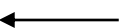


FATMA SARI TUNEL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MULTİMİNİCORE HASTASI İKİZ KARDEŞİN TÜM
EKZOM DİZİLEME VERİSİNDEN HASTALIK ETKENİ
VARYANTLARIN TESPİTİ, KONFİRMASYONU VE GEN
EKSPRESYONU ÇALIŞMALARI**

FATMA SARI TUNEL

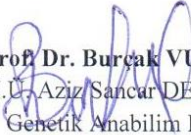
**DANIŞMAN
PROF. DR. BURÇAK VURAL**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Fatma SARI TUNEL tarafından Prof. Dr. Burçak VURAL'ın danışmanlığında hazırlanan "Multiminicore Hastası İkiz Kardeşin Tüm Ekzom Dizileme Verisinden Hastalık Etkeni Varyantların Tespiti, Konfirmasyonu ve Gen Ekspresyonu Çalışmaları" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 21.06.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Burçak VURAL
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Prof. Dr. Piraye OFLAZER
Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fatma SARI TUNEL

İTHAF

Gücüme güç katarak beni yetiştiren anne ve babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin tüm aşamalarında her türlü desteği ve özveriyi gösteren, çok değerli hocam Prof. Dr. Burçak VURAL'a,

Yüksek Lisans tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında bana destek olan çok değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Feyza Nur TUNCER KILINÇ, Doç. Dr. Evrim KÖMÜRCÜ BAYRAK, Zeliha GÖRMEZ (PhD) ve Prof. Dr. Piraye OFLAZER'e

Yüksek Lisans tez çalışmalarımda bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan Muhammed Abdulvahit KALKAN, Seda YILMAZ SALMAN, ve Didem ALTINDİREK'e,

Yüksek Lisans eğitimimi sürdürebilmem için çalışma planımda esneklik sağlayan, tezimin Sanger Dizileme çalışmasını Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi'nde çalışabilmem için gerekli izinleri veren, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yönetimi'ne ve Haseki EAH Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi İdaresi'ne

Tez çalışmalarım için gerekli malzemelerin en uygun şekilde teklifinin alınması ve tedarik edilmesinde yardımcı olan Haseki EAH Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi Depo çalışanı Hakan ÖZTÜRK'e,

Sanger dizileme yöntemi çalışmalarımda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan moleküler genetik departman sorumlusu Bahtınur ŞÜKÜR, moleküler genetik departmanı çalışanları Faruk ÇELİK (PhD-C), N. Duygu TORLAK, Sema BAYKARA, ve isimlerini yazamadığım diğer Haseki EAH Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi Moleküler Genetik Departmanı çalışanlarına,

Her koşulda beni destekleyen, yanımda olan; hayat arkadaşım, eşim Engin TUNEL'e,

Varlıklarıyla gurur duyduğum her zaman destekçim olan aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-27425.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KAS DOKUSU	3
2.2. İSKELET KASI HASTALIKLARI.....	5
2.3. KONJENİTAL MİYOPATİLER.....	7
2.4. MULTIMINICORE HASTALIĞI.....	8
2.4.1. Multiminicore Hastalığının Epidemiyolojisi	9
2.4.2. Klinik Değerlendirme	9
2.4.3. Patolojik/Histopatolojik Bulgular	10
2.4.4. Moleküler Temeli.....	11
2.4.4.1. <i>SEPN1</i> Geni	13
2.5. TÜM EKZOM DİZİLEME.....	16
2.5.1. TÜM EKZOM DİZİ DEĞERLENDİRME.....	17
2.5.2. VARYANT ANALİZİ	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. GEREÇ	22
3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Hasta Numuneleri	22
3.1.2. Çalışmalarda Kullanılan Kontrol Numuneleri	23
3.1.3. Kimyasallar	24
3.1.4. Kitler	24

3.1.5. Cihazlar	25
3.2. YÖNTEM	26
3.2.1. Tüm Ekzom Dizileme Çalışması	26
3.2.2. Tüm Ekzom Dizisi Veri Analizi	26
3.2.3. Varyant Analizi	27
3.2.4. Sanger Dizileme Çalışması	31
3.2.4.1. PZR	31
3.2.4.2. Pürifikasyon	32
3.2.4.3. Dizileme	33
3.2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı PZR) Çalışması	35
3.2.5.1. Lökosit İzolasyonu	35
3.2.5.2. RNA İzolasyonu	35
3.2.5.3. cDNA Sentezi	37
3.2.5.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı PZR)	38
3.2.6. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	42
4.1. Varyant Filtreleme Bulguları	42
4.2. Sanger Dizileme Bulguları	47
4.3. Gerçek Zamanlı PZR Bulguları	51
5. TARTIŞMA	53
KAYNAKLAR	57
HAM VERİLER	66
ETİK KURUL KARARI	67
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	68
ÖZGEÇMİŞ	69

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Tip I ve Tip II Kas Fibrillerinin Karşılaştırması (2)	4
Tablo 2-2: Kas Hastalıklarının Sınıflandırılması (4)	6
Tablo 2-3: MmD formları ve ilişkili genler	12
Tablo 3-1: Kullanılan Kimyasallar	24
Tablo 3-2: Kullanılan Kitler	24
Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar	25
Tablo 3-4: Kalıtım paternlerine uygun filtreleme parametreleri	30
Tablo 3-5: Sanger Dizileme Çalışmalarında Kullanılan Primerler	31
Tablo 3-6: Sanger Dizileme PZR Karışımı İçeriği	32
Tablo 3-7: Pürifikasyon Çalışması İçin Karışım İçeriği	33
Tablo 3-8: Pürifikasyon Çalışması PZR Çalışma Protokolü	33
Tablo 3-9: Sanger Dizileme Çalışması İçin Karışım İçeriği	33
Tablo 3-10: Dizileme PZR Çalışma Koşulları	34
Tablo 3-11: cDNA Sentezi Protokolü (E6300S-NEB)	37
Tablo 3-12: cDNA Sentezi Protokolü (“Roche Kiti”)	38
Tablo 3-13: Gerçek Zamanlı PZR Çalışması İçin Kullanılan Primerler	39
Tablo 3-14: Gerçek Zamanlı PZR Çalışması İçin Kullanılan Karışım İçeriği	39
Tablo 3-15: Gerçek Zamanlı PZR Sıcaklık-Zaman Protokolü	40
Tablo 4-1: Tüm Ekzom Verisinin Filtreleme Aşamaları	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: İskelet kasının yapısı (3)	4
Şekil 2-2: Konjenital miyopatilerde rol oynayan patojenik mekanizmaların şematik gösterimi (9).....	8
Şekil 2-3 Ökaryotlarda selenosistein amino asidin sentezi ve eş zamanlı olarak translasyon birleşimi(35)	14
Şekil 2-4: ACMG Rehberinde belirtilen 28 kriterin uygulama sistematığı (57).	20
Şekil 3-1: Filtreleme Seti-1 Ekran Görüntüsü	28
Şekil 3-2: Filtreleme Seti-2 Ekran Görüntüsü	29
Şekil 3-3: Filtreleme Seti-3 Ekran Görüntüsü	29
Şekil 3-4: Filtreleme Seti-4 Ekran Görüntüsü	30
Şekil 4-1: Filtreleme Seti-1 kriterleri için sonuç ekran görüntüsü.....	42
Şekil 4-2: Filtreleme Seti-2 kriterleri için sonuç ekran görüntüsü.....	42
Şekil 4-3: Filtreleme Seti-3 kriterleri için sonuç ekran görüntüsü.....	43
Şekil 4-4: Filtreleme Seti-4 kriterleri için sonuç ekran görüntüsü.....	43
Şekil 4-5: <i>MYH7</i> Geninde Bulunan Varyantın Aile Üyelerinin IGV Görüntüsü	44
Şekil 4-6: <i>SEPN1</i> Geni PZR Ürünlerinin Jel Görüntüsü	48
Şekil 4-7: Ebeveyn 1'in Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü	48
Şekil 4-8: Ebeveyn 2'nin Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü	49
Şekil 4-9: Hasta 1'e Ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü (ENST00000354177.4:c.715G>A/p.Gly239Arg)	49
Şekil 4-10: Hasta 2'ye Ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü (ENST00000354177.4:c.715G>A/p.Gly239Arg)	49
Şekil 4-11: Sağlıklı Kontrol 1'e ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü	50
Şekil 4-12: Sağlıklı Kontrol 2' ye ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü	50
Şekil 4-13: Sağlıklı Kontrol 3' ye ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü	50
Şekil 4-14: Amplifikasyon Eğrileri.....	51

Şekil 4-15:Hastalık Etkeni Varyantı Yabanıl, Homozigot, Heterozigot Durumda Bulunduran Grupların Rölatif <i>SEPN1</i> Geni Ekspresyon Seviyesi (p= 0.1810, “Kruskal-Wallis testi”)	52
--	----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MmD	<i>Multiminicore Disease (Multiminicore Hastalığı)</i>
RyR1	<i>Ryanodine Receptor 1 (Ryanodin Reseptörü 1)</i>
SEPN1	<i>Selenoprotein N</i>
MYH7	<i>Myosin Heavy Chain 7 (Miyosin ağır zincir 7)</i>
TTN	<i>Titin</i>
MEGF10	<i>Multiple EGF Like Domains 10 (Çoklu EGF Benzeri Domain 10)</i>
ACADS	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase Short Chain (Açıl-CoA Dehidrogenaz Kısa Zinciri)</i>
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
Ca⁺²	Kalsiyum (İyonize)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CK	Kreatin Kinaz
EMG	Elektromiyografi
CFTD	<i>Congenital Fiber Type Disproportion (Konjenital Lif Tipi Orantısızlığı)</i>
SECIS	<i>Selenocysteine Insertion Sequence (Selenosistein Ekleme Dizisi)</i>
SelN	Selenoprotein N
Sec	Selenosistein
3'UTR	<i>3' Untranslated Region</i>
tRNA^{Sec}	Selenosistein Taşıyıcı RNA
SecS	Selenosistein Sentaz
EFSec	Selenosistein Uzama Faktörü
SBP2	<i>Sequence-Binding Protein 2 (Dizi-Bağlayıcı Proteini 2)</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B (Nükleer Faktör kappa B)</i>
AP1	Aktivatör Protein 1
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
WES	Tüm Ekzom Dizileme
NGS	Yeni Nesil Dizileme

HGMD	<i>Human Gene Mutation Database (İnsan Gen Mutasyonu Veri Tabanı)</i>
QC	Kalite Kontrolü
GERP	<i>Genomic Evolutionary Rate Profiling (Genomik Evrimsel Hız Profili)</i>
PPIA	<i>Peptidylprolyl isomerase A (Cyclophilin A)(Peptidil isomeraz A-siklofilin A)</i>
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer (Bütünleştirici Genomik Görüntüleyici)</i>
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies (Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları)</i>
RSMD1	<i>Rigid Spine Congenital Muscular Dystrophy-1(“Rigid Spine” Konjenital Müsküler Distrofisi-1)</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>

ÖZET

SARI-TUNEL F. Multiminicore Hastası İkiz Kardeşin Tüm Ekzom Dizileme Verisinden Hastalık Etkeni Varyantların Tespiti, Konfirmasyonu ve Gen Ekspresyonu Çalışmaları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019.

Multiminicore hastalığı (MmD), konjenital miyopati grubunda olup, nadir bir genetik hastalıktır. MmD'nin görülme sıklığı bilinmemektedir. Ancak, epidemiyolojik bir çalışmada, konjenital miyopati sıklığı, canlı doğumların %0.006'sı olarak belirtilmektedir. MmD'nin kalıtım modeli, sorumlu olduğu gen ve mutasyona göre değişebilmektedir. Hastalığın tanısı genellikle, klinik ve kas dokusundaki histopatolojik bulgularla konulmaktadır. Kas dokusunda histopatolojik incelemede, kas lifleri arasında; oksidatif aktivite azlığı ya da yokluğu, çok sayıda, küçük çaplı kor yapıları önem taşımaktadır. Hastalığın klinik bulguları değişkenlik gösterebilmektedir; ancak solunum bozukluğu, motor gelişim geriliği, kas zayıflığı ortak klinik bulgulardır. MmD hastalığının moleküler temeli, henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bugüne kadar hastalığın fenotipi ile ilişkili *RYR1*, *SEPN1*, *MYH7*, *TTN*, *MEGF10* ve *ACADS* genlerinde çeşitli genetik varyantlar belirlenmiştir. Bu çalışmada, akraba evliliği olan anne ve babanın, çoklu düşüklerinin ardından *in vitro* fertilizasyon ile dünyaya gelen, klinik ve histopatolojik bulgularla MmD hastalığı tanısı konulan ikiz çocuklarının, önceden yapılmış tüm ekzom dizileme sonuçlarının, analiz edilmesi ve hastalıkla ilişkili varyantların belirlenmesi amaçlandı. Tüm ekzom dizileme veri analizi sonucunda *SEPN1* geninde daha önce MmD ile ilişkilendirilmiş bir varyant (c.817G>A/p.G273R) ilk defa ikiz çalışmasında belirlendi. ACMG standartlarına ve bilgisayar ortamındaki araçların değerlendirmelerine göre, bu varyant muhtemel patojenik etkili olarak bulundu. Belirlenen varyantın Sanger dizileme ile ebeveynlerde ve hasta çocuklarında doğrulaması yapıldı. Ayrıca aile üyeleri ve sağlıklı kontrollerin (n=3) lökositlerinde *SEPN1* gen ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Ekspresyon düzeylerinin (p= 0.1810, p<0.05) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Bu çalışma sonucunda *SEPN1* geninde, MmD hastalığı için varyant belirlenmiş olup, bu bilgi ile aileye genetik danışma verilebilecektir. Ayrıca çalışmamız MmD hastalığının moleküler patogenezi ile ilgili çalışmalara katkıda bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler : Multiminicore, MmD, Tüm Ekzom Dizileme, Konjenital Miyopati, Gen Ekspresyonu.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27425

ABSTRACT

SARI-TUNEL F., Detection, Confirmation and Gene Expression Studies of Disease Causing Variants from the Whole Exome Sequencing Data of Twins with Multiminicore Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master Thesis. İstanbul. 2019.

Multiminicore Disease (MmD) is a rare genetic disease which is one of the structural congenital myopathies. The incidence of MmD is not known. There are publications showing the existence of different hereditary forms in different genes related to MmD (15, 16, 17, 18). Generally, the disease is diagnosed by histopathological and clinical findings.

Histopathological examinations with oxidative stainings, show multiple non-staining cores in the muscle tissue. Although different clinical findings may be observed; respiratory failure, motor developmental retardation, muscle weakness are shared clinical findings. The molecular basis of MmD disease and its mechanisms have not been fully elucidated. To date, variants in *RYR1*, *SEPN1*, *MYH7*, *TTN*, *MEGF10* and *ACADS* genes were associated with the disease. In this study, whole exome sequencing data were analysed for twins with MmD disease and their parents who were first degree consanguineous. Thereby, it was intended to identify, disease causing variant(s). A disease causing variant (c.817G>A/p.G273R) which was not previously associated with MmD in the *SEPN1* gene was determined. According to the evaluations, this variant was considered to be likely pathogenic. The identified variant was confirmed by Sanger sequencing in all individuals. *SEPN1* gene expression levels were studied. It was not statistically significant.

As a result the defined variant in *SEPN1* gene in these twins with MmD disease made it possible to give genetic counseling to the family for the future. In addition, our study contributes to the molecular pathogenesis of MmD disease.

Key Words: Multiminicore, MmD, Whole Exome Sequencing, Congenital Myopathy, Gene Expression.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 27425

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kas hastalıkları, motor nöronlar, merkezi sinir sistemi, periferik sinirler veya sekonder olarak kas zayıflığına neden olan nöromüsküler bağlantıları içermeyen, yalnızca kası tutan ve miyopati olarak adlandırılan hastalıklardır. Kalıtsal ve edinsel kas hastalıkları olarak iki temel kategoride sınıflandırılmaktadır. Kalıtsal bir miyopati grubu olan konjenital miyopatiler, klinik ve genetik heterojenite göstermektedir. Konjenital miyopatilerin patolojisinde; iskelet kasında kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazı, kasılma-gevşeme mekanizması, impuls iletimi, oksidatif aktivite, otofaji, kas liflerinin yapısı ve işlevinde görev alan proteinler etkili olmaktadır. Konjenital miyopatilerin çoğunun birden fazla gendeki mutasyonlardan kaynaklandığı ve aynı gendeki mutasyonların farklı kas patolojilerine neden olabildiği belirtilmektedir (8). Kalıtsal miyopatilerden konjenital miyopatiler alt başlığı içerisindeki MmD hastalığı nadir bir kalıtsal hastalıktır. MmD hastalığına ait prevalans bilgisi mevcut değildir. Tüm konjenital miyopatilerin insidansı bin canlı doğumda 0.06 olarak belirtilmektedir (20, Kaynak: 21 p.102). Hastalığın 1971 yılında Engel ve Gomez tarafından tanımlanmasından günümüze kadar 100 civarında vaka raporlanmıştır (10, Kaynak:11 p.60). Raporlanan hastaların büyük çoğunluğuna klinik tanı, fenotip ve histopatolojik incelemeler doğrultusunda konulmuştur. Aynı histopatolojik ve fenotipik bulgulara sahip ve aynı klinik tanıyı alan vakalarda, farklı genlerde mutasyonlar tanımlanmıştır (22, 30). Genetik çalışmalarla raporlanan vakalar, *RYR1*, *SEPN1*, *TTN*, *MYH7*, *MEGF10* ve *ACADS* genlerindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (17, 22, 30, 31, 32). Raporlanan vakalara ait klinik bulgular incelendiğinde; aynı mutasyona sahip hastalarda, farklı histopatolojik ve fenotipik bulgular nedeniyle farklı klinik tanı konulan örnekler de mevcuttur (17). MmD hastalığı klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalıktır. MmD hastalığının daha fazla genetik, klinik araştırmalarla incelenmesi gerektiği araştırmacılar tarafından da ifade edilmektedir (11, 22).

Çalışmamızda birinci dereceden akraba evliliği yapan bir çift ve birden fazla düşük öyküleri sonrasında *in vitro* fertilizasyon yöntemiyle sahip oldukları MmD hastalığı tanısı almış ikiz çocuklarının tüm ekzom dizileme analizleri yapılmıştır.

Ebeveynlerin ve ikiz çocuklarının tüm ekzom dizileme çalışmaları 2014 yılında özel bir hastanede yapılmıştır. Bizim çalışmamızda tüm ekzom dizileme ham verileri incelenmiştir. Bunun için tüm ekzom dizileme verisi Seq platformu ile analiz edilerek tüm ekzom verisi filtrelenebilir hale getirildi. Seq platformu üzerinden fenotip bilgisi doğrultusunda gen önceliklendirme ile protein-protein, metabolik yolak ilişkileri gibi biyolojik süreçleri baz alan bilgisayar ortamındaki araçlarla (GeneCards, Phenolyzer) hastalık etkeni olarak belirlenen aday genler üzerinde, varyantın etkisi ve kalıtım paternlerine uygun filtrelemeler yapıldı. Filtrelemeler sonrasında tespit edilen varyantlar, aile segregasyonu ve ACMG - “*American College of Medical Genetics and Genomics*” tarafından yayınlanan standartlar doğrultusunda incelenerek; *SEPN1* geninde, hastalık etkeni olan varyant (c.817G>A/p.G273R) belirlendi.

SEPN1 geninde belirlenen varyant (c.817G>A/p.G273R), aile bireylerinde ve üç sağlıklı kontrolde Sanger dizileme yöntemi ile dizilendi. Bu varyant için ebeveynlerin heterozigot, ikiz çocukların homozigot segregasyonu Sanger dizileme yöntemi ile konfirme edildi.

Ayrıca *SEPN1* gen ifadesi (ekspresyon düzeyleri) hastalık etkeni varyantın (c.817G>A/p.G273R), *SEPN1* gen ifadesini nasıl etkilediği aile bireylerinde (n=4) ve kontrollerde (n=3) kantitatif PZR çalışmasıyla araştırıldı. Ekspresyon düzeyinin istatistiksel analiz sonucu anlamlı olmadığı belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KAS DOKUSU

Kaslar morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre üçe ayrılır.

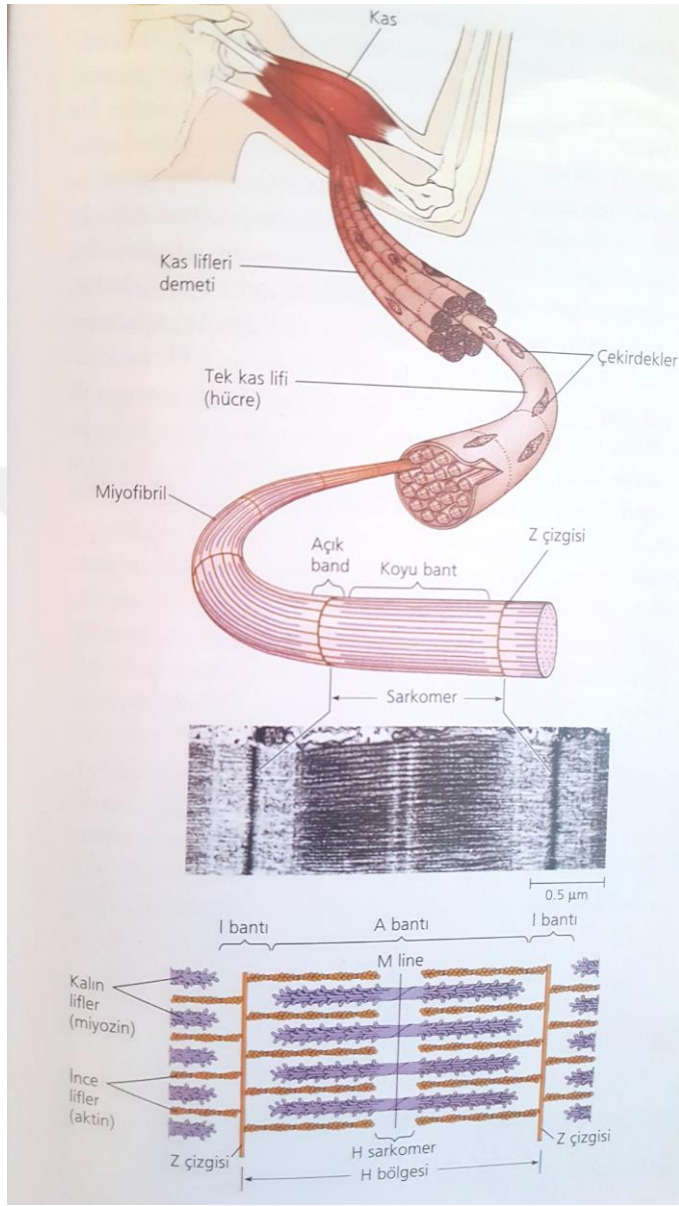
Düz Kas: Belirli organların istemsiz hareketlerini gerçekleştiren kas tipidir. Bu kas tipi en çok içi boşluklu organların ve kan damarlarının duvarlarında olur. Tek çekirdekli, küçük fuziform şekilli kas tipidir (1). Sempatik ve parasempatik sinirlerle uyarılmaktadır (2).

İskelet Kası: Birden fazla çekirdekli ve çizgili olan kas hücresidir (1). Tutunduğu iskeletin hareketini sağlayan kastır. Somatik sinirlerle uyarılır (2).

Kalp Kası: Kalbin büyük bir kısmını oluşturan, kalbin kasılmasını sağlayan kas tipidir. Kalp kası lifi; tek bir merkezi çekirdeği olan, dallanma gösteren, çizgili kas hücresidir (1). Otonom sinirler aracılığı ile uyarılır, istemsiz olarak kasılır (2).

İskelet kaslarına ait olan kas lifini meydana getiren, miyofilamentlerden oluşan uzun, kasılabilen lifcikler **miyofibril** olarak adlandırılır. Miyofibrillerin uzunlamasına dizilmesiyle meydana gelen, kasılabilen hücrelere **kas lifi** denir. İskelet kasında; kas lifleri bir araya gelerek **kas lifi demetlerini** oluşturmaktadır. (Şekil 2-1). Kas lifinin hücre zarı **sarkolemma** olarak isimlendirilirken; merkezi sinir sisteminden kaslara sinir uyarısını taşıyan sinir hücrelerine **motor nöron** denilmektedir (1).

Miyofibriller; iki zincirli aktin ve onun üzerine sarılı düzenleyici bir proteinden oluşan **ince filamentler** ve yatayda ince filamentlerin arasında, dikey konumda ise “Z” çizgilerin arasında miyozin proteininin karşı karşıya gelmeyecek şekilde düzenlenmesiyle **kalın filamentlerden** oluşmuştur. Filamentlerin düzenli dizilişi kasın çizgili yapısını oluşturmaktadır. İki “Z” çizgisi arasında kalan tekrarlanan her birime **sarkomer** denir. Sarkomer, iskelet kasının kasılma birimidir. Sarkomerin sadece ince filamentlerinin olduğu kenara yakın kısmına **I bandı**, kalın filamentlerin uzunluğuna karşılık gelen geniş alan **A bandı** olarak isimlendirilmektedir. A bandının ortasında sadece kalın filamentlerin görüldüğü iki Z çizgisi arasındaki kısım **“H bölgesi”** olarak isimlendirilir (Şekil 2-1) (3).



Şekil 2-1: İskelet kasının yapısı (3)

İskelet kas hücreleri Tip I (Kırmızı) ve Tip II (Beyaz) kas lifleri olmak üzere ikiye ayrılır. Çoğunlukla kaslar hem beyaz hem de kırmızı kas fibrillerini taşırlar. Tip I ve Tip II kas lifleri fonksiyon ve morfolojik olarak birbirinden farklıdır (Tablo 2-1)(2). Tip I ve Tip II kasların motor sinirleri ayrıdır ve kasın özelliklerini belirlediği de çalışmalarda gösterilmiştir (2).

Tablo 2-1: Tip I ve Tip II Kas Fibrillerinin Karşılaştırması (2)

Tip I Kas Lifi	Tip II Kas Lifi
Kırmızı kas, yavaş kas olarak da isimlendirilir.	Hızlı kas, beyaz kas olarak da isimlendirilir.
Miyogloblin içeriği zengindir.	Az miktarda miyogloblin taşır.
Kan damarları yoğundur. Uzun süre yorulmadan kasılabilir.	Kan damarları azdır. Çabuk yorulurlar.
Kas fibrillerinin çapı küçüktür ve bol miktarda mitokondri taşır.	Kas fibrillerinin çapı büyüktür ve az miktarda mitokondri taşır. Daha yoğun olarak glikojen taşır.
Enerjisinin çoğunu lipidlerden sağlar.	Enerjisinin çoğunu glikolizis ile sağlar.

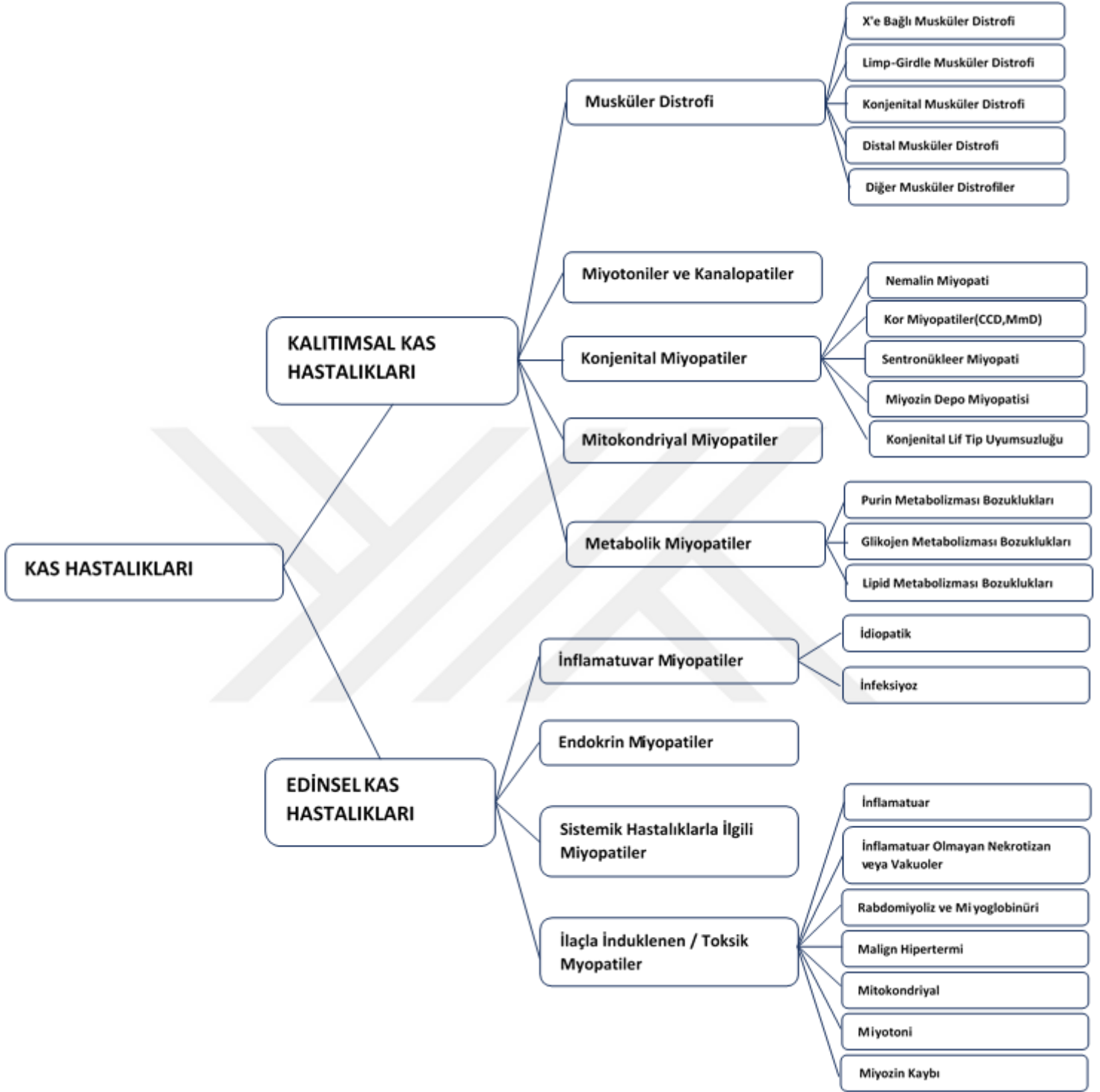
2.2. İSKELET KASI HASTALIKLARI

Yapısal ve fonksiyonel kas bozuklukları **miyopatiler** olarak isimlendirilmektedir. Miyopatiler merkezi sinir sistemi, yavaş motor nöronlar, periferik sinirler veya ikincil olarak kas güçsüzlüğüne neden olan nöromusküler bağlantıları içermeyen hastalıklardır ve sınıflandırılmaları Tablo 2-2’de belirtilmiştir. Miyopatiler, motor ünitenin karakteristik laboratuvar ve klinik bulguları ile diğer kas hastalıklarından farklıdır (4).

Bir motor ünite dört bileşenden oluşur:

1. Bir motor nöron
2. Motor nöronun akson ve terminal kısımları
3. Her terminal sinirin sonunda yer alan nöromusküler bağlantılar
4. İskelet kas fibrilleri (aksonlar ile merkezi sinir sistemine bağlanmaktadır.)

(4).



Tablo 2-2: Kas Hastalıklarının Sınıflandırılması (4)

2.3. KONJENİTAL MİYOPATİLER

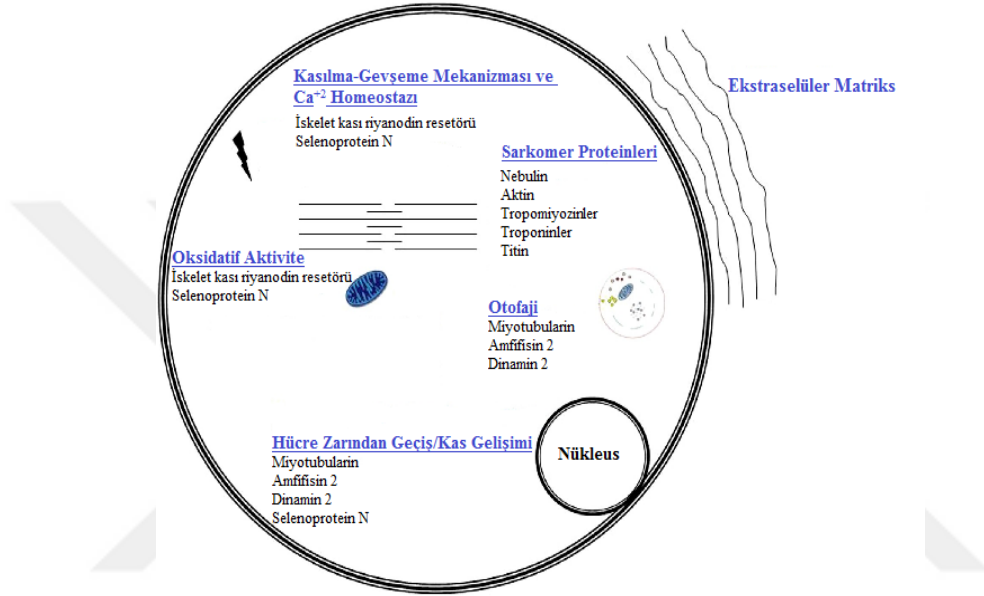
Konjenital miyopatiler; erken başlangıçlı (prenatal ya da erken bebeklik döneminde) temel olarak tekil veya çoklu korlar, çoklu merkezi çekirdekler, nemalin çubuklar ve kas lifleri arasındaki uyumsuzluk ile tanımlanan kalıtsal nöromusküler hastalıklardır (5). Hastalar, yaşam kalitesini çok etkilemeyen formundan ölümcül olabilecek kadar ağır klinik bulgulara kadar, farklı fenotipik özelliklere sahip olabilmektedir. İskelet kasında meydana gelen fonksiyon bozukluğunu tespit etmek için yapılan kas biyopsisinde, hastalığa özgün, anormal ve distrofik özellikleri olmayan histopatolojik bulgular ile tanı konulmakta, genellikle de kas histopatolojisinin ilişkili olduğu gen tahmini yapılabilmektedir (6). Ancak konjenital miyopati tanısı ile uyumlu klinik bulguları olan ve genetik olarak doğrulanan vakalarda özgün olmayan histopatolojik bulgular da raporlanmıştır (5). Histopatolojik bulgulara göre; çekirdek, sarkolemma, z disk, inklüzyon cisimciklerinin ya da organellerin anormal özellikleri göz önünde bulundurularak; yapısal konjenital miyopatiler ve yapısal olmayan miyopatiler olarak sınıflandırma yapılabilmektedir (7). Buna göre MmD hastalığı yapısal konjenital miyopatilerden kor miyopatilerinin içerisinde sınıflandırılmaktadır.

Diğer yandan son zamanlarda elde edilen moleküler verilerden sonra, majör konjenital miyopatilerin sınıflandırılmasında yeniden düzenlenme yapılması ihtiyacı oluşmuştur (7). Majör konjenital miyopatiler moleküler bilgiler dikkate alınarak, güncel bilgiler doğrultusunda aşağıdaki gibi 5 alt sınıfa ayrılmıştır (8).

1. Nemalin Miyopati (NM)
2. Kor Miyopatileri (CCM, MmD)
3. Sentronükleer Miyopati (CNM)
4. Miyozin Depo Miyopatisi (MDM)
5. Konjenital Lif Tipi Orantısızlığı (CFTD)

Histopatolojik değerlendirmelerde, kas morfolojilerindeki karakteristik bulgulara göre hastalık etkeni genin hangisi olabileceği genellikle tahmin edilebilmektedir. Konjenital miyopatilerin histopatolojik bulguları ile hastalık etkeni olan genlerin ilişkisi daha karmaşıktır ve bu hastalık grubu klinik ve genetik olarak heterojendir. Ayrıca konjenital miyopatiye neden olan bir mutasyon; aile

bireyleri arasında ya da bireyin gelişim dönemine göre farklı klinik ve histopatolojik bulgulara neden olabilmektedir (9). Konjenital miyopati etiyopatogenezinde (Şekil 2-2); kasılma-gevşeme mekanizması, iskelet kasında kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazı, impuls iletimi, otofaji, oksidatif aktivite, kas liflerinin yapısı ve işlevinde rol alan proteinlerdeki bozukluklar etkili olmaktadır (9).



Şekil 2-2: Konjenital miyopatilerde rol oynayan patojenik mekanizmaların şematik gösterimi (9).

Konjenital miyopati tanısı almasına rağmen genetik olarak sebebi belirlenememiş, genetik temelinin aydınlatılması gereken 1/3 oranında konjenital miyopati mevcuttur (5).

2.4. MULTIMINICORE HASTALIĞI

İlk kez 1971 yılında, Engel ve Gomez tarafından “multicore” hastalığı olarak isimlendirilerek kas liflerinin çok yönlü dejenerasyonu ile ilişkili konjenital miyopati olarak tanımlanmıştır (10, Kaynak:11 p.60). Currie ve arkadaşları tarafından 1976 yılında “minicore” hastalığı olarak isimlendirildi (12, Kaynak:13 p.12).

MmD hastalığı, Heinz Jungbluth tarafından; kas lifinin boyuna ekseninin sınırlı kısımlarında bulunan, oksidatif aktivitenin azaldığı çok sayıda alanın varlığı

ve konjenital miyopati klinik bulgularının varlığı ile karakterize kalıtsal nöromusküler bir hastalık olarak tanımlanmıştır (14).

Hastalık fenotipi ilr ilişkilendirilmemiş farklı genlerde, kalıtım şekillerinin de farklılık gösterdiğini belirten araştırmalar mevcuttur. MmD hastalığının çok farklı klinik bulguları olabilmektedir. Bu farklılıklar moleküler temelde incelendiğinde genetik heterojeniteyi göstermektedir (15, 16, 17, 18). Nozolojik çeşitlilik, fenotip değişkenliği, genetik heterojenite, küçük alanlarda özgün olmayan sarkomer düzensizliğinin belirlenebilmesi gibi zorluklar nedeniyle MmD çalışmaları zorludur (11).

2.4.1. Multiminicore Hastalığının Epidemiyolojisi

Epidemiyolojik araştırmalar sadece konjenital miyopatiler için mevcuttur. Tüm konjenital miyopatilerin canlı doğumlarda görülme sıklığının 0.06/1000 civarında olduğu ya da bütün nöromusküler vakaların 1/10'u olduğu belirtilmektedir (18, Kaynak: 19 p.102). Kuzey İrlanda (18, Kaynak: 20 p.69-73). ve Batı İsveç (18, Kaynak: 21 p.1-9) bölgelerinde konjenital miyopati prevalansı; pediatrik popülasyonda 3.5-5.0/100.000 olarak raporlanmıştır (18). Konjenital miyopati prevalansı ile ilgili ülkemizde yapılan bir çalışma bulunamamıştır.

2.4.2. Klinik Değerlendirme

Neonatal hipotoni, motor gelişim geriliği, genel olarak kas zayıflığı ve amiyotrofi bulgularının stabil olması ya da yavaş olarak ilerlemesi MmD hastalığının en yaygın klinik bulgularındandır. Zeka düzeyi her zaman normal sınırlardadır. Minor ya da sekonder olarak kardiyak anormallikler gözlemlenebilir. Solunum bozukluğu sekonder olarak kalp yetmezliğine neden olabilmektedir (14). Ayak bileği gibi eklem bölgelerinde ya da omurgada cerrahi müdahale gerektiren retraksiyonlar (kontraktür), trakeostomi gerektiren solunum yetmezliği gibi fenotipik özellikler hastalığın şiddeti hakkında bilgi vermektedir (22). Genellikle bebeklik ya da çocukluk döneminde hipotoni ya da kas güçsüzlüğünün görüldüğü prenatal başlangıçlı vakalarda fetal hareketlerdeki azalma ve polihidroamniyoz mevcuttur (15, 16). Serumda kreatin kinaz (CK) seviyesi genellikle normaldir. Artış gösterdiği vakalarda ise hiçbir zaman referans değerin üst sınırının 4 katından daha fazla olmamaktadır. EMG bulguları normal ya da bazen özgül olmayan miyopatik bulgular olarak raporlanmıştır (22).

MmD hastalığı klinik özelliklere göre 4 alt gruba ayrılmaktadır (15) .

Klasik form: Aksiyal kasların zayıflığı, ağır skolyoz ve hayatı tehdit edebilecek düzeyde solunum güçlüğü gözlenen bu form, MmD tanısını alan hastaların 2/3'sini kapsamaktadır. Başlangıç yaşı erkendir. Bu grupta, beslenme güçlüğü olan vakalar mevcuttur. Motor gelişim geriliği erken görülen bir bulgudur. Eksternal göz hareketleri normaldir. Boyun ve gövde kaslarının kontraktürleri ciddi toraks deformitelerinin oluşmasına neden olmaktadır (11, 15).

El amiyotrofinin olduğu hafif form: Yavaş ilerleyen, el kaslarının zayıflığı, amiyotrofi ve hiperlaksite görülen, en fazla pelvik kuşağı etkileyen MmD hastalığının alt grubudur. Solunum güçlüğü ya da skolyoz fenotipte hafif şiddette görülebilir ve bu alt grup için belirleyici bir özellik değildir. Hipotoni, kas zayıflığı, motor gelişim geriliği, nadiren beslenme ve solunum güçlüğü gibi özgül olmayan fenotipik bulgular tanımlanmıştır (11).

Artrogripozlu olan erken başlangıçlı form: Çoğul eklem kontraktürleri, az gelişmiş ve kontrakte kaslar, ekstremitelerde deformiteleri olan ancak duyu sorununun olmadığı alt gruptur (15). Artrogripoz, dismorfik özellikler (düşük kulak, kısa boyun, yüksek kemerli damak), erken ve şiddetli kifoza ya da kifo skolyoz, azalmış vital kapasite raporlanan fenotipik özelliklerdir. Kas gücünün stabil kaldığı belirtilmiştir (11).

Oftalmoplejik form: Düz toraks yapısı, faringolaringeal tutulum ve şiddetli skolyozdan kaynaklanan baş kontrolünün olmadığı klasik MmD fenotipine ek olarak oftalmopleji bulguları taşıyan alt gruptur. Diğer gruplarda faringolaringeal tutulum görülmemektedir (15, 22, 23).

2.4.3. Patolojik/Histopatolojik Bulgular

MmD hastalığı, histopatolojik değerlendirmelerde, miyofibriller düzensizlik ve miyofibrillerde mitokondriyal oksidatif aktivitenin azaldığı çok sayıda küçük korların varlığı ile karakterizedir. Çoklu küçük korların; Tip 1 ve Tip 2 fibrillerinin her ikisinde birden görülmesi ve kas fibrillerinin uzunluğu boyunca yerleşim göstermemesi multi-korların karakteristik özellikleridir. Küçük korlar, Marfan sendromu, inflamatuvar miyopati, müsküler distrofiler gibi bazı iskelet sistemi hastalıklarında da görülebilmektedir. Küçük korlar çok sayıda ve yaygın özellik

olarak gözlemlendiğinde MmD tanısı düşünülmelidir (12). Işık mikroskobu ile görülmeyen MmD fenotipine özgü küçük korlar ve histopatolojik özellikler elektron mikroskobu ile incelenmelidir (24, 15)

Kas fibrillerinin büyüklüklerinin değişkenliği, Tip 1 fibrillerinin baskınlığı, Tip 2 fibrillerinin daha büyük çapta olması MmD hastalığının belirleyici özelliklerinden birisidir. Endomisyal fibrozis, rejenerasyon-nekroz gibi distrofik bulguların olması MmD tanısını dışlamak için yeterlidir. NADH-TR ile boyanan MmD hastalarının kas biyopsilerinde; daha koyu boyanan Tip1 ve daha açık boyanan Tip 2 kas fibrillerinin sınırlı alanlarında, oksidatif aktivitenin yokluğu ya da azlığı görülebilmektedir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde; Z çizgilerinin ve sarkomer sınırlarının düzensizliği, miyofibriller yapının organizasyon bozukluğu tespit edilmiştir (22).

2.4.4. Moleküler Etiyopatogenezi

MmD klinik heterojenite gösterdiği gibi genetik olarak da heterojen bir hastalıktır (11, 15). MmD hastalığının alt grupları ve ilişkili olduğu genler Tablo 2-3’de verilmiştir.

Hastalığın sporadik, otozomal resesif kalıtım şekilleri yayımlanmıştır. Nadiren otozomal dominant kalıtım gösteren vakalar da raporlanmıştır (25, 26, 27, Kaynak:11 p.61-64).

Hastalıkla ilişkili olarak en fazla raporlanan genler *RYR1* ve *SEPN1* genleridir (14). *TTN*, *MYH7*, *MEGF10* ve *ACADS* genleri, MmD ile ilişkilendirilen diğer genlerdir (Tablo 2-3)(17, 30, 31, 32).

***RYR1* geni;** mutasyonlarından etkilenen malign hipertermi fenotipi ile birlikte MmD fenotipi gösteren veya MmD nin el amiyotrofinin olduğu hafif formu gösteren hastalar raporlanmıştır (28, 29).

***TTN* geninde** tespit edilen yanlış anlamlı varyantın titin proteinin yapısında bozukluğa neden olarak, otozomal resesif kalıtılan, kalp hastalığının da fenotipte görüldüğü MmD nin klasik form fenotipine neden olduğu tespit edilmiştir (30).

***MYH7* geninde** yer alan mutasyonlar kardiomiyopatiye ve geniş spektrumu olan iskelet miyopatilerine (“Laing” distal miyopatisi, Konjenital lif tipi uyumsuzluğu –CFTD- , miyofibriller miyopati ve kor miyopatisi –“multiminicore”

miyopatisi de dahil-) neden olmaktadır. *MYH7* geninde yer alan aynı mutasyonun biri aksiyal miyopati diğeri MmD kliniği gösteren iki vakada çok farklı bulgulara neden olduğu raporlanmıştır (17).

MEGF10 genindeki mutasyonlar, doğum öncesi, bebeklik başlangıçlı, kas biyopsisinde küçük korları olmayan miyopatiye ve çeşitli fenotiplere yol açabilmektedir. Yenidoğan ya da bebeklik döneminde eklem kontraktürleri olan; yetişkin başlangıçlı solunum yetmezliği, kas biyopsisinde küçük korları olan ve eklem hiperlaksitesi olan MmD formlarına neden olabilmektedir. Solunum yetmezliği ve skolyoz, *MEGF10* geni ile ilişkili miyopatinin ortak özellikleri olarak belirtilmektedir. *MEGF10* gen analizi, erişkin başlangıçlı solunum yetmezliği ile kendini gösteren, özellikle kas patolojisinde küçük korların varlığında ortaya çıkan kalıtsal miyopatili hastalarda düşünülmelidir. (31)

ACADS geninde mutasyon taşıyan ve oftalmopleji ile birliktelik gösteren MmD fenotipi raporlanmıştır (32).

Tablo 2-3: MmD formları ve ilişkili genler

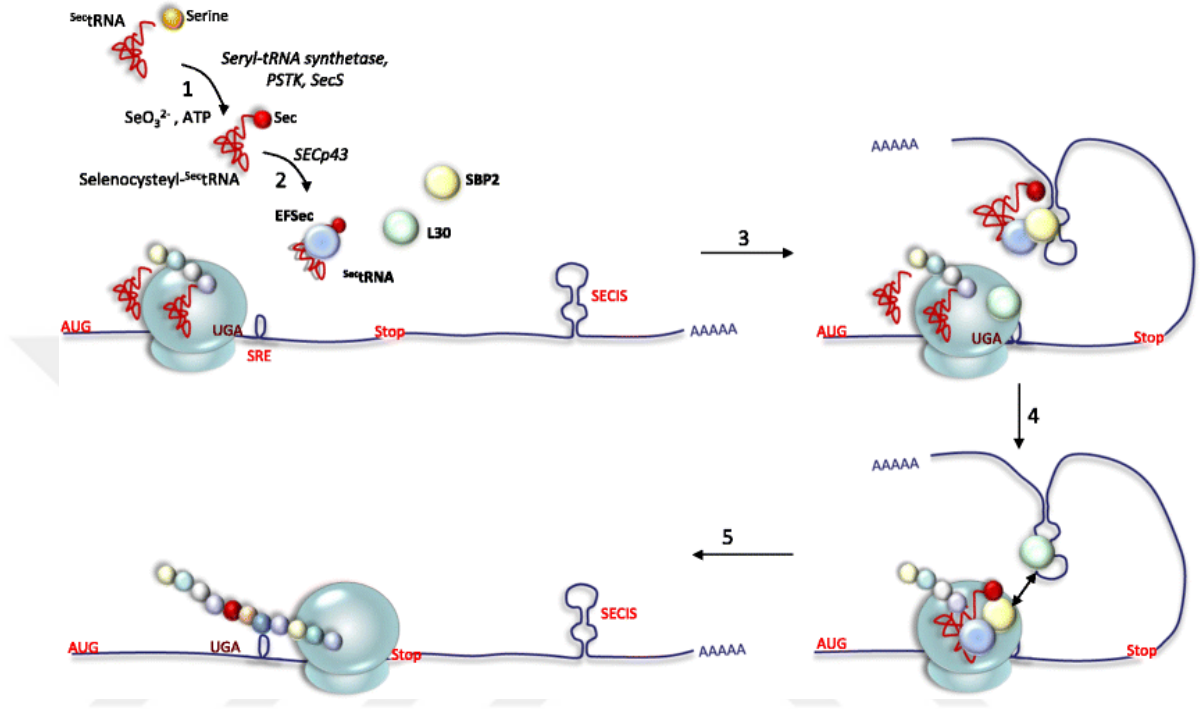
MmD Formu	Etkili Olan Genler	Kalıtım Şekli	Başlangıç dönemi	Mutasyon Çeşiti	Kaynak No
Klasik Form	<i>SEPN1</i>	OR	Bebeklik	Yanlış Anlamli, Kesilmeyi Etkileyen ve Anlamsız Mutasyonlar	11, 22, 33
	<i>MYH7</i>	OR	Bebeklik Erişkin	Yanlış Anlamli Mutasyon	17
	<i>TTN</i>	OR	Erişkin	Kırılma Mutasyonu	30, 34
El amiyotrofinin olduğu yavaş ilerleyen form	<i>RYR1</i>	OR	Erişkin	-	28, 29
Artrogripoz olan	<i>RYR1</i>	OR	Bebeklik	Yanlış Anlamli	28,29

erken başlangıçlı form				Mutasyon	
	<i>MEGF10</i>	OD	Yetişkin	Yanlış Anlamlı Mutasyon	31
Oftalmoplejik Form	<i>RYR1</i>	OR	Bebeklik Erişkin	Kırılma, Anlamsız ve Yanlış Anlamlı Mutasyon	23
	<i>ACADS</i>	OR	Bebeklik	Yanlış Anlamlı Mutasyon	32

2.4.4.1. *SEPN1* Geni

Selenosistein, serin aminoasitinin selenyum içeren türevidir. Selenosistein içeren proteinler selenoprotein olarak adlandırılır. *SEPN1* geni tarafından kodlanan selenoprotein N (SelN), insanlarda kalıtsal hastalıklara doğrudan neden olduğu bilinen selenoprotein ailesinin tanımlanmış ilk üyesidir (35). *SEPN1* geni ilk olarak 1999 yılında Lescure ve arkadaşları tarafından SECIS elementinin bilgisayar ortamında belirlenebilmesine dayanarak tanımlanmıştır (36). SelN ortolojileri tüm omurgalılarda; ekinodermiler, annelidler veya eklembacaklılar da dahil olmak üzere bazı omurgasızlarda tespit edilmiş, ancak bitkilerde veya bakteriyel genomlarda tespit edilememiştir (37). İnsanlarda, *SEPN1* geni kromozom 1p35-p36 üzerinde bulunur ve protein ürünü selenoprotein N endoplazmik retikulumda yer alan bir glikoproteindir. *SEPN1* geni kodlanan dizisi, ekzon 10 içinde yer alan ve kodlanan UGA dahil olmak üzere 13 ekzondan oluşur. İnsanlarda bulunan Alu dizisinden oluşan üçüncü ekzon, sadece primatlarda bulunmaktadır ve bu dizinin alternatif olarak ifade edilmesi ile *SEPN1* geninin iki transkript izoformu oluşur. Kısa transkript yaygın olarak ifade edilir ve büyük izoformun 3. ekzon içindeki bir durdurma kodonu olan, ikinci bir çerçeve içi UGA kodonunun varlığı nedeniyle, protein seviyesinde saptanmaz (38). Selenyumun temel biyolojik formu, tRNA'ya bağlı serinden sentezlenen bir sistein analogu olan selenosisteindir (Sec)(39). Okuma çerçevesi içerisinde yer alan sonlandırma kodonu olan UGA dizisinin 21. aminoasite dahil edilmesi benzersiz ve kendine özgü şekilde gerçekleşir. UGA

dizisinin stop kodonu yerine Sec kodonu olarak algılanabilmesi için UGA kodonunun ilerisinde ökaryotik selenoprotein transkriptinin 3'UTR bölgesinde birkaç yüz ya da birkaç bin baz çiftinden oluşan SECIS olarak adlandırılan “stem loop” yapısını bulundurması gerekmektedir (39, 40).



Şekil 2-3 Ökaryotlarda selenosistein amino asidin sentezi ve eş zamanlı olarak translasyon birleşimi(35)

Selenosistein (Sec) aminoasitinin sentezinde ilk sırada spesifik tRNA^{Sec} yer alır. Şekil 2-3’de, 1. basamakta; tRNA^{Sec} önce seril-tRNA sentetaz ile serillendirir, daha sonra fosfo-seril tRNA kinaz (PSTK) tarafından fosforile edilir ve son olarak da selenosistein sentaz (SecS) ile bir selenosistein grubuna dönüştürme işlemi gerçekleşir. Reaksiyonun özgüllüğü, tRNA^{Sec} dizisi ve konformasyonu tarafından belirlenir. 2. ve 3. basamakta, Sec-spesifik çeviri faktörleri ile tRNA^{Sec} etkileşimi, EFSec ve SBP2 (mavi ve sarı daireler), L30 proteini (yeşil daire) ile dinamik rekabet içinde olan SECp43 varlığında, 4. basamakta gösterildiği gibi ribozom A bölgesine daha fazla yaklaşır ve bu sayede SECIS “stem-loop” yapısı (çift ok) ile etkileşirler. 5. basamakta gösterildiği gibi SECIS üzerindeki selenosistein molekülü, yeniden programlanan UGA kodonuna yanıt olarak peptid dizisine dahil edildikten sonra, çeviri bir sonraki durma kodonuna kadar devam eder. SECIS bağlama proteinleri, özel bir uzama faktörü (EFsec) ve bir

selenosisteil-tRNA ile birlikte fonksiyonel bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin bozulması veya selenyum eksikliği, UGA kodonunda erken sona erme ile sonuçlanır ve “nonsense-mediated decay” yolağı ile selenoprotein mRNA'larının parçalanmasına neden olur (35).

İnsan embriyo hücrelerinde Selenoprotein N ifadesi yüksek bulunması, embriyogenezde kas oluşumunda rol oynadığını göstermektedir (38).

SEPN1 ile ilişkili miyopati bulguları taşıyan hastaların biyopsi numunelerinin histopatolojik incelemelerinde; sağlıklı ve diğer patolojik kontrollere göre satellit hücrelerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgu kas rejenerasyonunda *SEPN1* in önemli rolü olduğunu göstermektedir(41).

İn siliko analizlerde, *SEPN1* geninin promotör bölgesinde CpG adacıklarını içerdiği, transkripsiyon faktörü NF-kB için öngörülen hedef alanlarının yer aldığı, bir endoplazmik retikulum stres yanıt elemanı ve redoks duyarlı transkripsiyon faktörü AP1 için bağlayıcı alanların bulunduğu belirlenmiştir (42, 43). SelN defekti olan hastalardan alınan miyotüplerde ve ölümsüz fare myoblast hücre hattında *SEPN1* geninin “knock-down” edilmesiyle yapılan çalışmalarda artmış basal oksidatif aktivite gözlenmiştir (44, 45). Bu çalışmalar nedeniyle oksidatif homeostaz, oksidasyon-redüksiyon mekanizmalarında SelN'in rol oynadığı düşünülmektedir. Selenoproteinler reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize ederek ve/veya hasarlı makromolekülleri onararak oksidatif ve/veya retiküler strese karşı hücre korumasında belirleyici bir rol oynamaktadır (46, 47).

Selenoprotein N'in ryanodin reseptörünün regülasyonunda ve kalsiyum homeostazında rol oynadığı düşünülmektedir (48). Matur liflerde, SelN büyük olasılıkla ryanodin reseptörünün kanal aktivitesinin korunmasına ve oksidatif hasara karşı hücre savunmasına katılır. SelN aktivitesinin yokluğunda, ryanodin reseptörünün değiştirilmesi, mitokondriyal homeostazı bozabilecek, retiküler strese neden olabilecek ve hücre ölüm yolunu ve diğer kalsiyuma bağlı sinyalleme aktif edebilecek artmış kalsiyum sitoplazmik konsantrasyona yol açabilir. Bu yolların bir kısmının, hücrel proteolizi arttırarak lif anahtarını daha yavaş tiplere ve sarkomerik düzensizliğe doğru indüklediği bilinmektedir (49, 50). Hem *SEPN1* hem de *RYR1* ile ilişkili miyopatilerde mitokondriyel fonksiyon azlığı/yokluğunun

altında yatan neden, endoplazmik retikulum ve mitokondri arasındaki kalsiyum aracılı etkileşimin etkilenmesi olarak düşünülebilir (22).

2.5. TÜM EKZOM DİZİLEME

Yaklaşık olarak 20.000 gen, 180.000 ekzondan oluşan protein kodlayan bölgelerin dizilenmesine tüm ekzom dizileme (Whole Exome Sequencing-WES) denilmektedir. WES ile genomun yaklaşık olarak %1'i (ekzon ve splice bölgeleri dahil) dizilenmektedir (51). Hastalık etkeni varyantların %85'inin genomun kodlanan ve fonksiyonel bölgelerinde yer aldığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle tüm ekzom dizileme verilerinin analiz edilmesiyle nadir hastalıklar, monogenik genetik bozukluklar, yaygın hastalıklar ve kansere yatkınlık sağlayan varyantlar ortaya çıkarılabilmektedir. Ekzom dizilerinden elde edilen varyantların hastalık etkeni olduğu düşünülse dahi; epigenetik mekanizmaların fenotipi etkilediği hastalıkların ve intronik bölgelerdeki düzenlemelerin klinik önemi bilinmemektedir. Tüm genom dizisinin tanımlanmamış bölgeleri bulunmaktadır (52).

Hastalıkla ilişkili genlerin Yeni Nesil Dizileme (*Next Generation Sequencing*-NGS) ile dizilenmesi zaman ve maliyet açısından avantaj sağlayabilir. Klinik fenotipleri örtüşen, genetik heterojenite gösteren, diğer testlerle ayırt edilmesi güç ve maliyetli olan fenotiplerde, WES tanıyı kolaylaştırmakta ve bilgi sağlamaktadır. Preklinik vakalarda, genetik ve fenotip olarak heterojen olan kompleks hastalıkların tanısında, neonatal taramasında ve non-invaziv prenatal anöploidi tanı testlerinin çalışılmasında WES tercih edilmektedir. Tanı, preklinik bireylerin prognozu, yenidoğan tarama prosedürleri, terapötik yaklaşımları belirlemede; moleküler süreçleri inceleyerek ileri düzey tanı ve tedavinin gelişmesine; sonrasında "kişiselleştirilmiş tıp" uygulamalarına imkan tanınması düşünülmektedir. WES; hastalık etkeni olan ve hastalıklara yatkınlık sağlayan genleri/varyantları tanımlamada, kanserde germ hattı ve somatik mutasyonların tespit edilmesinde de kullanılabilir. WES verisi genel olarak değerlendirildiğinde bazı kısıtlamalar da söz konusudur (52, 53).

2.5.1. TÜM EKZOM DİZİ DEĞERLENDİRME

Tüm ekzom dizileme analizi genel olarak ham data (veri) kalite kontrolü, ön işleme, hizalama, varyant çağırma, yorumlama ve nceliklendirme aşamalarından oluşur (54).

Ham data kontrolü; nükleotit ya da aminoasitleri ifade eden harfleri çizgilerle ifade ederek dizi isimlerinden oluşan metin tabanlı format FASTA'dır. Dizi kalitesinin değerlendirilmesine olanak sağlayan "Phred" skorlama tabanlı, kalite skorlamayı içine alan FASTQ dosyaları NGS yönteminin standart ham data dosyalarıdır. Phred skoru; insan genom projesinde DNA dizilemede tespit edilen bazların belirlenmesinde kalite ölçütü olarak kullanılan skorlamadır. En kısa ve öz ifade ile bazların kalite skorudur (54).

n işleme; 3 ' uçlu adaptörün çıkarılmasını ve okumaların uçlarındaki düşük kaliteli bazların kırılmasını, çalışmanın dizaynına ya da datanın kullanımına bağlı olarak primer, adaptor ya da diğer özelliklerin kontaminasyonundan kaynaklanan gereksiz okumaların ve istenmeyen dizilerin çıkarılabildiği hizalama öncesinde gerekli olup olmadığının kontrol edilmesi gereken aşamadır. FASTQ dosyaları kullanarak; FastQC programından üretilen kapsamlı bir ham QC raporu ile araştırmacılar, hizalamadan önce, temel kırpma, okuma filtreleme veya adaptör kırpma gibi ön işleme adımlarının gerekli olup olmadığını belirleyebilirler (54).

Hizalama işleminde; kalitesi değerlendirilen uygun olmayan kısımları ıkarılan NGS ıktıları referans genoma yüksek verimlilik ve doğrulukla eşleştirilmesi yani hizalanması gerekmektedir. Genomik varyasyonların olabilmesi nedeniyle eşleştirme esnasında kullanılan dosya ya da programın hatalı eşleşmelere tolerans göstermesi gerekmektedir. Kısa okumaların haritalanması için programlar geliştirilmiştir. Hizalanan verilerin hassasiyet ve kesinliğinin değerlendirilmesi gerekmektedir (54).

Varyant ağırma; WES ile elde edilen tüm ekzom dizilerinin referans genom ile hizalandıktan sonra referans alelleri ve polimorfizmleri dışlayarak varyantların belirlenmesi, genomik pozisyonunun tanımlanması, varyant türünün tespit edilmesi işlemidir. Referans genoma hizalanan verilerde, varyantın germ hattı ya da somatik olması ve SNVs, indel, CNVs gibi farklı genomik varyant türü olup olmadığı değerlendirilmektedir (54).

Yorumlama aşamasında; genomik özelliği, gen sembolü, polimorfizm olup olmadığı, ekzonik fonksiyonu, evrimsel korunmuşluğu ve aminoasit değişikliği gibi varyantın özelliklerinin tanımlanmasıdır. Varyant ile ilgili bilimsel çalışma olup olmadığı, bilgisayar ortamındaki araçların patojenite tahminleri, doku spesifik ekspresyon düzeyi, transkripsiyon bağlama bölgeleri, histon modifikasyonu gibi detaylı bilgileri de ENCODE projesinden, “regulomeDB” ve “HaploReg” halka açık veritabanlarından elde edilebilir. Evrimsel korunmuşluk için “PhyloP”, “GERP” bilgisayar ortamı araçları kullanılabilir. Cosmic ve Clinvar gibi varyantların hastalık patogenezi ile ilgili deneysel kanıtlardan oluşan veritabanları değerlendirilir. KEGG yolak analizleri ile varyantın etkilediği süreçler incelenir (54).

Deneysel validasyon işleminde kısa varyant listesi oluşturmak için gen önceliklendirme ve varyant filtreleme önemlidir. İlk aşama; hastalık bilgisine uygun olarak gen önceliklendirilir (54). Literatür, protein-protein etkileşimleri, etkilenen yolaklar gibi veri kaynaklarını kullanarak ilgilenilen biyolojik süreçte (hastalık, fenotip vb) etkili olabilecek kromozomal bölgeler, bu bölgelerde yer alan ya da etkileşimde olan genlerin önceliklendirilmesi gerekmektedir. Önceliklendirme işlemi için sayısal hesaplama formüllerini, farklı veri kaynaklarını kullanarak fenotip, yolak, hastalık ile ilgili aday genleri tespit eden web araçları geliştirilmiştir (55). İkinci aşama; düşük kalite, düşük kapsam düşük güvende okuma bölgeleri ve SNV kümelerinin filtrelenmesidir. Üçüncü basamak ise sık görülen varyantların toplumsal alel sıklığı nadir görülen hastalıklara göre daha fazla olacaktır (54).

Illumina platformu tarafından dizilenen WES örneklerinde 50x veya daha yüksek derinlikte dizileme önerilirken, tümör örneklerinde tümör içi genetik heterojenite nedeniyle en az 125x derinlikte dizileme önerilir (54).

2.5.2. VARYANT ANALİZİ

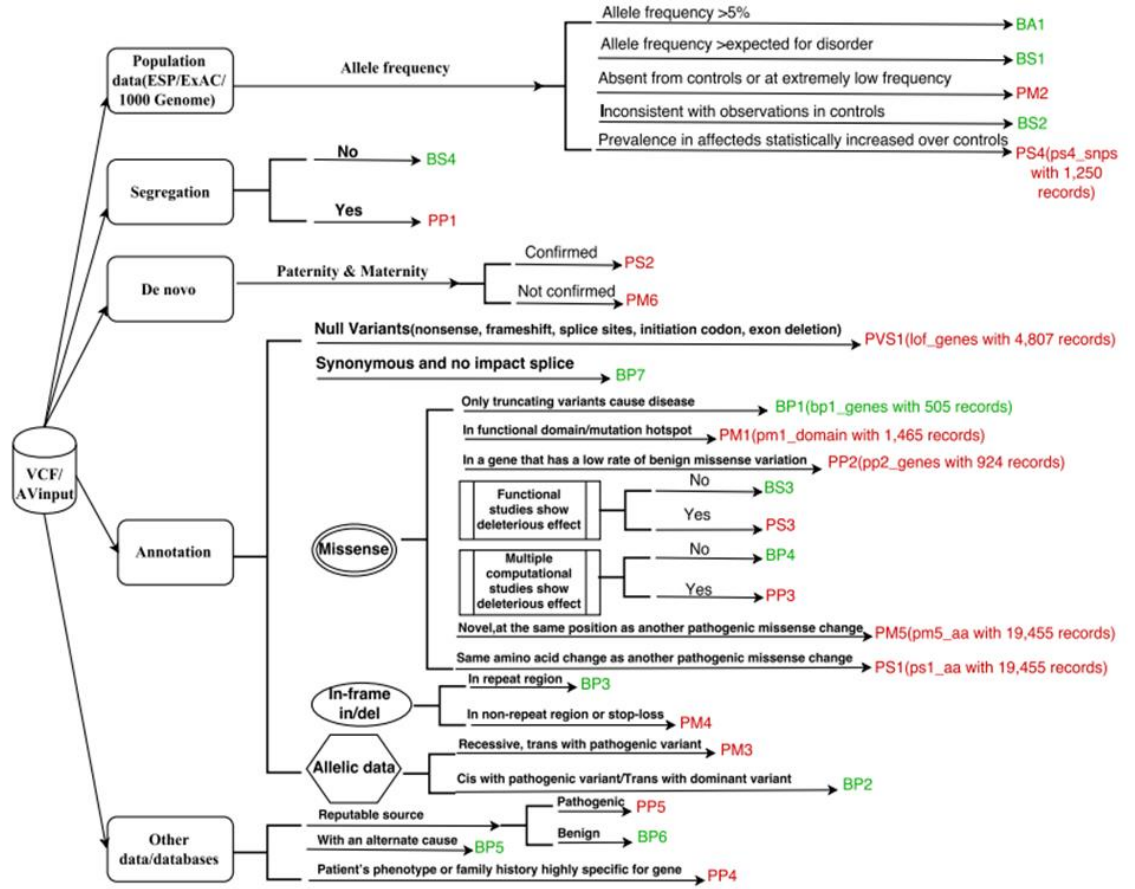
Son yıllarda hızla gelişen yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisi, kısa sürede çok fazla genetik verinin elde edilmesini sağlamıştır. Elde edilen genetik bilginin büyüklüğü ve kompleksliği, değerlendirilmesi için uygun yöntemler belirlenmesini gerekli kılmıştır. Mevcut durumda elde edilen genetik bilginin boyutları, anlamlı varsayılan durumlar doğrultusunda, ilgili uzmanların önerileri ile DNA dizileme sonucunda elde edilen verilerin standart metodoloji ile değerlendirilmesi

amaçlanmaktadır. Bu amaçla ACMG uzmanların uygulama ve deneyimlerini de dikkate alarak yaptığı çalışmalarla, varyant değerlendirmesi için metodoloji geliştirilmiştir (56).

Nükleotit dizindeki kalıcı değişiklik mutasyon olarak tanımlanırken, polimorfizm ise toplumda %1 'in üzerinde sıklıkla görülen varyantlar olarak tanımlanmaktadır. Bu durum, patojenik ya da benin etkilerde yanlış varsayımlara neden olduğundan “varyant” terimi ile değiştirilmesi ve niteleyici ifadelerle birlikte kullanılması uygun bulunmuştur. Bu niteleyiciler patojenik, muhtemelen patojenik, önemi belirsiz, muhtemelen benin, benin olmak üzere 5 basamaklı sistemden oluşmaktadır. Patojenite bildirimlerinde varyant pozisyonu, değişim, varyant türü, hastalık ve kalıtım şekli bilgilerini içerecek şekilde bir bütün olarak ifade edilmesi önerilir. Örn; c.715G>A (GRCh37 (hg19), ENST00000354177.4)(p.Gly239Arg), muhtemelen patojenik, MmD, otozomal resesif. “Muhtemel” ifadesinin tam olarak ne kadar kesinlik içeren bir ifade olduğunun belirlenmesi için araştırma yapıldığında; %90 kesinlikte patojen ya da %90 kesinlikte benin ifade edecek şekilde anlamlandırılması önerilmektedir (56).

Kalıtsal hastalık olarak şüphelenilen (öncelikle Mendel kalıtımı gösteren hastalıklarda) hastalara ait dizileme verisinden elde edilen varyantların yorumlanması için kullanılmalıdır. Hastalık etkeni olarak belirlenen varyantlar, hastalıkla ilişkilendirilen aday genlerde olmalıdır. Somatik varyasyonlar, farmakogenomik varyantlar, Mendel kalıtım göstermeyen multigenik ya da kompleks hastalıklarda ve aday genlerde olmayan varyantları yorumlamak için ACMG standartları kullanılmamalıdır (56).

ACMG Standartları aşağıdaki Şekil 2-4’de belirtilen uygulama akışına uygun olarak aile bilgisi, fenotip ve genotip verileri ile birlikte değerlendirilmelidir (57).



Şekil 2-4: ACMG Rehberinde belirtilen 28 kriterin uygulama sistematığı (57).

ACMG standartları doğrultusunda varyantların klinik öneminin yorumlanması için pratik ve etkin bilgisayar ortamında bir araç olan InterVar özellikle yüksek penetrans gösteren, doğumsal veya çok erken başlangıçlı gelişimsel bozuklukların değerlendirilmesinde faydalıdır. Varyantlarının yorumlama süresini oldukça kısaltmaktadır (57).

“SIFT” ve “PolyPhen-2” bilgisayar ortamındaki araçların patojen ve muhtemelen patojen varyantları tespitinin yetersiz olduğu manuel değerlendirmelerle ortaya konulmuştur (57).

Amendola ve ark. (2015) manuel olarak yorumladığı verilere göre; HGMD (Human Gene Mutation Database)’de patojenik olarak görülen varyantların büyük çoğunluğunun muhtemelen gerçek patojen olmadığı sonucuna ulaşmıştır (58). InterVar yorumlarının Amendola ve ark. (2015) ile uyumlu olduğu görülmüştür (57, 58).

InterVar'ın kısıtlamaları; doğru yorumlama için varyant veri tabanına ihtiyaç vardır. Çok çalışılan genler için klinik veritabanlarında daha çok giriş olduğundan daha doğru yorumlanması söz konusudur. Mendel kalıtımı gösteren hastalıkların daha doğru yorumlanması söz konusudur. 2. Adım manuel bilgi girişi gerektirdiğinden kullanıcı girişi doğrultusunda değerlendirilmektedir. Ciddi konjenital ya da çok erken başlangıçlı gelişimsel bozukluklar için varyant yorumlamayı neredeyse %100 penetrans ile ele almak uygundur. Ancak geç başlangıçlı ya da resesif hastalıklar için etkinliği daha düşük olabilir. Bunun nedeni “ESP6500/ExAC Browser” veritabanları kontrol veri tabanı olarak uygun olmamasından kaynaklanır. 1000 Genom projesi, genel kontrol denekleri için daha uygun olsa dahi nadir varyantlar için yetersiz olabilmektedir (58).

Dizileme sonuçlarından elde edilen hastalık etkeni olduğu düşünülen varyantların potansiyel patojenite etkilerini tahmin eden bilgisayar ortamındaki araçların yetersiz ve çelişkili sonuçlar verebilmesi nedeniyle kapsamlı kriterler tanımlanması gerekmektedir. ACMG standartlarına bu nedenle ihtiyaç duyulmaktadır (57).

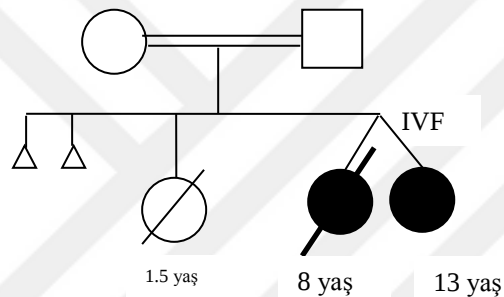
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Hasta Numuneleri

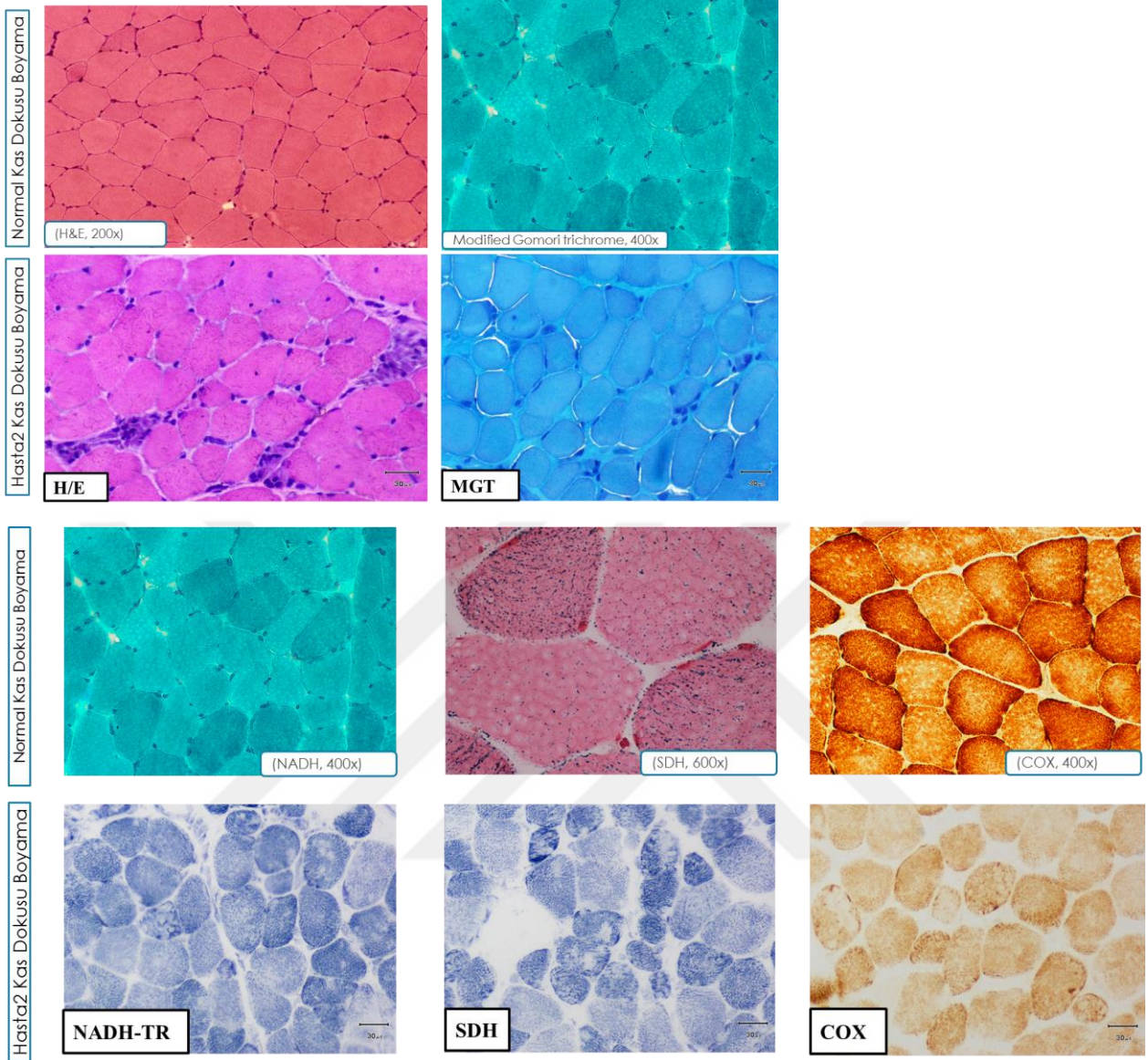
2011 yılında klinik ve histopatolojik bulgular ile MmD tanısı konulan ikiz çocuklardan (doğum tarihleri: 2006) ve ebeveynlerinden Medipol Üniversitesi'nde 2014 yılında tüm ekzom dizileme testi için kullanılmış olan DNA örnekleri kullanıldı.

MmD tanısı alan ikiz vakaların klinik bulguların varlığına göre oluşturulmuş aile ağacı aşağıdaki gibidir.



Akraba evliliği yapmış (1.derece, amca çocukları) ebeveynlerin nörolojik değerlendirmelerinde herhangi bir klinik bulguya rastlanmadı.

Hasta 2'nin klinik muayenesinde skolyoz, kas zayıflığı, motor gelişim geriliği, solunumu güçlüğü bulguları belirlenmiştir. Hasta 2'den alınan kas biyopsi numunesinde yapılan patolojik incelemede belirlenen bulgular Şekil 3-1'de gösterilmiştir. Hasta 2 gripal enfeksiyonu sonrasında 2014 yılında kaybedilmiştir. Otopsi yapılmamıştır.



Şekil 3-1: Hasta 2 ye ait histopatoloji görüntüleri

3.1.2. Çalışmalarda Kullanılan Kontrol Numuneleri

Sanger dizileme ve gen ekspresyonu çalışmalarında; gönüllü olarak katılmak isteyen, sağlıklı kontrol 1, sağlıklı kontrol 2, sağlıklı kontrol 3 bireylerinden alınan periferik kandan izole edilen RNA dan sentezlenen cDNA numuneleri kullanıldı.

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 23.05.2017 tarih 527 sayılı kararı ile alınmıştır.

3.1.3. Kimyasallar

Deneyleerde kullanılan kimyasallar Tablo 3-1 'de listelenmiştir.

Tablo 3-1: Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası	Katalog Numarası
Etidyum Bromür	Sigma	E1510
Agaroz	Bioline	BIO-41026
PBS	Bioshop	PBS404.200
Etanol	Merck	8187601000
β -mercaptoetanol	Sigma	M6250
MgCl ₂ (25 Mm)	Fermentas	-
dNTP Mix (10 mM)	Fermentas	R0192
Taq Polimerase	Fermentas	EP0402
Taq Buffer (10X)	Fermentas	-
Loading Dye (6X)	Fermentas	R0611
Marker (100 bp, 50 bp)	Fermentas	-
ExoSAP	Thermo Fisher Scientific	78250
BigDye	Applied Biosystems	4336917
BigDye Buffer	Applied Biosystems	4336699

3.1.4. Kitler

Deneyleerde kullanılan kitler Tablo 3-2 'de listelenmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan Kitler

Kit Adı	Markası	Katalog Numarası
Thermo Dream Taq Master Mix	Thermo Scientific	K1071
RNeasy Plus Mini Kit (50)	Qiagen	74134

ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs	E6300S
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche	05091284001
Luna® Universal qPCR Master Mix	New England Biolabs	M3003S

3.1.5. Cihazlar

Deneyleerde kullanılan cihazlar Tablo 3-3 'de listelenmiştir.

Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar

Cihazın Adı	Markası	Bulunduğu Yer
Buzdolabı (+4 °C, -20 °C, -80 °C)		AS-DETAE, Genetik ABD
Buz Makinası	Cornelius	AS-DETAE, Genetik ABD
Soğutmalı Santrifüj		AS-DETAE, Genetik ABD
Nanodrop	NanoDrop Technologies	AS-DETAE, Genetik ABD
Elektroforez Tankı	İnvitrogen	AS-DETAE, Genetik ABD
Mikrodalga Fırın	Arçelik	AS-DETAE, Genetik ABD
Mini Trans-Blot Elektroforetik transfer sistem	Bio-Rad	AS-DETAE, Genetik ABD
Jel Görüntüleme Sistemi		AS-DETAE, Genetik ABD
Masaüstü Santrifüj		AS-DETAE, Genetik ABD
PZR Cihazı	Bio-Rad T100 Thermo-Cycler	AS-DETAE, Genetik ABD
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı (LightCycler 480)	Roche	AS-DETAE, Genetik ABD
Laminer Akış Kabini		AS-DETAE, Genetik ABD
Distile Su Cihazı	Millipore	AS-DETAE, Genetik ABD
Vorteks		AS-DETAE, Genetik ABD
		S.B.Ü Haseki EAH, Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi
Otomotik Pipetler	Ependof,	AS-DETAE, Genetik ABD

PZR Cihazı	ABI Veriti	ABD S.B.Ü Haseki EAH, Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi
ABI 3730 Sanger Dizileme Cihazı	Applied BioSystem	S.B.Ü Haseki EAH, Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Tüm Ekzom Dizileme Çalışması

Bu projede 2014 yılında Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik&REMER’de Tüm ekzom dizileme çalışması yapılmış örneklerin ham datası (verisi) çalışılmıştır.

3.2.2. Tüm Ekzom Dizisi Veri Analizi

Tüm ekzom verileri Seq platformunda (Genomize) analiz edildi (59).

Seq platformunda varyantların patojenite sınıflandırması ACMG standartlarına uygun olarak yapıldı (52, 59).

NGS yöntemiyle dizilenen Ebeveyn 1, Ebeveyn 2, Hasta 1 ve Hasta 2 ‘ye ait WES analizine ait FASTA verilerini WES çalışmasında kullanılan kit ve cihazı seçildikten sonra analiz parametreleri aşağıda tanımlanan koşullar ile Genomize-Seq platformuna yüklendi. WES verilerini hem Refseq hem de Ensembl veritabanlarında otomatik analize alındı.

Analiz Versiyonu = BWA-Freebayes-PCR dedup (v.16.1)

Anotasyon Versiyonu = Refseq / Ensembl

Birincil Kaplam Eşik Değeri (alternatif alel) = 5

İkincil Kaplam Eşik Değeri (alternatif alel) = 50

Strand Bias Metric Threshold (SBM) For Heterozygote Calls = 8,0

Heterozigot Varyantlar İçin Alternatif Alel Oranı Eşik Değeri = 0,0

Minimum Alternate Fraction For Variant Calling = 20

Okuma Ucu Maskeleme = 0

Yüksek Oranda Okuma Hatası Filtresi = 0

Her İki İplikçikten Kanıt Bekliyorum = False

Yukarıda tanımlanan parametreler çerçevesinde NGS yöntemiyle elde edilen FASTA verisinin, ham data kalite kontrolü, ön işleme, hizalama, varyant çağırma, yorumlama aşamaları otomatize sistem ile gerçekleştirildi.

3.2.3. Varyant Analizi

Gen önceliklendirme işlemi için; MmD hastalığı fenotipine neden olan aday genleri belirlemek amacıyla Phenolyzer (60) ve GeneCards (61) bilgisayar ortamı gen önceliklendirme araçları kullanıldı. Belirlenen aday genler aşağıda belirtilmiştir.

RYR1, COL6A3, DES, SCN4A, MYH7, NEB, GAA, CACNA2D1, PIK3C2A, CACNA1S, RYR2, SECISBP2, COL6A2, FKBP1A, ACADSB, CPT2, QDPR, LARGE, FKBP14, POMT1, MEGF10, PABPC1L, FKRP, NME5, LAMA2, RSPH4A, ITGA7, STAC3, ABCB7, CASQ1, FARSF, FKTN, CACNG1, POMGNT2, LMNA, DMD, CLIP1, SLC25A13, POMGNT1, LMAN2, MYOT, RYR3, ACADS, TTN, ANO5, POMT2, ACADM, MB, RSPH3, FHL1, CHKB, COL6A1, DYSF, ISPD, SEPN1

Yukarıda belirlenen aday genler üzerinden filtreleme yapıldı.

Tüm ekzom verilerinin filtrelenmesi için Seq platformu (Genomize) tarafından önerilen sistematik kullanıldı.

Filtreleme Seti-1'in ekran görüntüsü Şekil 3-1'de verilmiştir.

Filtreleme Seti-1 aşamaları:

- Bilinen gen, bilinen mutasyon aranır.
- Herhangi bir ClinVar kaydında patojenik ya da muhtemelen patojenik olmalıdır.
- Toplumsal alel frekansı <1 olmalıdır.

- Pedigri var ve güvenilir ise kalıtım şekline uygun olarak heterozigot/homozigot seçilir. Eğer pedigri yok ya da güvenilir değil ise; heterozigot veya homozigot seçilir.

The screenshot shows the 'Ece-Naz_S3 omegı için Varyantlar (EXOME)' interface. The top bar includes the sample name, kit information, and buttons for 'Varyantlar', 'Kalite Kontrol', and 'Klinik Veri Giriş'. The main area is divided into two panels: 'Filtreler' (Filters) on the left and 'Diğer örneklerle karşılaştır' (Compare with other samples) on the right.

Filtreler Paneli:

- Kromozom:** Dropdown menu.
- Başlangıç:** Dropdown menu.
- Bitiş:** Dropdown menu.
- Kalite:** Dropdown menu.
- Fraksiyon Eşiği:** Input field.
- Hgvs:** Input field.
- dbSNP:** Input field.
- Genotip:** Dropdown menu.
- Genler:** Input field.
- Değişim Sonucu:** Input field.
- Herhangi bir ClinVar kaydı patojenik veya olası patojenik:** Dropdown menu.
- Sift, Polyphen, MutationTaster:** Dropdown menu.
- Herhangi bir referans normal toplu...:** Input field.
- Seq Patojenitesi:** Input field.
- Ekzonik:** Input field.
- Yıkıcı:** Input field.
- Min Örnek Sayısı:** Input field.
- SEQ Alel Frekansı:** Input field.
- Tüm analizlerde ara:** Input field.
- Merkezimde filtrele:** Input field.

Diğer örneklerle karşılaştır Paneli:

Koşum / Örnek (Analiz Sürümü) / Gen Paneli	Genotip	Kalite
15.02.18-EXOMEs / Anna_S1(v26) / EXOME	Het Veya Hom	Hepsi
15.02.18-EXOMEs / Baba_S2(v26) / EXOME	Het Veya Hom	Hepsi
15.02.18-EXOMEs / Sude-Naz_S4(v26) / EXOME	Het Veya Hom	Hepsi

Buttons at the bottom: 'Filtreleri Uygula', 'Filtreleri Temizle'.

Şekil 3-2: Filtreleme Seti-1 Ekran Görüntüsü

Filtreleme Seti-2 ekran görüntüsü Şekil 3-2’de verilmiştir.

Filtreleme Seti-2 aşamaları:

- Bilinen gen, yıkıcı mutasyonlar (PVS1-Null varyantlar: anlamsız, çerçeve kayması, kurallı +/- 1 veya 2 splice site, başlangıç kodonu, tek ya da çoklu ekzon delesyonu şeklinde meydana gelen mutasyon çeşitleri) aranır.
- Toplumsal alel frekansı <1 olmalıdır.
- Pedigri var ve güvenilir ise kalıtım şekline uygun olarak heterozigot/homozigot seçilir. Eğer pedigri yok ya da güvenilir değil ise; heterozigot veya homozigot seçilir.

This screenshot is identical to the one above, showing the 'Ece-Naz_S3 omegı için Varyantlar (EXOME)' interface with the same filter settings and comparison table.

Şekil 3-3: Filtreleme Seti-2 Ekran Görüntüsü

Filtreleme Seti-3 ekran görüntüsü Şekil 3-3’de verilmiştir.

Filtreleme Seti-3 aşamaları:

- Bilinen gen, yanlış anlamlı mutasyonlar aranır.
- Toplumsal alel frekansı <1 olmalıdır.
- Pedigri var ve güvenilir ise kalıtım şekline uygun olarak heterozigot/homozigot seçilir. Eğer pedigri yok ya da güvenilir değil ise; heterozigot veya homozigot seçilir.

Şekil 3-4: Filtreleme Seti-3 Ekran Görüntüsü

Filtreleme Seti-4 ekran görüntüsü Şekil 3-4’de verilmiştir.

Filtreleme Seti-4 aşamaları:

- “Novel” gen
- Toplumsal alel frekansı <1 olmalıdır.
- Pedigri var ve güvenilir ise kalıtım şekline uygun olarak heterozigot/homozigot seçilir. Eğer pedigri yok ya da güvenilir değil ise; heterozigot veya homozigot seçilir.

Ece-Naz_S3 örneği için Varyantlar (EXOME), Koşum: 16.02.18-EXOMEs, Kit: Roche SeqCap EZ Whole Exome V3/Roche

Parametreler Varyantlar Kalite Kontrol Klink Veri Giriş

Filtreler

Kromozom Başlangıç Bitiş ClinVar

Kalite Fraksiyon Eşliği Sift, Polyphen, MutationTaster

Hgvs dbSNP Herhangi bir referans normal toplu... 1

Genotip Seq Patojenizitesi

Genler

Genselleri

Değişim Sonucu Ekzonik Yıkıcı

Bu örnekte çok fazla varyant olduğundan frekans filtresi geçici olarak devre dışıdır.

SEQ Frekans Filtresi (yanlış pozitif ve/veya bölgesel polimorfizmleri ayıklamak için tasarlanmıştır)

Dikkat: Belirlediğiniz kadar örnekte galgımadığından dolayı ayıklanmayan varyantlar kırmızı ile işaretlenir.

Min Örnek Sayısı Tüm analizlerde ara

SEQ Alel Frekansı % Merkezimde filtrele

Filtreleri Uygula Filtreleri Temizle

Filtreler

Diğer örneklerle karşılaştır

Koşum / Örnek (Analiz Sürümü) / Gen Paneli

Genotip Kalite

16.02.18-EXOMEs / Anne_S1(v-26) / EXOME Het Veya Hom Hepsi

16.02.18-EXOMEs / Baba_S2(v-26) / EXOME Het Veya Hom Hepsi

16.02.18-EXOMEs / Sude-Naz_S4(v-26) / EXOME Het Veya Hom Hepsi

Örnek Genotip Hepsi

Şekil 3-5: Filtreleme Seti-4 Ekran Görüntüsü

Ayrıca otozomal resesif, otozomal dominant, *de novo*, kompond heterozigot kalıtım paternine uygun olacak şekilde filtrelemeler de Tablo 3-4'de belirtildiği gibi yapıldı. Bu filtrelemelerde de hastalığa ait prevalansın olmaması nedeniyle toplumsal alel frekansı <1 olarak seçildi.

Tablo 3-4: Kalıtım paternlerine uygun filtreleme parametreleri

	Kalıtım Paterni						
	Otozomal Dominant		Otozomal Resesif	<i>De Novo</i>		Kompond Heterozigot (Aynı gende farklı lokuslardaki varyantlar değerlendirilecektir.)	
Ebeveyn 1	Heterozigot	Yabanıl	Heterozigot	Yabanıl	Yabanıl	Heterozigot	Yabanıl
Ebeveyn 2	Yabanıl	Heterozigot	Heterozigot	Yabanıl	Yabanıl	Yabanıl	Heterozigot
Hasta 1	Heterozigot	Heterozigot	Homozigot	Heterozigot	Homozigot	Heterozigot	Heterozigot
Hasta 2	Heterozigot	Heterozigot	Homozigot	Heterozigot	Homozigot	Heterozigot	Heterozigot

ACMG Standartları (54) doğrultusunda tespit edilen varyantların patojenik olup olamayacağı sorgulandı.

3.2.4. Sanger Dizileme Çalışması

Sanger dizileme yönteminde DNA dizisinin zincir sonlandırma metoduna dayalı olarak bazların floresan işaretlenmesi ve kapiller elektroforez kombinasyonu ile okunmasıdır (62).

Belirlenen varyantın doğrulaması için Sanger dizileme yapılmıştır. Örnekler dizilenmeden önce PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılıp, purifikasyonları yapılmıştır.

3.2.4.1. PZR

Ebeveyn 1, Ebeveyn 2 ve ikiz kardeşlerin, DNA izolatlarından rutin PZR çalışılıp hastalık etkeni olarak belirlenen bölgenin amplifikasyonu yapıldı. Sağlıklı kontrollere dizileme için cDNA kullanılmıştır. Sanger dizilemede çalışmasında kullanılan primerler Tablo 3-5’de belirtildi.

Tablo 3-5: Sanger Dizileme Çalışmalarında Kullanılan Primerler

Gen	İleri Primer	Geri Primer	Dizi Uzunluğu	Hedef
<i>SEPN1</i>	CTCACCAAGTGCAGTGT TTG	CCAGCCTTCACAGCTT CT	844 bç	DNA
<i>SEPN1</i>	CTCGGCCCTTTGTGAAG AC	GCATGGATCCGGAACA TCAC	101 bç	cDNA

Genomik DNA lar Nanodropta ölçüldükten sonra, 100 ng/μl son derişimde olacak şekilde dilue edildi. Çalışmada daha önce Haseki EAH Genetik hastalıkları Tanı Merkezinde daha önce dizilenen tanımsız hasta numunesi, pozitif kontrol olarak kullanıldı. PZR kimyasalları (Thermo Scientific), Tablo 3-6’da belirtilen içerik oranında hasta sayısına göre genişletilerek çalışıldı.

Tablo 3-6: Sanger Dizileme PZR Karışımı İçeriği**a) Genomik DNA Primerleri Karışımı****b) cDNA Primerleri Karışımı**

<u>PZR Mix-SEPNI</u>		<u>PZR Mix-SEPNI</u>	
dH2O	10,5 µl	dH2O	12,2 µl
DreamTaq PCR Master Mix	12,5 µl	MgCl ₂ (25 Mm)	2,5 µl
Primer-İleri Zincir (10 mM)	0,5 µl	dNTP Mix (10 mM)	1 µl
Primer-Geri Zincir (10 mM)	0,5 µl	Taq Polimerase	0,3 µl
Örnek(DNA) (1 mM)	1 µl	Taq Buffer (10X)	2,5 µl
		Primer-İleri Zincir (10 mM)	1 µl
		Primer-Geri Zincir (10 mM)	1 µl
		Örnek(cDNA) (250ng)	2,5 µl

PZR ürünü %2 lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Sanger Dizileme çalışması Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi'nde optimize edilen yöntemle çalışıldı.

3.2.4.2. Pürifikasyon

PZR işleminden sonra örnekler Tablo 3-8'de belirtilen karışım ile pürifikasyon işlemine alındı. Her örnek için forward ve reverse olmak üzere 2 tüp hazırlandı. Forward ve reverse zincirler ayrı ayrı tüplerde ayrı ayrı dizilendi.

Tablo 3-7: Pürifikasyon Çalışması İçin Karışım İçeriği

<u>Karışım İçeriği</u>	<u>Örnek başına miktar</u>
EkzoSAP	1 µl
PZR ürünü	2,5 µl

PZR işlemine alınır.

Tablo 3-8: Pürifikasyon Çalışması PZR Çalışma Protokolü

<u>PZR Çalışma Protokolü</u>		
37 °C	15 dk	1 cycle
80 °C	15 dk	1 cycle

3.2.4.3. Dizileme

Sanger dizileme çalışması “Big Dye Terminatör” DNA dizileme kiti ile (Applied Biosystems) ABI 3730 (Applied Biosystems) cihazında çalışıldı. Tablo 3-9’de belirtilen miktarlar örnek sayısı ile doğru orantılı genişletilerek hazırlanan Sanger dizileme karışımı; 6 ‘şar µL olarak purifikasyon ürününün üzerine pipetlendi. Tüplerin üzerinde yazıldığı şekilde ileri ve geri zincir primerleri ayrı ayrı pipetlendi.

Tablo 3-9: Sanger Dizileme Çalışması İçin Karışım İçeriği

<u>Karışım İçeriği</u>	<u>Örnek başına miktar</u>
BigDye Terminatör v1.1, v3.1 -5x Sequencing Buffer	2 µl
BigDye Terminatör v3.1 Cycle Sequencing RR-100	1 µl
dH2O	3 µl

Primer -Forward (1 pikomol) / Primer-Reverse (1 pikomol)	3 µl
--	------

Dizileme PZR çalışma koşulları Tablo 3-10'de verilmiştir.

Tablo 3-10: Dizileme PZR Çalışma Koşulları

Sekans PZR Protokolü		
96 °C	1 dk	1 cycle
96 °C	10 sn	
50 °C	0.05 sn	25 cycle
60 °C	4 dk	
20 °C	0.01 sn	1 cycle

Sephadex ile hazırlanan kolonların altına toplama tüpü yerleştirilmeden önce 30 sn vortekslendi. Hava kabarcığı kalmaması, damlaların üstte toplanması ve homojenize olması amacıyla vorteks işlemi yapıldı. Kolonun altında bulunan küçük tıpa alındı ve altına toplama tüpü yerleştirildi. Sefadex kolonları 2700 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek iyice kurutuldu. Toplama tüpleri atıldı, yenileri takıldı. Örneğin tamamı pipetlendi. Kolona pipetleme yapılırken, membran üzerinde silikon-süngerimsi yapıya zarar vermeden tam üzerine gelecek şekilde pipetleme yapılmalıdır. Örneğin tam üzerine gelmeden bırakılması kirli okuma olmasına neden olabilir. 3200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Örnek Sephadex'den geçerek altta bulunan toplama tüpüne geçti. Toplama tüpüne geçen tüm örnek pipet ile alınarak çalışma formunda kayıtlı olduğu "plate" kuyucuğuna pipetlendi. Hazırlanan "plate" üzeri plastik septa ile örtüldü, cihaza ait kaba konuldu ve cihaza yerleştirildi. Cihaza bağlı bilgisayarda bulunan programa "plate" ve içerisindeki hasta bilgileri kaydedildi.

Sanger dizileme çalışmasında S.B.Ü Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi 'nde bulunan ABI 3730 (Applied Biosystems) cihazı gerekli izin (18/04/2019 Prot. No:143) alınarak kullanıldı.

3.2.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı PZR) Çalışması

3.2.5.1. Lökosit İzolasyonu

Hasta 1 (2018 yılında) ve Hasta 2 (2014 yılında) izole edilen, -80 °C muhafaza edilen RNA'lar kullanıldı. Ebeveyn 1 ve Ebeveyn 2 örnekleri ise -80 °C de SOLD olarak muhafaza edildi.

Sağlıklı kontrollerden EDTA lı tüpe alınan yaklaşık 7 µL periferik kandan; lökosit izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

- 50 ml falcon tüpe EDTA lı kanların tamamı (7.5 ml) boşaltıldı.
- Toplam kan hacminin 2 katı kadar (15 ml) GEY'S Buffer (1x) ilave edildi.
- Kan ve GEY'S Buffer solüsyonu homojenize edildikten sonra +4 °C de 20 dk bekletildi.
- 18 °C de 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Pellet kısmına zarar verilmeden süpernatant kısmı alındı.
- Pellet üzerine ilk toplam hacim kan hacmi kadar (7.5 ml) GEY'S Buffer (1x) ilave edildi.
- 18 °C de 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Pellet kısmına zarar verilmeden süpernatant kısmı alındı. Pelletin üstü iyice temizlendi.
- Pelletin üzerine 1 ml PBS konuldu.
- PBS i uzaklaştırmak için 15000 rpm'de 18 °C de 5 dk santrifüj edildi.
- Pellete zarar vermeden süpernatant uzaklaştırıldı. PBS uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine SOLD (600 µL) pipetlendi ve homojenize edildi.
- 1.5 ml ependorf tüpe pipetlendi. -20 °C de en az 20 dk bekletildi.

3.2.5.2. RNA İzolasyonu

Ebeveyn 1, Ebeveyn 2 ve sağlıklı kontrollerden (3 örnek) SOLD de bulunan hücrelerden “RNeasy Plus Mini Kit” (Qiagen) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

- SOLD üzerine örnek hacmi kadar (600 µL) %70 lik etanol eklendi. Homojenize edildi.
- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) içerisinde çıkan renksiz kolona SOLD+%70 etanol karışımı 600 µl olarak pipetlenir.
- 8000 g de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolonun altındaki toplama tüpü atılır yenisi takıldı. Kolona 600 µl SOLD+%70 etanol karışımı pipetlendi.
- 8000 g de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama türünde toplanan sıvı 350 µL %70 etanol ile karıştırılır, “RNeasy Plus Mini Kit” (Qiagen) içerisinde çıkan pembe renkli kolona pipetlendi.
- 8000 g de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü yenisi ile değiştirildikten sonra kolona 700 µL “RW1 Buffer” eklendi.
- 8000 g de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü yenisi ile değiştirildikten sonra kolona 500 µL “RPE Buffer” eklendi.
- 8000 g de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü yenisi ile değiştirildikten sonra kolona 500 µL “RPE Buffer” eklendi.
- 8000 g de 2 dk santrifüj edildi.
- Kolonun altında bulunana toplama tüpü yenisi ile değiştirildikten sonra max. devirde 1 dk santrifüj edildi.
- 1.5 ml lik ependorfa membranlı kolon konularak üzerine 15 ml “RNase Free Water” pipetlenir. 1 dk oda ısısında bekletildi.
- 8000 g de 1 dk santrifüj edildi. RNA lar 1.5 ml lik ependorf tüpte toplanıp, kalite ve kantite tayinine kadar -20 °C’de en az 30 dk bekletildi.

3.2.5.3. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA ların Nanodrop cihazında kalite ve konsantrasyon ölçümü yapıldı. Son derişim 250 ng/μl olacak şekilde RNA lardan alınacak miktarlar belirlendi.

İzole edilen RNA lardan; “ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit (E6300S-NEB)” kitinin protokolüne uygun olarak cDNA sentezi yapıldı.

Her örneğin total RNA derişimi 250 ng/μl olacak şekilde, örnek sayısına göre genişletilerek kullanılan miktarlar Tablo 3-11’de belirtilmiştir.

Tablo 3-11: cDNA Sentezi Protokolü (E6300S-NEB)

d(T)23VN (50 μM)	2 μl
Total RNA	Değişken
“Nükleaz Free H ₂ O”	Değişken
Toplam Hacim	8 μL

70 °C de 5 dk inkube edildi. Buz üzerine alındı.

“M-MuLV Reaction Mix” 10 μl

“M-MuLV Enzyme Mix” 2 μl

42 °C de 1 saat inkube edildi.

80 °C de 5 dk inkube edildi.

Primer optimizasyonunda sağlıklı kontrollerin cDNA numuneleri tükendiğinden, Sanger dizileme ve gen ekspresyonu çalışması için sağlıklı kontrollere ait kalan RNA’lardan; “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” (Roche) kitinin protokolüne uygun olarak cDNA sentezi yapıldı.

Her örneğin total RNA derişimi 250 ng/μl olacak şekilde, örnek sayısına göre genişletilerek kullanılan miktarlar Tablo 3-12’de belirtilmiştir.

Tablo 3-12: cDNA Sentezi Protokolü (“Roche Kiti”)

“Oligo(dT)18 Primer (50 pmol/ml)”	2 µl
Total RNA	Değişken
dH ₂ O, “PCR Grade”	Değişken
Toplam Hacim	11,4 µL

65 °C de 10 dk inkube edildi. Buz üzerine alındı.

“Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer”	4 µl
“Proctector RNase Inhibitor, 40 U/ µL”	0,5 µl
“Deoxynucleotide Mix, 10 µM”	2 µl
“DTT”	1 µl
“Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase”	1,1 µl

55 °C de 30 dk inkube edildi.

85 °C de 5 dk inkube edildi.

cDNA numuneleri -20 °C de muhafaza edildi.

3.2.5.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek Zamanlı PZR)

Gerçek zamanlı PZR; tek tüp içerisinde DNA ve ürünlerinin çoğaltılmasına olanak sağlayan, çoğaltılan ürünlerin özgül ya da özgül olmayan işaretleyiciler ile izlenerek değerlendirilebilmesine olanak tanıyan bir yöntemdir (63, 64). Gerçek zamanlı PZR işlemi; “SYBR Green I” gibi özgül olmayan boyama sistemleri ya da hidroliz problemleri, moleküler boncuk ve hibridizasyon prob gibi floresan işaretli problemlerin kullanıldığı özgül boyama sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (64).

Çalışmamızda gen ifadesi (ekspresyonu) ebeveyn 1, ebeveyn 2, hasta 1, hasta 2 ve sağlıklı kontrol 1,2 ve 3 bireylerine ait numuneler “SYBR Green” boyası içeren karışım (NEB- M3003S) ile; cDNA derişimi 450 ng olacak şekilde, hedef gen(*SEPN1*) ve referans gen (*PPIA=siklofilin A*) ile her bir numune için duplike olarak tek çalışma yapıldı.

SEPN1 için seçilen primerler genin tüm transkriptlerini belirleyecek şekilde oluşturuldu.

SEPN1 gen ekspresyonu çalışmasında Tablo 3-13’de belirtilen primerler kullanılarak Tablo 3-14’de belirtilen karışım kullanıldı.

Tablo 3-13: Gerçek Zamanlı PZR Çalışması İçin Kullanılan Primerler

Gen	İleri Primer	Geri Primer	Dizi Uzunluğu
<i>SEPN1</i>	CTCGGCCCTTTGTGAAGAC	GCATGGATCCGGAACATCAC	101 bç
<i>PPIA</i>	TATCTGCACTGCCAAGACTGA GTG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATT CC	127 bç

Tablo 3-14: Gerçek Zamanlı PZR Çalışması İçin Kullanılan Karışım İçeriği

Luna® Universal qPCR Master Mix	10 µl
Primer-Forward (1 pikomol)	1 µl
Primer-Reverse (1 pikomol)	1 µl
cDNA (250ng)	1,8 µl
dH ₂ O	6,2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Numuneler “plate” kuyucuklarına pipetlendikten sonra gerçek zamanlı PZR çalışmasına alındı.

Tablo 3-15: Gerçek Zamanlı PZR Sıcaklık-Zaman Protokolü

Denatürasyon	95 °C	60 sn	1 döngü
	95 °C	15 sn	
Amplifikasyon	62 °C	30 sn	45 döngü
	72 °C	10 sn	
	95 °C	5 sn	
Erime Eğrisi	65 °C	1 dk	1 döngü
	97 °C	5°C/sn	
Soğutma	40 °C	30 sn	1 döngü

Gerçek zamanlı PZR deneylerinde, “ROCHE LighCycler 480” cihazı kullanıldı.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Gerçek zamanlı PZR’de analiz amacına uygun olarak mutlak (63, 65) ve rölatif (66, 67) kantifikasyon değerlendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Rölatif kantifikasyonda analit, endojen bir referansa (mRNA, mikroRNA) göre ölçülmektedir. Mutlak kantifikasyonda ise analit bir dizi standart kullanılarak oluşturulan standarda göre ölçülür (68). Gen ekspresyonu çalışmalarının istatistiksel yöntemlerle değerlendirilerek anlamlı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmaktadır (69).

Hedef genin (*SEPN1*), referans gene (*PPIA*) göre rölatif kantitatif gen ifadesinin nasıl düzenlendiği; “Gerçek Zamanlı PZR” cihazından elde edilen “Cp”

değerleri üzerinden “Microsoft Office-Excel 2010” programında, $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanarak değerlendirildi. Verilerin “Graphpad Prism v.6.0” programı ile istatistiksel analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar; 3 ya da daha fazla grubun karşılaştırılmasında kullanılan non-parametrik bir metod olan “Kruskal-Wallis testi” kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Varyant Filtreleme Bulguları

Filtreleme Seti-1 kriterleri için aile analiz edildiğinde varyant bulunamadı (Şekil 4-1).

The screenshot displays the Filtreleme Seti-1 interface. The top section contains search criteria: Kromozom (Chromosome), Başlangıç (Start), Bitiş (End), Kalite (Quality), Fraksiyon Esliği (Fractional Match), Hgvs (HGVS), dbSNP, Genotip (Genotype), and Genler (Genes). The 'Herhangi bir ClinVAR kaydı patojenik veya olası patojenik' (Any ClinVAR record pathogenic or possibly pathogenic) checkbox is checked. The 'Herhangi bir referans normal toplu...' (Any reference normal batch...) checkbox is checked, and the 'Seç Patolojisi' (Select Pathology) dropdown is set to 'Seq Patolojisi'. The 'Genler' section shows 'Multiminicore Disease' selected. The 'Değişim Sonucu' (Change Result) section shows 'Ekzonik' (Exonic) and 'Yıkıcı' (Deleterious) options. A red warning message states: 'Bu örnekte çok fazla varyant olduğundan frekans filtresi geçici olarak devre dışıdır.' (Due to too many variants in this sample, the frequency filter is temporarily disabled). The 'SEQ Frekans Filtresi' (SEQ Frequency Filter) section is also visible. The bottom section shows the 'Filtreler' (Filters) table with columns: IGTV, Pat, Güvenlilik, Gen, Pozisyon, Nükleotid Değişimi, Alternatif Okumalar (F/R), Değişim Tipi, Değişim Sonucu, Genotip, dbSNP No (v20180423), Rapor, and SEQ alet frekansı (merkezim / hepsi). The table is empty, indicating no variants were found.

Şekil 4-1: Filtreleme Seti-1 kriterleri için sonuç ekran görüntüsü

Filtreleme Seti-2 kriterleri için aile analiz edildiğinde varyant bulunamadı (Şekil 4-2).

The screenshot displays the Filtreleme Seti-2 interface. The top section contains search criteria: Kalite (Quality), Fraksiyon Esliği (Fractional Match), Sift, Polyphen, MutationTaster, Hgvs (HGVS), dbSNP, Genotip (Genotype), and Genler (Genes). The 'Herhangi bir referans normal toplu...' (Any reference normal batch...) checkbox is checked, and the 'Seç Patolojisi' (Select Pathology) dropdown is set to 'Seq Patolojisi'. The 'Genler' section shows 'Multiminicore Disease' selected. The 'Değişim Sonucu' (Change Result) section shows 'Ekzonik' (Exonic) and 'Yıkıcı' (Deleterious) options. A red warning message states: 'Bu örnekte çok fazla varyant olduğundan frekans filtresi geçici olarak devre dışıdır.' (Due to too many variants in this sample, the frequency filter is temporarily disabled). The 'SEQ Frekans Filtresi' (SEQ Frequency Filter) section is also visible. The bottom section shows the 'Filtreler' (Filters) table with columns: IGTV, Pat, Güvenlilik, Gen, Pozisyon, Nükleotid Değişimi, Alternatif Okumalar (F/R), Değişim Tipi, Değişim Sonucu, Genotip, dbSNP No (v20180423), Rapor, and SEQ alet frekansı (merkezim / hepsi). The table is empty, indicating no variants were found.

Şekil 4-2: Filtreleme Seti-2 kriterleri için sonuç ekran görüntüsü

Filtreleme Seti-3 kriterleri için aile analiz edildiğinde 2 adet varyant bulundu (Şekil 4-3).

The screenshot displays the Filtreleme Seti-3 interface. The top section contains filters for HGVS, dbSNP, and a dropdown for 'Herhangi bir referans normal toplu...'. The middle section shows a list of variants with columns for Gen, Pozisyon, Nükleotid Değişimi, Alternatif Okumalar (F/R), Değişim Tipi, Değişim Sonucu, Genotip, dbSNP No, Rapor, and SEQ alel frekansı. Two variants are highlighted: MYH7 (chr14:23901901) and SEP11 (chr10:135440311). The bottom section shows a table of variants with columns for IG, Pat, Güvenilirlik, Gen, Pozisyon, Nükleotid Değişimi, Alternatif Okumalar (F/R), Değişim Tipi, Değişim Sonucu, Genotip, dbSNP No, Rapor, and SEQ alel frekansı. Two variants are highlighted: MYH7 (chr14:23901901) and SEP11 (chr10:135440311).

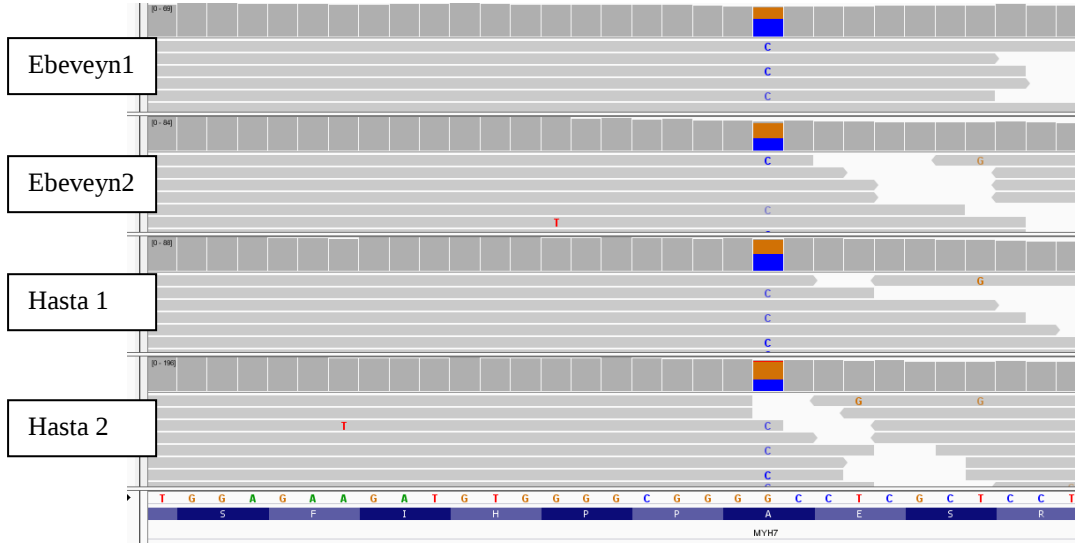
Şekil 4-3: Filtreleme Seti-3 kriterleri için sonuç ekran görüntüsü

Filtreleme Seti-4 kriterleri için aile analiz edildiğinde fenotip ile ilişkilendirilen aday genlerin dışında; bilinen (gen) ya da bilinmeyen lokuslarda 9.250 adet varyant bulundu (Şekil 4-4).

The screenshot displays the Filtreleme Seti-4 interface. The top section contains filters for HGVS, dbSNP, and a dropdown for 'Herhangi bir referans normal toplu...'. The middle section shows a list of variants with columns for Gen, Pozisyon, Nükleotid Değişimi, Alternatif Okumalar (F/R), Değişim Tipi, Değişim Sonucu, Genotip, dbSNP No, Rapor, and SEQ alel frekansı. Two variants are highlighted: MYH7 (chr14:23901901) and SEP11 (chr10:135440311). The bottom section shows a table of variants with columns for IG, Pat, Güvenilirlik, Gen, Pozisyon, Nükleotid Değişimi, Alternatif Okumalar (F/R), Değişim Tipi, Değişim Sonucu, Genotip, dbSNP No, Rapor, and SEQ alel frekansı. Two variants are highlighted: MYH7 (chr14:23901901) and SEP11 (chr10:135440311).

Şekil 4-4: Filtreleme Seti-4 kriterleri için sonuç ekran görüntüsü

Filtrelemeler sonucu; fenotip ile ilişkilendirilen aday genlerden, *SEP11* ve *MYH7* genlerinde varyantlar elde edildi. Varyantların IGV programında görüntüsü incelendi (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: MYH7 Geninde Bulunan Varyantın Aile Üyelerinin IGV Görüntüsü

MYH7 genindeki varyant Ebeveyn 1 ve Ebeveyn 2’de da aynı şekilde kalıtıldığından, ikizlerin MmD fenotipinden sorumlu hastalık etkeni varyant olarak düşünülemez.

Kalıtım paternlerine uygun olarak filtreleme yapıldı.

➤ Otozomal dominant kalıtım paterni için filtreleme yapıldığında;

COL6A1, chr21:47407549 (Exon 8), G -> A (c.785G>A), yanlış anlamlı varyantı; SIFT bilgisayar ortamı patojenite hesaplama aracında tolere edilebilir, Mutation Taster bilgisayar ortamı patojenite hesaplama aracında polimorfizm, PolyPhen bilgisayar ortamı patojenite hesaplama aracında bilinmeyen olarak raporlandı. Herhangi bir ClinVar girdisi yoktur.

TTN, chr2:179518052 (Intron 197), A -> G(c.38708-4T>C), Intronic, Splice Region varyantı; ClinVar da benin ve muhtemelen benin olarak 2 çalışma ile raporlanmıştır.

➤ Otozomal resesif kalıtım paterni için filtreleme yapıldığında;

SEPN1, chr1:26135586(Ekzon 5), G -> A (c.715G>A), yanlış anlamlı varyantı; “SIFT”, “Mutation Taster”, “PolyPhen” bilgisayar ortamı patojenite hesaplama araçlarında muhtemelen patojenik olarak raporlandı. Ebeveynlerin akraba evliliği yapması ve birden fazla düşük aile öyküsü nedeniyle otozomal resesif kalıtım öngörüldü.

➤ *De novo* kalıtım paterni için filtreleme yapıldığında;

Ebeveyn 1 ve Ebeveyn 2’de yabancı olup sadece çocuklarda ortak olarak görülen varyant bulunamadı.

➤ Kompound heterozigot kalıtım paterni için filtreleme yapıldığında;

Ebeveyn 1 ve çocuklarda ortak olan heterozigot varyantlar ile Ebeveyn 2 ve çocuklarda ortak olan heterozigot varyantlar filtrelenip karşılaştırılarak aynı gende farklı lokuslarda yer alan heterozigot varyantlar kompound heterozigottur. Fakat Ebeveyn 1 ve çocuklar; Ebeveyn 2 ve çocuklar ortak heterozigot varyantlar filtrelemesinde; aynı gende farklı lokuslarda heterozigot varyantlar bulunmadı.

SEPN1 geninde, ENST00000354177.4:c.715G>A/p.Gly239Arg (Chr 1: 26135586) (GhRC37 / hg19)

(Chr 1:26135575 - TGCCCCCTCAG [G>A] GAGCTGTGGC - Chr 1:26135597) varyantının hastalık etkeni olabileceği düşünüldü.

SEPN1 geninin 3 transkripti tanımlanmıştır. Bu çalışmada belirlenen transkript ENST00000354177.4 tir. Varyantımız ise bu transkriptte c.715G>A (GhRC 37/ Hg19) pozisyonunda yer almaktadır. Diğer tanımlanan *SEPN1* transkriptleri ENST00000361547.2 ve ENST00000374315.1’dir. Varyantımızın bu transkriptlerdeki pozisyonu sırası ile c.817G>A ve c.715G>A’dır. Bu varyantlar biribiri ile aynıdır.

Varyant; Mutation Taster (0.999- hastalığa neden olan) (70), SIFT (0.002- zarar verici) (71), PolyPhen-2(0,998- muhtemelen zarar verici) (72) gibi bilgisayar ortamındaki patojenite tahmin araçları tarafından patojenik bulundu.

ACMG standartları doğrultusunda bilgisayar ortamındaki araçla (InterVar)(73) değerlendirildiğinde; toplumsal alel frekansının olmaması nedeniyle PM2, bilgisayar ortamındaki araçlarda zararlı olarak tahmin edilmesi nedeniyle PP3 kanıtları doğrultusunda “önemi belirsiz” olarak tanımlanmıştır. ACMG standartları incelendiğinde; patojenik varyantların bulunduğu bölgeye yakın yer alan, protein yapısını raporlanan diğer patojenik varyantlara benzer şekilde etkileyen yanlış anlamlı varyantların PM1 kanıtını sağlayacağı belirtilmektedir. Otuzdan fazla *SEPN1* mutasyonu konjenital miyopati fenotipi ile uyumlu tanımlanmıştır. Bunların yaklaşık %50’si MmD’nin klasik formudur (22). Bu doğrultuda hastalık etkeni

olduğunu düşündüğümüz varyantın bulunduğu lokusun etrafında yer alan yanlış anlamlı varyantlar çoğunlukla kas hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir. Tespit ettiğimiz varyant PM1 kanıtını sağlamaktadır. Kesinlikle hastalık etkeni olduğu bilinen bir gendeki varyantın birden fazla aile üyesinde görülmesi PP1 kanıtını sağlamaktadır. Bizim çalışmamızda da çift yumurta ikizi kardeşler ayrı bireyler olarak düşünülürse birden fazla aile üyesinde aynı varyantın aynı hastalığa neden olması nedeniyle PP1 kanıtı sağlanmaktadır. Hastanın fenotipi ya da aile öyküsü tek genetik etiyolojisi olan hastalık için yüksek derecede özgün ise PP4 kanıtı sağlanır. Hastanın 2014 yılında yapılan histopatolojik incelemesinde; tespit edilen histopatolojik bulguların *SEPN1* geni ilişkili olduğu öngörülmüştür. MmD klasik formu klinik tanısı alması, patoloji incelemesinde *SEPN1* genine özgü bulgular bulundurması PP4 kanıtını desteklemektedir. Klinik bulgular ve aile öyküsü ile birlikte varyant incelendiğinde; ACMG standartlarının benin kriterlerine uygun herhangi bir durum tespit edilmemiştir. Sonuç olarak PM1, PM2, PP1, PP3 ve PP4 kanıtları sağlanmaktadır. 2 orta derece kanıt (PM1,PM2), 3 destekleyici kanıt (PP1, PP3 ve PP4) bulunması ACMG rehberine göre “muhtemelen patojenik” olarak sınıflandırılabilceğini belirtmektedir. Bilgisayar ortamındaki araçla (Intervar) (73), ikinci aşamada fenotip bulgularını manuel olarak eklediğimizde yapılan değerlendirmede de “muhtemelen patojenik” sonucuna ulaşıldı. ACMG standartlarına göre “muhtemel” ifadesi %90 oranında kesinlik ifade etmektedir (56). Etkin fonksiyon deneyleri ile desteklenmesi ya da aynı hastalık fenotipini gösteren farklı vakaların tanımlanması neticesinde “patojen” ifadesine ulaşılabilir.

SEPN1 genindeki patojenik mutasyonlarla ilgili pozitif klinik penetrans %100 olarak öngörülmektedir (18). *SEPN1* geninde tespit ettiğimiz, “muhtemelen patojenik” yani %90 oranında patojen olan varyantın, ikiz kardeşlerde MmD hastalığının fenotipinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

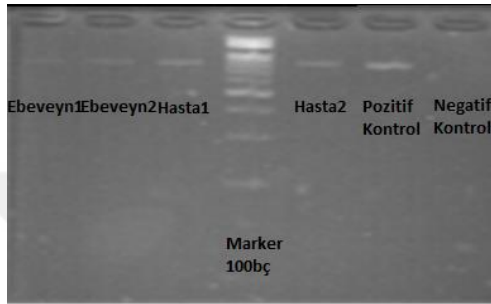
Tüm ekzom verisinin filtreleme aşamalarında varyant sayıları Tablo 4-1’de verilmiştir.

Tablo 4-1: Tüm Ekzom Verisinin Filtreleme Aşamaları

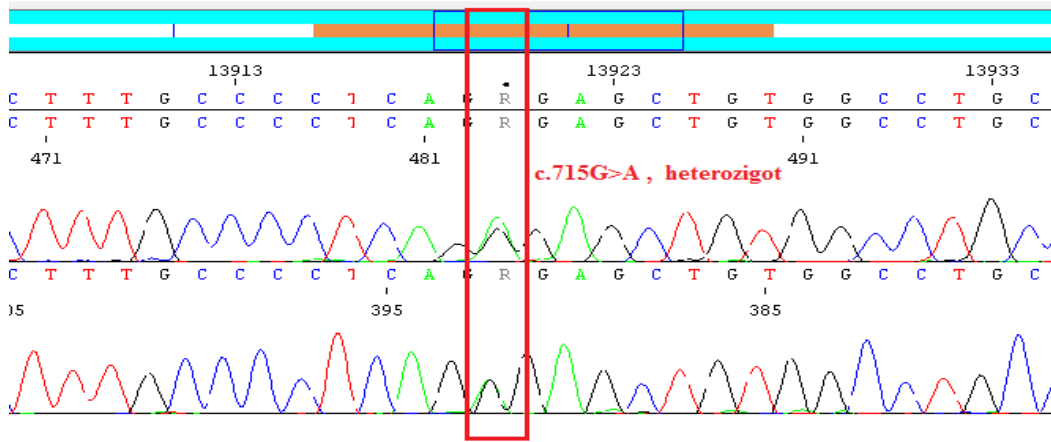
	Ebevyn 1	Ebeveyn 2	Hasta 1	Hasta 2
Tüm Ekzom Dizileme Varyant Sayısı	176.018	177.057	201.705	200.112
Toplumsal Alel Frekansı <1 (ExAC, gnomAD, 1000G) ve Bilgisayar Ortamında Tahmin Araçlarının En Az İkisinde Zararlı	190	168	173	163
Yıkıcı Ve Yanlış Anlamalı Varyantlar	190	168	173	163
Aday Genler	1 <i>SEPN1</i> , Tek varyant, Heterozigot	3 <i>NEB</i> , Tek Varyant, Heterozigot <i>LAMA2</i> , Tek Varyant, Heterozigot <i>SEPN1</i> , Tek Varyant, Heterozigot	2 <i>NEB</i> , Tek Varyant, Heterozigot <i>SEPN1</i> , Tek Varyant, Homozigot	2 <i>LAMA2</i> , Tek Varyant, Heterozigot <i>SEPN1</i> , Tek Varyant, Homozigot
Aile İçi Segregasyon	1	1	1	1

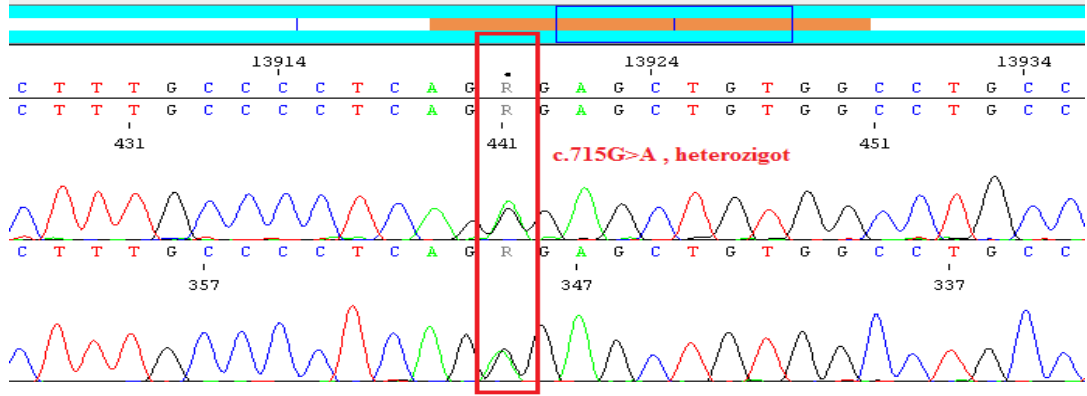
4.2. Sanger Dizileme Bulguları

Dizileme için yapılan *SEPN1* geninin PZR çalışması sonuçlarının jel görüntüleri Şekil 4-6 ‘dadır.

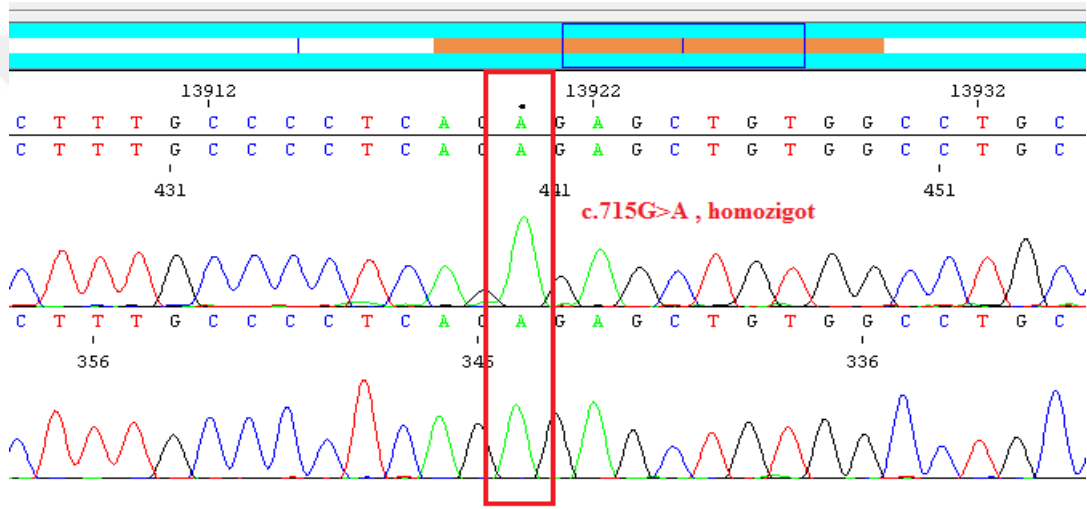
a-Ailenin Jel Görüntüsü(844bç)**b- Sağlıklı Kontrollerin Jel Görüntüsü(101bç)****Şekil 4-6: *SEPN1* Geni PZR Ürünlerinin Jel Görüntüsü**

c.715G>A/p.Gly239Arg varyantı ebeveynlerde heterozigot, ikiz kardeşlerde homozigot ve sağlıklı kontrollerde yabancı tip olarak dizilenmiştir. Aile ve sağlıklı kontrollere ait Sanger dizileme sonuçları Şekil 4-7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14’de verilmiştir.

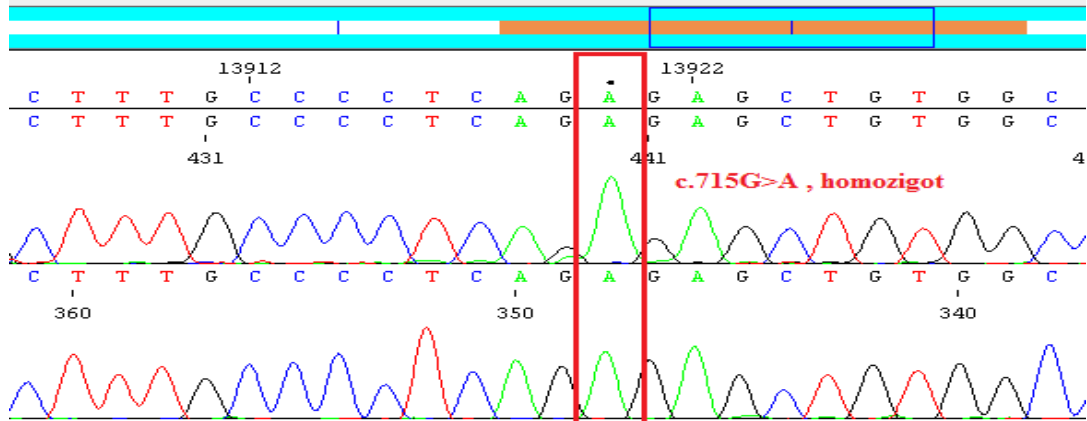
**Şekil 4-7: Ebeveyn 1’in Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü**



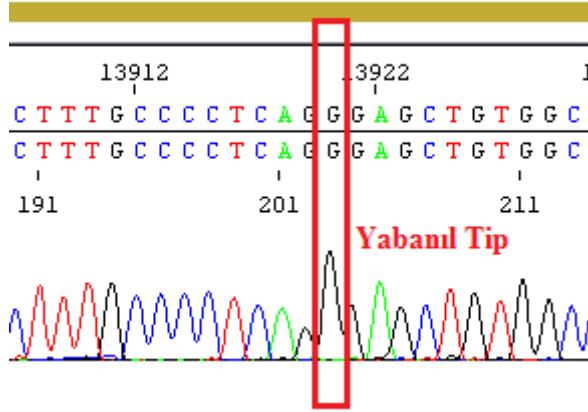
Şekil 4-8: Ebeveyn 2'nin Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü



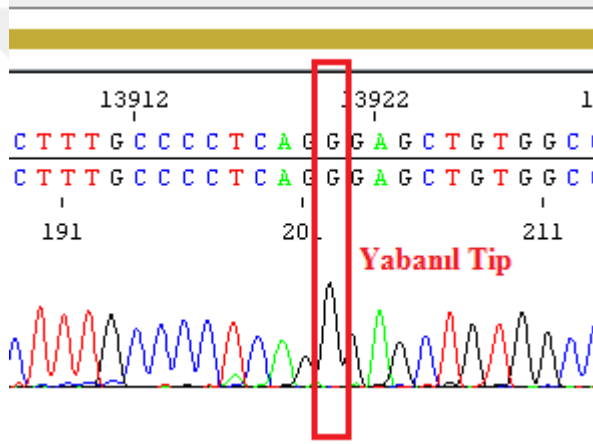
Şekil 4-9: Hasta 1'e Ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü (ENST00000354177.4:c.715G>A/p.Gly239Arg)



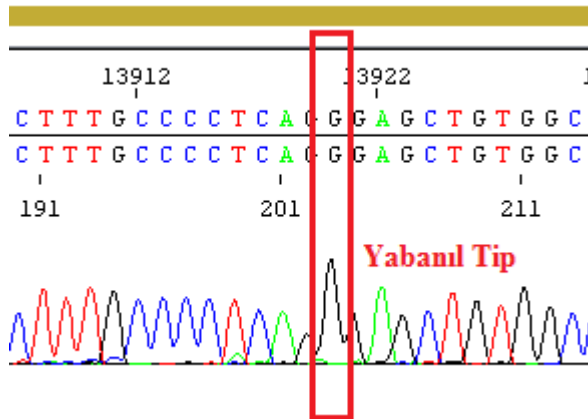
Şekil 4-10: Hasta 2'ye Ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü (ENST00000354177.4:c.715G>A/p.Gly239Arg)



Şekil 4-11: Sağlıklı Kontrol 1'e ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü



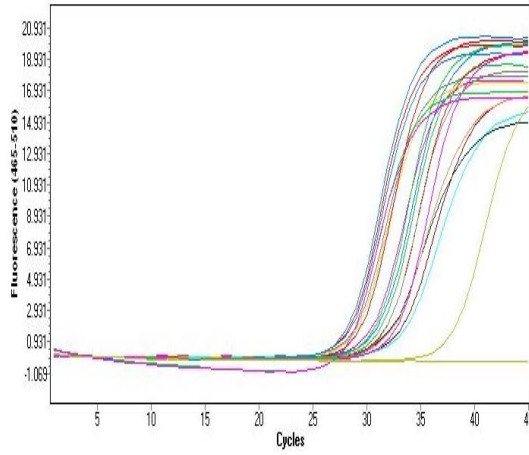
Şekil 4-12: Sağlıklı Kontrol 2' ye ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü



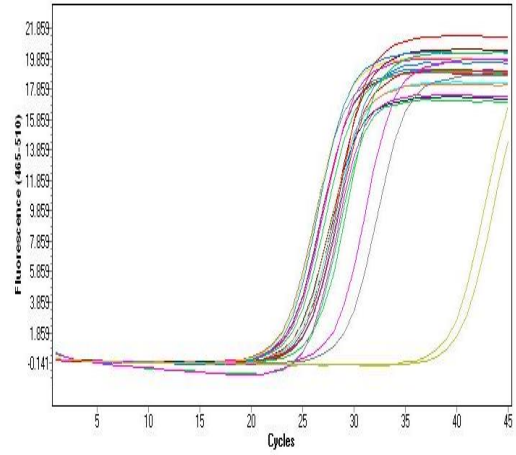
Şekil 4-13: Sağlıklı Kontrol 3' ye ait Sanger Dizileme Çalışması Sonucu Elde Edilen Elektroferogram Görüntüsü

4.3. Gerçek Zamanlı PZR Bulguları

MmD tanısı konulan ikiz kardeşlerde homozigot durumda olan hastalık etkeni olduğu düşünülen varyantın; heterozigot (Ebeveyn 1 ve Ebeveyn 2) ve yabani tipte olan sağlıklı kontrollere (Sağlıklı Kontrol 1, Sağlıklı Kontrol 2, Sağlıklı Kontrol 3) göre gen ekspresyonları incelendi. Gen ekspresyonu çalışması aile bireyleri ve sağlıklı kontrollerin periferik kan numunelerinden çalışılmıştır. *SEPN1* geni ve referans gen (*PPIA-siklofilin A*) amplifikasyon eğrileri Şekil 4-14’de verilmiştir. Ekspresyon çalışmamız *SEPN1* geninin tüm transkriptlerini kapsayacak şekilde düzenlenmiştir.

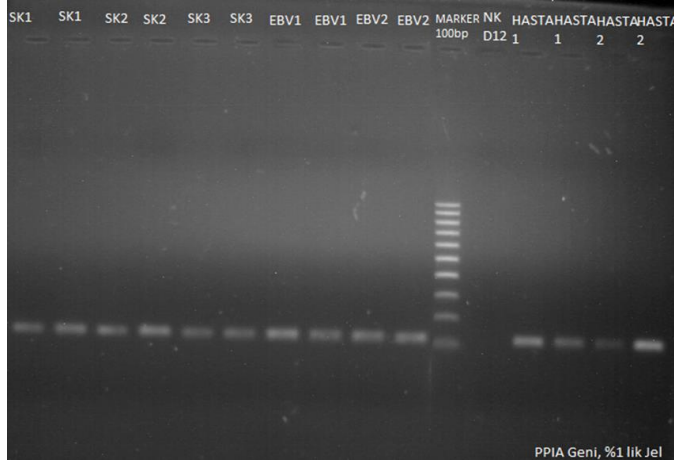


a- *SEPN1* Geni



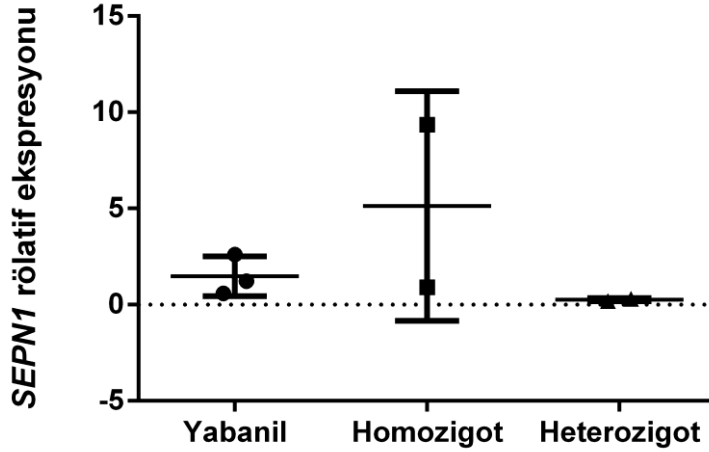
b- *PPIA* Geni

Şekil 4-14: Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 4-15: PPIA (siklofilin A) Geni Kantitatif PZR Ürünleri Jel görüntüsü

Hedef gen (*SEPN1*) ekspresyon düzeyi, referans gene (*PPIA*) normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplandı. Ekspresyon seviyeleri, yabancı, heterozigot ve homozigot numunelerinde non-parametrik “Kruskal-Wallis testi” ile değerlendirildiğinde, ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.1810$, $p<0.05$). *SEPN1* geni rölatif ekspresyonu Şekil 4-15’de verilmiştir.



Şekil 4-16: Hastalık Etkeni Varyantı Yabancı, Homozigot, Heterozigot Durumda Bulunduran Grupların Rölatif *SEPN1* Geni Ekspresyon Seviyesi ($p=0.1810$, “Kruskal-Wallis testi”)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, birinci derece akraba evliliği yapmış ve birden fazla düşük öyküsü olan ebeveyn ile “*in vitro*” fertilizasyon ile sahip oldukları, klinik ve histopatolojik bulgularla MmD tanısı konulmuş, ikiz çocuklarına ait tüm ekzom dizi verileri analiz edilmiştir.

Her bir aile bireyine ait ham tüm ekzom dizileme verisi SEQ platformuna yüklenmiştir. Fenotipe uygun olarak bilgisayar ortamındaki araçlar tarafından verilen aday genler incelenmiş ve değerlendirme hassasiyetini yüksek tutmak için önceliklendirilen tüm genlerle set oluşturularak filtreleme yapılmıştır. Oluşturulan gen seti, aile içi segregasyon ile varyantların patojenite derecelerine ve kalıtım paternlerine göre filtrelenmiştir. Filtremeler sonucunda patojen olma olasılığı yüksek olan *SEPN1* geninde ekzon 5 içinde yer alan ve ikiz kardeşlerde homozigot olarak bulunan ENST00000354177.4:c.715G>A (Chr 1: 26135586) (GhRC 37/ Hg19) varyantının hastalık etkeni olabileceği düşünüldü. Hastalık etkeni varyantın ebeveynlerde heterozigot durumda olması, hastalığın otozomal resesif kalıtım paterni göstermesi, iki çocukta birden aynı fenotip olması nedeniyle ikiz çocuklarda MmD hastalığının ortaya çıkmasına IVF uygulamasının neden olacağı düşünülmektedir.

Belirlenen *SEPN1* varyantımız klinik bulgular ve aile öyküsü ile birlikte incelendiğinde; ACMG standartlarının benin kriterlerine uygun herhangi bir durum tespit edilmemiştir. Sonuç olarak varyantımız ACMG standartının PM1, PM2, PP1, PP3 ve PP4 kanıtları sağlanmaktadır. 2 orta derece kanıt (PM1,PM2), 3 destekleyici kanıt (PP1, PP3 ve PP4) bulunması ACMG rehberine göre “muhtemelen patojenik” olarak sınıflandırılabilceğini belirtmektedir. Bilgisayar ortamındaki araçla (Intervar) (73), ikinci aşamada fenotip bulgularını manuel olarak eklediğimizde yapılan değerlendirmede de “muhtemelen patojenik” sonucuna ulaşılmıştır. ACMG standartlarına göre “muhtemel” ifadesi %90 oranında kesinlik ifade etmektedir (56). Etkin fonksiyon deneyleri ile desteklenmesi ya da aynı hastalık fenotipini gösteren farklı vakaların tanımlanması neticesinde “patojen” ifadesine ulaşılabilir.

SEPN1 genindeki patojenik mutasyonlarla ilgili pozitif klinik penetrans %100 olarak öngörülmektedir (18). *SEPN1* geninde tespit ettiğimiz, “muhtemelen

patojenik” yani %90 oranında patojen olan varyantın, ikiz kardeşlerde MmD hastalığının fenotipinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

NGS yöntemiyle çalışılan WES, WGS verileri analiz edilerek belirlenen hastalık etkeni varyantların, NGS verilerinin genel olarak daha düşük kalitede olması nedeniyle Sanger dizileme yöntemi ile konfirme edilmesi gerekmektedir (74). Son yıllarda yapılan karşılaştırma çalışmalarında NGS yöntemiyle tespit edilip, Sanger dizileme yöntemiyle tespit edilemeyen varyantlar bildiren yayınlarda, Sanger dizileme yöntemiyle konfirmasyon gerekliliği olmadığı savunulmaktadır (76). Çalışmamızda, NGS yöntemiyle elde edilen varyant, Sanger dizileme yöntemiyle dizilenerek konfirme edildi ve aile içi segregasyonu gösterildi.

Çalışmamızda hastalık etkeni olabileceğini düşündüğümüz varyant (ENST00000354177.4:c.715G>A/p.Gly239Arg), RAF inhibitörlerine karşı klinik direnç geliştiren BRAF^{V600} melanom dokusunun klinik spektrumunu karakterize etmek için tüm ekzom diziliminin gerçekleştirildiği bir çalışmada da raporlanmıştır. Ancak RAF inhibitörlerine direnç geliştiren varyant olarak ilişkilendirilmediğinden yayında değerlendirilmemiş olup “COSMIC” web sitesinde raporlanmıştır (77).

SEPN1 geni ilk defa omurga sertliği ve solunum güçlüğü sendromunun olduğu konjenital müsküler distrofilerle ilişkilendirildiği makalede 14 hastada *SEPN1* mutasyonları Moghadaszadeh ve ark. (2001) tarafından tanımlanmıştır. Bu hastalardan altı tanesinde *SEPN1* geninde c.817G>A/p.G273E varyantı belirlenmiştir (78). Bu makaleden bir yıl sonra yayınlanan ve *SEPN1* gen mutasyonlarının bulunduğu RSMD ve MmD fenotipleri arasındaki nozolojik sınırların yeniden değerlendirildiği makalede Moghadaszadeh ve ark.(2001) tarafından c.817G>A/p.G273E varyantının raporlandığı 6 hastadan 2’sine ait örneklerde *SEPN1* varyantı c.817G>A/p.G273R olarak belirtilmiştir. Bu durumda Moghadaszadeh ve ark.(2001) tarafından yayınlanan yayında protein pozisyon bilgisi yanlış olarak raporlandığını düşünmekteyiz. Söz konusu iki hastaya ait histopatolojik incelemede hastalardan birinde distrofik bulgu gözlenmediği, MmD histopatolojik bulgularının mevcut olduğu raporlanmıştır. Bu hastanın Türk olduğu görülmektedir. Aynı mutasyona sahip diğer hastada ise distrofik bulgular olduğu belirtilmiştir ancak MmD histopatolojik bulgusu yoktur (22).

SEPN1 ile ilişkili farklı fenotipte miyopatisi olan onbir çocuğun raporlandığı bir diğer makalede c.817G>A/p.G273R varyantı 3 hastada homozigot olarak raporlanmış, fakat klinik muayene ve histopatolojik inceleme ile MmD fenotipi ile ilişkilendirilmemiştir (79).

SEPN1 geninde c.817G>A/p.G273R varyantı farklı transkript pozisyonunda bizim belirlediğimiz c.715G>A/p.G239R varyantı ile aynıdır.

Selenoprotein N'in her iki izoformu iskelet kası, beyin, akciğer ve plasentada ifade edilirken; izoform 2 kalp, diyafram ve midede ifade edilir (35). *SEPN1* ile ilişkili miyopatilerde; kas zayıflığı, solunum güçlüğü fenotipinin görülmesi yoğun olarak ifade edildiği dokularla ilişkilendirilebilir. Yayınlanan çalışmalarda bazı MmD fenotipi gösteren bireylerin solunum yolu ya da göğüs enfeksiyonu nedeniyle vefat ettiği raporlanmıştır (12, 15, 24).

İki RSMD1 hastasının çalışıldığı ve *SEPN1* geninde iki yeni mutasyonun rapor edildiği bir çalışmada RSMD1'in patogenez mekanizmasını anlamak için aynı zamanda hastaların kan örneklerinde *SEPN1* geni ekspresyonları ve kas biyopsi örneklerinde *SEPN1* proteinini incelemişlerdir. Araştırmacılar *SEPN1* geninde belirledikleri prematür sonlanma kodonu oluşturan anlamsız mutasyonların sonucunda oluşan truncated (budanmış, güdük) mRNA'ların normalde NMD (nonsensemediated decay) mekanizması ile degrade olması gerektiğini belirtmektedirler. Bununla birlikte çalışmalarında *SEPN1* genine ait truncated (budanmış, güdük) mRNA'ları saptamış olma nedenlerinin *SEPN1* mRNA'sının NMD mekanizmasına direnç göstermiş olabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca çalışmada belirledikleri *SEPN1* genindeki yeni mutasyonlar ile *SEPN1* genine ait mRNA çalışmalarını karşılaştırdıklarında hastalar arasında farklılıklar bulunmuştur. Araştırmacılar çalışma sonucunda *SEPN1* geninde yeni mutasyonlar belirlediklerini ve RSMD1 hastalığında *SEPN1* geninin rolünün anlaşılması için daha fazla sayıda hastanın incelenmesi gerektiğini belirtmektedirler (80).

Bizim çalışmamızda periferik kan örneklerinde yapılan gen ifade (ekspresyon) deneylerinde; *SEPN1* gen ekspresyon seviyelerini, hastalık etkeni olduğu düşünülen varyantımızı homozigot olarak bulunduran ikiz kardeşlerde; heterozigot olarak bulunduran ebeveynler ve yabanıl olan sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0.1810$, $p<0.05$) olmadığı tespit edildi.

Analizlerimizde kardeşler arasında anlamlı olmasa da ekspresyon farkı bulunmaktadır. Ekspresyon çalışması sonucu vefat eden kardeşin mRNA ifadesinin, kardeşi (Hasta 1) ve sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür.

Farklı dokularda gen ifadesinin farklı olması; periferik kan hücreleri üzerinden yapılan *SEPN1* geninin ekspresyonu hastalık etkeni varyantın etkisi hakkında bilgi verebilir fakat etkili bir fonksiyon çalışması olarak düşünülemez. *SEPN1* gen ekspresyonu seviyesi iskelet kasında yüksek bulunduğunu ve *SEPN1* geninin rol aldığı, iskelet kasının sarkoplazmik retikulum yapısı, Ca^{+2} homeostasisi ve oksidatif aktivite mekanizmalarında yer alan proteinler ile ilişkisi ekspresyon çalışmasında kullanılan periferik kan dokusunda ve lenfositlerde bulunmadığını göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Ayrıca kantitatif gerçek zamanlı PZR çalışmasıyla *SEPN1* sadece gen ifadesi incelenmiş olup, protein olarak ne şekilde ifade edildiği bilinmemektedir. Bunun yanında kontrol örnek sayısının genişletilmesinin çalışmanın anlamını etkileyebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

MmD hastalığında belirlediğimiz *SEPN1* gen varyantımızın *SEPN1* gen ifadesi üzerindeki etkisini anlamak için gen ifade çalışılmasının hastalara ait kas biyopsi örneklerinde yapılması anlamlı olacaktır. Ayrıca *SEPN1* gen varyantının ürünü olan selenoprotein N seviyesinin kas doku örneklerinde değerlendirilmesi önemli olacaktır.

Bu çalışma sonucunda ilk kez ikiz çocuklarda, MmD hastalığı için *SEPN1* geninde bir varyant belirlenmiş olup, bu bilgi ile aileye genetik danışma verilebilecektir. Ayrıca çalışmamız, *SEPN1* genin MmD hastalığı patogenezi mekanizmasının anlaşılması için fonksiyonel çalışmalara kapı açmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Yıldırım M, editör. *İnsan Anatomisi Atlası Açıklamalı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2013.
2. Noyan A. *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. 17th ed. Ankara: Palme Yayıncılık, 2008.
3. Gündüz E. editör, Demirsoy A. editör, Türkan İ. editor. *Biyoloji*. 6th ed. Ankara Palme Yayıncılık, 2006.
4. Goldman L, I. Schafer A. *Cecil Medicine*. 23th ed. Amsterdam: Elsevier Journals, 2008.
5. Maggi. Congenital myopathies--clinical features and frequency of individual subtypes diagnosed over a 5-year period in the United Kingdom. *Neuromuscul Disord* 2013; **23**(3): 195-205.
6. Ravenscroft, Laing, Bonnemann. Pathophysiological concepts in the congenital myopathies: blurring the boundaries, sharpening the focus. *Brain* 2015; **138**(Pt 2): 246-268.
7. Hans H. Goebel, MD. Congenital Myopathies in the New Millennium. *Journal of Child Neurology* 2005; **20**(2): 94-101
8. North KN, Wang CH, Clarke N, Jungbluth H, Vainzof M, Dowling JJ ve ark. Bonnemann. Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul Disord* 2014; **24**(2): 97–116.
9. Jungbluth H. Current and future therapeutic approaches to the congenital myopathies. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2017; **64**: 191–200.
10. Engel AG, Gomez MR, Groover RV. Multicore disease. A recently recognized congenital myopathy associated with multifocal degeneration of muscle fibers. *Mayo Clin Proc* 1971; **46**(10): 666-81.

11. Ana Ferreiro, Michel Fardeau. 80th ENMC International Workshop on Multi-Minicore Disease: 1st International MmD Workshop 12–13th May, 2000, Soestduinen, *The Netherlands*. *Neuromuscular Disorders* 2002; **12**(1): 60-68.
12. Sharma MC, Gulati S, Sarkar C, Jain D, Kalra V, Suri V. Multi-minicore disease: a rare form of myopathy. *Neurol India* 2007; **55**(1): 50-3.
13. Currie S, Noronha M, Harriman D. Minicore disease. 3rd International Congress on Muscle Diseases. *Excerpta Medica Int Congress* 1974; **12** (Abstract).
14. Jungbluth H. Multi-minicore Disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2007; **2**: 31.
15. Ferreiro A, Estournet B, Chateau D, Romero NB, Laroche C, Odent S ve ark. Multi-Minicore Disease–Searching for Boundaries: Phenotype Analysis of 38 Cases. *American Neurological Association* 2000; **48**: 745–757.
16. Jungbluth H, Sewry C, Brown SC, Manzur AY, Mercuri E, Bushby K ve ark. Minicore myopathy in children: a clinical and histopathological study of 19 cases. *Neuromuscul Disord*. 2000; **10**(4-5): 264-73.
17. Clarke NF, Amburgey K, Teener J, Camelo-Piragua S, Kesari A, Punetha J, ve ark. A novel mutation expands the genetic and clinical spectrum of MYH7-related myopathies. *Neuromuscular Disorders* 2013; **23**(5): 432–436.
18. Lillis S, Abbs S, Ferreiro A, Muntoni F, Jungbluth H. Clinical utility gene card for: Multi-minicore disease. *European Journal of Human Genetics* 2012; **20**(2). Erişim 22.05.2019, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009146>.
19. Wallgren-Pettersson C. Congenital nemaline myopathy: a longitudinal study. *Academic dissertation, University of Helsinki, Commentationes Physico-Mathematicae 111/Dissertationes*; 1990; **30**: 102.
20. Hughes MI, Hicks EM, Nevin NC, Patterson VH. The prevalence of inherited neuromuscular disease in Northern Ireland. *Neuromuscul Disord*. 1996; **6**: 69–73.

21. Darin N, Tulinius M. Neuromuscular disorders in childhood: a descriptive epidemiological study from Western Sweden. *Neuromuscul Disord*. 2000; **10**: 1–9.
22. Ferreira A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Goemans N, Bönnemann C ve ark. Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet*. 2002; **71**(4): 739-49.
23. Swash M, Schwartzb M.S. Familial multicore disease with focal loss of cross-striations and ophthalmoplegia. *J Neurol Sci*.1981; **52**(1): 1-10.
24. Nadaj-Pakleza A, Fidziańska A, Ryniewicz B, Kostera-Pruszczyk A, Ferreira A, Kwieciński H, Kamińska A. Multi-minicore myopathy: a clinical and histopathological study of 17 cases. *Folia Neuropathologica*, 2007; **45**(2): 56-65.
25. Paljarvi L, Kalimo H, Lang H, Savontaus ML, Sonninen V. Minicore myopathy with dominant inheritance. *J Neurol Sci* 1987; **77**:11-22.
26. Vanneste JA, Stam FC. Autosomal dominant multicore disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1982; **45**(4): 360-5.
27. Yoshida T, Morita M, Yamanouchi Y, Okamoto K, Hirai S. A family with multicore disease. *Muscle Nerve* 1993; **16**(5): 568-9.1993
28. Guis S, Figarella-Branger D, Monnier N, Bendahan D, Kozak-Ribbens G, Mattei JP, Lunardi J, Cozzzone PJ, Pellissier JF. Multiminicore disease in a family susceptible to malignant hyperthermia: histology, in vitro contracture tests, and genetic characterization. *Arch Neurol*. 2004; **61**(1): 106-13.
29. Jeong SK, Kim DC, Cho YG, Sunwoo IN, Kim DS. A Double Mutation of the Ryanodine Receptor Type 1 Gene in a Malignant Hyperthermia Family with Multiminicore Myopathy. *J Clin Neurol*. 2008; **4**(3): 123-30.
30. Chauveau C, Bonnemann CG, Julien C, Kho AL, Marks H, Talim B ve ark. Recessive TTN truncating mutations define novel forms of core myopathy with heart disease. *Hum Mol Genet*. 2014; **23**(4): 980-91.

31. Liewluck T, Milone M, Tian X, Engel AG, Staff NP, Wong LJ. Adult-onset respiratory insufficiency, scoliosis, and distal joint hyperlaxity in patients with multiminicore disease due to novel *MEGF10* mutations. *Muscle Nerve*. 2016; **53**(6): 984-8.
32. Tein I, Elpeleg O, Ben-Zeev B, Korman SH, Lossos A, Lev D et al. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutation (c.319C>T) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of Ashkenazi Jewish origin. *Mol Genet Metab*. 2008; **93**(2): 179-89.
33. Tajsharghi H, Darin N, Tulinius M, Oldfors A. Early onset myopathy with a novel mutation in the Selenoprotein N gene (*SEPN1*). *Neuromuscul Disord*. 2005; **15**: 299-302.
34. Ge L, Fu X, Zhang W, Wang D, Wang Z, Yuan Y et al. Recessive mutations in proximal I-band of *TTN* gene cause severe congenital multi-minicore disease without cardiac involvement. *Neuromuscul Disord*. 2019; **29**(5): 350-357.
35. Castets P, Lescure A, Guicheney P, Allamand V. Selenoprotein N in skeletal muscle: from diseases to function. *J Mol Med (Berl)*. 2012; **90**(10): 1095-107.
36. Lescure A, Gautheret D, Carbon P, Krol A. Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 38147–38154.
37. Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta*. 2009; **1790**: 1424–1428.
38. Petit N, Lescure A, Rederstorff M, Krol A, Moghadaszadeh B, Wewer UM, Guicheney P. Selenoprotein N: an endoplasmic reticulum glycoprotein with an early developmental expression pattern. *Hum Mol Genet*. 2003; **12**: 1045–1053.
39. Allmang C, Krol A. Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. *Biochimie*. 2006; **88**(11): 1561-71.

40. Caban K, Copeland PR. Size matters: a view of selenocysteine incorporation from the ribosome. *Cell Mol Life Sci.* 2006; **63**(1): 73-81.
41. Castets P, Bertrand AT, Beuvin M, Ferry A, Le Grand F, Castets M ve ark. Satellite cell loss and impaired muscle regeneration in selenoprotein N deficiency. *Hum Mol Genet.* 2011; **20**: 694–704.
42. Stoytcheva ZR, Berry MJ. Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. *Biochim Biophys Acta.* 2009; **1790**: 1429–1440.
43. Arbogast S, Ferreiro A. Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. *Antioxid Redox Signal.* 2010; **12**: 893–904.
44. Arbogast S, Beuvin M, Fraysse B, Zhou H, Muntoni F, Ferreiro A. Oxidative stress in *SEPN1*-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann Neurol* 2009; **65**: 677–686.
45. Moghadaszadeh B, Aracena-Parks P, Ronan M, Gasmi H, Agrawal P, Hamilton S, Beggs A. *SEPN1*-related myopathy: a defect in redox regulation. *Neuromuscul Disord.* 2007; **17**: 899–900.
46. Steinbrenner H, Sies H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**:1478–1485.
47. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal.* 2007; **9**: 775–806.
48. Jurynek MJ, Xia R, Mackrill JJ, Gunther D, Crawford T, Flanigan KM ve ark. Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 12485–12490.
49. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev.* 2000; **80**: 1215–1265.
50. Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve.* 2007; **35**: 411–429.

51. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P ve ark. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**(45): 19096-101.
52. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* .2014; **59**(1): 5-15.
53. Kobelka CE. Exome sequencing: expanding the genetic testing toolbox. *Clin Genet*. 2010; **78**(2): 132-4.
54. Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe WA, Jiang H, Feng G. Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer Inform*. 2014; **13**: 67-82.
55. Nitsch D, Tranchevent LC, Thienpont B, Thorrez L, Van Esch H, Devriendt K, Moreau Y. Network analysis of differential expression for the identification of disease-causing genes. *PLoS One* 2009; **4**(5): e5526.
56. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J ve ark. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; **17**(5): 405-24.
57. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *Am J Hum Genet*. 2017; **100**(2): 267-280.
58. Amendola LM, Dorschner MO, Robertson PD, Salama JS, Hart R, Shirts BH ve ark. Actionable exomic incidental findings in 6503 participants: challenges of variant classification. *Genome Res*. 2015; **25**(3): 305-15.
59. Genomize. SEQ Platformu. 21.03.2019; Erişim 22.05.2019, <https://seq.genomize.com/> .
60. Phenolyzer: Phenotype based gene analyzer. 08.05.2019; Erişim 22.05.2019, <http://phenolyzer.wglab.org/> .
61. GeneCards-Human Genes-Gene Database-Gene Search. Erişim 22.05.2019, <https://www.genecards.org/> .

62. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; **74**(12): 5463-7.
63. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000; **25**(2): 169-93.
64. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K ve ark. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006; **27**(2-3): 95-125.
65. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 2005; **6**: 62.
66. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007; **8**(2): R19.
67. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; **29**(9): e45.
68. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*. 2015; **3**: 9-16.
69. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*. 2001; **25**(4): 402-8.
70. MutationTaster. Erişim 23.05.2019, <http://www.mutationtaster.org/> .
71. SIFT - Predict effects of nonsynonmous / missense variants. Erişim 23.05.2019, <https://sift.bii.a-star.edu.sg/> .
72. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs. Erişim 23.05.2019, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> .
73. InterVar-Genetic variants Interpretation by ACMG/AMP 2015 guideline. Erişim 23.05.2019, <http://wintervar.wglab.org/> .

74. Cavalleri GL, Delanty N. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2012; **89**: 65-83.
75. Home - HomoloGene – NCBI. Erişim 23.05.2019, www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene.
76. Beck TF, Mullikin JC; NISC Comparative Sequencing Program, Biesecker LG. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clin Chem.* 2016; **62**(4): 647-54.
77. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 2014; **4**(1): 94-109.
78. Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L ve ark. Mutations in *SEPN1* cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nature.* 2001; **29**: 17-18.
79. Schara U, Kress W, Bönnemann CG, Breitbach-Faller N, Korenke CG, Schreiber ve ark. The phenotype and long-term follow up in 11 patients with juvenile selenoprotein N1-related myopathy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2008; **12**(3): 224-30.
80. Okamoto Y, Takashima H, Higuchi I, Matsuyama W, Suehara M, Nishihira Y, Hashiguchi A, Hirano R, Ng AR, Nakagawa M, Izumo S, Osame M, Arimura K, Molecular mechanism of rigid spine with muscular dystrophy type 1 caused by novel mutations of selenoprotein N gene. *Neurogenetics.* 2006 Jul;**7**(3):175-83.



HAM VERİLER

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 527

Konu: Prof. Dr. Burçak VURAL hk.

Tarih : 23.05.2017

Sayın Prof. Dr. Burçak VURAL
Tıbbi Genetik

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 19/04/2017 gün ve 150466 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Fatma Sarı TUNEL' in yürüteceği 2017/494 dosya numaralı "Multiminicore hastalığına (MmD) sahip ikiz kardeşlerde tüm ekzom dizileme sonuçlarının değerlendirilerek varyant analizi, hastalık etkeni varyantların konfirmasyonu ve gen ekspresyon analizi çalışmaları" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/05/2017 gün ve 09 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MULTİMİNİCORE HASTASI İKİZ KARDEŞİN TÜM EKZOM
DİZİLEME VERİSİNDEN HASTALIK ETKENİ VARYANTLARIN
TESPİTİ, KONFİRMASYONU VE GEN EKSPRESYONU
ÇALIŞMALARI

ORIJİNALLIK RAPORU

% 2	% 1	% 0	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNT ERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	deneysestip.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Istanbul Medeniyet Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to Kastamonu University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	pharmacy.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to University of Sydney	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma	Soyadı	SARI TUNEL
Doğ.Yeri	SAMSUN	Doğ.Tar.	25.02.1988
Email	ftm.sari@hotmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İnönü Üniversitesi	2011
Lise	YDA Eyüp Otakçılar Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Kalite Birim Temsilcisi	Haseki EAH Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi	2017-Devam
2.	Kalite Yöneticisi	Burç Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi	2015-2016
3.	Laboratuvar Teknisyeni, Kalite Yönetim Sorumlusu	Ahenk Tıbbi Laboratuvarı	2012-2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	57,5	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer)Puanı (ALES)	74,41	65,51	52,16

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office (Word, Excel, Power Point)	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Fatma Sarı-Tunel, Feyza Nur Tuncer, A. Evrim Komurcu-Bayrak, Seda Yılmaz-Salman, Piraye Oflazer, Burçak Vural. *Whole Exome Sequence Analyses In A Consanguineous Family With Affected Dizygotic Twins Reveal A Novel SEPN1*

Variant Associated With Multiminicore Disease. 13. Balkan Congress Of Human Genetics Congress, Edirne, Turkey, 17-20 April 2019.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):



