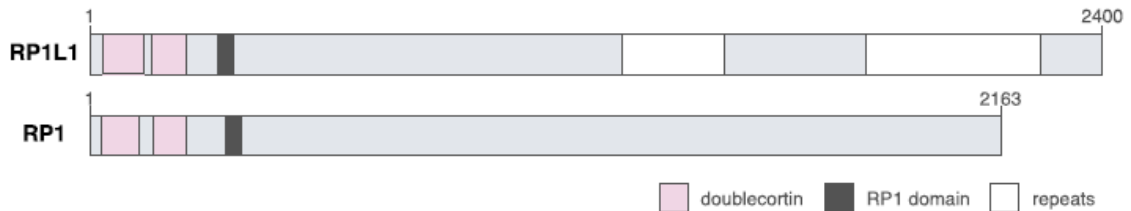
TED analizinde ek olarak, benzer etkilenmiş kardeşte *RP1L1* (8p23, *retinitis pigmentosa 1-like 1*, NM_178857.5, NP_849188) geninde 2. ekzonda homozigot c.455G>A (p.Arg152Gln) varyantı da saptanmıştı. Bu varyant için indeks olgumuzun heterozigot, sağlıklı kardeşin ise değişimi taşımadığı belirlendi. Bu değişimi anne ve babanın heterozigot olarak taşıdıkları, benzer etkilenmiş kardeşin ise normal olduğu Sanger dizileme ile gösterildi.

RP1L1 (MIM#608581) (NM_178857.5, NP_849188) geni 8p23.1 bölgesinde yerleşik, ters zincirden transkribe olan, 4 ekzonlu bir gendir. 8,014 bp. uzunluğundadır ve 2,400 aa'lık bir polipeptidi kodlamaktadır (Şekil 5-5) (76).



Şekil 5-5: *RP1L1* transkriptinde ekzon ve intronlar (ok ile gösterilen saptanan değişimin bulunduğu ekzonu göstermektedir.)

RP1L1 proteini, fotoreseptör aksoneminin bir bileşeni olan, mikrotübüllerden ve proteinlerden oluşan fotoreseptör siliyum içindeki çekirdek yapıyı kodlar. *RP1L1* proteini, iki doublecortin (mikrotübül bağlama) alanı, bir RP1 alanı ve 16 amino asit tekrarı içeren iki tekrarlı bölge içerir. Bir tekrar bölgesinin uzunluğu değişkendir (1-6); dolayısıyla *RP1L1* proteini minimum 2400 amino asit, maksimum ise 2480 amino asit uzunluğuna sahiptir. Özgün tekrar sayısının fotoreseptör hastalığına artan duyarlılıkla ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir. Adından da anlaşılacağı gibi *RP1L1*, gen yapısı, boyutu, alanları ve lokalizasyonu açısından *retinitis pigmentosa 1 (RP1)* genine oldukça benzerdir (Şekil 5-6) (77).



Şekil 5-6: *RP1L1* ve *RP1* genlerinin şematik görüntüsü (74)

Genin ekspresyonu yalnızca retinal fotoreseptörlerde tespit edilmiştir. Bu protein, retinaya özgü bir proteindir (77). Farelerde hem *RP1* hem de *RP1L1* heterozigot

fonksiyon kaybı mutasyonlarının kalıtımı, fotoreseptör dejenerasyon fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (78). *RP1L1* ile ilişkili hastalıklar arasında Occult Macular Distrofi (OMD) ve Retinitis Pigmentosa (RP) bulunmaktadır. OMD'li hastaların yaklaşık %50'sinin bir genetik nedeninin olduğu düşünülmektedir ve bunların çoğu *RP1L1*'de patojenik varyantlardır. OMD'ye neden olan en yaygın bildirilen varyant p.Arg45Trp.'tir. *RP1L1* proteininin ilk doublecortin (mikrotübül bağlanma) alanında bulunur. OMD ile ilişkili varyantlara eğilimli ikinci bölge ise 1172. ve 1258. amino asitler arasındadır. Bu bölgede, aynı rezidünün farklı amino asit değişikliklerine yol açan birçok varyant bildirilmiştir (Şekil 5-7). Bu bölgedeki varyantların *RP1L1* proteinin yanlış katlanmasına yol açabileceği düşünülmektedir. Farklı bölgelerde *RP1L1* mutasyonları olan hastalar arasında fenotipik farklılık kaydedilmemiştir (79). OMD OD kalıtım ile geçiş göstermektedir. OD kalıtımla geçen hastalıkların ortaya çıkışında penetrans eksikliği önemli bir etkidir. Bu hastalık için de penetrasyonu %82.7 olarak hesaplanmıştır (80).

Table 1 – Disease-causing variants associated with occult macular dystrophy reported in the literature					
Base change	Protein consequence	Mutation type	Allelic state	Literature source (first report)	Allele frequency
133C>T	R45W	Missense	Heterozygous; single reported homozygous case (Zodor et al 2018)	Akahori et al (2010) ⁵	2.03e-05
217C>T	P73S	Missense	Heterozygous	Saffra et al (2017) ⁴⁷	1.65e-03
329C>T	P110L	Missense	Heterozygous	Davidson et al (2013) ¹²	1.05e-04
661G>A	G221R	Missense	Heterozygous	Fujinami et al (2016) ¹⁶	2.41e-05
2026A>T	S676C	Missense	Heterozygous	Ahn et al (2013) ⁴	1.2e-05
2849G>A	R950H	Missense	Heterozygous	Davidson et al (2013) ¹²	2.72e-04
2873G>A	R958H	Missense	Heterozygous	Davidson et al (2013) ¹²	2.43e-05
3107T>C	W960R	Missense	Heterozygous	Akahori et al (2010) ⁵	1.21e-05
3514C>A	L1172I	Missense	Heterozygous	Fujinami et al (2016) ¹⁶	2.79e-03
3581C>T	T1194M	Missense	Heterozygous; in cis with T1196I	Fujinami et al (2016) ¹⁶	5.61e-05
3587C>T	T1196I	Missense	Heterozygous; in cis with T1194M	Fujinami et al (2016) ¹⁶	4.01e-06
3593C>T	S1198F	Missense	Heterozygous	Fujinami et al (2019) ¹⁶	N/A
3595T>C	S1199P	Missense	Heterozygous	Takahashi et al (2014) ⁵¹	N/A
3596C>G	S1199C	Missense	Heterozygous	Kabuto et al (2012) ¹³	N/A
3599G>A	G1200D	Missense	Heterozygous	Fujinami et al (2016) ¹⁶	N/A
3599G>C	G1200A	Missense	Heterozygous	Davidson et al (2013) ¹²	N/A
3599G>T	G1200V	Missense	Heterozygous	Fujinami et al (2016) ¹⁶	N/A
3602T>G	V1201G	Missense	Heterozygous	Fujinami et al (2016) ¹⁶	N/A
3628T>C	S1210P	Missense	Homozygous	Kikuchi et al (2015) ²¹	N/A
3773T>C	F1258S	Missense	Heterozygous	Davidson et al (2013) ¹²	3.01e-04
4273G>C	N1425H	Missense	Heterozygous	Ahn et al (2013) ⁴	3.74e-04
4650T>G	N1550K	Missense	Heterozygous	Fujinami et al (2016) ¹⁶	8.16e-06
6063delC	D2021Efs*3	Frameshift	Heterozygous	Fujinami et al (2016) ¹⁶	1.24e-04
6932A>C	Q2311P	Missense	Heterozygous	Ahn et al (2013) ⁴	2.0e-05

Şekil 5-7: Literatürde bugüne kadar bildirilen OMD ilişkili varyantlar (79).

RP1L1 varyantları OR RP ile de ilişkilendirilmiştir. Japon popülasyonunda, OR RP'nin %8 kadarının *RP1L1*'deki varyantlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (81). *RP1L1*'in bazı popülasyonlarda OR RP'ye neden olabileceği bildirilse de, RP için yapılan klinik genetik testlerde kullanılan ticari birçok panel *RP1L1*'i içermez, bu da literatürde RP ile ilişkili *RP1L1* varyantların kaçırılmasına neden olabilir (79). *RP1L1*

ile ilişkili fotoreseptör dejenerasyonunun, şiddetini ve başlangıcını etkileyen faktörler hala tam olarak anlaşılmamıştır; diğer genetik faktörlerde muhtemelen hastalığın ortaya çıkışındaki değişiklikleri açıklar (Şekil 5-8) (79).

Table 2 – <i>RP1L1</i> variants associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa reported in the literature					
Base change	Protein consequence	Mutation type	Allelic state	Literature source (first report of variant)	Allele frequency
235C>T	R79C	Missense	Homozygous	Oishi et al (2014) ³⁶	1.32e-04
326_327insT	K111Qfs*27	Frameshift	Heterozygous; in cis with Q2373*, putative digenic inheritance with C2orf71	Liu et al (2017) ²⁵	4.08e-05
455G>A	R152Q	Missense	Compound heterozygous with c.5959C>T; p.Q1987*	Zobor et al (2018) ⁵⁸	3.57e-04
601delG	K203Rfs*28	Frameshift	Homozygous	Davidson et al (2013) ¹²	2.41e-05
1107G>A	W369*	Nonsense	Homozygous	Zobor et al (2018) ⁵⁸	3.22e-05
1637G>C	S546T	Missense	Homozygous	Davidson et al (2013) ¹²	4.7e-05
1972C>T	R658*	Nonsense	Homozygous	Oishi et al (2014) ³⁶	2.41e-05
3022C>T	Q1008*	Nonsense	Homozygous	Zobor et al (2018) ⁵⁸	N/A
3955_3956insGGAC	A1319fs	Frameshift	Homozygous	Albarry et al (2019) ⁶	N/A
TAAAGTAATAGA AGGGCTGCAAGAA GAGAGGGT GCAGTTAGAGG					
5959C>T	Q1987*	Nonsense	Compound heterozygous with c.455G>A; p.R152Q	Zobor et al (2018) ⁵⁸	1.55e-03
7117C>T	Q2373*	Nonsense	Heterozygous; in cis with Lys111Glnfs*27, putative digenic inheritance with C2orf71	Liu et al (2017) ²⁵	4.01e-06

Şekil 5-8: Literatürde bildirilen *RP1L1* ile ilişkili RP varyantları (79).

Saptadığımız varyantla ilgili yaptığımız literatür araştırmasında 2018 yılında 42 OMD ve 4 RP tanılı hastaların oluşturduğu bir kohortta yapılan çalışmada *RP1L1* geninde birçok varyant saptanmıştır. Bu kohorttaki bir olguda (25 yaşındayken gece körlüğünü fark eden ve yıllar içinde görme yetisinde gerileme, merkezi görmeye hafif azalması olan 45 yaşındaki RP tanılı kadın hasta) *RP1L1* geninde birleşik heterozigot olarak c.455G>A (p.Arg152Gln) ve c.5959C>T (p.Gln1987Ter) varyantı saptandı. Saptanan bu missense değişimin (c.455G>A), *RP1L1*'in doublecortin alanında bulunan ve evrimsel olarak korunmuş bir amino asiti etkilediği ve hastalığa bu şekilde neden olduğunu düşünmüşlerdir (80). Retina distrofilerinin en önemli özelliklerinden biri genetik heterojeniteye sahip olmalarıdır. Bazı allelik mutasyonlar farklı klinik fenotiplere yol açarken, öte yandan klinik olarak ayırt edilemeyen bazı retina dejenerasyon formları, çeşitli genlerdeki mutasyonlarla ve farklı genotipler ile ilişkilendirilebilmektedir (80).

RP1L1 genindeki dominant mutasyonlar OMD (MIM#613587) ve bi-allelik patojenik varyantları RP (MIM#618826) ile ilişkilendirilmektedir. Bu çalışma sonucunda gösterilen c.455G>A (p. Arg152Gln) değişimi, daha önce literatürde retinitis pigmentozası olan bir olguda aynı gende ‘dur’ kodonu mutasyonu ile birlikte saptanmış

ancak ebeveyn analizleri yapılamadığı için değişimin cis ya da trans konumu belirlenememiştir (80).

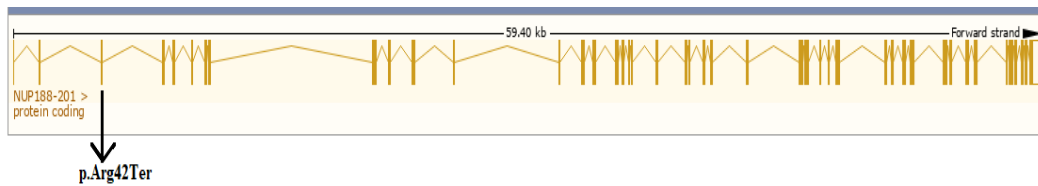
Ailedeki *RP1L1* gen varyantı için homozigot olan etkilenmiş kardeşin ve taşıyıcıların ilişkili klinik bulgular açısından değerlendirilmesi ve genetik danışma almaları önerilmiştir.

5.3. Olgu 3

Çalışmadaki benzer etkilenmiş eks kardeş öyküsü bulunan 3. olgunun klinik bulguları; fallot tetralojisi, hidrocefali, yarık damak/bifid uvula, pelvik sağ böbrek, katarakt, hepatomegali, dismorfizm (kaba yüz, düşük geriye yerleşimli kulaklar, alında kıllanma artışı, medialde dağınık kaşlar, basık burun kökü, kısa burun, bulböz burun ucu, kısa kolumella, uzun filtrum, balık ağzı görünümü, dar yüksek damak, sekonder alveolar kemer, üst gingivada birkaç adet abse ve bifid uvula) idi.

TED analizi sonunda, *NUP188* (9q34.11, *nucleoporin 188kDa*, NM_015354.2, NP_056169) geninde ekzon 3'te c.124C>T (p.Arg42Ter) varyantı indekste homozigot, sağlıklı kardeşte ise heterozigot olarak saptandı. Aile bireylerinde *NUP188*'deki c.124C>T için yapılan Sanger dizileme ile doğrulama ve segregasyon analizinde, annenin, babanın ve sağlıklı kardeşin heterozigot, indeksin homozigot formda olduğu belirlendi ve OR kalıtımla uyumlu olarak değerlendirildi.

NUP188 (MIM#615587) (NM_015354.2, NP_056169) geni 9q34.11 bölgesinde yerleşik, düz zincirden transkribe olan, 44 ekzonlu bir gendir. 5,689 bç. uzunluğundadır ve 1,749 aa'lık bir polipeptidi kodlar (Şekil 5-9) (82).



Şekil 5-9: *NUP188* transkriptinde ekzon ve intronlar (ok ile gösterilen saptanan değişimin bulunduğu ekzonu göstermektedir.)

Nüklear por kompleksinin (NPC) büyük bir parçası olan nükleoporin 188'i kodlamaktadır. NPC'ler, nükleoporinler (nup) olarak adlandırılan çekirdek ve sitoplazma arasındaki tüm giriş çıkışları kontrol eden ve evrimsel olarak korunmuş proteinlerden meydana gelen kanallardır. NPC, nüklear zarf boyunca sekizgen bir kanal

oluşturur ve nükleositol plazmik taşınmada işlev görür, nükleer çerçeveyi korur ve gen ifadesinin düzenlenmesini sağlar (83). Hücre çekirdeği, moleküllerin sitoplazmadan çekirdeğe veya tam tersi akışı kontrol eden iki katmanlı bir zar ile çevrilidir. Sitoplazma ve çekirdek arasındaki moleküler trafik esasen membrana gömülü olarak bulunan ve çok proteinli yapılardan oluşan nükleer por kompleksleri tarafından kontrol edilmektedir. Her NPC, moleküllerin çekirdeğe girip çıkmasına izin veren merkezi por yapısını oluşturmak üzere bir araya gelen yaklaşık 30 farklı proteinden oluşur. NPC merkezinin, çok sayıda fenilalanin-glisin (FG) tekrarı içeren protein filamentleri içerdiği düşünülmektedir. Sitoplazma ve çekirdek arasında çeşitli moleküller taşıyan, nükleer transport reseptörleri adı verilen özelleşmiş moleküller, FG tekrarlarına bağlanır ve reseptörler ile FG tekrarları arasındaki bu etkileşim, moleküllerin sitoplazma ve çekirdek arasındaki seçici taşınmasında önemli rol oynar (84). Kırk kDa'dan daha küçük metabolitler, iyonlar ve moleküller nükleer zarıtan serbestçe geçebilirken, daha büyük makromoleküller (örn. proteinler, mRNA, tRNA, ribozom alt birimleri ve virüsler) bu şekilde taşınamazlar, NPC ile aktif olarak taşınmaları gerekmektedir (85). Çekirdek başına bulunan NPC sayısı, çevre koşullarına ve hücresel aktiviteye göre değişmektedir. Nükleer por fonksiyonunun tam kaybının hücre yaşayabilirliği ile uyumsuz olduğu varsayılsa da, kısmi kaybına neden olan nükleoporindeki patojenik varyantlar, nefrotik sendromlar, fetal akinezi deformasyon sekansı ve ilerleyici nörolojik hastalıklar olmak üzere birçok kalıtsal hastalıkta rol oynadığı gösterilmiştir (86).

NUP188, NPC'nin ikinci büyük yapısal birimi olan *NUP93* subcomplex'in bir bileşenidir. Bu kompleksin zar proteinlerinin dış nükleer membrandan iç nükleer membrana geçişini kontrol ettiği bilinmektedir ve bu nedenle nükleer membranların bütünlüğü için çok önemlidir (87). *NUP188* ve *NUP93*, endoplazmik retikulum ile bitişik olan dış nükleer membran ve iç nükleer membran gibi nükleer zarfın alt bölümlerinin organizasyonunu kontrol eder. *NUP188* ve *NUP93*, membran proteinlerinin dış nükleer membrandan iç nükleer membrana geçmesini önleyen bir bariyer oluşturur. *NUP188*'in yokluğunda, NPC'ler aracılığıyla integral membran proteinlerinin hızlıca yer değiştirmesinden dolayı çekirdeğin boyutu artar (88). *NUP188* ve *NUP93* kompleksinin knockdown edilmesi sonucunda, NPC fonksiyonu büyük ölçüde bozulmadan kalsa da, embriyonik gelişim sırasında silia kaybına yol açtığı gösterilmiştir (89).

NUP188, nükleer taşımadaki rolü dışında çok çeşitli hücrel işlevlerle de ilişkilendirilmiştir; bu tür fonksiyonlar arasında siliyogenez, kromatin organizasyonu, transkripsiyonel düzenleme ve kromozom ayrışması yer alır (86). Mayada NUP188'in bozulmasının, NPC aracılığıyla yapılan mRNA ve protein trafiğini engellediği gösterilmiştir.

Konjenital kalp hastalığı olan heterotaksili 262 bireyin oluşturduğu bir kohortta yapılan çalışmada NUP188 ve 5 komşu geni etkileyen bir duplikasyon bulgusu bu gendeki çalışmaların başlamasına neden olmuştur (90).

Yates ve ark., diyafragma hernisi olan bir fetüste *NUP188* geninde heterozigot bir missens varyant (p.Arg202His) saptamışlardır. Haskell ve ark., mitral kapak prolapsusu olan erişkin bir hastada *NUP188* geninde başka bir heterozigot varyant (c.4737+1G>T) bildirmiştir (91). Bir başka çalışmada Strauss ve ark. motor gecikme, 1. servikal vertebra (C1) displazisi, işitme kaybı, trakeo malazi ve kriptorşidizmi bulunan 3 yaşındaki bir çocukta *NUP188* geni ile ilişkili, biri yanlış anlamlı (c.313C>T; p.Arg105Trp), diğeri ise intronik (c.3429+5G>A) olan 2 varyant bildirmişlerdir. Tüm bu çalışmalar, NUP188 gen varyantı ve ilgili fenotip-genotip arasında açık bir ilişki gösterememiştir (92).

2019 yılında Sandestig ve arkadaşlarının çalışmasında, benzer fenotip gösteren birbiriyle bağlantısı bulunmayan pre- ve postnatal mikrosefali, trigonosefali, konjenital bilateral katarakt, yarık dudak ve damak/yüksek damak, kamptodaktili, rocker-bottom ayaklar, kalp anomalileri, beyin anomalileri, ince korpus kallozum ve gecikmiş miyelinizasyon gibi pek çok benzer bulguları olan iki yenidoğan dişi hastada yaptıkları TED analizi sonucunda *NUP188* geninde 2 farklı homozigot anlamsız varyant saptamışlardır. Aralarında 1. derece kuzen evliliği bulunan Suriyeli anne ve babanın 5. çocuğu olan olguda yapılan analiz sonucunda *NUP188* geninde (NM_015354.2) c.287dupA; p. (Tyr96Ter) varyantını homozigot olarak saptamışlar, bu varyant açısından anne ve babanın heterozigot taşıyıcı oldukları göstermişlerdir. Aralarında akraba evliliği olmayan Hint kökenli bir ailenin 2. çocuğu olarak dünyaya gelen 2. olgunun *NUP188* geninde (NM_015354.2) c.337C>T (p.Gln113Ter) varyantını homozigot, anne babanın ise heterozigot olarak taşıdıkları gösterilmiştir. Saptanan her iki varyant da erken dur kodonu oluşumuna neden olmaktadır. Olgular sırasıyla 67 ve 140 günlükken merkezi solunum yetmezliği nedeniyle kaybedilmiştir. Tüm bu

bilgilerden yola çıkarak her iki olguda da gözlenen *NUP188* genindeki homozigot anlamsız varyantların neden olduğu klinik durumu, ‘Nukleoparin 188 yetmezlik sendromu’ olarak tanımlamışlardır (89).

2020 yılında yapılan bir başka çalışmada benzer klinik özellikler taşıyan (konjenital kalp hastalığı, mikrosefali, konjenital katarakt, hipotoni ve beyin anomalileri) altı hastada yapılan çalışmada *NUP188* de bi-allelilik varyantlar saptanmışlardır. Altı olgudan beşi, yaşamının ilk 7 ayı içerisinde, biri de 2 yaşında solunum yetmezliği nedeniyle kaybedilmiştir. Çalışmaya alınan Aşkenazi Yahudi kökenli iki farklı aileden üç olguda *NUP188* geninde c.904_907delATT (p.Ile302Valfs*7) ve c.3144C> G (p.Tyr1048Ter) varyantları bileşik heterozigot formda saptanmıştır. Üçüncü aileden iki kardeşle çerçeve kaymasına ve erken dur kodon oluşumuna neden olacağı tahmin edilen homozigot bir varyant saptanmıştır (c.5032dupC, p.(Arg1678Profs*13)). Altıncı olguda bileşik heterozigot formda iki anlamsız varyant (c.1890G> A (p.Trp630Ter) ve c.4078C>T (p.Gln1360Ter) saptanmıştır. Ek olarak bu çalışmada *NUP188* geninde p.Ile302Valfs*7 ve p.Tyr1048Ter varyantlarını taşıyan bireylerin fibroblastlarından immüno blot ve immüno floresan analizi sonucunda bu varyantların ya tam *NUP188* kaybıyla ya da işlevsel olmayan bir güdük protein ürünüyle sonuçlandığı gösterilmiştir (86).

NUP188 genindeki bi-allelilik patojenik varyantlar, pre- ve post-natal mikrosefali, trigonosefali, konjenital katarakt, mikroftalmi, kamptodaktili, periventriküler ak madde kaybı, ince korpus kallozum, gecikmiş miyelinizasyon gibi bulgularla karakterize Sandestig-Stefanova Sendromu (MIM # 618804) ile ilişkilendirilmektedir (89). Bu çalışma sonucunda saptanan *NUP188* varyantı daha önce tanımlanmamış olup, ACMG kriterlerine göre ‘patojenik’ olarak sınıflandırılmaktadır. İndekste klinik bulguların Sandestig-Stefanova sendromu’nun klinik özellikleri açısından değerlendirilmesi ve aileye genetik danışma verilmesi önerildi.

Mendelyen kalıtım gösteren bir hastalıkta etiyolojinin belirlenmesi (nedensel mutasyonun tanımlanması), hasta ve ailesinde genetik tanı olduğu kadar taşıyıcılıkların belirlenmesini de mümkün kılar. Bu, hasta yönetimi ve aile danışmanlığı için büyük önem taşır ve terapötik müdahaleler için bir başlangıç da oluşturur (93). Dahası, Mendel kalıtım modeli ile uyumlu hastalık genlerinin tanımlanması, genel olarak sağlık ve hastalığın altında yatan etiyopatogenezi ve biyolojik yolları anlamamıza da katkıda

bulunur (94). Rutin uygulamada, bilinen bir genetik hastalık tanısı konulamıyorsa metabolitlerin analizi, karyotipleme ve/veya mikroyarray gibi testlere veya belirli fenotipik veya radyografik özellikler veya biyopsi bulgularından yola çıkılarak gen panel testleri dahil yapılmasına karşın genetik hastalıkların birçoğuna tanı koyulamamaktadır. Hastalıkların klinik ve genetik heterojenitesi, ilişkili genetik değişikliklerin genin kodlanmayan bölgelerinde bulunma olasılığı moleküler tanıyı zorlaştıran faktörlerdir. Bu durum, klinik tanısı olmayan hastalıklar için uzun bir tanı yolculuğu anlamına gelmektedir. Mendelyen hastalığa neden olan genetik faktörlerin tanımlanmasını amaçlayan araştırmalar, DNA'nın çok daha yüksek bir verimle ve daha önce mümkün olandan çok daha düşük maliyetlerle dizilenmesini sağlayan YND teknolojilerin geliştirilmesiyle hızlanmıştır. Son yıllarda bu tür hastalıkların tanısında yaygın olarak kullanılan YND teknolojileri, Mendel kalıtımına uyan hastalıkların moleküler etiyojisini belirleme açısından çok önemli katkılar sunmuştur. Bu testler geleneksel test metodolojilerine göre daha gelişmiş tanı olanakları sağlamaktadır (95). Bu tür teknolojilerin erken kullanılabilirliği, önlenabilir ve invaziv girişimleri azaltabilir ve tanısal zorlukları büyük ölçüde ortadan kaldırabilir. Bu teknolojilerin Mendel hastalıklarında direkt uygulanması ile zaman ve maliyet kaybının azalacağı bildirilmektedir. Bununla birlikte, TGD veya TED 'nin en uygun maliyetli genomik teşhis teknolojisi olup olmadığı henüz kesinlik kazanmamıştır. Ancak, TEG'nin dizi varyantlarının yanı sıra kopya sayısı değişimlerini de tanımaya yönelik programları geliştirilmektedir. Bu durum, YND teknolojilerinin uzun dizi analizlerini pratik uygulamalara sokmaya başlamasıyla, hem yapısal hem de dizisel değişimlerin tek bir platformda çözülebilir olacaktır. YND'de en büyük zorluk büyük verinin analizinde yaşanmaktadır. Bu zorluklar sürekli geliştirilen rehberler ve in silico araçlarla aşılmaya çalışılmaktadır. Klinik ilişkili yeni varyantların saptanması bu amaçla kullanılan veri tabanlarının geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Akraba evliliği doğan olguların klinik bulgularının değerlendirilmesi son derece önemlidir. Bu durum fenotip-genotip korelasyonun kurulmasını zorlaştırabilmektedir. Çünkü, bazı ailelerde hastalığın klinik bulguları bir değil iki veya daha fazla genin mutasyonları ile ortaya çıkmış olabilir ve bu olasılık akraba evliliği olgularında göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak, tez çalışmasına dahil edilen her üç ailede de tahmin araçlarının patojenik olarak sınıflandırdığı en az bir değişim saptanmıştır. Bu değişimlerden ikisi klinik bulgularla uyumlu iken birisi tam olarak kliniği açıklamaya yeterli bulunmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen olguların tümünde bir değişim saptanmış olsa da, örnek sayısının azlığı ve seçim kriterleri nedeniyle TED tekniğinin her olguda benzer tanı katkısı sağlayacağını iddia etmek fazla iyimser olacaktır. Bu çalışmaya dahil edilen olguların akılcı seçimi kesin tanıya büyük katkı sağlamış ve ‘yöntemden tanıya’ giden yolda yaklaşımsal aşamaları sunmuştur. Daha geniş bütçeli çalışmalar, bu tip yaklaşımların daha yüksek sayıdaki hasta ailelerine uygulanmasına ve tanıya ulaşmalarına fırsat verecektir.

TED çalışmalarında saptanan novel varyantların fonksiyon analizleri ile incelenmesi hastalık yollarının daha iyi anlaşılmasını ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bu tez çalışmasında klinik tanıya uyumlu bulunan patojenik varyasyonlar aileye verilecek genetik danışmaya ve ailedeki diğer riskli bireylerin belirlenmesine katkı sağlayacak gebeliklerinde prenatal ve preimplantasyon tanı olanağı sunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yang, Yaping, et al. "Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders." *New England Journal of Medicine* **369**.16 (2013): 1502-1511.
2. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Punnett_square_mendel_flowers.svg (erişim tarihi: 18.05.2020)
3. S. Tobias Edward, Connor Michael, Ferguson-Smith Malcolm, Tıbbi Genetiğin Esasları. Çev., Uğur Özbek. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri, 2014, s.7.
4. Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard, THOMPSON & THOMPSON GENETICS IN MEDICINE, EIGHTH EDITION, Elsevier, 2016, s.2
5. S. Tobias Edward, Connor Michael, Ferguson-Smith Malcolm, Tıbbi Genetiğin Esasları. Çev., Uğur Özbek. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri, 2014, s.118
6. Online Mendelian Inheritance in Man <https://www.omim.org/statistics/geneMap>, (erişim tarihi: 15.01.2021)
7. EuroGentest, <http://www.eurogentest.org/>, (erişim tarihi: 18.05.2020)
8. OKUR, M. İhsan, A. Mustafa YILDIRIM, and K. Ö. S. E. Rüştü. "Doğuştan yarık el ve ayak: Literatürün gözden geçirilmesi ve iki olgu sunumu." *Fırat Tıp Dergisi* **9**.1 (2004): 23-27.
9. Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard, THOMPSON & THOMPSON GENETICS IN MEDICINE, EIGHTH EDITION, Elsevier, 2016, s.63
10. Nadeau, Joseph H. "Modifier genes in mice and humans." *Nature Reviews Genetics* **2**.3 (2001): 165-174.
11. Brockdorff, Neil, and Bryan M. Turner. "Dosage compensation in mammals." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**.3 (2015): a019406.
12. Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntington F. Willard, THOMPSON & THOMPSON GENETICS IN MEDICINE, EIGHTH EDITION, Elsevier, 2016, s.55
13. Posey, Jennifer E. "Genome sequencing and implications for rare disorders." *Orphanet Journal of Rare Diseases* **14**.1 (2019): 153.
14. S. Tobias Edward, Connor Michael, Ferguson-Smith Malcolm, Tıbbi Genetiğin Esasları. Çev., Uğur Özbek. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri, 2014, s.164-168
15. Fuhrmann, Walter, and Friedrich Vogel. *Genetic counseling*. Springer Science & Business Media, 2012.

16. Bezelye Dergisi, <https://www.bezelyedergi.net/post/kromozom-boyama-tekn%C4%9Fi-fish> , (erişim tarihi:18.05.2020)
17. Van Zelderen-Bhola, S. L., et al. "Prenatal and postnatal investigation of a case with Miller–Dieker syndrome due to a familial cryptic translocation t (17; 20)(p13. 3; q13. 3) detected by fluorescence in situ hybridization." *Prenatal diagnosis* **17.2** (1997): 173-179.
18. Jacobsen, Anja, et al. "Comparison of comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization in ovarian carcinomas: possibilities and limitations of both techniques." *Cancer genetics and cytogenetics* **122.1** (2000): 7-12.
19. Nacheva, Elisabeth P., et al. "Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis." *Cancer genetics and cytogenetics* **100.2** (1998): 93-105.
20. Shaw, Greg. "Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNP s)." *BJU international* **112.5** (2013): 664-665.
21. Nowakowska, Beata. "Clinical interpretation of copy number variants in the human genome." *Journal of applied genetics* **58.4** (2017): 449-457.
22. Pinto, Irene Plaza, et al. "Cytogenomic Microarray Testing." *Cytogenetics-Past, Present and Further Perspectives*. IntechOpen, 2018.
23. Cheung, Sau Wai, and Amber Nolen Pursley. "Comparative Genomic Hybridization in the Study of Human Disease." *eLS*.
24. Schouten, Jan P., et al. "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification." *Nucleic acids research* **30.12** (2002): e57-e57.
25. New England Biolabs, <https://bitesizebio.com/41396/mlpa/>, (erişim tarihi:18.05.2020)
26. S. Tobias Edward, Connor Michael, Ferguson-Smith Malcolm, *Tıbbi Genetiğin Esasları*. Çev., Uğur Özbek. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri, 2014, s.45
27. Green, Eric D., and Mark S. Guyer. "Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside." *Nature* **470.7333** (2011): 204-213.
28. Rabbani, Bahareh, et al. "Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders." *Journal of human genetics* **57.10** (2012): 621-632.

29. Normand, Elizabeth A., et al. "Clinical exome sequencing for fetuses with ultrasound abnormalities and a suspected Mendelian disorder." *Genome medicine* **10.1** (2018): 74.
30. Makałowski, Wojciech. "The human genome structure and organization." *Acta Biochimica Polonica* **48.3** (2001): 587-598.
31. Tarailo-Graovac, Maja, et al. "Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders." *New England Journal of Medicine* **374.23** (2016): 2246-2255.
32. Iglesias, Alejandro, et al. "The usefulness of whole-exome sequencing in routine clinical practice." *Genetics in Medicine* **16.12** (2014): 922-931.
33. Yang, Yaping, et al. "Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing." *Jama* **312.18** (2014): 1870-1879.
34. Bainbridge, Matthew N., et al. "De novo truncating mutations in ASXL3 are associated with a novel clinical phenotype with similarities to Bohring-Opitz syndrome." *Genome medicine* **5.2** (2013): 11.
35. Li, Chumei, and Marta Szybowska. "A novel mutation c. 4003 G> C in the CREBBP gene in an adult female with Rubinstein–Taybi syndrome presenting with subtle dysmorphic features." *American Journal of Medical Genetics Part A* **152.11** (2010): 2939-2941.
36. Posey, Jennifer E., et al. "Molecular diagnostic experience of whole-exome sequencing in adult patients." *Genetics in Medicine* **18.7** (2016): 678-685.
37. Petersen, Britt-Sabina, et al. "Opportunities and challenges of whole-genome and-exome sequencing." *BMC genetics* **18.1** (2017): 1-13.
38. Behjati, Sam, and Patrick S. Tarpey. "What is next generation sequencing ?." *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice* **98.6** (2013): 236-238.
39. Schang, A-L., D. Sabéran-Djoneidi, and V. Mezger. "The impact of epigenomic next-generation sequencing approaches on our understanding of neuropsychiatric disorders." *Clinical Genetics* **93.3** (2018): 467-480.
40. Shearer, A. Eliot, et al. "Utilizing ethnic-specific differences in minor allele frequency to recategorize reported pathogenic deafness variants." *The American Journal of Human Genetics* **95.4** (2014): 445-453.

41. He, Feng, and Allan Jacobson. "Nonsense-mediated mRNA decay: degradation of defective transcripts is only part of the story." *Annual review of genetics* **49** (2015): 339-366.
42. <https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/help/GUID-8CF8A299-8BA1-4AFC-B6FE-837F59A7E74D.html> (erişim tarihi:26.10.2020)
43. Richards, Sue, 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." *Genetics in medicine* **17.5** (2015): 405-423.
44. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467 (1977)
45. Maxam, A. M. & Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 560–564 (1977)
46. Green, Eric D., and Mark S. Guyer. "Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside." *Nature* **470.7333** (2011): 204-213.
47. [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000015133;r=14:91271323-91417844;t=ENST00000389857,](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000015133;r=14:91271323-91417844;t=ENST00000389857) erişim tarihi:29.01.2021
48. Oshita, Akihiko, et al. "Identification and characterization of a novel Dvl-binding protein that suppresses Wnt signalling pathway." *Genes to Cells* **8.12** (2003): 1005-1017.
49. ALTINOK, Buket, and Asuman SUNGUROĞLU. "Wnt sinyal yolağı ve kanser."
50. Takagishi, Maki, et al. "Daple coordinates planar polarized microtubule dynamics in ependymal cells and contributes to hydrocephalus." *Cell reports* **20.4** (2017): 960-972.
51. Drielsma, Anais, et al. "Two novel CCDC88C mutations confirm the role of DAPLE in autosomal recessive congenital hydrocephalus." *Journal of medical genetics* **49.11** (2012): 708-712.
52. Wallis, Mathew, et al. "Surprisingly good outcome in antenatal diagnosis of severe hydrocephalus related to CCDC88C deficiency." *European journal of medical genetics* **61.4** (2018): 189-196.

53. TANIR, Hanife GÜLER, and Şayeste DEMİREZEN. "Wnt sinyal yolunun biyolojisi ve bu yolda görev alan biyomoleküller." *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* **29.5** (2009): 1292-1297.
54. GeneCards The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCDC88C> (erişim tarihi 08.09.2020)
55. Tully, Hannah M., Walter A. Kukull, and Beth A. Mueller. "Clinical and surgical factors associated with increased epilepsy risk in children with hydrocephalus." *Pediatric neurology* **59** (2016): 18-22.
56. Tully, Hannah M., and William B. Dobyns. "Infantile hydrocephalus: a review of epidemiology, classification and causes." *European journal of medical genetics* **57.8** (2014): 359-368.
57. Ruggeri, Gaia, et al. "Bi-allelic mutations of CCDC88C are a rare cause of severe congenital hydrocephalus." *American Journal of Medical Genetics Part A* **176.3** (2018): 676-681.
58. <https://www.omim.org/entry/236600>, erişim tarihi: 30.01.2021.
59. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENS G00000196924;r=X:154348524-154374634;t=ENST00000369850, erişim tarihi:29.01.2021.
60. Duval, D., et al. "Valvular dystrophy associated filamin A mutations reveal a new role of its first repeats in small-GTPase regulation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1843.2** (2014): 234-244.
61. Haataja, Tatu JK, et al. "Critical structural defects explain filamin A mutations causing mitral valve dysplasia." *Biophysical journal* **117.8** (2019): 1467-1475.
62. Ritelli, Marco, et al. "Ehlers–Danlos syndrome with lethal cardiac valvular dystrophy in males carrying a novel splice mutation in FLNA." *American Journal of Medical Genetics Part A* **173.1** (2017): 169-176.
63. <https://medlineplus.gov/> (erişim tarihi: 15.10.2020)
64. Sheen, Volney L., et al. "Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females." *Human molecular genetics* **10.17** (2001): 1775-1783.

65. Brunetti-Pierri, Nicola, et al. "Terminal osseous dysplasia with pigmentary defects (TODPD) due to a recurrent filamin A (FLNA) mutation." *Molecular Genetics & Genomic Medicine* **2.6** (2014): 467-471.
66. Parrini, E., et al. "Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations." *Brain* **129.7** (2006): 1892-1906.
67. Reinstein, Eyal, et al. "Vascular and connective tissue anomalies associated with X-linked periventricular heterotopia due to mutations in Filamin A." *European Journal of Human Genetics* **21.5** (2013): 494-502.
68. Lardeux, Aurélie, et al. "Filamin-a-related myxomatous mitral valve dystrophy: genetic, echocardiographic and functional aspects." *Journal of cardiovascular translational research* **4.6** (2011): 748-756.
69. Zenker, Martin, et al. "A dual phenotype of periventricular nodular heterotopia and frontometaphyseal dysplasia in one patient caused by a single FLNA mutation leading to two functionally different aberrant transcripts." *The American Journal of Human Genetics* **74.4** (2004): 731-737.
70. Parrini, Elena, et al. "Familial periventricular nodular heterotopia, epilepsy and Melnick–Needles Syndrome caused by a single FLNA mutation with combined gain-of-function and loss-of-function effects." *Journal of medical genetics* **52.6** (2015): 405-412.
71. Kyndt, Florence, et al. "Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy." *Circulation* **115.1** (2007): 40.
72. Bernstein, Jonathan A., et al. "Familial cardiac valvulopathy due to filamin A mutation." *American Journal of Medical Genetics Part A* **155.9** (2011): 2236-2241.
73. Kim, Hugh, et al. "Regulation of cell adhesion to collagen via $\beta 1$ integrins is dependent on interactions of filamin A with vimentin and protein kinase C epsilon." *Experimental cell research* **316.11** (2010): 1829-1844.
74. Kim, Hugh, et al. "Filamin A is required for vimentin-mediated cell adhesion and spreading." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **298.2** (2010): C221-C236.
75. Derynck, Rik, and Ying E. Zhang. "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling." *Nature* **425.6958** (2003): 577-584.
- 76.

(https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENS)

G00000183638;r=8:10606349-10712187;t=ENST00000382483,erişim

tarihi:29.01.2021

77. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RP1L1>, erişim tarihi: 01.11.2020
78. Yamashita, Tetsuji, et al. "Essential and synergistic roles of RP1 and RP1L1 in rod photoreceptor axoneme and retinitis pigmentosa." *Journal of Neuroscience* **29.31** (2009): 9748-9760.
79. Noel, Nicole CL, and Ian M. MacDonald. "RP1L1 and Inherited Photoreceptor Disease: A Review." *Survey of Ophthalmology* (2020).
80. Zobor, Ditta, et al. "Phenotype variations caused by mutations in the RP1L1 gene in a large mainly German cohort." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **59.7** (2018): 3041-3052.
81. Oishi, Maho, et al. "Comprehensive molecular diagnosis of a large cohort of Japanese retinitis pigmentosa and Usher syndrome patients by next-generation sequencing." *Investigative ophthalmology & visual science* **55.11** (2014): 7369-7375.
82. https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENS00000095319;r=9:128947699-129007096;t=ENST00000372577, erişim tarihi:30.01.2021
83. Brohawn, Stephen G., et al. "The nuclear pore complex has entered the atomic age." *Structure* **17.9** (2009): 1156-1168.
84. Itoh, Go, et al. "Nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis." *Cancer science* **104.7** (2013): 871-879.
85. Kabachinski, Greg, and Thomas U. Schwartz. "The nuclear pore complex—structure and function at a glance." *Journal of cell science* **128.3** (2015): 423-429.
86. Muir, Alison M., et al. "Bi-allelic Loss-of-Function Variants in NUP188 Cause a Recognizable Syndrome Characterized by Neurologic, Ocular, and Cardiac Abnormalities." *The American Journal of Human Genetics* (2020).
87. Theerthagiri, Gandhi, et al. "The nucleoporin Nup188 controls passage of membrane proteins across the nuclear pore complex." *Journal of Cell Biology* **189.7** (2010): 1129-1142.
88. Poot, Martin. "Mutated NUP188 and Other Nucleoporins as Gateways to Developmental Syndromes." *Molecular Syndromology* **11.1** (2020): 1-3.

89. Sandestig, Anna, et al. "NUP188 Biallelic Loss of Function May Underlie a New Syndrome: Nucleoporin 188 Insufficiency Syndrome?." *Molecular Syndromology* **10.6** (2019): 313-319.
90. Fakhro, Khalid A., et al. "Rare copy number variations in congenital heart disease patients identify unique genes in left-right patterning." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108.7** (2011): 2915-2920.
91. Haskell, Gloria T., et al. "Whole exome sequencing identifies truncating variants in nuclear envelope genes in patients with cardiovascular disease." *Circulation: Cardiovascular Genetics* **10.3** (2017): e001443.
92. Strauss, Kevin A., et al. "Genomic diagnostics within a medically underserved population: efficacy and implications." *Genetics in Medicine* **20.1** (2018): 31-41.
93. Antonarakis, Stylianos E., and Jacques S. Beckmann. "Mendelian disorders deserve more attention." *Nature Reviews Genetics* **7.4** (2006): 277-282.
94. Oti, Martin, and Han G. Brunner. "The modular nature of genetic diseases." *Clinical genetics* **71.1** (2007): 1-11.
95. Rabbani, Bahareh, Mustafa Tekin, and Nejat Mahdieh. "The promise of whole-exome sequencing in medical genetics." *Journal of human genetics* **59.1** (2014): 5-15.