

VVOLKAN KARAMAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021

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

(DOKTORA TEZİ)

**SANTRAL ERKEN PUBERTE OLGULARINDA YENİ
NESİL DİZİLEME İLE MOLEKÜLER PATOLOJİNİN
AYDINLATILMASI**

VOLKAN KARAMAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. ZEHRA OYA UYGUNER**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI



BEYAN



ITHAF

Bu tezi *Aileme* ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini bir an olsun bile paylaşmaktan çekinmeyen, sabırlı, öğretici ve düşünmeye yol gösterici çok değerli danışman hocam *Prof. Dr. Zehra Oya UYGUNER*'e

Tezimin her cümlesini sabırla okuyup dokunuşlarıyla katkısını ve engin bilgilerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, öğretici ve bilgilendirici çok kıymetli sayın hocam *Prof. Dr. Seher BAŞARAN*'a,

Tezimdeki özellikle klinik bilgilerin oluşmasında öğretici ve yardımcı olan, her sorumu sabırla yanıtlayan, çalışma temposu asla düşmeyen değerli hocam *Prof. Dr. Firdevs BAŞ*'a

En başta tüm ekzom dizileme verileri olmak üzere moleküler teknik ve analizlerde problem çözümüne odaklı, sorgularken öğreten, ikinci tez danışmanım, bir ağabey olarak gördüğüm sayın hocam *Dr. Öğr. Üyesi Güven TOKSOY*'a

Bilgi ve destekleriyle hep yanımda olduklarını bildiğim sevgili hocalarım, *Prof. Dr. Birsen KARAMAN*, *Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK*, *Doç. Dr. Bilge ÖZSAİT*, *Doç. Dr. Gözde Yeşil* ve *Uzm. Dr. Ayça ASLANGER*'e

Tezimin analizleri ve görsel programlarında zaman ayırıp öğretmekten asla şikayet etmeyen sayın *Doç. Dr. Asuman GEDİKBAŞI* ve *Dr. Çağrı GÜLEÇ*'e

Tezimin klinik bulgularıyla ilgilenip yol gösteren arkadaşlarım *Dr. Esin KARAKILIÇ ÖZTURAN*, *Dr. Pınar ÖZTÜRK* ve *Dr. Zehra YAVAŞ ABAL*'ya

Tez çalışmam boyunca moral, motivasyon ve desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarım *Alev YALIN*, *Gizem KINA*, *Ebru PEKTAŞ* ve *Fatih TEPGEÇ*'e

Sabırla ve içtenlikle desteklerini esirgemeyen gelmiş ve geçmiş Tıbbi Genetik AD. tüm çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi destekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan özverili ve sevgili aileme,

Her zaman yanı başımda olan, motivasyon ve huzur kaynağım sevgili eşim *İrem Yeşildağ KARAMAN*'a

Tezimin yazımı boyunca meraklı ve eğlenceli soruları ile yazıma ortak olan oyun arkadaşım canım kızım *Ahu Naz KARAMAN*'a,

Şimdi yanımda olmasa bile varlığını hep hissettiğim ve özlediğim *Babam*'a

teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından Proje No: TDK-2018-32682 desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XVİİİ
ABSTRACT.....	XİX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
4. BULGULAR.....	78
5. TARTIŞMA	116
KAYNAKLAR	136
HAM VERİLER	144
FORMLAR	145
ETİK KURUL KARARI	146
PATENT HAKKI İZNİ	147
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	148
ÖZGEÇMİŞ	149

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1; SEP ile ilişkili genler ve özellikleri (Genlerin transkript numaraları için HGMD'den yararlanılmıştır (25)).	8
Tablo 2; İndeks ve çalışmaya katılan aile bireylerinin DNA ölçüm bilgileri.	45
Tablo 3; Tanımlı SEP genleri için tasarlanan primer çiftleri, kapsadığı ekzon bölgeleri ve amplikon boyları	48
Tablo 4; <i>PROKR2</i> geni primer çiftleri (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı kayıtları).	50
Tablo 5; <i>DLK1</i> - cDNA primer çiftleri	50
Tablo 6; <i>ANO4</i> gen varyantı için tasarlanan primer çiftleri (NM_178826.3)	50
Tablo 7; <i>CDHR3</i> gen varyantı için tasarlanan primer çiftleri (NM_152750.5).	50
Tablo 8; <i>CDHR3</i> - cDNA primer çiftleri	50
Tablo 9; <i>FGFR1</i> geni primer çiftleri (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı Kayıtları) (NM_023110).	51
Tablo 10; Hedef bölgelerin çoğaltılması için hazırlanan karışım	58
Tablo 11; Hedef bölgelerin çoğaltılması için PZR döngü koşulları	58
Tablo 12; Amplikonların kesilmesi amacıyla uygulanan PZR koşulları	59
Tablo 13; Barkod ve adaptör karışımı için gerekli içerik ve hacimlerini gösteren tablo (x:seçilmiş olan örnek).	60
Tablo 14; Barkod ve adaptör ligasyonu için karışım hazırlama malzemeleri ve hacimlerini gösteren tablo.	60
Tablo 15; Ligasyon işleminde uygulanan PZR koşullarını gösteren tablo	61
Tablo 16; Kütüphane çoğaltımı için PZR protokolünü gösteren tablo	61
Tablo 17; Varyant Puanlama Tablosu (91)	69
Tablo 18; Patojenik olduğu öne sürülen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler	70
Tablo 19; Zararsız tariflenen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler	71
Tablo 20; Hastalıkların araştırılmasında kullanılan veri tabanları	72
Tablo 21; Bu tez kapsamında yararlanılan bazı veri tabanları ve çevrimiçi bağlantıları	73
Tablo 22; Veri filtrelemede kullanılan imprinted genlerin isimleri, kromozomal lokasyonları ve anlatım yapılan parental alleli (93,94).	73

Tablo 23; Veri filtrelemede kullanılan hipofiz bezi ilişkili genlerin listesi.....	75
Tablo 24; Olguların demografik özellikleri.....	78
Tablo 25; Olguların başvuru sırasındaki antropometrik ölçümleri ve klinik özellikleri	79
Tablo 26; Olguların tanı sırasındaki laboratuvar bulguları.....	81
Tablo 27 TED çalışmasında SEP#11, indeks olguda (III:1) etkilenmiş kız kardeş (III:2) ve annede (II:1) saptanan varyant sayıları	96
Tablo 28; TED çalışmasında elde edilen varyantların filtrelenmesi sonrasında belirlenen patojenik/olası patojenik/VUS statüsündeki veya en az iki <i>in silico</i> analizde zararlı öngörüsünde bulunan varyantlar.....	98
Tablo 29; TED çalışmasında SEP#15 ve etkilenmiş kuzende saptanan varyant sayıları	107
Tablo 30; SEP#15 ailesinde TED çalışmasında elde edilen varyantların filtrelenmesi ardından belirlenen patojenik/olası patojenik/VUS statüsündeki veya en az iki <i>in silico</i> analizde zararlı öngörüsünde bulunan varyantlar	109
Tablo 31; SEP olgularında <i>KISS1</i> geninde saptanan polimorfik varyantlar ve literatürde bildirilmiş SEP ilişkili polimorfik varyantlar.	114
Tablo 32; <i>MKRN3</i> geninde ilişkili varyant saptanan olgumuz ile aynı varyantın gösterildiği literatürdeki olgunun klinik verilerinin karşılaştırması (Simon (2016)'dan düzenlenmiştir)	124

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1; Kızlarda ve erkeklerde Tanner evrelemesi (Tanner 1969, 1970)	3
Şekil 2; Hipotalamo-hipofizer-gonad (HHG) eksen ve çalışma düzeni	5
Şekil 3; Günümüzde puberte ile ilişkisi bildirilmiş olan genler (25).....	8
Şekil 4; <i>KISS1R</i> geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli	9
Şekil 5; a. <i>KISS1R</i> gen transkriptinin (NM_032551.5) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. <i>KISS1R</i> proteinin (NP_11 5940.2) UniProt (Q969F8) ve Prosite (PS50262) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.	9
Şekil 6; <i>KISS1R</i> proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.....	10
Şekil 7; <i>KISS1R</i> proteinin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısı (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.....	10
Şekil 8; <i>KISS1</i> geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli	11
Şekil 9; a. <i>KISS1</i> transkriptinin (NM_002256.4) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. <i>KISS1</i> proteinin (NP_002247.3) UniProt (Q15726) ve Prosite (PS51127) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.	11
Şekil 10; <i>KISS1</i> proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.....	12
Şekil 11; <i>KISS1</i> proteinin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısının gösterimi (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.....	12
Şekil 12; Kisspeptinin peptid yapıları Pinilla (32) dan modifiye edilerek düzenlenmiştir.	13
Şekil 13; <i>PROKR2</i> geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli.....	14
Şekil 14; a. <i>PROKR2</i> transkriptinin (NM_144773.3) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. <i>PROKR2</i> proteinin (NP_658986.1) UniProt (Q8NFJ6) ve	

Prosites (PS50262) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.	15
Şekil 15; PROKR2 proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.....	15
Şekil 16; PROKR2 proteinin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısının gösterimi (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.....	16
Şekil 17; <i>MKRN3</i> geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli.....	17
Şekil 18; a. <i>MKRN3</i> gen transkriptinin (NM_005664.3) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. <i>MKRN3</i> proteinin (NP_005655.1) UniProt (Q13064) ve Prosites (PS50103) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.	17
Şekil 19; <i>MKRN3</i> proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.	18
Şekil 20; <i>MKRN3</i> proteinin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısının gösterimi. (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.....	18
Şekil 21; <i>MKRN3</i> geninin PWS/AS ilişkili gen kümesi içindeki yerleşimi (48).....	22
Şekil 22; <i>MKRN3</i> proteininin farklı organlardaki anlatım oranları, The Human Protein Atlas veri tabanı sitesinden alınan grafik (54). Anonim 45 farklı insana ait doku tipinin immünohistokimyasal test ile antikor bazlı protein profillemesinden görselleştirilmiştir (Bu görsel Türkçe'ye uyarlanmıştır).	23
Şekil 23; <i>MKRN3</i> proteini ve çinko parmak bölgeleri Christoforidis (2017) ve Valaderes (2019)'den modifiye edilerek düzenlemiştir(41,57).....	24
Şekil 24; <i>DLK1</i> geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli.....	24
Şekil 25; a. <i>DLK1</i> gen transkriptinin (NM_003836.7) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. <i>DLK1</i> proteinin (NP_003827.4) UniProt (P80370) ve Prosites (PS50193) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.	25
Şekil 26; <i>DLK1</i> gen ekspresyonunun 53 dokudaki gösterimi (GTEx portalından alınmış görseldir).	26

Şekil 27; DLK1 proteinin domain yapısı Gomes (2019)'den modifiye edilerek sunulmaktadır (62). SP: sinyal dizisi, TM: transmembran, EGF-LD:EGF benzeri domain CR; Sitoplazmik alan.	26
Şekil 28; DLK1 proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.....	27
Şekil 29; DLK1 proteinin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısının gösterimi (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.....	27
Şekil 30; SEP ilişkili bilinen genlerin kodladığı proteinlerin birbiriyle ilişkileri <i>in silico</i> araçlarla inBio Discover açık veri tabanından alınarak sunulmuştur.	29
Şekil 31; G bantlama ile bantlanmış normal bir karyotip örneği (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Sitogenetik laboratuvarı arşivi).....	31
Şekil 32; aCGH tekniğinin şematize edilerek gösterimi (64)	33
Şekil 33; aCGH tekniğinin analiz ara yüzü (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Sitogenetik laboratuvarı arşivi)	33
Şekil 34; Sanger Dizileme tekniğinin gösterimi, https://letstalkscience.ca/educational-resources/backgrounders/sanger-sequencing sitesinden Türkçe'ye çevrilerek modifiye edilmiştir.	35
Şekil 35; Applied Biosystems® 3500 / 3500xL SD için genetik analiz cihazı, http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4476988.pdf sitesinden alınarak sunulmaktadır.....	36
Şekil 36; MLPA protokolünün şematize aşamaları, https://www.mrcholland.com/ 'dan modifiye edilerek düzenlenmiştir.	37
Şekil 37; Dizileme teknolojilerindeki ilerlemeler, https://www.pacb.com/blog/the-evolution-of-dna-sequencing-tools/ sitesinden Türkçe olarak modifiye edilmiştir.	38
Şekil 38; Farklı YND platformlarında DNA dizilemenin şematize edilmesi (Gupta 2019) (68) (Türkçe olarak modifiye edilmiştir).....	39
Şekil 39; PacBio ve Oxford Nanopore'un platform, okuma uzunluğu vb. karşılaştırılması (Kanzi 2020'den modifiye edilerek düzenlenmiştir) (69).	40
Şekil 40; Farklı YND platformları ve özellikleri ile ilgili bazı bilgiler Türkçe düzenlenmiştir (Kanzi 2020)' den (69).....	40

Şekil 41; Ion AmpliSeq™ Exome RDY kit ile ekzom dizileme basamaklarının şematik gösterimi (http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CSD/Flyers/ion-ampliseq-exome-rdy-flyer.pdf).....	56
Şekil 42; Ion AmpliSeq için Ekzom RDY iş akış şeması (https://www.thermofisher.com/)’dan düzenlenmiştir.....	57
Şekil 43; Hedefli çoğaltılan reaksiyonların birleştirilmesi	59
Şekil 44; Ion GeneStudio™ S5(https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A27212#/A27212).....	64
Şekil 45; Escalante, Next generation sequencing technologies’den düzenlenmiştir	64
Şekil 46; Ion Torrent dizilemede çipe verinin gönderiminin şematize edilmesi (https://researchcrunch.org/an-in-depth-guide-to-next-generation-sequencing/ den modifiye edilerek düzenlenmiştir.).....	65
Şekil 47; Ion Şef / Chef Cihazı (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4484177#/4484177).....	66
Şekil 48; Torrent Server ın üzerinde okuma özetleri ve uzunluk bilgilerinin gösterimi	66
Şekil 49; 2015 yılı ACMG-AMP yönergelerinden 28 kriterin gösterimi. Bazı kriterler için, veri tabanının adı ve boyutu parantez içinde belirtilmiştir (Li 2017).	72
Şekil 50; SEP#01’in aile ağacı.....	84
Şekil 51; SEP#02’in aile ağacı.....	85
Şekil 52; SEP#03 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	86
Şekil 53; SEP#04 ’ün aile ağacı.....	87
Şekil 54; SEP#17 olgusunda <i>DLK1</i> geninin normal (4xbmB, 383aa) (a) ve kodladığı peptidde oluşması beklenen p.(Cys389Ter) değişiminin (4cbzA, 119 aa) (b) I-Tasser (31) ve PyMOL Viewer (95) da tasarlanan 3D modeli (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER ’dan modifiye edilerek düzenlenmiştir.).....	87
Şekil 55; SEP#05’in aile ağacı.....	88
Şekil 56; SEP#06 ’ın aile ağacı.....	89
Şekil 57; SEP#07 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	90
Şekil 58; SEP#08 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	91
Şekil 59; SEP#09 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	92
Şekil 60; SEP#10 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	93
Şekil 61; SEP#11 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	94

Şekil 62; SEP#11 ailesinde yapılan TED analizinin Torrent Server üzerindeki okuma özetleri ve uzunluk bilgileri.	95
Şekil 63;Torrent Server üzerinde SEP#11 ailesinde haritalama sonuçlarının gösterimi	95
Şekil 64;Torrent Server üzerinde SEP#11 ailesinde kapsam ve derinlik analizlerinin gösterimi	96
Şekil 65; SEP#11 ailesindeki varyantların bireylerdeki dağılımı	97
Şekil 66; SEP#11 ailesinde TED’de filtrelenen varyantların gösterimi	97
Şekil 67; TED analizinde SEP#11 ailesinde ANO4 geninde intron 26 da saptanan ve in silico analizlerde kırılma hatasına yol açtığı tahmini verilen c.2677-7_2677-6insGT değişimin IGV görüntüsü.....	99
Şekil 68; SEP#11 ailesinde ANO4 geninde intron 26’da saptanan değişimin SD sonuçlarının aile ağacı üzerinde gösterimi.....	99
Şekil 69; SEP#12 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	101
Şekil 70; SEP#13 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	102
Şekil 71; SEP#14 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	103
Şekil 72; SEP#15 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	105
Şekil 73; SEP#15 ailesinde yapılan TED analizinin Torrent Serverın üzerindeki okuma özetleri ve uzunluk bilgileri.	105
Şekil 74; Torrent Server üzerinde SEP#15 ailesinde haritalama sonuçlarının gösterimi	106
Şekil 75; Torrent Server üzerinde SEP#15 ailesinde kapsam ve derinlik analizlerinin gösterimi	107
Şekil 76; SEP#15 ailesindeki varyantların bireylerdeki dağılımı	108
Şekil 77; SEP#15 ailesinde TED’de filtrelenen varyantların gösterimi	108
Şekil 78; TED analizinde SEP#15 ailesinde CDRH3 geninde saptanan c.1225-1G>A değişiminin IGV görüntüsü.	110
Şekil 79; SEP#15 aile ağacı ve CDHR3 varyantının ailedeki segregasyonu. CDHR3 geninde intron 9 da saptanan c.1225-1G>A kırılma bölgesi değişiminin aile ağacı üzerinde gösterimi. II.2, II.3, II.5, III.1 ve III.2 bireylerinde saptanan değişim II.1, II.4 ve III.3 de saptanmamıştır.	111
Şekil 80; SEP#16 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi	112
Şekil 81; SEP#17 aile ağacı ve KISS1R varyantının ailedeki segregasyonu.	113

- Şekil 82; SEP#18 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi. SEP#18 olgusunda saptanan MKRN3 gen varyantının ailedeki dağılımı; II:3, II:6, III:1, III:3'de heterozigot saptanan varyantı II:2 ve III:2 bireyleri taşımamaktadır. 114
- Şekil 83; MKRN3 proteininde bildirilmiş değişimlerin şekil üzerinde gösterimi, çalışmamızda saptanan varyant kırmızı kare içerisinde gösterilmiştir (Montenegro (2020) ve Valaderes (2019))'den düzenlenmiştir (41). 121
- Şekil 84; *DLK1* geni, ekzon yapıları, kodladığı proteinin domain yapıları, rezidüleri ve günümüzde hastalık ilişkili bildirilmiş varyantları. (a) NM_003836.7 transkripti, ekzonları, ekzon-intron nükleotidleri, ekzonlar arasında ortak kodlanan rezidüler kırmızı sayılarla ifade edildi, (b) proteininin (Uniprot; P80370) ve domain yapıların şematik gösterimi. Kısaltmalar aa= Aminoasit, SP=sinyal peptidi (1-23), 6 EGF benzeri domain (24-245), hücre dışı bölge (24-303), CR=sitoplazmik bölge (328-383). Günümüzde HGMD de bildirilen mutasyonlar listelenmektedir (siyah), çalışmamızda saptanan mutasyon (kırmızı) (Jensen (1994), Gomes (2019), Uniprot.org, HGMD ve Ensembl'dan modifiye edilerek düzenlenmiştir). 128
- Şekil 85; CDHR3 proteinin I TASSER da oluşturulan 3 boyutlu yapısının gösterimi. Peptid zincirinde N' bölgeden C-terminaline gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır. 133

SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

ACMG	: American College of Medical Genetics and Genomics
aa	: Amino asit
bç	: Baz Çifti
BAM	: Binary Alignment Map
cDNA	: Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
CNV	: Copy number variation (Kopya Sayısı Değişiklikleri)
DLK1	: Delta like non-canonical Notch ligand1
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
ddNTP	: Didideoksi nükleotid trifosfat
del/dup	: delesyon/duplikasyon
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Dk	: Dakika
DM	: diabetes mellitus
dH₂O	: Distile su
E2	: Östradiol
EP	: Erken Puberte
emPCR	: Emülsiyon Temelli Polimeraz Zincir Reaksiyonu
EDTA	: Etilen diamin tetraasedik asit
ExAC	: Exome Aggregation Consortium
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GAD	: Gene associated with Mendelian Disorders
GnRH	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
GABA	: γ -amino bütirik asit
GnomAD	: Genome Aggregation Database
GWAS	: Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (Genome-wide association study)
HGMD	: Human Gene Mutation Database (İnsan Mutasyon Veri Bankası)
HGVS	: Human Genome Variation Society
HH	: Hipogonadotropik Hipogonadizm

HHG	: Hipotalamik-Hipofiz-Gonadal
HiDi	: Highly Deionized
IR	: Ion Reporter
IRGV	: Ion Reporter Genomic Viewer
IGV	: Integrative Genomics Viewer
İHH	: İzole Hipogonadotropik Hipogonadizm
İGP	: İnsan Genom Projesi
KED	: Klinik ekzom dizileme
KISS1	: KiSS-1 metastasis suppressor
KISS1R	: KISS1 receptor
Kb	: kilobaz
LH	: Luteinize Edici Hormon
LHRH	: Luteinizan hormon salgılatıcı hormon
Mat	: Maternal
Mbç	: Mega baz çifti
MAF	: Minör allel frekansı
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MLPA	: Multiplex ligation-dependent probe amplification
MKRN3	: Makorin ring finger protein 3
NPY	: Nöropeptit Y
NCBI	: The National Center for Biotechnology Information
ncRNA	: Küçük Kodlamayan RNA
OD	: Otozomal Dominant
OMIM	: Online Mendelian Inheritance in Man
OR	: Otozomal Resesif
ÖEB	: Önerilen erişkin boy
Pat	: Paternal
PBY	: Puberte başlangıç yaşı
PEP	: Periferik Erken Puberte
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PHA	: Fitohemaglütinin

PROKR2	: Prokineticin receptor 2
PGE2	: Prostaglandin
RNA	: Ribonükleik Asit
SEP	: Santral Erken Puberte
Sn	: Saniye
SD	: Sanger Dizileme
SNP	: Single Nucleotide Polymorphisms
TED	: Tüm Ekzom Dizileme
Tm	: Temperature of Melting
VIP	: Vasoaktif İntestinal Peptit
TGD	: Tüm Genom Dizileme
UTR	: Untranslated region
UCSC	: University of California Santa Cruz
USG	: Ultrasonagrafi
VCF	: Variant Caller Format
VUS	: Variant of Uncertain Significance (önemi bilinmeyen varyant)
YND	: Yeni Nesil Dizileme
µl	: Mikrolitre

ÖZET

Karaman V. Santral Erken Puberte Olgularında Yeni Nesil Dizileme İle Moleküler Patolojinin Aydınlatılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2021.

Kızlarda sekiz, erkeklerde dokuz yaşından önce ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesi erken puberte (EP) olarak tanımlanır. Gerçek/Santral erken puberte (SEP), gonadotropin salgılayan hormonun hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini erken etkinleştirilmesiyle ortaya çıkar. Kızlarda daha sık gözlenen SEP'in etiyolojisinde %60-80 genetik bir köken olduğu ve yaklaşık %27,5'inde otozomal dominant kalıtım bildirilmektedir. Günümüzde puberte yolaklarında 40'dan fazla gen tanımlanmış ancak pek azı (*KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3*, *DLK1* ve *PROKR2*) SEP ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda, 18 ailevi SEP olgusunda bildirilen genlerin Sanger Dizileme (SD) ile taranması, ilişkili değişim saptanmayan iki ailede tüm ekzom dizileme (TED) ile yeni genlerin araştırılması amaçlandı. *DLK1*'de, iki farklı kız olguda iki farklı tanımlanmamış varyant (c.67+78C>T ve c.357C>G;p.(Tyr119Ter)) ve *MKRN3*'de bir kız olguda daha önce SEP ilişkisi bildirilmiş bir değişim (c.982C>T;p.(Arg328Cys)) gösterildi. Aile çalışmasında *DLK1* ve *MKRN3* varyantlarının maternal imprinted özellik ile uyumlu olarak anlatım yapan paternal allelde yer aldığı gösterildi. *DLK1* ve *MKRN3*'ün olgularımızdaki SEP'in %17'sinden sorumlu olduğu saptandı. TED uygulanan iki aileden birinde ilişkili bir gen gösterilemezken diğerinde *CDHR3*'de evölüsyonel olarak korunmuş intronik bölgede (*splicing acceptor*) c.1225-1G>A saptandı ve değişimin diğer aile bireylerinde klinikle uyumlu seyrege olduğu gösterildi. Hücre zarında kalsiyum-bağımlı adhezyon yapısı ile hücre-hücre etkileşiminde ve hücre-iskeleti kompleksinin düzenlenmesinde rolü olan *cadherin* protein ailesinin bir üyesi olan *CDHR3*'ün günümüzde herhangi bir fenotiple ilişkisi bildirilmemiştir. İleride *CDHR3*'ün SEP ile ilişkisinin fonksiyonel olarak araştırılması ve bilinen genlerde mutasyon saptanmayan diğer olgu ve ailelerimizde TED yapılması planlandı. SEP'te yeni genlerin tanımlanarak puberte yolaklarının daha iyi anlaşılmasının prepubertal çocukların, presemptomatik tanı ve tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler : Santral erken puberte, tüm ekzom dizileme, *MKRN3*, *DLK1*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-32682

ABSTRACT

Karaman V. Enlightenment of Molecular Pathology with Next Generation Sequencing in Central Precocious Puberty. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Doctoral Thesis. İstanbul. 2021.

The development of secondary sex characteristics before the age of eight in girls and nine in boys is defined as precocious puberty. True/Central precocious puberty (CPP) occurs upon early activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis that releases gonadotropins. CPP, higher frequency in girls, reveals 60-80% genetic cause and ~27.5% is autosomal dominant. Today, >40 genes have been revealed in puberty, but few (*KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3*, *DLK1*, and *PROKR2*) are associated with CPP. In our study, 18 familial CPP patients are stepwise investigated by Sanger sequencing (SD) for known genes and two families by whole-exome-sequencing (WES). In *DLK1*, two different novel (c.67+78C>T and c.357C>G;p.(Tyr119Ter)) and in *MKRN3* one known variant (c.982C>T;p.(Arg328Cys)), all in females, are revealed. Segregation analysis confirmed all are paternally inherited, complying with maternal imprinted. As a result, *DLK1* and *MKRN3* were found responsible for 17% of our CPP. No associated variant was identified in one family with WES, while c.1225-1G>A was shown in the splicing acceptor region of *CDHR3* segregating in affected members in the second family. *CDHR3*, a member of the cadherin protein family that plays a role in cell-cell interaction and the regulation of cell-skeleton complex with the structure of calcium-dependent adhesion in the cell membrane, has not been associated with any phenotype before. In the future, a functional investigation is planned for this variant. It was thought that a better understanding of puberty pathways by identifying new genes in CPP could contribute to the development of new strategies for prepubertal children in presymptomatic diagnosis and treatment.

Key Words: Central precocious puberty, whole exome sequencing, *MKRN3*, *DLK1*

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2018-32682

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağı ile yetişkinlik arasındaki geçiş dönemi olarak tanımlanan puberte (ergenlik); genetik, hormonal, çevresel, etnik, beslenme, sosyoekonomik ve psikolojik koşullardan etkilenen karmaşık bir biyolojik süreçtir (1,2). Bu süreçte, hipotalamo-hipofizer-gonad (HHG) eksenin uyarılması ile fiziksel değişiklikler, ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimi, gonadların olgunlaşması ve üreme kapasitesinin kazanılması gerçekleşir (1). İlk pubertal sinyaller, kızlarda telarş (meme tomurcuklanması), erkeklerde ise testis hacminde artıştır. Normal puberte aralığı kızlarda 8-13 yaş, erkeklerde ise 9-14 yaş arasında kabul edilir (3). Pubertenin kızlarda sekiz, erkeklerde ise dokuz yaşından önce başlaması erken puberte (EP) olarak tariflenir (1,4).

EP, santral erken puberte (SEP) (gonadotropin bağımlı, gerçek erken puberte) ve periferik erken puberte (PEP) (gonadotropin bağımlı olmayan puberte, periferik puberte) olmak üzere iki grupta değerlendirilir (1,5,6). SEP, kızlarda çoğunlukla idiyopatikdir (%74-90) ve erkeklere göre daha sıktır (15 - 20:1). Amerika'da insidansı 1:5.000 ila 1:10.000 iken, Danimarka'da prevalansı 1:500 olarak bildirilmektedir (3,6,7). Ergenliğin zamanlamasındaki değişikliklerin, kardiyovasküler hastalıklar, depresyon, davranış bozuklukları, diyabet, meme ve testiküler kanser gibi çeşitli hastalıklar için artmış riske neden olduğu ileri sürülmektedir (1,8).

Normal pubertenin başlama zamanlaması genetik ve çevresel olaylardan etkilenmekte ve genetik faktörlerin bu süreçteki etkisinin %50-80 olduğu düşünülmektedir (2,9-11). Genetik etiyojinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar son yıllarda yeni tekniklerin kullanımı ile artmaktadır. Puberte zamanlaması ile aday gen/genlerin ve yolakların ilişkilerinin belirlenmesi için büyük serilerde genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yapılmış ve ilişkili lokuslar belirlenmeye başlamıştır (8,10). Günümüzde SEP ilişkili beş gen (*KISS1*, *KISS1R*, *PROKR2*, *MKRN3* ve *DLK1*) bildirilmiştir (2,10). Bu genlerdeki fonksiyon kazanımı/kaybı ile ilişkili değişimlerin HHG ekseninin erken uyarılmasına neden olarak SEP'e yol açtığı bildirilmektedir (2,10). *KISS1*, *KISS1R* ve *PROKR2* fonksiyon kazanım mutasyonlarının SEP ile ilişkili olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, sporadik olgularda bu genlerdeki mutasyonların oldukça nadir saptandığı da bildirilmektedir (12). *MKRN3* ve *DLK1* genlerindeki fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar ise hem sporadik hem de ailevi olgularda gösterilmiştir (2,12). İlişkili varyant saptanamayan hem sporadik hem de ailevi olgular,

SEP ilişkili yeni genlerin varlığına işaret etmektedir. Normal puberte varyantları, tipik ve atipik erken puberte tiplerinin ayırt edilmesi, takip ve tedavi planı açısından önem taşımaktadır.

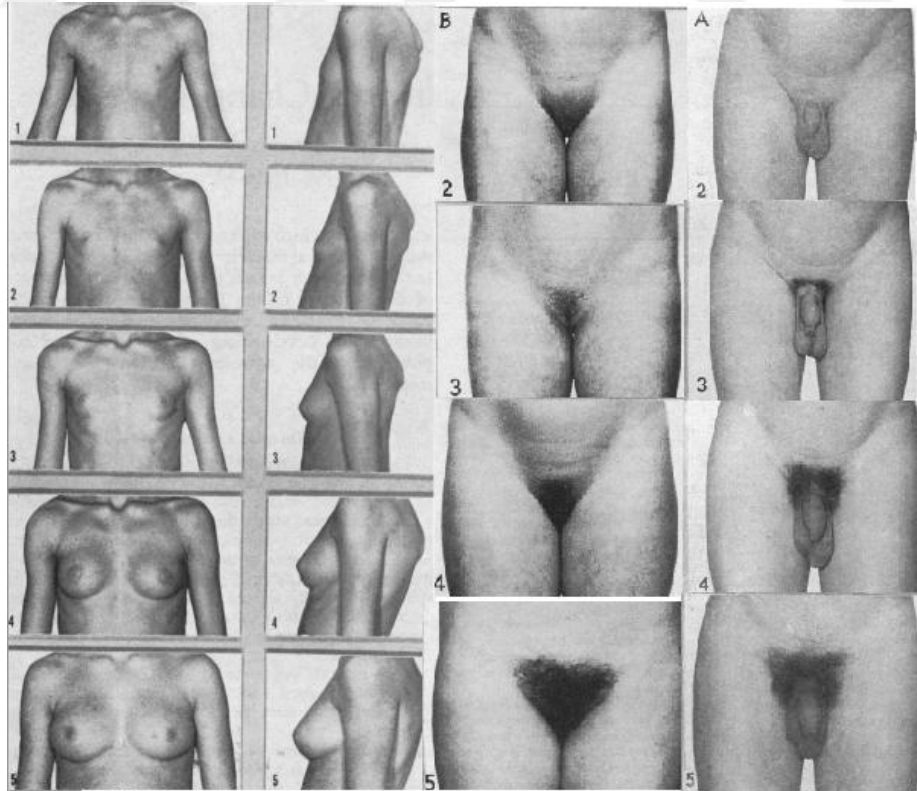
Bu çalışmada SEP tanılı olgularda, genetik etiyolojinin aydınlatılması amacıyla ilk aşamada bilinen beş genin Sanger dizileme yöntemi ile incelenmesi, ilişkili varyant saptanmayan iki indeks olgu ve ailesinde ise tüm ekzom dizileme (TED) tekniği kullanılarak patolojide rol alan gen ve varyantların araştırılması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Puberte tanımı

Puberte, çocukluk çağı ile yetişkinlik arasındaki, gonadların olgunlaşması ile üreme kapasitesinin kazanıldığı, meme gelişimi ve pubik kıllanma gibi ikincil cinsiyet karakterlerin geliştiği kritik bir dönemdir. Bu biyolojik değişim süreci, genetik faktörler, beslenme, hormonal, çevresel, etnik durum ve sosyoekonomik koşullardan etkilenmektedir (1,2). Pubertenin başlamasının ilk belirtileri kızlarda telarş, erkeklerde ise testis büyümesidir. 1969 yılında Marshall ve Tanner'ın çalışmaları puberte sınıflandırmasındaki temel kaynaklardan biri olmuştur. Evre 1 prepubertal dönemi ifade ederken evre 5 pubertenin son evresidir (**Şekil 1**). Kızlarda telarş evre 2, erkeklerde ise testis hacminin >4 ml /uzunluk >25 mm (evre 2) ve üzerinde olan artışı değerlendirilmiş bununla birlikte her iki cinsiyette de pubik kıllanma verileri de incelenmiştir. (1,3,4,13,14). Ayrıca biyokimyasal veriler ve MRI görüntüleme yöntemleri de puberte tanısında kullanılmaktadır (4).



Şekil 1; Kızlarda ve erkeklerde Tanner evrelemesi (Tanner 1969, 1970)

Puberte zamanlamasında yaş önemli bir ayıraçtır, kızlarda 8-13 yaş, erkeklerde ise 9-14 yaş aralığında normal pubertenin başladığı kabul edilir (2,3). Bu aralıktan daha önce pubertenin başlaması ise “erken puberte” olarak tariflenir. Erken puberte temel olarak santral erken puberte (SEP) ve periferik erken puberte (PEP) olarak iki grupta değerlendirilir (1,5).

2.2. Erken Puberte (EP) Sınıflandırması

EP, santral erken puberte (SEP) (gonadotropin bağımlı, gerçek erken puberte) ve periferik erken puberte (PEP) (gonadotropin bağımlı olmayan puberte, periferik puberte) olmak üzere ikiye ayrılır (1,5,6).

2.2.1. Santral erken puberte (SEP)

SEP, hipotalamik gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salgılayan nöronların erken aktivasyonu ile karakterizedir, kızlarda erkeklere göre daha sıktır (15-20:1) ve çoğunlukla idiyopatik (%74 - 90) olmakla birlikte yaklaşık %27,5’in ailevi geçiş gösterdiği bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nde kızlar arasında insidansı 1:5.000-1:10.000 ve Danimarka’da prevalansı 1:500 olarak bildirilmiştir (3,6,7,15,16). Santral sinir sisteminin malformasyonları, tümör benzeri yapılar olan hipotalamik hamartomlar, araknoid kistler, septo-optik displazi, hidrocefali gibi nörolojik nedenlerin SEP’e yol açtığı bilinmektedir (17). Ayrıca, Silver-Russel, Kabuki, Nörofibromatozis tip I gibi bazı sendromlarda da SEP birlikteliği görülebilmektedir (14).

2.2.2. Periferik erken puberte (PEP)

PEP’in sıklığı SEP’e göre çok daha düşüktür ve HHG ekseninin aktivasyonunu içermez. Cinsiyet steroidlerine erken maruz kalma, gonadotropin salgılayan tümörler, gonadal patolojiler, McCune Albright sendromu ve konjenital adrenal hiperplazi gibi nedenler PEP etiyolojisinde yer alabilir. Bununla birlikte ikincil cinsiyet özelliklerine göre erken gelişmenin durumu uygunsa izoseksüel, uygun değilse heteroseksüel erken puberte olarak da değerlendirilebilmektedir (14,17).

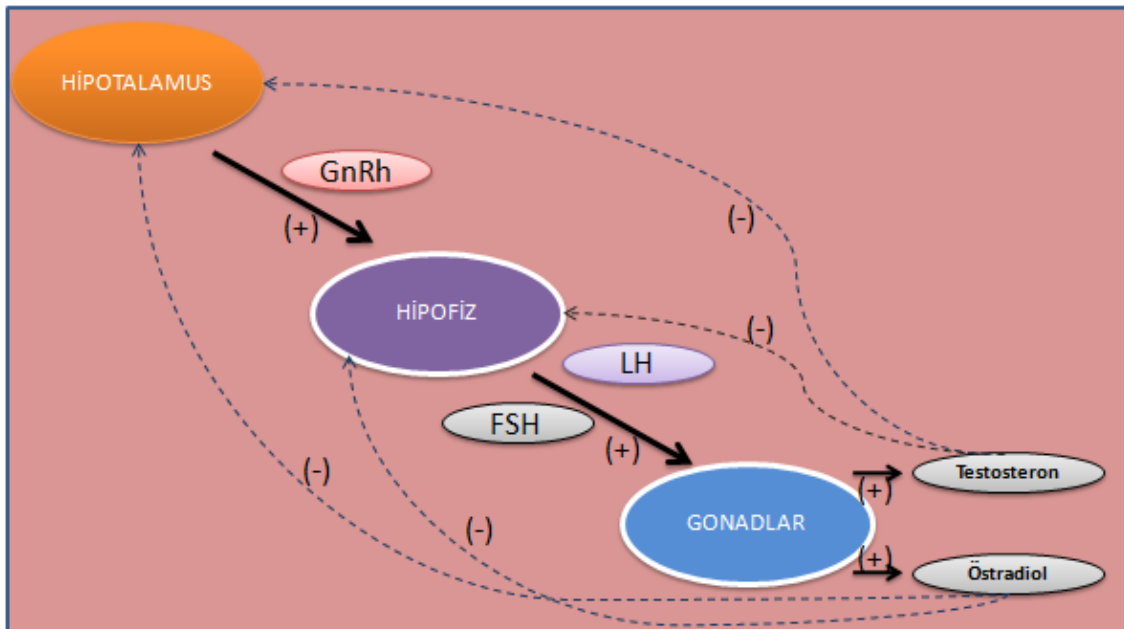
2.3. Puberte zamanlaması

Puberte zamanlaması, biyolojik, psikososyal ve uzun vadede sağlığı etkileyebilmektedir. Özellikle erken puberte ile kızlarda görülen erken menarşın, erken epifiz füzyonuna yol açması nedeniyle kısa erişkin boy ve olumsuz psikososyal sonuçlar ortaya çıkardığı bildirilmektedir. Erken yaştaki menarş dışında obezite, hipertansiyon

riski, tip 2 diyabet, iskemik kalp hastalığı, inme, meme kanseri, endometrial kanser, kardiyovasküler hastalık gelişimi ve davranış bozuklukları açısından da erken puberte risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (3). Günümüzde puberte zamanlamasını etkileyen hormonal süreçte etkili faktörlerin ilişkileri iyi irdelenmiş olsa da genetik sebepler tam olarak aydınlatılamamıştır (9).

2.3.1. Hormonal Faktörler

HHG eksenin uyarımı ile pubertenin başladığı bilinmektedir. Puberte başlangıcının ayırt edici özelliği GnRH/Luteinizan hormon salgılatıcı hormon (LHRH)'un hipotalamusdan pulsatil (nabız atımına benzer) olarak sekresyonudur. 1970'li yıllarda hayvan modellerinde HHG ekseninin aktivasyonu için aralıklı GnRH salınımının gerekli olduğu gösterilmiştir. GnRH, hipotalamusun preoptik alanında üretilir ve akson terminallerinden salınarak anterior hipofizden luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormonun (FSH) pulsatil salgılanmasını uyarır. Glikoprotein hormon ailesinin üyesi olan bu iki gonadotropin, gametogenezi ve cinsiyet steroidogenezini (östradiol [E2], testosteron [T]) teşvik etmek için gonadlara etki eder (Şekil 2). Böylece gonadal/genetik cinsiyete göre ikincil özelliklerin gelişimi ve üreme kapasitenin kazanımı uyarılır (1,18).



Şekil 2; Hipotalamo-hipofizer-gonad (HHG) eksenini ve çalışma düzeni

GnRH ve LH'nin pulsatil salınımı, cinsiyet fonksiyonunun gelişmesinde ve menstrüal döngünün normal düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (19). GnRH'nin

salınımını inhibe ya da aktive eden bir çok nörotransmitter mevcuttur. Çocukluk döneminde baskın olan inhibe edici faktörlerin pubertenin başlangıcında etkisinin azaldığı düşünülmektedir. İnsanlarda, embriyonik ve neonatal dönemde de hipotalamustan GnRH sekresyonu olmakta ve HHG eksenini aktifleştirmektedir. Gebeliğin sonuna doğru ise GnRH salgısının azalması ve durmasıyla aktivasyon da sessizleşmektedir. Doğumla birlikte yeniden aktivasyonla gonadotropin konsantrasyonlarında bir artış ve 6. aydan itibaren GnRH düzeyinde kademeli olarak azalma başlar, kızlarda FSH konsantrasyonu 3-4 yaşına kadar yükselirken, erkek çocuklarda testosteron konsantrasyonu 1-3 aylıkken yüksek olsa da daha sonra düşen LH konsantrasyonu ile birlikte azalmaya başlar ve yaşamın erken dönemlerinde HHG ekseninin bu aktivitesi “mini puberte” olarak adlandırılmaktadır (1,3,20). Çocukluk boyunca GnRH salgılanması ve HHG eksenini fizyolojik olarak aktivasyon göstermez.

Puberte, bu sakin dönemden sonra hipotalamustan GnRH'nin pulsatil salgılamasında sürekli bir artışla başlar, pubertenin başlamasını tetikleyen mekanizmalar tam anlaşılmamış olmakla birlikte var olan göstergeler puberte başlangıcında GnRH salgılanmasını baskılayan inhibitörlerin etkisinin azalması, GnRH sekresyon aktivatörlerinin artmasıyla doruğa ulaştığını göstermektedir (1). GnRH'nin eksikliğinde pubertal gelişme gerçekleşmez ve genellikle infertilite ilişkili hipogonadotropik hipogonadizm (HH)'e neden olur (20).

Hipotalamustan GnRH'nin pulsatil salgılamasındaki değişim nöroendokrin mekanizmalar ve nörotransmitterler ile sağlanır, HHG ekseninin aktivasyonu için GnRH'nin gerekli olduğu ilk olarak 1970'li yıllarda hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1). *GNRH* geni 8p21.2 bölgesinde yerleşik ve ters iplikçikten transkribe olan, ilk kodonu translasyona uğramayan toplam 4 ekzondan oluşan bir gendir. Ensembl veri tabanında 2 kodlayan transkript varyantı olduğu gösterilmektedir. En büyük transkriptin (NM_001083111.2) boyu 1760 bp olup, kodlanan proteinin (NP_001076580.1) büyüklüğü 92 aa'dır (21).

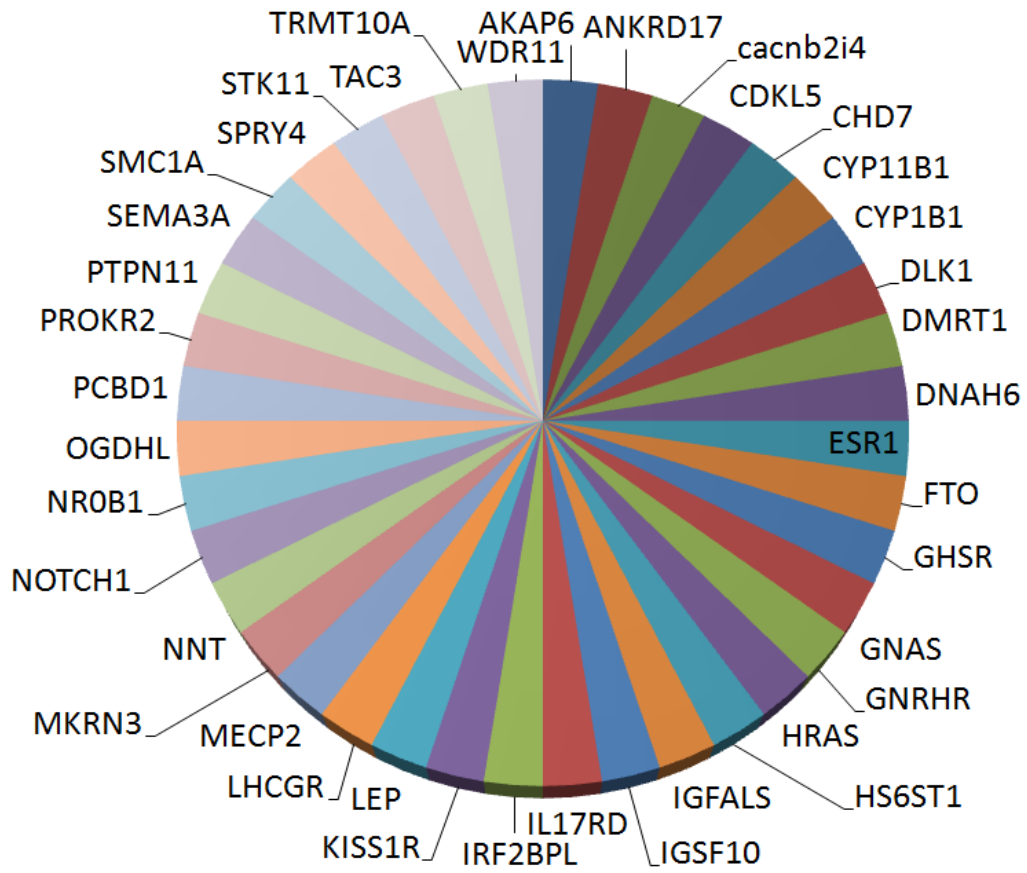
HHG ekseninin aktivasyonunda, nöronal ağ, trans-sinaptik ve glial-nöronal iletişimdeki koordinasyon önemlidir (1). Glial uyarıcı hücreler, büyüme faktörüne bağlı hücre-hücre sinyal yolları ile GnRH salgılanmasını kolaylaştırmaktadırlar. GnRH nöronal ağında, nöronal ve glial uyarıcı sinyaller arttıkça, trans-sinaptik inhibe edici etki azalır ve GnRH sekresyonu pubertal aktivasyona yol açar. Bu süreçte

nörotransmisyon/nöromodülasyon için yaygın şekilde yer alan aktive edici faktörler arasında, adrenalin, noradrenalin, prostaglandin (PGE2), leptin, glutamat ve kisspeptin gibi faktörler yer alırken, GnRH salınımını baskılayıcı faktörler arasında ise γ -amino bütirik asit (GABA), vasoaktif intestinal peptit (VIP), melatonin, nöropeptit Y (NPY), dopamin, serotonin ve opiaterjik gibi moleküller olduğu bildirilmektedir (17,22,23).

GnRH, hipotalamustaki yaklaşık 1000 nörondan pulsatil bir şekilde salınır. Salınımın aralıklı olması önem taşır, çünkü gonadal steroidler, GnRH ve gonadotropin ekspresyonunu inhibe eden klasik bir negatif geri besleme (*feedback*) döngüsü içinde hipotalamus ve hipofiz üzerine etki eder, sürekli sanınımda ise HHG eksenini sürekli aktif kalır (19,23).

2.3.2. SEP İlişkili Genetik Nedenler

Pubertenin normal başlangıç zamanlamasında genetik faktörlerin etkisinin %50-80 olduğu düşünülmektedir (2,9-11,18). İnsan gen mutasyon veritabanı (Human Gene Mutation Database/HGMD) 2021 verilerine göre bugüne kadar puberte ile ilişkili 41 gen (**Şekil 3**) bildirilmiş olmasına karşın bunlardan sadece *DLK1*, *KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3*, *PROKR2* (**Tablo 1**) genleri erken puberte ile ilişkilendirilmiştir. Otozomal dominant (OD) kalıtım form ile ilişkili görülen bu genlerden *KISS1R*, SEP ile ilişkilendirilen ilk gen olsa da (24), en sık bildirilmiş olan gen *MKRN3*'dür (25-27). *KISS1* geni tarafından kodlanan kisspeptin, GnRH sekresyonunun aktivatörlerinden biri olup puberte zamanlamasında kritik önemdedir (20). *KISS1*, *KISSR* ve *PROKR2* genlerindeki fonksiyon kazanım mutasyonlarının, *MKRN3* ve *DLK1* genlerinde ise fonksiyon kaybı mutasyonlarının SEP'e neden olduğu gösterilmiştir. *KISS1R* ve *KISS1* genlerindeki fonksiyon kaybı mutasyonları ise HH ile ilişkilendirilmiştir (24,28) (**Şekil 3, Tablo 1**).



Şekil 3; Günümüzde puberte ile ilişkisi bildirilmiş olan genler (25)

Tablo 1; SEP ile ilişkili genler ve özellikleri (Genlerin transkript numaraları için HGMD'den yararlanılmıştır (25)).

Gen	Yerleşim	Protein	Transkript ID	Kalıtım	Varyant Etkisi	Tanımlanma Yılı
KISS1R	19p13.3	KISS1 receptor	NM_032551.5	Otozomal Dominant	Fonksiyon kazanımı	2008
KISS1	1q32	KiSS-1 metastasis suppressor	NM_002256.4			2010
PROKR2	20p12.3	Prokineticin receptor 2	NM_144773.4			2017
MKRN3	15q11-q13	Makorin ring finger protein 3	NM_005664.4	Otozomal dominant (maternal allel imprinted)	Fonksiyon kaybı	2013
DLK1	14q32	Delta like non-canonical Notch ligand1	NM_003836.7			2017

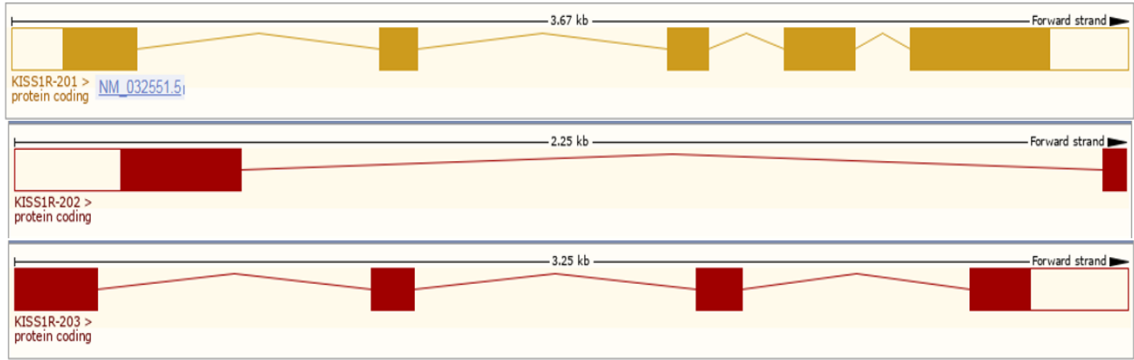
SEP ilişkili genlerin protein yapısı, proteinler arası ilişkilerin gösterildiği ağlar ve domainlerin kodladığı bölgeler Şekiller 4-29'da gösterilmiştir. Protein domain ve

bölgelerini kodlayan amino asit ve genomik dizileri HGNC (The HUGO Gene Nomenclature Committee) sitesinden ulaşılabilmektedir (29).

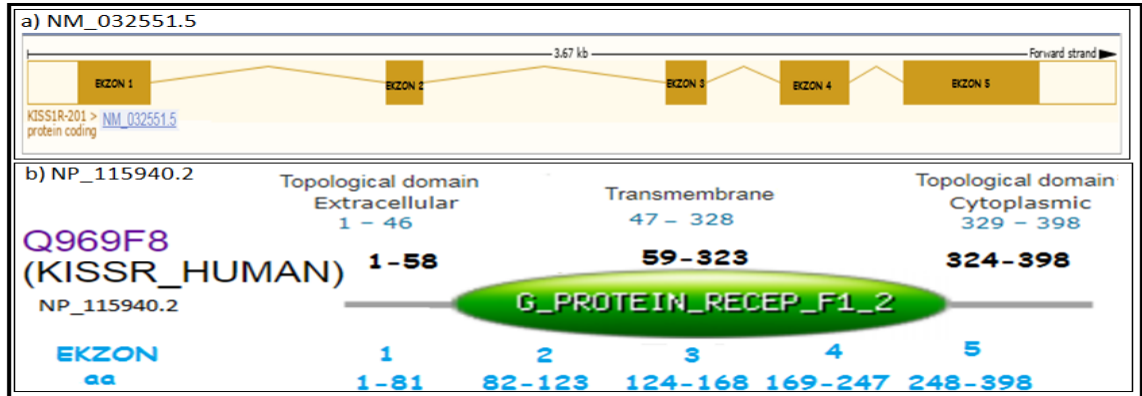
2.3.2.1. Kisseptin Sistemi (KISS1 ve KISS1R)

KISS1 Reseptör (*KISS1R*/*GPR54*) Geni:

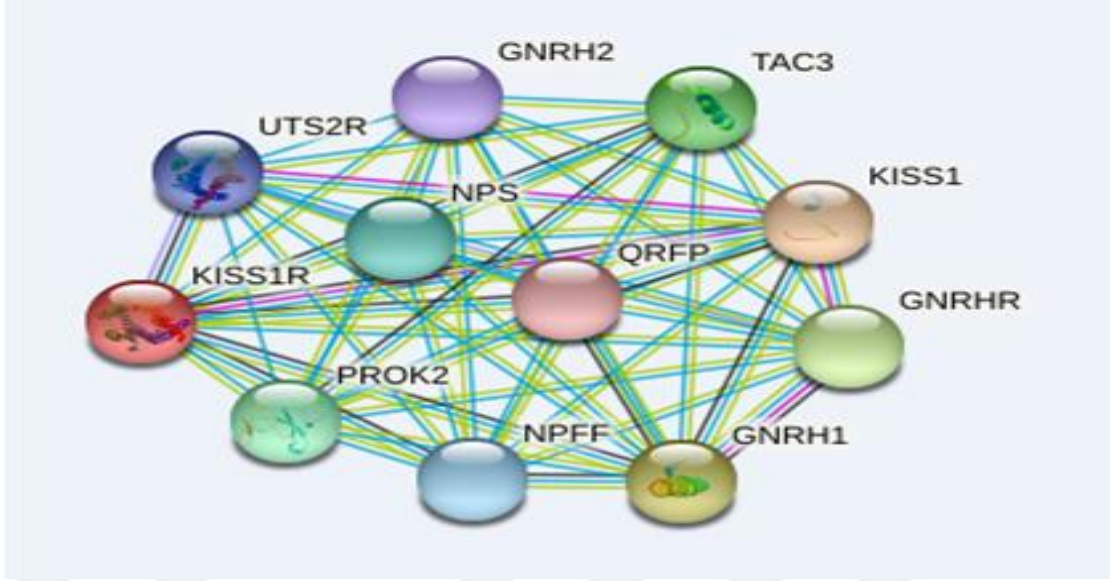
KISS1R (OMIM#604161) geni, 19p13.3 bölgesinde yerleşik, beş ekzonlu bir gendir. Kodlayan üç transkript varyantı bulunmaktadır (Şekil 4). En büyük transkriptin (NM_032551.5) boyu 1.624 bp, kodladığı protein (NP_115940.2) 398 aa'dır (21,30) (Şekil 5 – 7).



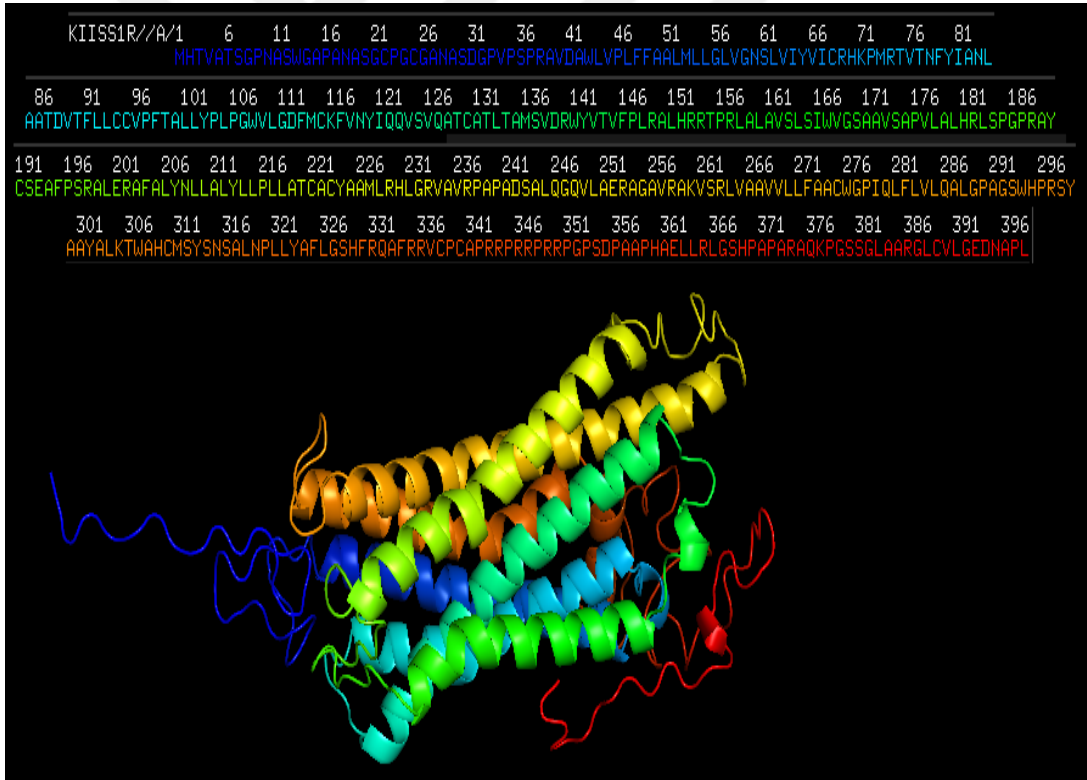
Şekil 4; *KISS1R* geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli



Şekil 5; a. *KISS1R* gen transkriptinin (NM_032551.5) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. *KISS1R* proteininin (NP_115940.2) UniProt (Q969F8) ve Prosite (PS50262) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.



Şekil 6; KISS1R proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.

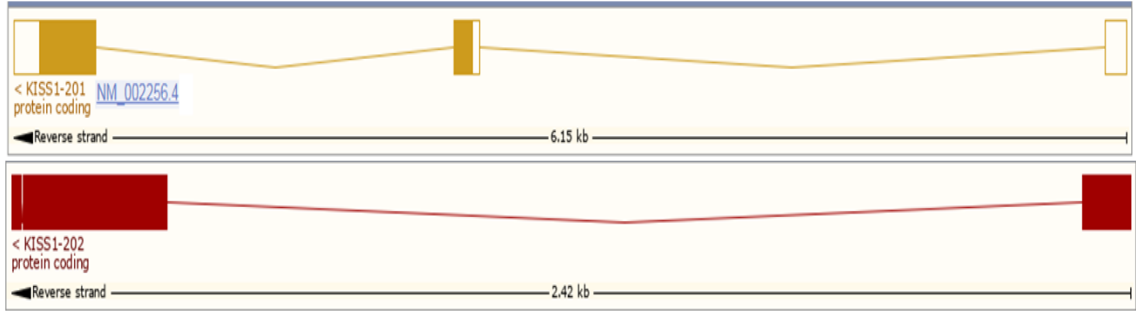


Şekil 7; KISS1R proteinin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısı (<https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.

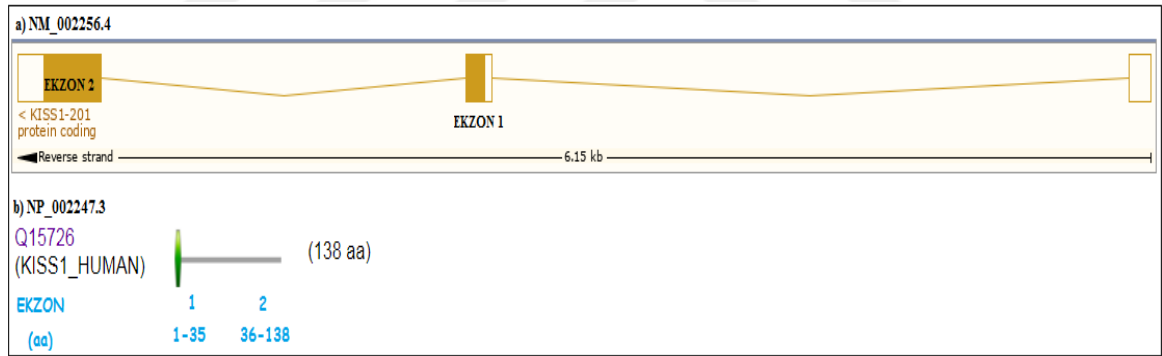
KISS1 metastasis suppressor (*KISS1*) Geni:

KISS1 (OMIM#603286) geni 1q32.1’de yerleşik ve ters iplikçikten transkribe olan, birinci ekzonu translasyonu yapılmayan toplam üç ekzonlu bir gendir. Ensemble veri tabanında iki kodlayan transkript varyantı bulunduğu bildirilmektedir (Şekil 8).

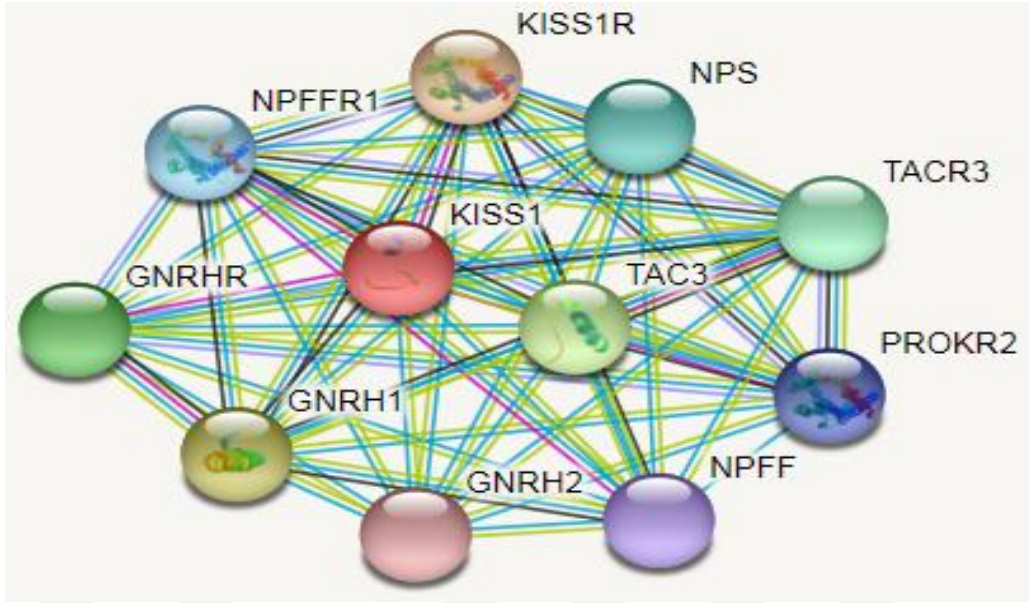
En büyük transkriptin (NM_002256.4) boyu 714 bp ve kodladığı proteinin (NP_002247.3) boyu 138 aa’dır (21) (Şekil 9-11).



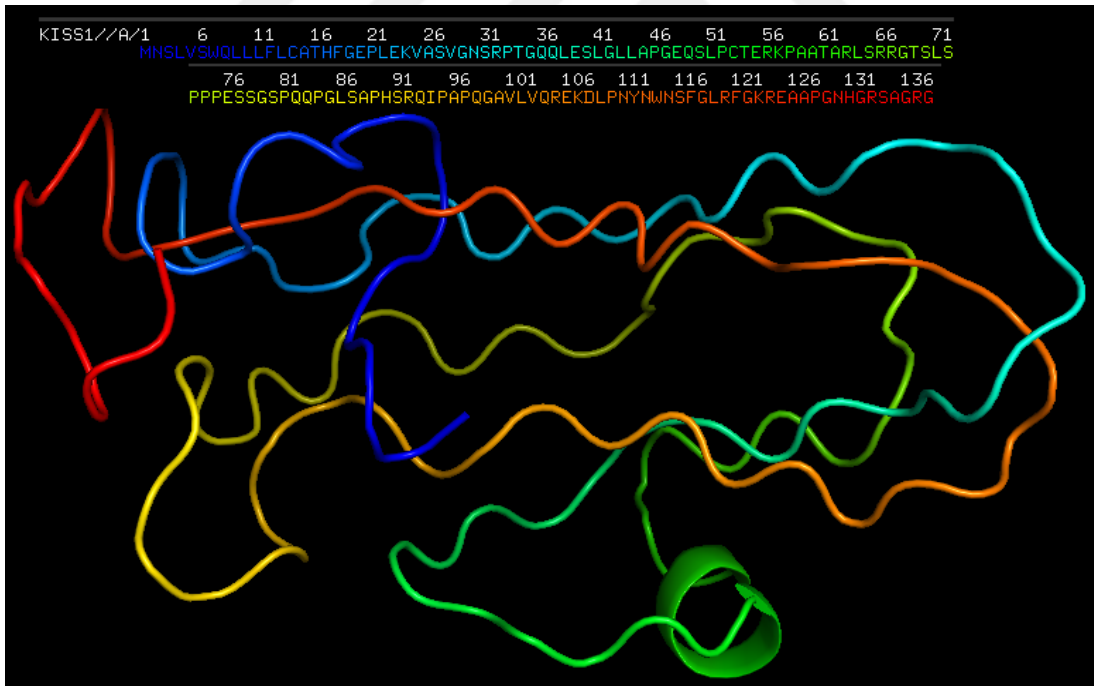
Şekil 8; *KISS1* geninin Ensembl veri tanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli



Şekil 9; a. *KISS1* transkriptinin (NM_002256.4) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. *KISS1* proteininin (NP_002247.3) UniProt (Q15726) ve Prosite (PS51127) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.



Şekil 10; KISS1 proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.

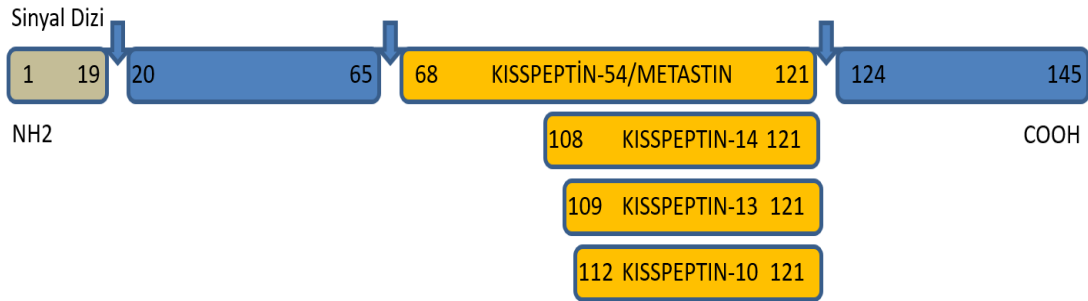


Şekil 11; KISS1 proteininin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısının gösterimi (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.

GnRH salgılanmasını ve dolayısıyla gonadal işlevi kontrol eden nöronal mekanizmaların anlaşılmasında kisspeptinlerin ve bunların reseptörleri GPR54 (KISS1R)'ün fizyolojik rollerinin tanımlanması etkili olmuştur. *KISS1* ve protein

ürünleri olan kisspeptinler, ilk olarak 1996 yılında tümör metastaz baskılayıcılar olarak tanımlanmıştır. *KISS1* geninin malign melanomada kanser metastazının düzenlenmesinde rol aldığı (32) ve 2001 yılında *KISS1R*'nin ligantı olduğu, daha sonra yapılan çalışmalarda ise pubertenin ana düzenleyicilerinden biri olduğu gösterilmiştir (16).

Yüz kırkbeş rezidüden oluşan kisspeptin aynı zamanda öncü (prepro kisspeptin) olarak da isimlendirilir. Bu protein farklı proteolitik işlemler ile aktif kisspeptinlerin üretilmesinde kullanılabilir. Oluşan kisspeptinler, bir sinyal dizisine (1-19 aa) sahiptir. Öncü protein potansiyel iki kesim noktasına sahiptir. Bunlardan ilki 65. ve 68. aa'ler arasında, diğeri ise 121. ile 124. aa'ler arasında yer alır. Bu işlemler sonunda, merkezde metastin olarak adlandırılan 54 amino asitlik bir peptid (kisspeptin 54/ Kp-54) ve bu bölgenin proteolitik işleme uğramasıyla daha düşük moleküler ağırlıkta Kp-14, Kp-13 ve Kp-10 olarak belirtilen diğer kisspeptinler oluşur (**Şekil 12**). Oluşan yeni proteinlerin C terminal uçları amidleşir ve reseptörü olan *KISS1R* ile bağlanmayı sağlayarak sinyal iletimini başlatır (32,33).



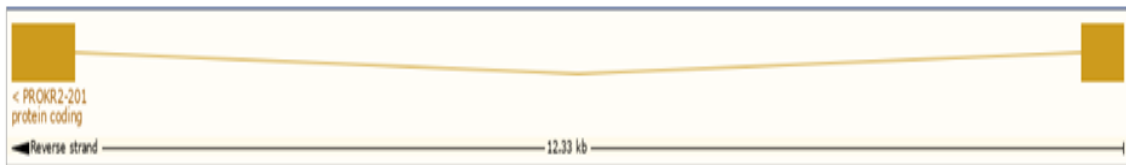
Şekil 12; Kisspeptinin peptid yapıları Pinilla (32) dan modifiye edilerek düzenlenmiştir.

Kisspeptin sisteminin-*KISS1/KISS1R*'nin, HHG ekseninin pubertal aktivasyonu için önemli bir anahtar düzenleyici olarak keşfi 2003 yılında, *KISS1R* (GPR54) geninin işlev kaybı mutasyonlarının izole HH'ye neden olmasıyla anlaşılmıştır (1,32,34,35). SEP tanılı Brezilyalı evlatlık bir kız çocuğunda *KISS1R*'de nadir heterozigot bir yanlış anlamlı değişimin aktive edici nitelikte olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar değişimin *KISS1R*'nin *KISS1*'e bağlanması sonrasında hücre içi sinyal iletim süresinin uzadığını göstermiştir. Bu durum, ortaya çıkan klinik tablonun *KISS1R*'deki fonksiyon

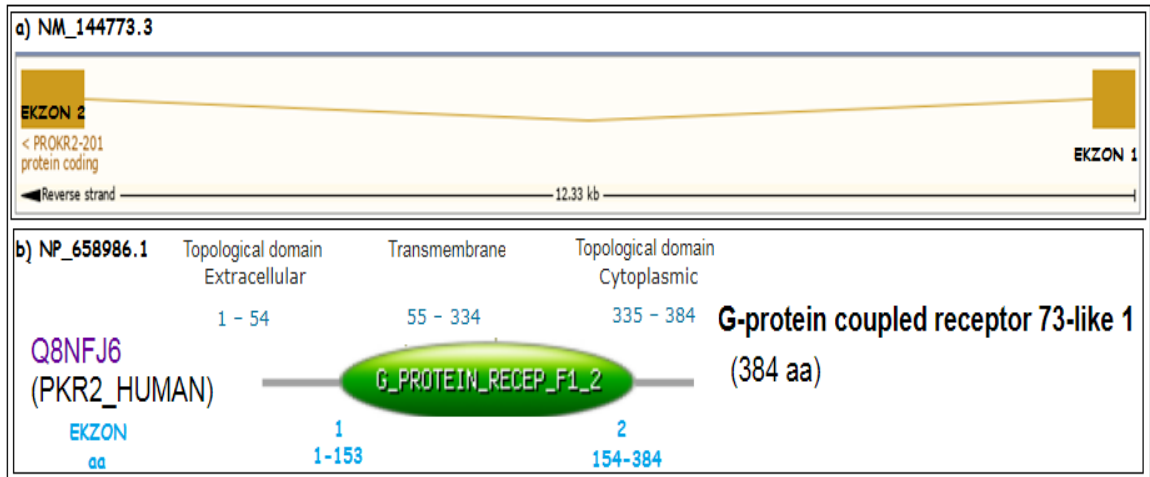
kazanım mutasyonu sonucu oluştuğunu, GnRH salınımının arttığını, HHG ekseninin aktif kaldığını ve SEP'e neden olduğunu düşündürmüştür. (2,24). Ayrıca, farelerde 2003 yılında yapılan bir çalışmada *KISS1R* geninde saptanan bir delesyonun pubertenin başlamasını engellediği bildirilmiştir (34). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar, kisspeptinin farelerde erken cinsel gelişim ve olgunlaşmaya, maymunlarda ise GnRH'nin erken salınımına yol açtığını göstermiştir (24). Sıçanlar, koyunlar, primatlar ve insanlar dahil çeşitli türler üzerine yapılan çok sayıda çalışma KISS1/KISS1R sisteminin GnRH salgılanmasını uyarma ile pubertenin başlangıcını tetiklediğini göstermiştir (33). Bununla birlikte, Smith ve ark. (2005), estradiol tarafından inhibe edilen arkuat çekirdekteki KISS1 nöronlarının, GnRH sekresyonunun regülasyonunda negatif geri-besleme (*feedback*) ile rol oynadığını, östradiol tarafından uyarılan antero-ventral periventricüler çekirdekteki KISS1 nöronlarının ise, GnRH sekresyonunun pozitif geri-besleme (*feedback*) ile düzenlemesinde etkisi olduğunu belirtmişlerdir (36,37).

2.3.2.2. Prokineticin receptor 2 (*PROKR2*) Geni

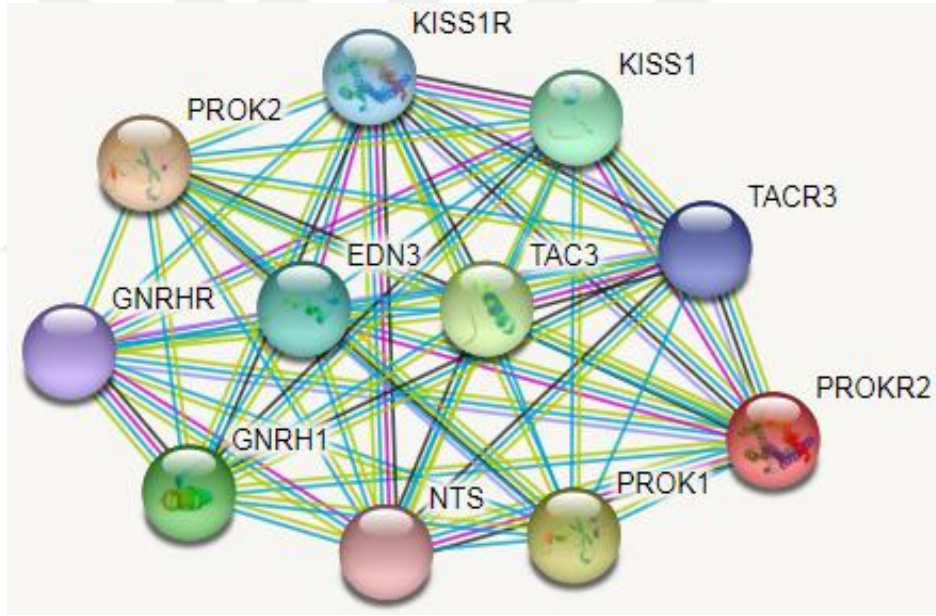
PROKR2 (OMIM# 607123) geni, 20p12.3'de yerleşik ve ters iplikçikten transkribe olan bir gendir. *PROKR2* 'nin kodlayan iki ekzondan oluşan bir transkript varyantı bulunmaktadır (Şekil 13). Bu transkriptin (NM_144773.3) boyu 1.155 bp ve kodladığı protein (NP_658986.1) 384 aa uzunluğundadır (21,30) (Şekil 14-16).



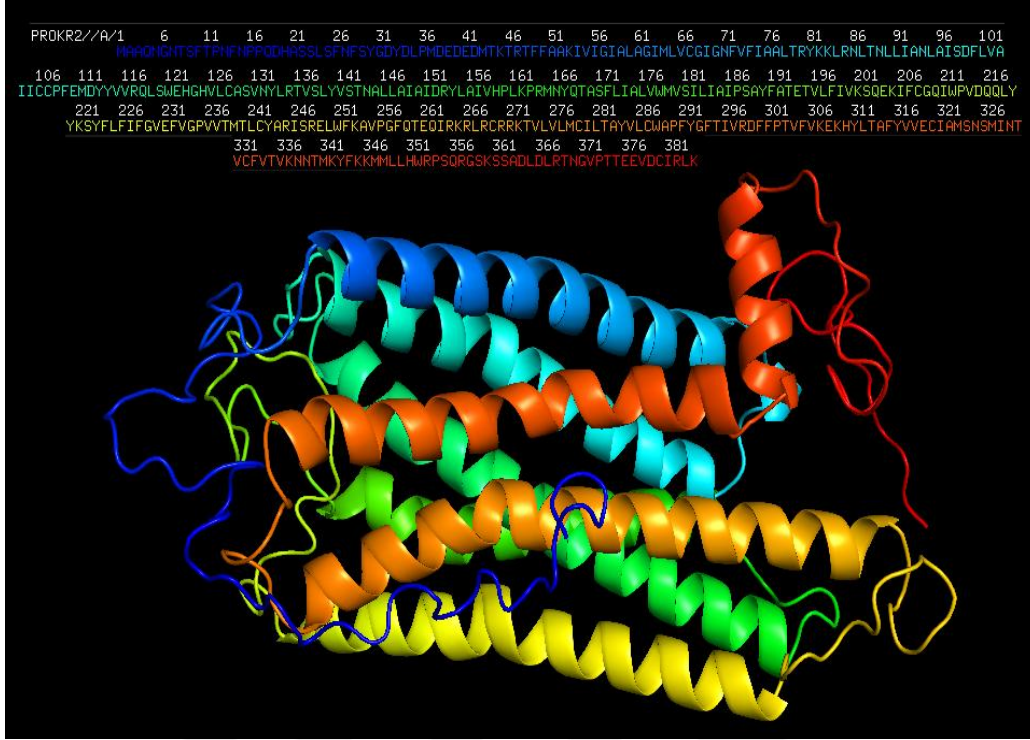
Şekil 13; *PROKR2* geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli



Şekil 14; a. *PROKR2* transkriptinin (NM_144773.3) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. *PROKR2* proteinin (NP_658986.1) UniProt (Q8NFJ6) ve Prosite (PS50262) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.



Şekil 15; *PROKR2* proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.

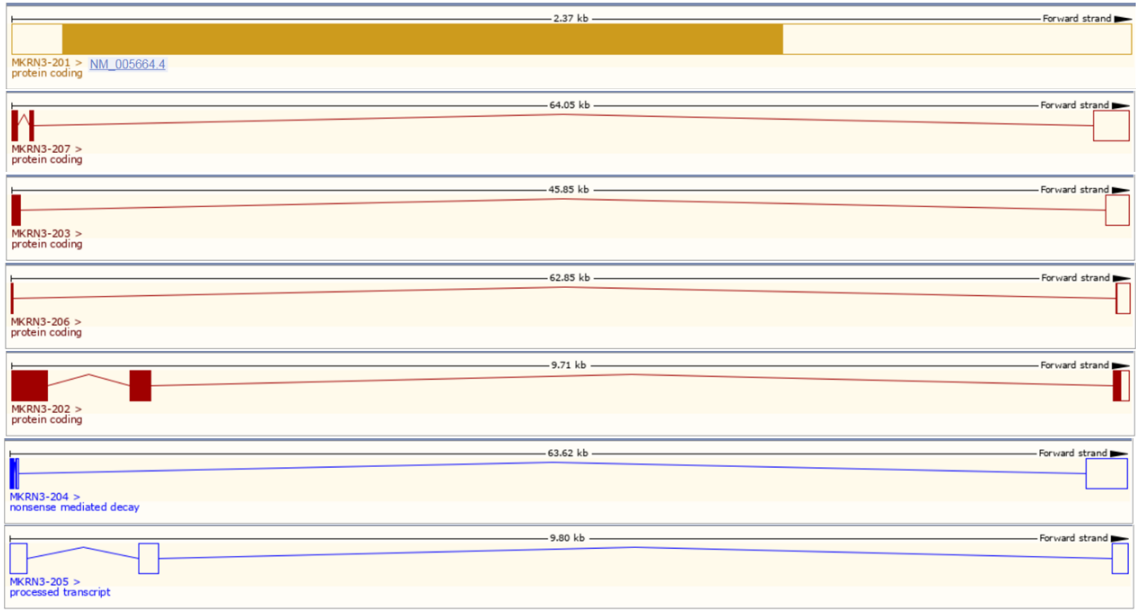


Şekil 16; PROKR2 proteinin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısının gösterimi (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.

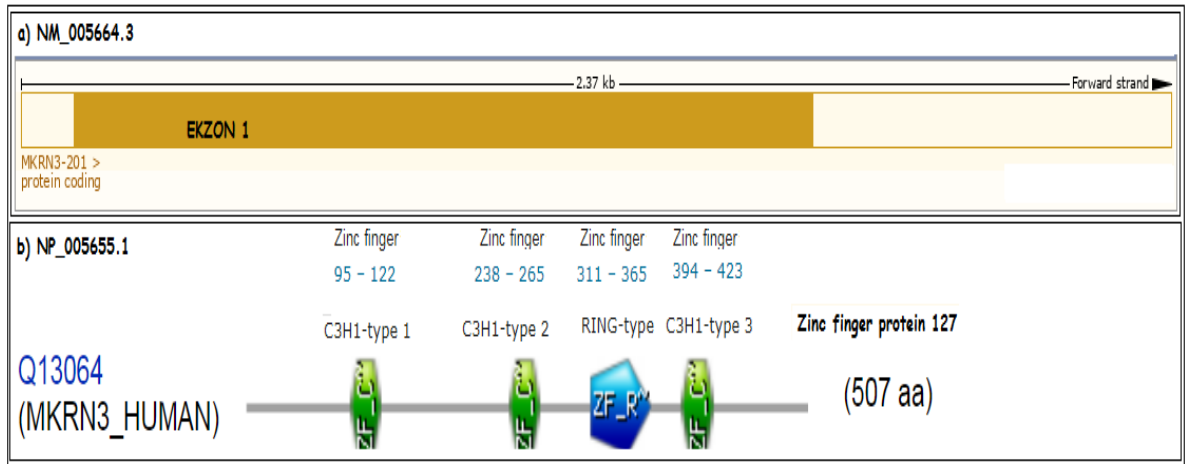
PROKR2'nin beyin, testis, yumurtalık, tiroid, hipofiz, ince bağırsak, ve tükürük bezinde eksprese olduğu tespit edilmiştir (38). HGMD veritabanında bu gende bildirilen 76 klinik ilişkili varyantın yüksek oranda HH ve Kallmann sendromuna (%50) neden olduğu bildirilmektedir (25). Ancak, bugüne kadar sadece bir SEP'li olguda *PROKR2* geni ilişkisi gösterilmiştir (39).

2.3.2.3. Makorin ring finger protein 3 (*MKRN3/ZNF127*) Geni

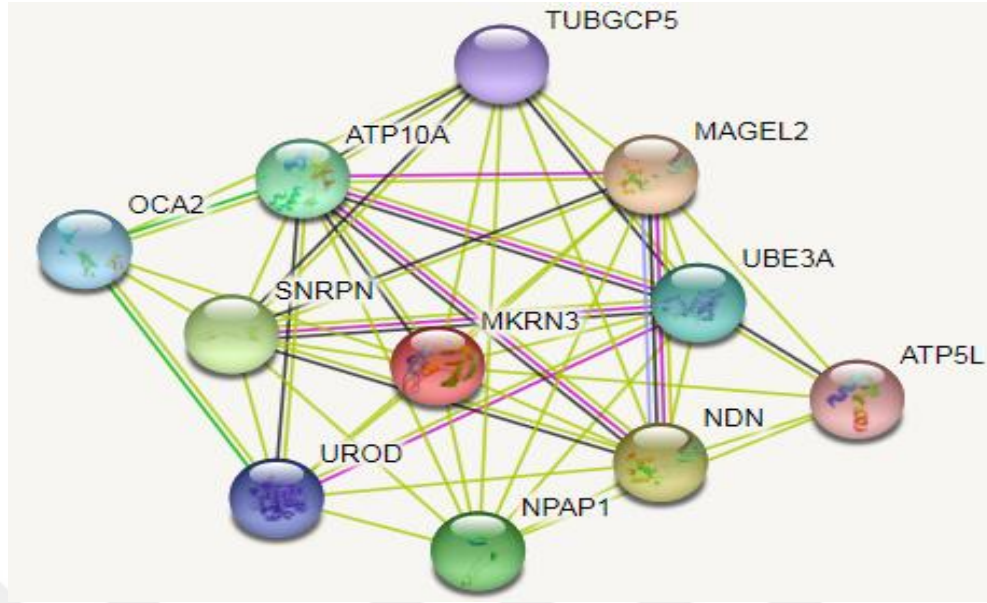
MKRN3 (OMIM# 603856) geni 15q11.2 bölgesinde yerleşik, tek ekzonlu bir gendir. İki kodlamayan toplam yedi transkript varyantı bulunmaktadır (**Şekil 17**). En büyük transkriptin (NM_005664.4) boyu 2.371 bç ve kodladığı proteinin (NP_005655.1) boyu 507 aa'dır (21,30) (**Şekil 18-20**).



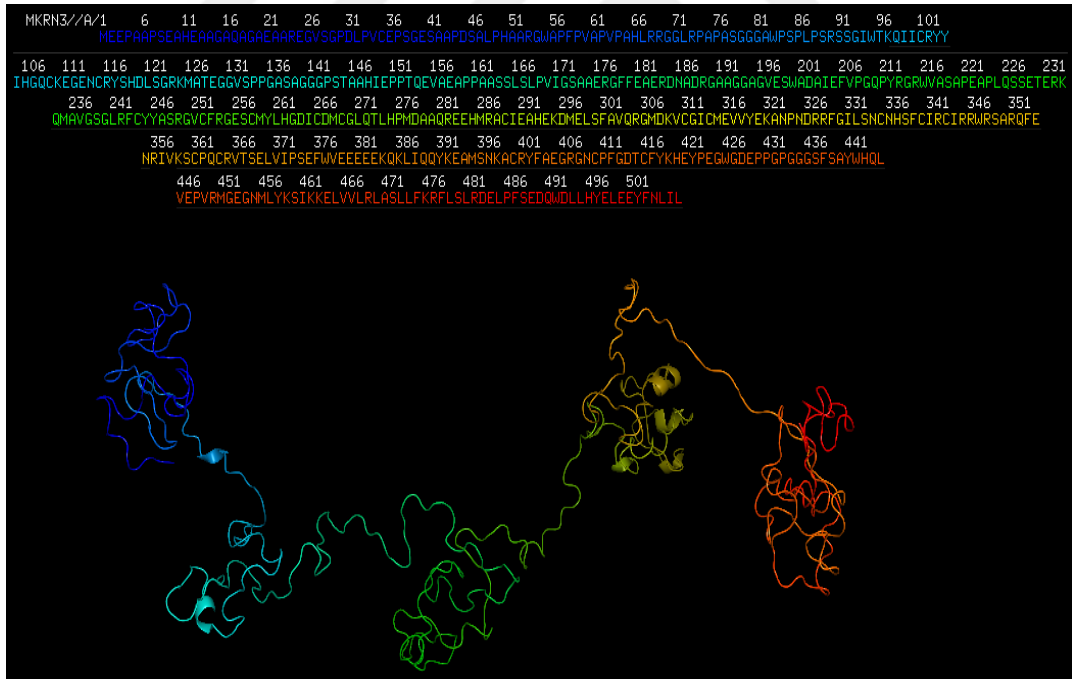
Şekil 17; *MKRN3* geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli



Şekil 18; a. *MKRN3* gen transkriptinin (NM_005664.3) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. *MKRN3* proteininin (NP_005655.1) UniProt (Q13064) ve Prosite (PS50103) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.



Şekil 19; MKRN3 proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli. .



Şekil 20; MKRN3 proteininin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısının gösterimi. (https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.

GnRH sekresyonunun inhibisyonu konusunda insanda ilk ilişkilendirilen gen *MKRN3*'dür. Türler arasında yüksek oranda korunmuş olan bu gen *ZNF127* olarak da bilinmektedir. İntron içermeyen bu genin paternal alleldeki heterozigot mutasyonların

SEP ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (25,40,41). MKRN3 amino asit dizileri fare ve insanda %69 özdeşlik ve %82 benzerlik göstermektedir. Farede kromozom 7C'de yerleşik *Mkrn3*'ün infantil ve erken juvenil dönemde ekspresyonunun, hem erkek hem de kız prepubertal farelerin hipotalamik arkuat nükleusunda yüksek olduğu belirlenmiştir (42,43). Ayrıca bu bölgedeki *Kiss1* ve *Ttac3* genlerinin de puberte için önemli olduğu bildirilmektedir. Fare hipotalamusundaki ekspresyonun *Mkrn3* mRNA seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PZR ile değerlendirilmiş ve pubertenin başlangıcında *Mkrn3* mRNA ekspresyonu azalırken, doğrusal bir ilişki ile arkuat nükleustaki *Kiss1* ve *Tac3* ekspresyonlarında artış olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, *MKRN3*'ün, prepubertal çocuklarda hipotalamusta endokrin aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Danimarka'da geniş bir seriyle yapılan çalışmada sağlıklı Danimarkalı kızlarda serum MKRN3 konsantrasyonunun puberte başlangıcında azaldığı, prepubertal kızlarda ise bu oranın saptanamayacak kadar düşük seviyede olduğu görülmüştür. MKRN3 ile GnRH arasındaki bu negatif korelasyon, MKRN3'ün çocukluk döneminde hipotalamik GnRH salgılanmasının düzenleyicisi olduğunu desteklemektedir. MKRN3'ün pubertenin inhibitörü gibi işlev görmesi, SEP olgularında görülen *KISS1* ve *KISS1R* genlerindeki işlev kazanım mutasyonlarının aksine, *MKRN3*'teki işlev kaybı mutasyonları SEP ile ilişkilendirilmektedir (10,40,42-45).

İlk kez 2013 yılında SEP gözlenen 15 ailenin 40 üyesinde tüm ekzom dizileme (TED) tekniği kullanılarak yapılan çalışmada *MKRN3* geninde mutasyonlar bildirilmiştir (40). Bu çalışmada ailelerin 5'inde etkilenen bireylerde üç heterozigot çerçeve kayması değişimi ve bir yanlış anlamlı değişim saptandığı ve etkilenen bireylerin bu varyantları babalarından kalıttıkları gösterilmiştir (40). Mutasyonu annesinden kalıttığı bilinen bir heterozigot taşıyıcının ise klinik olarak etkilenmediği bildirilmiştir (40). *MKRN3*'teki fonksiyon kaybı mutasyonları, bir çok çalışmada hem ailesel hem de sporadik SEP vakalarında, Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, İsrail, Kore, Tayvan ve sekiz Avrupa ülkesindeki çeşitli gruplarda da tanımlanmış ve SEP ilişkili genetik mutasyonların bir çoğunun bu gende olduğu bildirilmiştir (10).

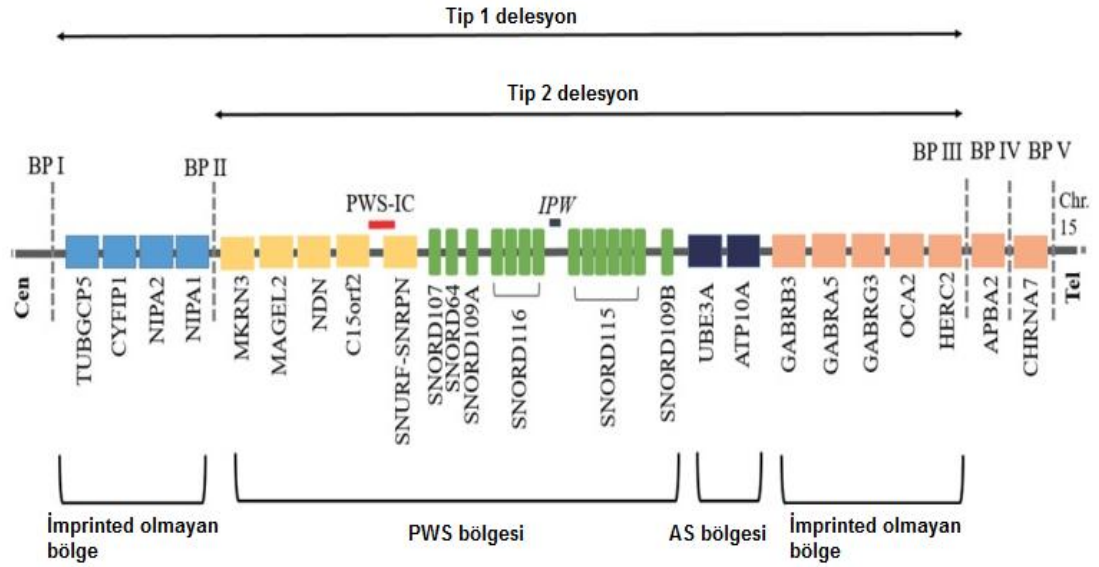
Bi-allelık otozomal genlerden birinin parental orijine göre seçici olarak baskılanmasına, dışlanmasına yani ifade edilmemesine genomik imprinting denir.

MKRN3 geni maternal imprinted bir gendir. Epigenetik mekanizmalar hem transkripsiyon (DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu) hem de translasyona (küçük kodlamayan RNA [ncRNA]) etki ederek gen anlatımını düzenler. Genlerin promotor bölgesinde gerçekleşen DNA metilasyonu genin sessizleşmesine yol açar. Genomik imprintingde birden fazla X kromozomunun gözlemlendiği karyotiplerde gözlenen X kromozom inaktivasyonunda farklı epigenetik mekanizmalar rol oynar (46). Embriyonik gelişim ve hücre farklılaşmasında imprinting mekanizmalarının önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar imprinted gen ekspresyonunu bozan değişimlerin farelerde embriyonik dönemde letaliteye, insanlarda ise doğuştan hastalıklara yol açabileceğini göstermiştir (47). Günümüzde 100'ün üzerinde imprinted gen tanımlanmıştır. Bunların bir çoğu hem insan hem de farede benzer dokularda imprinted özelliktedir. İmprinted genlerin bir çoğu gen kümeleri içerisinde yer alırlar, ekspresyonlarının kontrolü ise maternal ya da parental kökene göre farklı şekilde metillenmiş düzenleyici diziler olan ICR'lerce (*imprinting control region*) sağlanmaktadır. Gametogenez esnasında hangi kromozomal kopyanın eksprese olacağını seçimi parental kökene göre genlerin promotor bölgelerindeki sitozin bazının guanin bazını izlediği CpG dinükleotid dizilerinde sitozin nükleotidlerinin primidin halkasında 5. pozisyonundaki karbon atomunun spesifik metillenmesi gibi modifikasyonlarla transkripsiyonun susturulması ile düzenlenmektedir (46-49).

Beckwith–Wiedemann, Russell–Silver, Prader–Willi, Kagami–Ogata ve Temple sendromu gibi pediatrik hastalıkların oluşumu imprinted gen kümelerinin uniparental kalıtımı ile ilişkilendirilmiştir. Prader-Willi Sendromu'na (PWS) (MIM#176270) neden olan genomik ve epigenetik değişiklikler içerisinde, PWS'li olguların çoğunda (%70) paternal 15. kromozomun yaklaşık 5-6 Mb *de novo* delesyonu [del(15)(q11–q13)pat], ikinci sıklıkta maternal mayotik nondisjunction ve ardından paternal kromozom 15'in mitotik kaybından kaynaklanan (%25-30) maternal uniparental dizomi 15 [upd (15) mat] ve bazı olgularda (%1) paternal kromozomun maternal imprinted olduğu imprinting hataları bulunmaktadır (50).

Nörojenetik hastalıklardan biri olan PWS bulgularından bazıları, hipotoni, erken çocukluk döneminde başlayan hiperfaji ve obezite, gelişme geriliği, hipogonadotropik hipogonadizm, geç ya da yavaş ilerleyen puberte, büyüme hormon eksikliği, kısa boy, küçük el ve ayaklar, uyku apnesi, davranış sorunları ve hafif-orta derecede zeka özürü

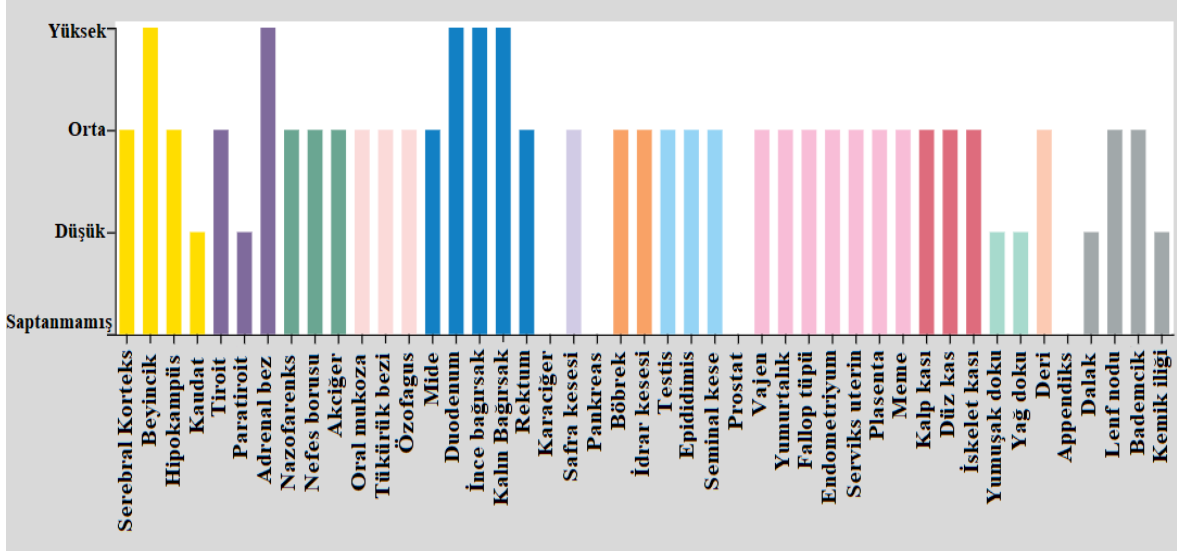
bulunabilmektedir. İlk olarak Jong ve ark. tarafından 1999 yılında PWS/AS kritik bölgesinde yapılan çalışmada klonlanan *MKRN3*, kromozom 15q11.2-q13 üzerinde PWS ile ilişkilendirilen ve paternal allelden anlatım yapan genlerin bulunduğu imprinted gen kümesi içerisinde bulunmaktadır. PWS bölgesini oluşturan genlerden en az ikisinin (*SNRPN*, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN* ve bazı *snoRNA*'lar) ifade kaybının bu sendromun oluşumuna yol açtığı bilinmektedir, ancak bu genlerden hangilerinin özellikle PWS ile ilişkili olduğu henüz anlaşılamamıştır. Onbeşinci kromozomun uzun kolunda ve PWS'nun kritik bölgesinde (**Şekil 21**) yer almasına rağmen *MKRN3*'ün bu sendromdaki fonksiyonel rolü halen belirsizliğini korumaktadır. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar ile, uniparental dizomi (UPD), genomik imprinting hatası (ICR bölgesinde) ya da *de novo* delesyonlar sonucu paternal alleldeki *MKRN3* geninde oluşabilecek fonksiyon kaybı mutasyonlarının PWS patogenezinde oynadığı rol incelenmiştir. İlginç olarak *MKRN3*, *MAGEL2* ve *NDN* genlerinin paternal delesyonu olan SEP tanılı bir kız olguda obezite, gelişimsel gecikme ve yüksek ağrı eşiği belirlenirken PWS bulgularını göstermediği ve bu delesyonun PWS'ye neden olmak için yeterli olmadığı sonucuna varıldığı bildirilmiştir (48,50). Bu görüşün tersine az sayıda olguda PWS ve SEP birlikteliği gösterilmiştir (51). Maternal allelin metile olduğu bir gen olan *MKRN3*, sadece paternal allelden ifade edilmekte ve bu durumda yalnızca babalarından *MKRN3* mutasyonu kalıtan bireylerde SEP görülmekte, kız ve erkek çocuklar eşit etkilenebilmektedir. Bu durum kızların erkeklere göre daha sık etkilendiği idiopatik SEP olgularından farklılık göstermektedir (1,40,42,48,52,53).



Şekil 21; *MKRN3* geninin PWS/AS ilişkili gen kümesi içindeki yerleşimi (48)

MKRN3 geni (ID Q13064) Makorin zincfinger (çinko parmak) ailesinin bir üyesi olan makorin ringfinger (halka parmak) protein 3'ü kodlar. İnsan Protein Atlas (The Human Protein Atlas) veri bankasına göre, plazma membranı, sitoplazma ve nükleoplazmada gösterilmiş olup karaciğer, pankreas, prostat ve apendiks dışında tüm organlarda eksprese olmaktadır (Şekil 22) (54).

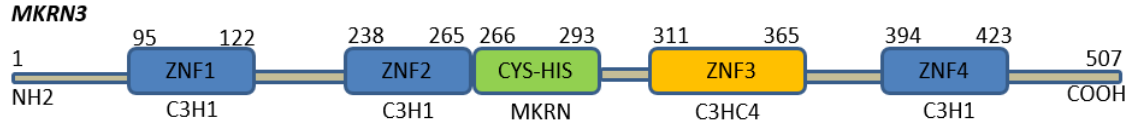
MKRN3'ün hücre içi sinyal trafiğindeki rolü ve ubiquitinleşmeye etkisi ile GnRH'nin sekresyonunun inhibisyonuna yol açarak puberte zamanlamasına etki ettiği düşünülmektedir. *MKRN3*, E3 ubiquitin ligazlarına benzer. Bu özelliğiyle hipotalamik seviyede uyarıcıların inhibisyonunu E3 ubiquitin ligaz olarak hareket ederek sağladığı düşünülmektedir. Ubikutinlenmenin hücre döngüsünün düzenlenmesi, farklılaşma ve morfogenezinde önemli olduğu, ayrıca hedef proteinlerin ubiquitinlenmesi ile proteozom tarafından degradasyonuna ve protein fonksiyonunun modifikasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Hayvan çalışmalarında *MkRN3*'ün ekspresyonundaki azalma ile GnRH uyarıcı faktörlerinde ve/veya GnRH ekspresyonunda artışla ilişkili olduğu varsayılmaktadır. *MKRN3*'ün fonksiyon kaybı mutasyonlarının, HHG ekseninin erken aktivasyonuna ve fenotipik olarak SEP'e yol açtığı bildirilmektedir (40,42,55-57).



Şekil 22; MKRN3 proteininin farklı organlardaki anlatım oranları, The Human Protein Atlas veri tabanı sitesinden alınan grafik (54). Anonim 45 farklı insana ait doku tipinin immünohistokimyasal test ile antikor bazlı protein profillemesinden görselleştirilmiştir (Bu görsel Türkçe'ye uyarlanmıştır).

MKRN3 proteinin özgün bir yapısı vardır, dört çinko parmak içerir; ZNF1 (95–122), ZNF2 (238–265), ZNF3 (311–365) ve ZNF4 (394–423). ZNF3'ün halka tipi oluşturduğu tahmin edilmektedir (**Şekil 23**). Halka çinko parmakların protein - protein etkileşimlerine aracılık ettiği gösterilmiştir. C3H çinko parmak motifleri Sistein (Cys) ve Histidin (His) rezidüleri ile bir halka parmak yapısal motifine (266–293) sahiptir. Çinko parmaklar, çeşitli ribonükleoproteinler ve RNA bağlayıcı proteinlerde de bulunmaktadır. Bu proteinler, posttranskripsiyonel RNA işlenmesini, mRNA stabilitesini, mRNA lokalizasyonunu, alternatif kırılmayı ve translasyon etkisini düzenlemektedir. Halka çinko parmak domaini ubiquitin-ligaz aktivitesinden sorumludur ve E3 ubiquitin ligazda bulunur. Ubiquitin E2 ile kompleks yaparak lizin substratı olan bir monoubikitin veya lizin rezidülerinden poliubikitin zinciri oluşturabilir. Bu değişiklikler proteozomun hedef proteinin proteolizisinden, protein fonksiyon yapısından, birlikteliği ve/veya yerleşimini etkileyen bir dizi etkiden oluşmaktadır. Bununla birlikte Cys and His rezidülerinin görevi halen tam olarak aydınlatılamamış

olsa da çinko parmak motif işleyişinin düzenlenmesinde rolleri olduğu düşünülmektedir (20,57).

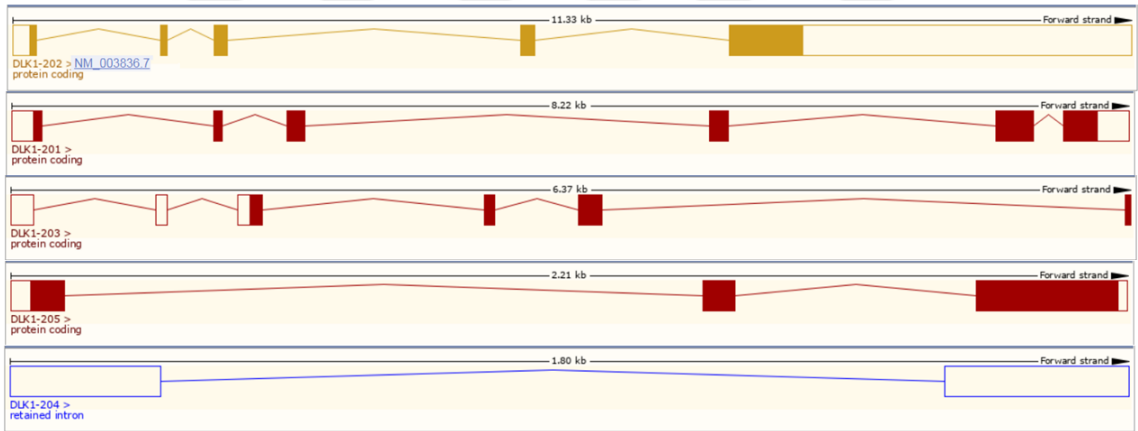


Şekil 23; MKRN3 proteini ve çinko parmak bölgeleri Christoforidis (2017) ve Valaderes (2019)'den modifiye edilerek düzenlemiştir(41,57).

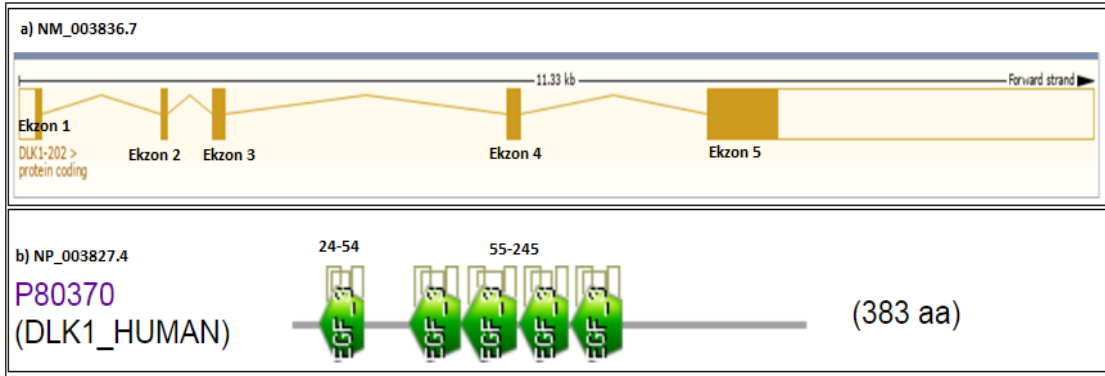
2.3.2.4. Delta like non-canonical Notch ligand 1 (*DLK1*) Geni

DLK1 (OMIM# 176290) geni 14q32.2'de yerleşik olan beş ekzonlu bir genidir. Ensembl veri tabanında 4'ü kodlama yapan biri kodlamayan toplam beş transkript varyantı bulunmaktadır (Şekil 24).

En büyük transkriptin (NM_003836.7) boyu 4.657 bp ve kodladığı proteinin (NP_003827.4) boyu 383 aa'dır (21,30) (Şekil- 25-29).

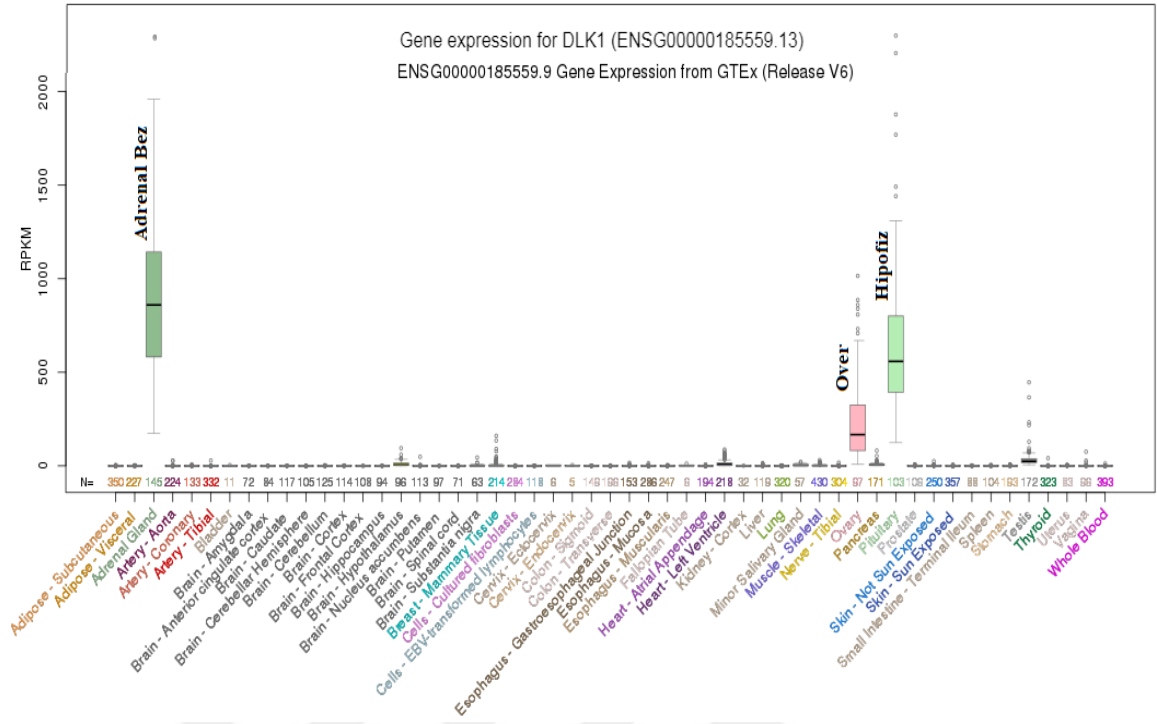


Şekil 24; *DLK1* geninin Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) kırılma varyant görseli



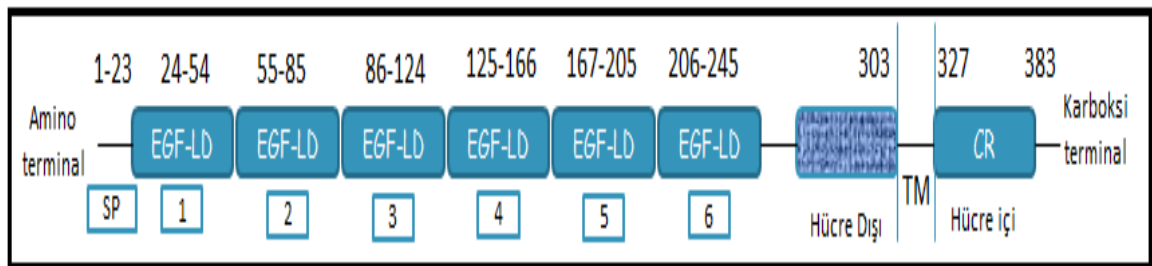
Şekil 25; a. *DLK1* gen transkriptinin (NM_003836.7) Ensembl veri tabanındaki (GRCh38.p13) görseli; b. *DLK1* proteinin (NP_003827.4) UniProt (P80370) ve Prosite (PS50193) veri tabanındaki görseli. Ekzon, kodlayan amino asitler ve domain yapısı modifiye edilerek resmedilmiştir.

Preadiposit faktör 1 / delta like non-canonical Notch ligand 1 / pref-1 olarak da bilinen *DLK1*, sitoplazmik bölgesinde epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrarlar içeren bir transmembran proteinidir. Evrimsel olarak korunmuş olan Delta-Notch sinyal yolağında yer alır ve adiposit farklılaşmasının inhibisyonunda rol oynar. Delta-Notch sinyal yolağındaki işlev kaybı mutasyonları genellikle letaldir. *Dlk1* geni, farelerde hipotalamus ve kisspeptin nöronlarının olduğu hücre hatlarında eksprese olmaktadır (12,44,58). Yaklaşık 1000 kişinin hastalıklı olmayan 54 doku bölgesi örnekleri üzerinden açık veri kaynağı olarak sunulan Genotip-Doku İfadesi (GTEx) projesinin görseline göre, *DLK1*, insanda embriyonik dokuda yaygın olarak eksprese edilmekte, ancak doğum sonrası diğer dokularda azalırken, adrenal, hipofiz ve yumurtalık dokusunda en yüksek seviyede eksprese olmaya devam etmektedir (12,59) (Şekil 26). Hipofizde, *DLK1* ve notch sinyalinin, hipofiz hücre tipi farklılaşmasında rol oynadığı bildirilmiştir (44).

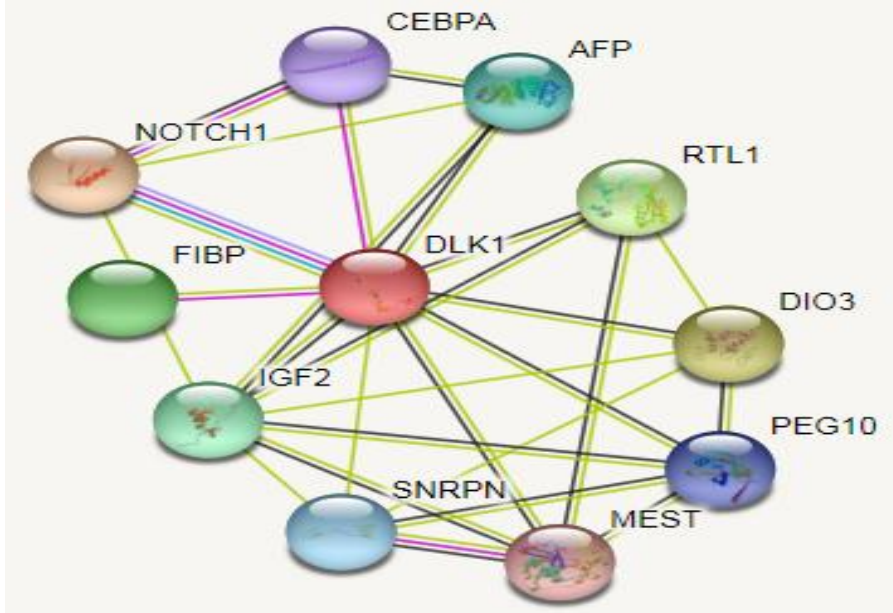


Şekil 26; DLK1 gen ekspresyonunun 53 dokudaki gösterimi (GTEx portalından alınmış görseldir).

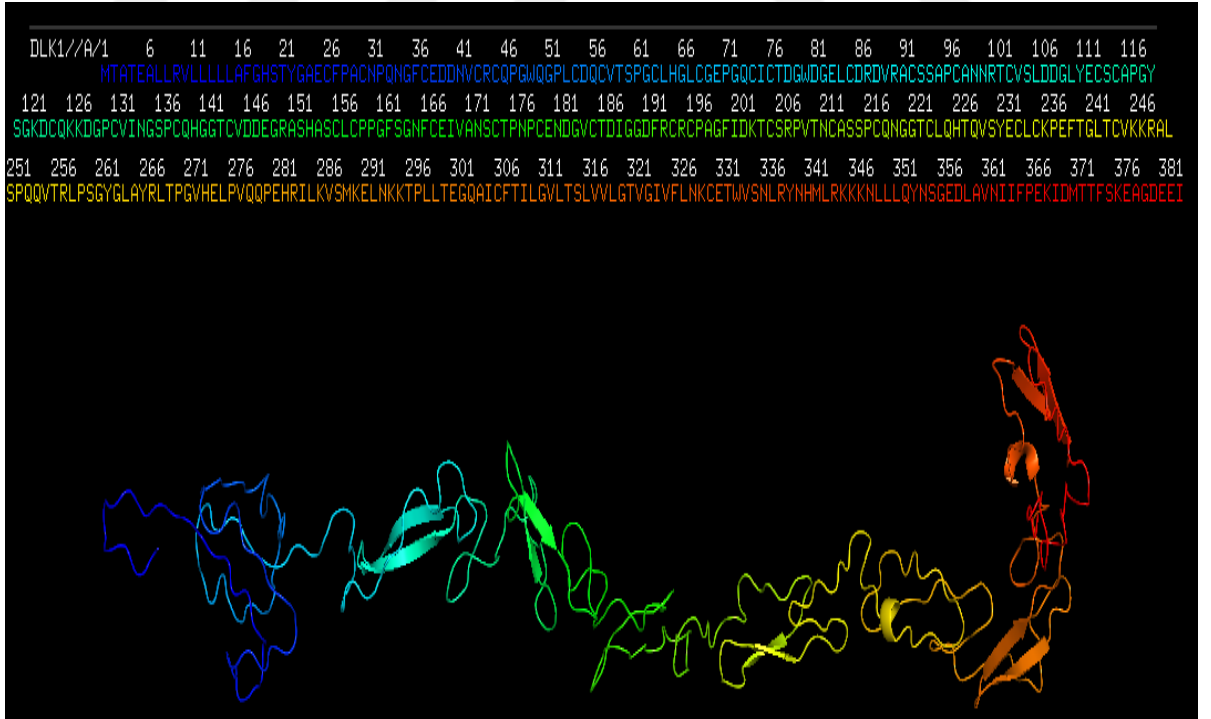
DLK1'in adipoz, mezenkimal, nöroendokrin ve hematopoetik dokuların gelişim ve farklılaşmasında rol oynadığı bildirilmiştir. İlk olarak 1987'de adrenal medullar nöroendokrin tümörlerde yüksek oranda anlatım yaptığı, 2000 yılında ise Wylie ve arkadaşları tarafından fare çalışmalarında 12. kromozomda yerleşik *Dlk1*'in maternal imrinted bir gen olduğu gösterilmiştir. Paternal eksprese olan genin ürünü 383 aa'dan oluşan DLK1 proteini insan ve farede %86 benzerlik göstermektedir. Hem insan hem de fare DLK'si, 6 EGF benzeri tekrar bölgesi, bir transmembran bölgesi ve bir sinyal peptit dizisi içermektedir (Şekil 27) (60,61).



Şekil 27; DLK1 proteinin domain yapısı Gomes (2019)'den modifiye edilerek sunulmaktadır (62). SP: sinyal dizisi, TM: transmembran, EGF-LD:EGF benzeri domain CR; Sitoplazmik alan.



Şekil 28; DLK1 proteini ile yakın etkileşim gösteren peptitlerin String veri tabanı görseli.



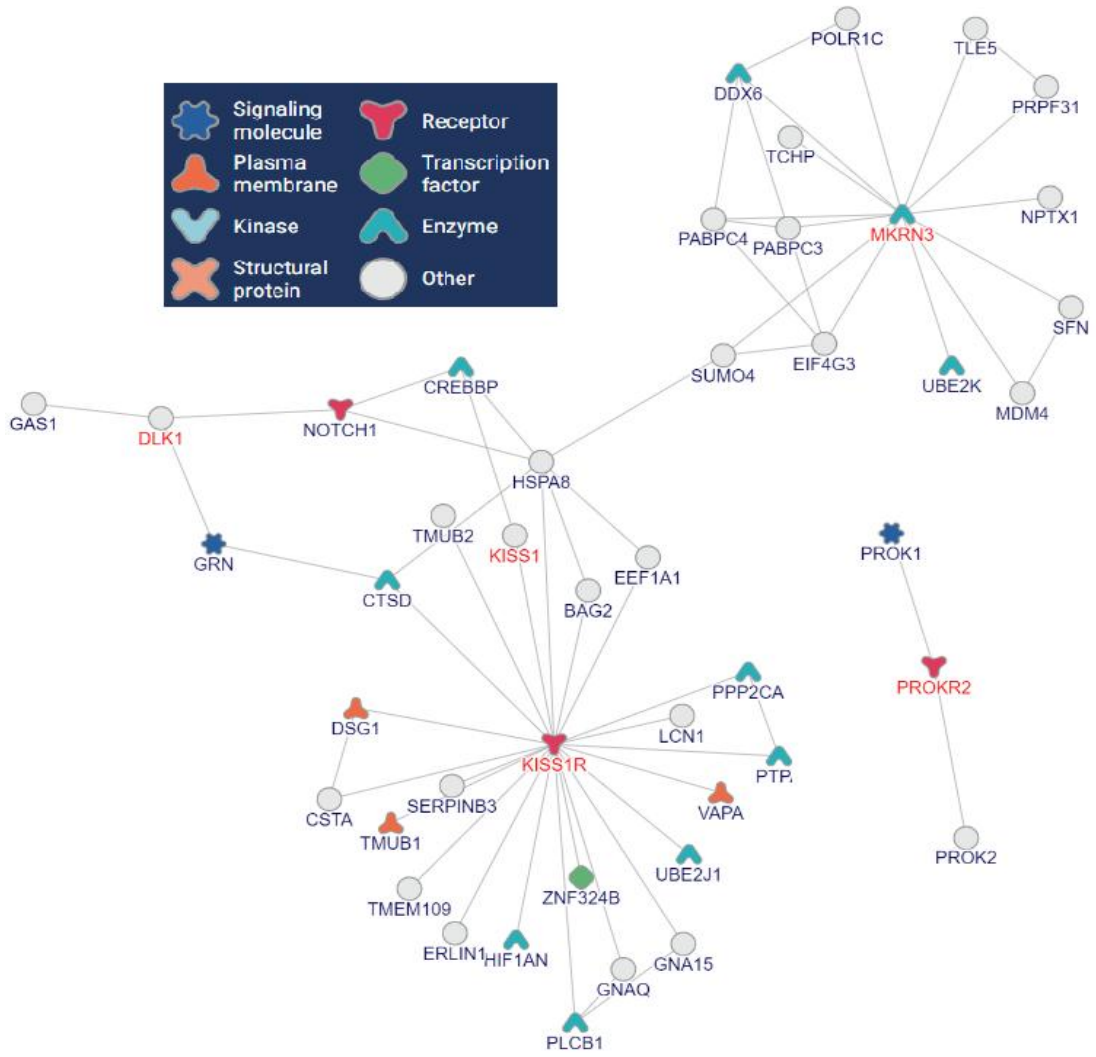
Şekil 29; DLK1 proteinin I TASSER'den oluşturulan üç boyutlu yapısının gösterimi (<https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)(31). N-terminalden C-terminale doğru maviden kırmızıya gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır

DLK1 ve SEP ilişkili diğer bir maternal imprinted gen olan *MKRNS3*'ün insan puberte başlangıcındaki ve zamanlamasındaki rolü farklı ülkelerden ve kökenlerden kadınların dahil edildiği 57 büyük GWAS çalışmasıyla araştırılmış olup menarş sinyallerinin ilişkili olduğu varyantlar belirlenmeye çalışılmıştır. *DLK1*'in nöroendokrin varlığı hipotalamik çekirdekte postnatal *DLK1* ekspresyonunun varlığıyla desteklenirken, kaybının hipofiz hormon düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (12,58).

14. kromozomun uzun kolunda (14q32) yerleşik *DLK1*, maternal uniparental dizominin de görüldüğü bir imprinting sendrom olan Temple sendromu (*MIM#616222*) ilişkili lokus içerisinde yer almaktadır (63). 1991 yılında ilk kez tanımlanan bu sendrom, PWS'ye benzer ve klinik özellikleri arasında intrauterin büyüme geriliği, infantil dönemde beslenme problemleri, doğum sonrası kısa boy, hipotoni, küçük eller, hafif yüz dismorfizmleri ve erken puberte yer alır (12).

DLK1'in SEP ile ilişkisi ilk olarak 2017 yılında Dauber ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bağlantı analizi ve tüm genom dizileme (TGD) sonuçlarının birlikte değerlendirildiği, Afrika kökenli Brezilyalı dört kız kardeşte (iki kız kardeş ve baba tarafından iki üvey kız kardeş) yapılan çalışmada ekzon 1'i de kapsayan yaklaşık 14 kb'lık delesyon ile 269 bp'lik bir duplikasyon saptanmıştır. Fonksiyon kaybına yol açan bu mutasyon sendrom ilişkili olarak bildirilmiştir. Çalışmada serum *DLK1* düzeyi, etkilenmiş bireylerde ve kontrollerde incelendiğinde etkilenen olgularda düzeyin tespit edilemeyecek kadar azaldığı gösterilmiştir. Bu olguların erken puberte bulgularına ek olarak dört olgunun üçünde obezitenin olduğu ancak Temple sendromu'nda görülen diğer klinik bulgulara rastlanmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada *Dlk1*'in farelerde adiposit oluşumunun düzenlenmesindeki rolünün araştırılması amacıyla yürütülen *knock-out* farelerde artmış adipoz, yüksek kolesterol ve trigliserit seviyeleri saptadıkları bildirmiştir (12). *DLK1*'in puberte zamanlamasının düzenlenmesinde kisspeptin sinyal yolağını etkileyerek rol oynadığı düşünülmektedir (12).

Bu çalışmada sunulan SEP ile ilişkili proteinlerin diğer proteinlerle etkileşimleri inBio Discover açık veri tabanında (**Şekil 30**) gösterilmiştir.



Şekil 30; SEP ilişkili bilinen genlerin kodladığı proteinlerin birbiriyle ilişkileri *in silico* araçlarla inBio Discover açık veri tabanından alınarak sunulmuştur.

2.4. Genetik Hastalıkların Tanısında/Araştırılmasında Kullanılan Analiz Yöntemleri

Genetik Hastalıkların tanısında ve araştırılmasında kullanılan teknikler, analiz hedefine göre, klasik sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler teknikler başlıkları altında toplanmaktadır.

2.4.1 Sitogenetik

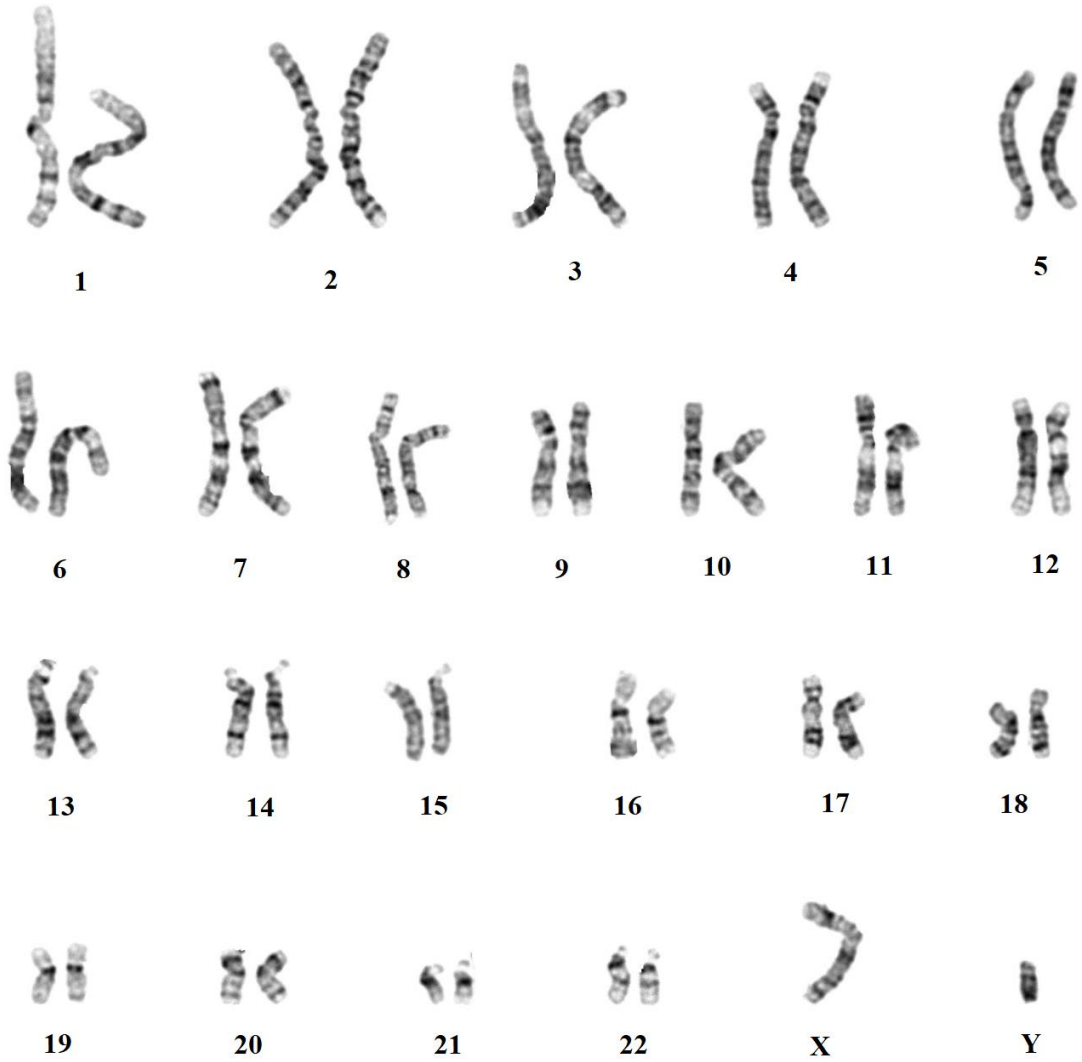
İnsan sitogenetiği, kromozomların yapısını, kalıtım şekillerini ve anomalilerini inceleyen bilim dalıdır. Kromozomlar, DNA ve karmaşık yapıdaki histon ve non-histon proteinlerinden oluşurlar ve bir kuşaktan diğerine aktarılan genetik bilginin taşınmasından sorumludurlar. Kromozom anomalileri canlı doğumların yaklaşık

%1'inde görülür. Doğumsal anomalilerin, zihinsel geriliklerin, infertilitenin, cinsiyet gelişim bozukluklarının ve fetal kayıpların en önemli nedenlerinden birisi kromozom anomalileridir. Kromozom analiz yapılma gereksinimi, kromozom anomalileri için artmış risk taşıyan pre ve postnatal dönemde ayrıntılı bir öykü ve fizik muayene sonucunda belirlenmelidir.

2.4.1.1. Klasik Sitogenetik Teknikler

Sitogenetik analizler kromozomlardaki sayısal ve yapısal değişimlerin araştırılmasında kullanılmaktadır. Analizler ışık mikroskopunda yapılmakta ve mikroskopik olarak tüm sayısal ve >8-10 Mb boyutundaki dengeli veya dengesiz kromozom anomalilerinin tanısına olanak sağlamaktadır. Kromozom analizleri yapılırken her bir homolog kromozom çiftinin diğerinden ayırt edilmesine olanak sağlayan bantlama teknikleri kullanılır. Bu bantlama teknikleri arasında rutin analizlerde tüm kromozomların incelenmesini sağlayan G bantlama (**Şekil 31**) ve seçici kromozom bölgelerinin analizini mümkün kılan C bantlama, NOR boyama ve diğerleri bulunmaktadır.

Klasik sitogenetik analizlerde bölünme özelliğini kaybetmemiş başta periferik kan lenfositleri olmak üzere, amniyositler, koryon villuslar, deri fibroblastları ve kemik iliği gibi hücre ya da dokular kullanılmaktadır. Analizler geliş endikasyonu ve anomali beklentisine göre, metafaz ve prometafazda yapılmaktadır. Bilinen trizomi 21, 13, 18 ve monozomi X gibi kromozom anomali sendromlarında metafaz evresinde 400/450 bant düzeyinde analiz yeterli iken, mikrodelsiyon, mikroduplikasyon ya da non-spesifik konjenital anomali/zihinsel yetmezlik nedeniyle kromozom analizi yapılan olgularda HRBT olarak da adlandırılan ve kromozomların prometafaz evresinde 650/850 bant düzeyinde analiz edilebilmesine olanak tanıyan teknik kullanılmaktadır.



Şekil 31; G bantlama ile bantlanmış normal bir karyotip örneği (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Sitogenetik laboratuvarı arşivi)

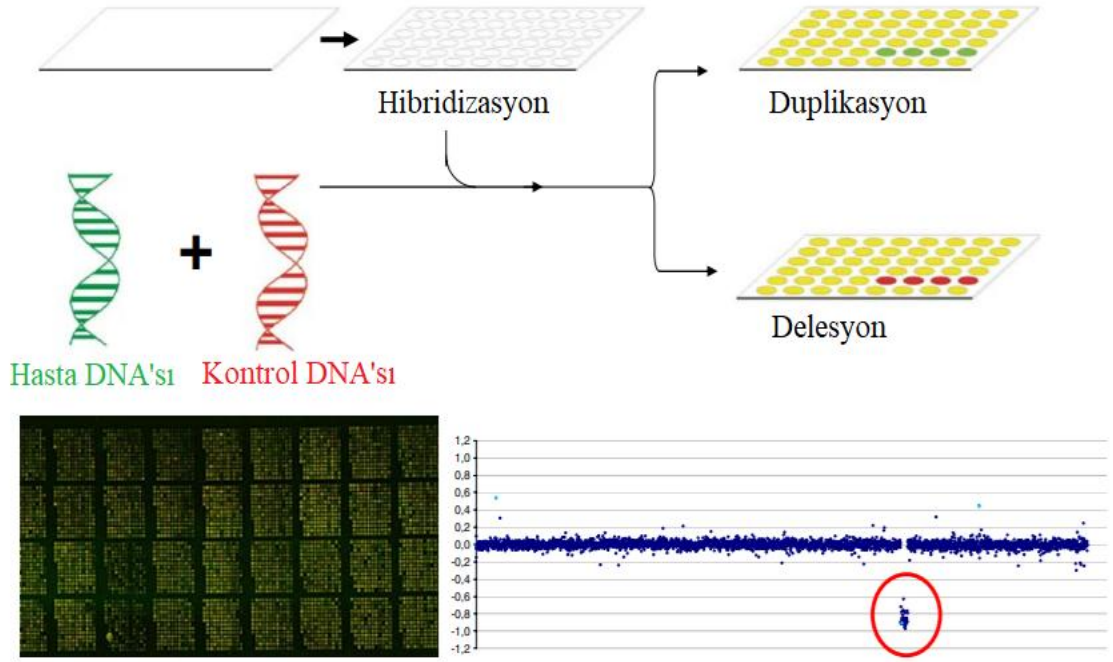
2.4.1.2. Moleküler Sitogenetik Teknikler

Floresan in situ hibridizasyon (FISH): sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerin birlikte kullanıldığı, klasik sitogenetik tekniklerin tanıda yetersiz kaldığı kromozom anomalilerinde kullanılan tamamlayıcı bir tekniktir. 1990'lı yıllardan itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle anöploidilerin hızlı tanısına, kanser hücrelerinde kromozom eldesinde zorluk yaşanan durumlarda hücre kültürüne gereksinim duyulmadan direkt analiz edilebilmesine imkan tanınması nedeniyle klasik

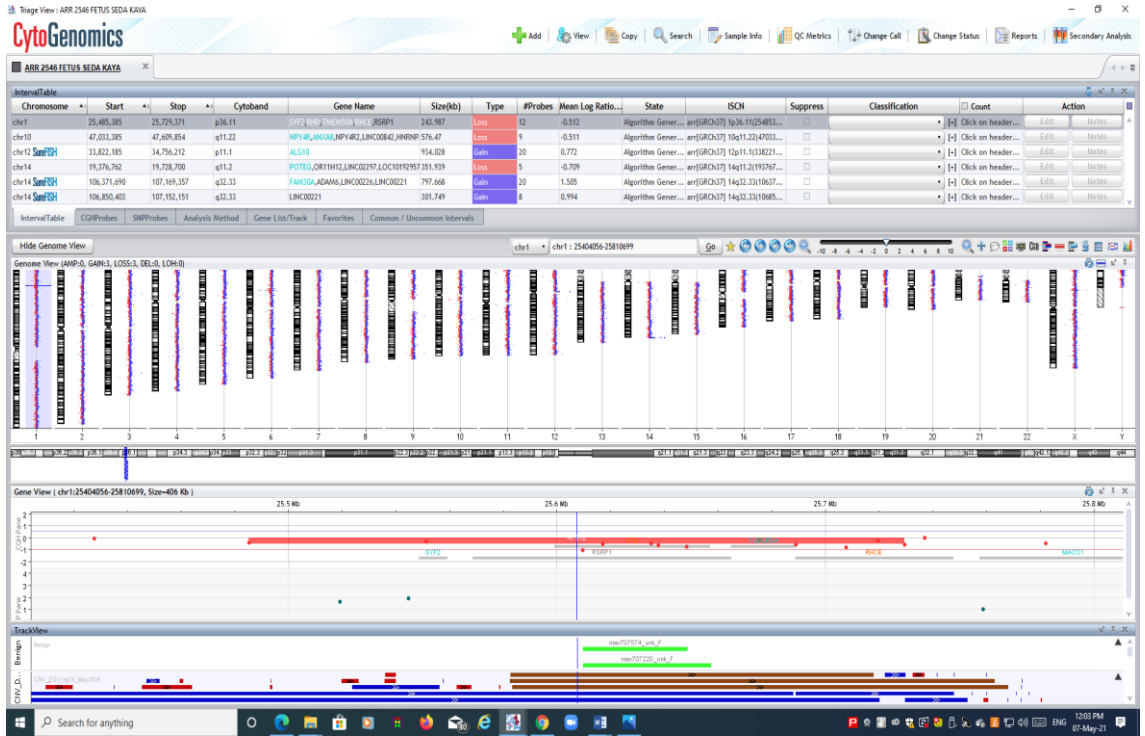
sitogenetiğe üstünlük sağlamaktadır. Ayrıca submikroskopik düzeyde mikrodelesyon/duplikasyon sendromları (Örneğin, PWS/AS) gibi klinik ön tanılarda, inversiyon, translokasyon, delesyon ve duplikasyon gibi yapısal kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında önemli rol oynar. Teknik, hedefli analize olanak sağlamaktadır, belirli bir bölgeye ya da tüm kromozoma özgü işaretli problemlerin interfaz ve metafaz kromozomları ile hibridize edilmesi sonucu oluşan hibrit sinyallerin floresan mikroskopunda değerlendirilmesi ile yapılır.

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) tekniği; indeks DNA ile kontrol DNA'sının farklı floresan boyalar ile işaretlenerek metafaz kromozomlarına hibridizasyonu ve floresan mikroskobu altında renklerin karşılaştırılmasıyla delesyon/duplikasyon analizi temeline dayanır. Günümüzde düşük çözünürlük ve analiz zorluğu nedeniyle tercih edilmemektedir.

Array CGH (aCGH) tekniği ise, genomdaki dengesiz değişimleri DNA düzeyinde araştırmak amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Hedeflenen bölgelere veya tüm genomla özgü oligonükleotit problemler yardımı ile referans ve indekse ait DNA ların farklı floresan boylarla (cy3 yeşil ve cy5 kırmızı) işaretlenerek çip üzerindeki DNA'ya hibridize edilmesi ile analiz gerçekleştirilir. (**Şekil 32**). Teknik dengeli kromozom anomalilerini, düşük oranlı mozaizizmleri ve poliploidileri saptayamaz. Dengesiz anomalilerin yüksek çözünürlükle gösterilebilmesinde, az miktarda DNA ile dahi çalışılabilmesi ve tüm genomun kısa bir sürede incelenebilmesi gibi avantajları nedeniyle özellikle konjenital anomali ve zihinsel yetmezliği olan olgularda birinci basamak test olarak tercih edilmektedir (**Şekil 33**).



Şekil 32; aCGH tekniğinin şematize edilerek gösterimi (64)

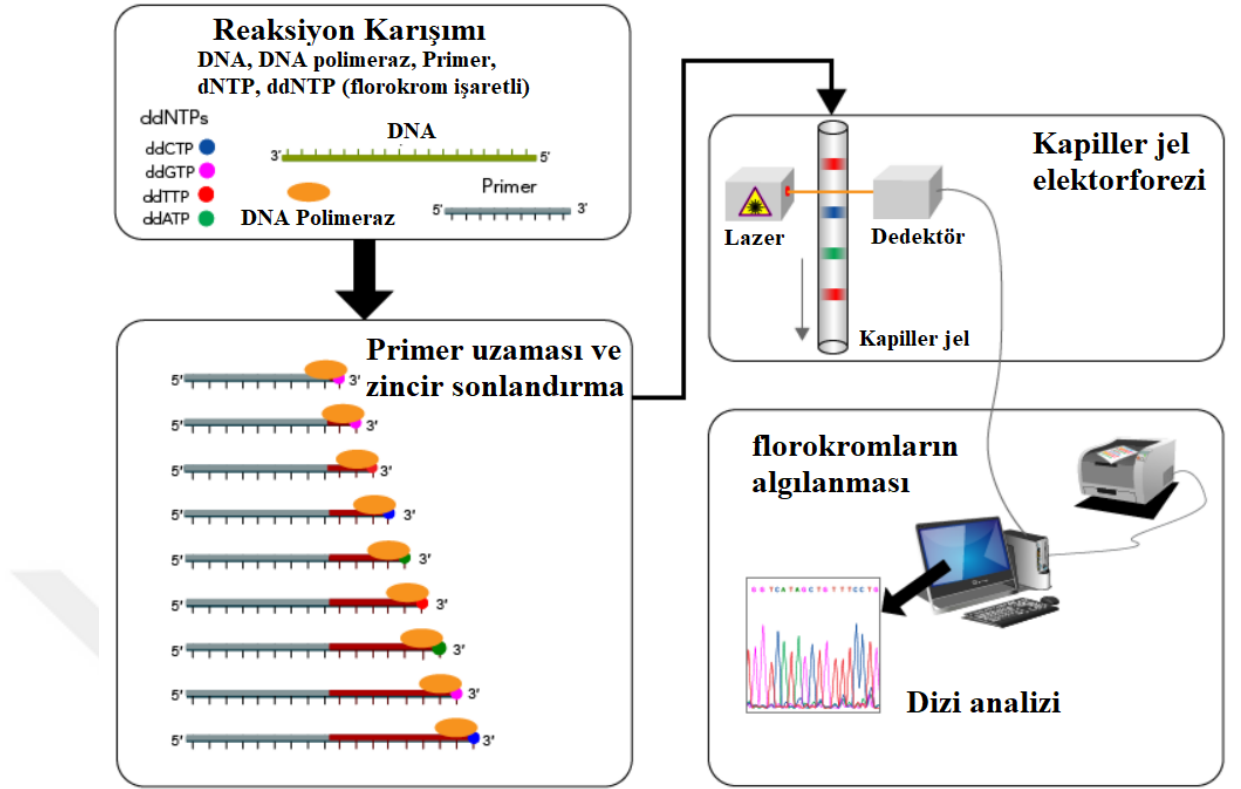


Şekil 33; aCGH tekniğinin analiz ara yüzü (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dah, Moleküler Sitogenetik laboratuvarı arşivi)

2.4.2. Moleküler Teknikler

2.4.2.1. Sanger Dizileme Tekniği

1977 yılında Frederick Sanger'in günümüzde altın standart olarak değeriendirilen ve 3'OH grubu bulunmayan dideoksinükleotid (ddNTP)'lerin kullanımıyla, ardışık deoksinükleotid (dNTP)'in 5' pozisyonundaki fosfatı ile fosfodiester bağının kurulamaması sonucu DNA'nın zincir uzamasının sonlandırılmasını sağladığı bir yöntemdir (65). Bu yaklaşım ile yapılan dizileme dideoksi zincir sonlandırma yöntemi olarak da isimlendirilir. DNA zincirlerinin uzatılması için farklı florometrik işaretleme ile dedektör aracılığıyla saptaması yöntemini ve kapiller elektroforez gibi teknik gelişmelerin olması sonucu otomatik ve bilgisayar destekli sistemler ile entegre olan tekniğin kullanımında çok sayıda (384) örnek eş zamanda dizilenebilir hale gelmiştir (**Şekil 34 - 35**). Sistem, tek yönden 600 ile çift yönden 1400 baz uzunluğu arasındaki DNA dizisini yüksek doğruluk ile okuyabilmektedir (66). Amerika'nın Ulusal Sağlık Enstitüsü (*National Institutes of Health*, USA) tarafından 1990 yılında başlatılan İnsan Genom Projesi (İGP), 2000 yılında tamamlanmıştır. Bu 10 yıllık süreçte İGP'den elde edilen bilgiler ile ekonomik ve zaman açısından genomun dizilenmesi için yeni tekniklere ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır.



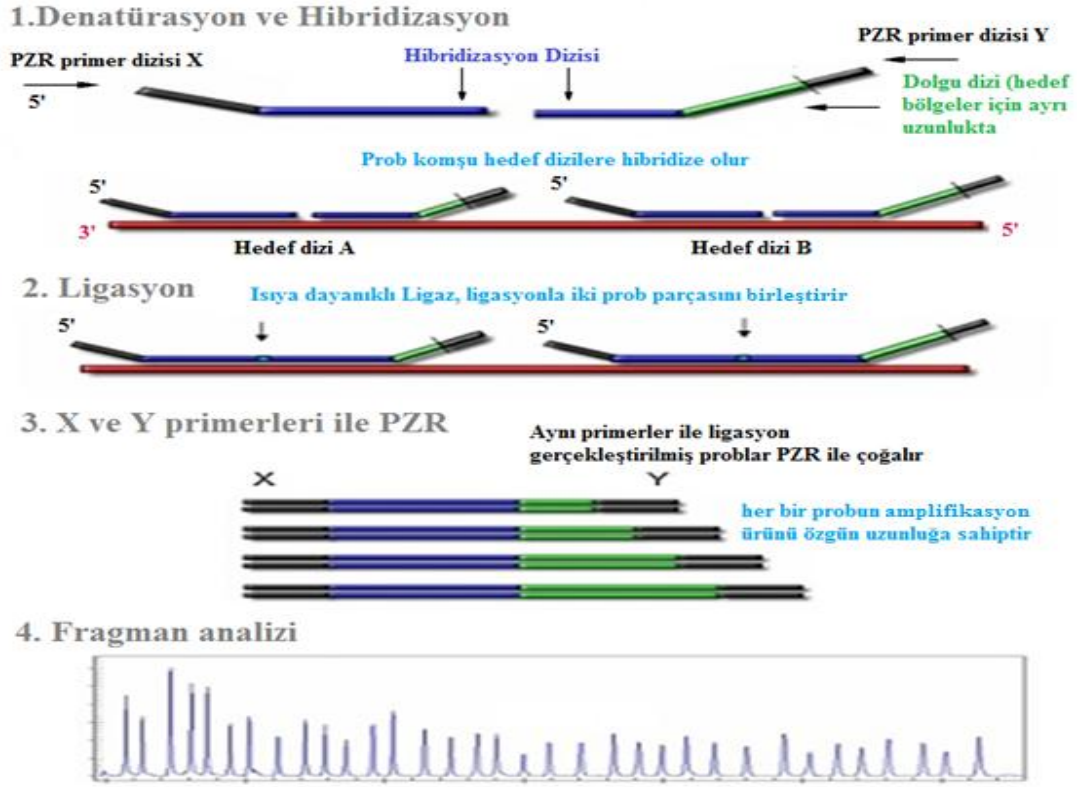
Şekil 34; Sanger Dizileme tekniğinin gösterimi, <https://letstalkscience.ca/educational-resources/backgrounders/sanger-sequencing> sitesinden Türkçe'ye çevrilerek modifiye edilmiştir.



Şekil 35; Applied Biosystems® 3500 / 3500xL SD için genetik analiz cihazı, <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4476988.pdf> sitesinden alınarak sunulmaktadır.

2.4.2.2. Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) Analizi

Çoklu Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu (*Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*) tekniği primer çiftlerinden oluşan prob karışım setleri ile hedef gen bölgesindeki değişimleri, delesyon ve duplikasyonları araştırmak amacıyla kullanılmaktadır (**Şekil 36**). Teknik aynı reaksiyon sürecinde tek gen hastalıkları ile ilişkili delesyon ve duplikasyonları, DNA'nın metilasyon varlığını ve indirekt olarak prob bağlanma bölgelerindeki küçük değişimlerin gösterilmesini sağlamakta olup, tek ekzon delesyonlarının Sanger dizi ile doğrulanmasını gerektirir (67).



Şekil 36; MLPA protokolünün şematize aşamaları, <https://www.mrcholland.com/>'dan modifiye edilerek düzenlenmiştir.

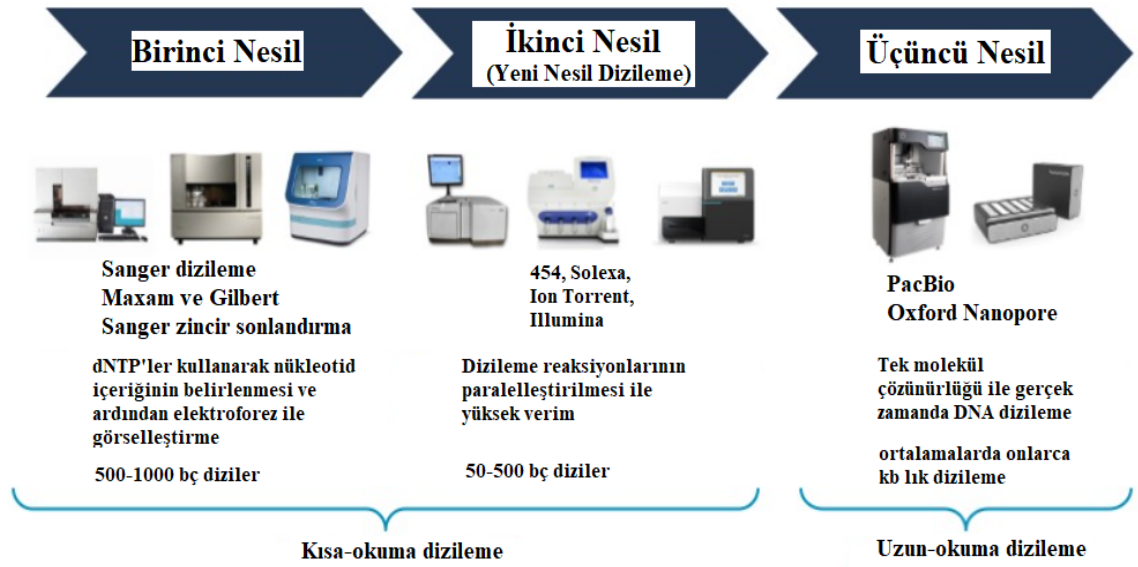
2.4.3. Yeni Nesil Dizileme (YND)

İGP'nin tamamlanması sonrasında, masif paralel dizileme ya da yeni nesil dizileme (YND) olarak adlandırılan yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Eş zamanlı DNA fragmanının dizilenmesine dayanan bu teknolojiler ile kısa sürede daha fazla dizileme ile büyük miktarda veri çıktısı elde edilebilmektedir. Günümüzde genetik heterojenitesi yüksek olan ve çok ekzon sayılı genlerle ilişkili olan hastalıkların moleküler genetik tanısında kullanılmaya başlanan bu teknoloji, hastalık ilişkili yeni genlerin araştırılması için de bir fırsat sunmaktadır. YND tekniği aşamaları, tek bir DNA molekülünün veya tek DNA molekülünün klonal çoğaltılmasıyla, fragmentasyon, kalıp/taslak hazırlanması, dizileme işlemi, görüntülenme ve veri analizlerinden oluşmaktadır.

2005 yılında, Life Sciences tarafından 454 platformu piyasaya çıkmıştır. Bu platformda, boncuklar üzerine bağlanmış kalıp molekül emülsiyon PZR (emPZR) ile

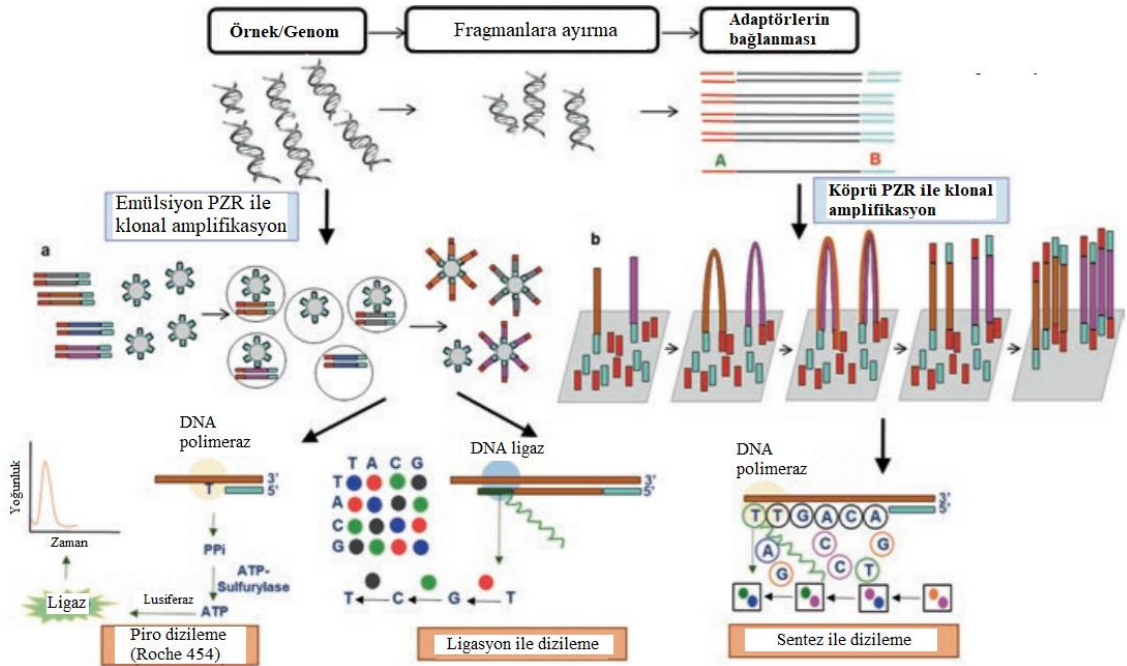
çoğaltılır. Kalıp hazırlanması ve milyonlarca kopya boncuklara bağlı molekül ile her kuyucuğa bir boncuk girecek şekilde pikolitrelilik kuyulara yüklenir. Fragmanlar paralel olarak piro sekans (tek nükleotid ekleme) yöntemiyle dizilenmektedir.

Daha sonraki yıllarda ise Solexa firması tarafından Genome Analyser ve Agencourt firması tarafından Solid, 2011 de ise Ion Torrent PGM, Illumina MiSeq ve Pacific Biosciences RS (Pac Bio) platformları ortaya çıkmıştır (**Şekil 37**).



Şekil 37; Dizileme teknolojilerindeki ilerlemeler, <https://www.pacb.com/blog/the-evolution-of-dna-sequencing-tools/> sitesinden Türkçe olarak modifiye edilmiştir.

Illumina platformunda, cam bir yüzey yardımı ile DNA fragmanları yakalanırlar ve cam yüzey üzerinde köprü PZR tekniği ile DNA fragmanları çoğaltılarak klonal DNA'ların elde edilmesi sağlanır. Bir sonraki aşamada SD'ye benzer olarak floresan işaretli sonlandırıcılar ile dizileme gerçekleştirilir. Firmanın MiSeq cihazı ile daha az kapasitede ve kısa süreli dizilemeleri yapılırken, genelde TED/TGD de kullanılan HiSeq 2500 platformunda 6 günlük ıslak laboratuvar çalışması ile 1 TB gibi yüksek kapasiteli dizilemeler yapılabilmektedir (66). Solid, üçüncü sıradaki YND platformudur. Platform, mekanik ya da enzimatik fragmentasyon sonrasında, yağ damlacıkları içerisinde emülsiyon PZR yöntemiyle çoğaltılan DNA fragmanlarının floresan işaretlenmesi ve probler kullanılarak ligasyon ile dizileme gerçekleştirmektedir. Farklı YND platformlarla ilgili bilgiler **Şekil 38**'de gösterilmiştir.



Şekil 38; Farklı YND platformlarında DNA dizilemenin şematize edilmesi (Gupta 2019) (68) (Türkçe olarak modifiye edilmiştir).

PacBio [Single Molecule, Real-Time (SMRT)] dizileme sistemi DNA molekülünün PZR amplifikasyonundan bağımsız gerçek zamanlı dizilenmesini sağlayan bir platformdur. Kuyular içerisinde bağlanmış polimerazlar ile γ -fosfat floresan işaretlenmiş nükleotidler kullanılarak tek iplikli DNA molekülünden, yeni bir zincir oluşur. Bu sentez esnasında her baza özgü bir floresan ışımaya gerçekleşir, bu sayede gerçek zamanlı olarak DNA dizilenir. Ayrıca Oxford Nanopore firmasının tek zincirli DNA molekülünün elektriksel algılanması teknolojisi de günümüzde farklı bir yaklaşım benimsemiştir. PacBio ve Oxford Nanopore firmalarının uzun okuma dizileme karşılaştırmaları Şekil 39'da bulunmaktadır.

Teknoloji	Platform	Okuma uzunluğu (bp)	Veri çıkışı	Çalışma süresi	Önerilen uygulama
PacBio SMRT	RS II	~20 Kb	up to 1 Gb	4 h	WGS, PGS
	Sequel	8–12 Kb	3.5–7 Gb	30 Min–6 h	
	Sequel II 2.0	~15 Kb	160 Gb/ SMRTcell		
Oxford NanoPore	Flongle		1.8 Gb	Real time ⁺	WGS*, PGS
	MinION	5–200 Kb [▲]	30 Gb		
	GridION Mk1	2 Mb longest [▲]	250 Gb		
	PromethION		up to 4 Tb		

PacBio SMRT ve Oxford NanoPore sıralama platformları. bp, baz çifti; Kb, kilobaz; WGS, tüm genom dizileme; PGS, hedeflenen nesil sıralaması; Gb, Gigabayt; Tb, Terabayt. *Küçük tüm genom dizileri.

▲Tüm Nanopore dizileyiciler, sunulan DNA / RNA parçasının tamamını okur.

Şekil 39; PacBio ve Oxford Nanopore’un platform, okuma uzunluğu vb. karşılaştırılması (Kanzi 2020’den modifiye edilerek düzenlenmiştir) (69).

Günümüzde birçok firmanın dizileme platformları kullanılmaktadır. Bu platformların bazıları ve özellikleri Şekil 40’da gösterilmektedir (69).

Teknoloji	Dizileme platformu	Okuma uzunluğu (bp)	Veri çıkışı	Çalışma süresi	Önerilen uygulama
Illumina	NovaSeq 6000 System	150 PE*	2.4–3.0 Tb	44 h	WGS, WES, PGS
	NextSeq 550 System		100–200 Gb	29 h	
	HiSeq 3000/4000 System		up to 1.5 Tb	4 days	
	HiSeq X Series		1.6–1.8 Tb	3 days	
Ion Torrent	Ion GeneStudio S5 System	200 SE	10–15 Gb	19 h	WGS, WES, PGS
	Ion GeneStudio S5 Plus System	400 SE	20–30 Gb	10 h	
	Ion GeneStudio S5 Prime System	200 SE	40–50 Gb	12 h	
	Ion PGM 314 System	400 SE	30–50 Mb	2.3 h	
	Ion PGM 316 System	600 SE	60–100 Mb	3.7 h	
	Ion PGM 318 System	200 SE	300–600 Mb	3.0 h	
	Ion Proton System (Ion PI Chip)	200 SE	600 Mb–1 Gb	4.9 h	
		400 SE	600 Mb–1 Gb	4.4 h	
		200 SE	1.2–2 Gb	7.3 h	
		400 SE	up to 15 Gb	2.5 h	
BGI/MGI	DNBSEQ-T7	100 PE, 150 PE	6 Tb	24 h	WGS, WES, PGS
	DNBSEQ-G400/MGISEQ 2000/BGISEQ 500	400 SE, 100 PE, 150 PE,	18.75–1,080 Gb	~78 h	WGS, WES
	DNBSEQ-G400 FAST	200 PE	330 Gb	12–13 h	PGS
	DNBSEQ-G50/MGISEQ 200/BGISEQ 50	100 SE, 150 PE	10–150 Gb	10–64 h	PGS
		50 SE, 100 SE, 50 PE, PE100			

Sıralama performans özellikleri şirket açıklamasına göre. bp, baz çifti; WGS, tüm genom dizileme; WES, tüm ekzom dizileme; PGS, hedeflenen nesil sıralaması; SE, Tek uçlu okuma; PE, Paired-End/iki uçlu okuma; Gb, Gigabayt; Tb, Terabayt. * Tüm dizileyiciler için geçerlidir.

Şekil 40; Farklı YND platformları ve özellikleri ile ilgili bazı bilgiler Türkçe düzenlenmiştir (Kanzi 2020)’ den (69).

YND’de diğer türlerinde farklı dizi teknolojisi kullanan bir diğer platform da Ion Torrent olup Rothberg (70) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknolojide floresan tabanlı işaretleme yerine nükleotidler pH ölçümü ile okunur, kullanılır. Öncelikle kalıp/taslak ve kütüphane hazırlığı amacıyla DNA’nın fragmentasyonu yapılır. Daha sonra bu fragmanların uçları enzimatik olarak modifikasyona uğratarak adaptörlerin bağlanması sağlanır. Adaptöre bağlı kütüphane ürünleri manyetik bilyelere bağlı olarak emPZR ile çoğaltılır. emPZR reaksiyonu yağ damlacıkları içinde yer alan manyetik bilyelerin üzerinde gerçekleşmektedir. Fragmente olmuş genomik DNA parçacıklarının her iki ucuna da oligonükleotit dizilerinin ligasyon ile eklenmesi sağlanır. Bu sayede tamamlayıcı bazlarından oluşan bu dizilerin karşısına uygun adaptörler gelir. Böylece, DNA fragmentleri ile hibridize olurlar ve bilyelere kovalent olarak bağlanırlar. Bu ürünleri taşıyan manyetik boncuklar daha sonra amplifikasyona katılmamış boncuklardan yağ parçacıkları ve reaktiflerden ayrıştırılarak zenginleştirilir. Bu aşamanın sonunda ortalama olarak her DNA molekülüne bir boncuk üzerinde olacak şekilde işlem yapılır. Boncukların Ion çip üzerinde mikro kuyucuklara yüklenmesi yapılır. Dizileme sırasında kuyucukların her biri uzamanın olduğu DNA zincirine uygun olarak dNTP bağlandığında ortaya salınan proton (H^+) iyonları sinyal dedektörü tarafından algılanarak oluşan pH değişimlerini elektrik sinyallerine dönüştürür. Ortama sıra ile her bir baz için (A, C, G, T) ayrı bir tekrar döngüsü ile işlem sürdürülür. Bu sayede her kuyucuktaki DNA dizisi saptanır (70,71).

Son yıllarda, YND tekniklerinin klinikte kullanımının giderek arttığı görülmektedir. TED/TGD klinik etkilenmiş pediatrik ve yetişkin hastaların moleküler tanısında bir araç olarak daha yaygın olarak kullanılmaktadır (72). YND tekniklerin klinikte kullanıma yönelik diğer bir yaklaşım ise Mendel hastalıklarıyla ilişkisi bilinen genlerin (5000-7000) panel yapılar dizilenmesidir. Genetik hastalıklarla ilişkili olduğu HGMD, OMIM vb. veritabanlarında bildirilmiş bu genlerin kapsanması ile hastalığa neden olan varyantların belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu inceleme, klinik fenotip bulguların varlığında genotip ilişkisinin gösterilmesinde yaygın bir moleküler test olmaya başlamıştır (73).

2.4.3.1. Tüm Ekzom Dizileme Tekniği

Genom ve ekzom dizilemeyi anlamak için anahtar kavram, ~20.000 genin değerlendirmesi olarak lanse edilmiş olsa da gerçekte tüm genler değerlendirilememektedir. Genellikle bu teknolojiler “tüm genom dizileme” veya “tüm ekzom dizileme” olarak tanıtılırlar. "Tüm" kelimesinin kullanılması onları tek gen veya gen paneli testlerinden ayırmaktadır, ancak "tüm" kelimesinin kullanılması, klinisyenleri veya hastaları, mutasyonlara neden olan hastalıkları tespit etmede %100 duyarlı olduğu yanılsamasına yönlendirebilmektedir. DNA'daki tekrarlayan bölgelerin varlığı, çok büyük delesyonların, duplikasyonların okunmasındaki yetersizlik, dizileme kapsamlarının (coverage) %100'den düşük olması gibi nedenlerden dolayı, bu testlerin bilinen genlerdeki ortalama 20 X derinlikteki kapsamı %85-92 olarak bildirilmektedir (74).

İnsan genomunun yaklaşık %1'ini oluşturan yaklaşık 200.000 ekzon (≈ 30 Mbç), proteinlerin kodlamasında görev yapmaktadır. Bu bölgelerin tamamı ekzom olarak ifade edilir. YND tekniklerinden TED tekniği ile yüksek çıktılı paralel DNA dizileme teknolojisi özellikle nadir Mendel hastalıkları ve/veya tek gen hastalıklarının tanısında ve yeni genlerin keşfinde etkili kullanılmaktadır. Patojenik varyantların birçoğunun (>%85) protein kodlayan ekzonlar ve sınırları olan intron bağlanma noktalarında gerçekleştiği bildirilmektedir. Bu durumdan dolayı TED tekniğinin monogenik hastalıkların aydınlatılmasında etkili bir araç olduğu düşünülmektedir (74-76). YND ile yüksek veri eldesinden sonra veri analizinde en büyük zorluk polimorfizmler ile hastalık yapıcı varyantların birbirinden ayrılmasıdır (75). Columbus-Ohio'daki bir çocuk hastanesine 24 ay ardaşık sürede yapılan bir araştırmada, global gelişme geriliği, dismorfik yüz görünümü, müsküler hipotoni gibi bulguları olan çocuklar ve ebeveynlerden oluşmuş 357 hasta örneğinde, moleküler temeli bilinen genlerde yapılan YND analizlerinde, yöntemin tanıya katkısının %32 olduğu ve bu oran içinde otozomal dominant kalıtımın ve taze mutasyonların görüldüğü grubun %46 gibi en yüksek payı aldığı tüm grup içinde ise oranının %15 olduğu tespit edilmiştir (77). Otozomal resesif geçiş gösteren tanı konulamayan metabolik hastalık grubunda ise TED'in tanıya katkısının %65 olduğu saptanmıştır (78).

TED hesaplamaya dayalı çeşitli karmaşık analiz basamaklarından oluşmaktadır;

- okuma çıktısı Raw, ham veri (FASTA/FASTQ), baz çağrılması ve görüntüleme analizleri

- FASTA / FASTQ dosyalarının kalite kontrolü ve veri ön işleme
- Referans genom ile haritalama ve hizalama (SAM [Sequence Alignment Map] / BAM [Binary Alignment Map] dosyaları olarak)
- Verilerin işlenmesi ve varyantların çağırılması (VCF [Variant call format] dosyaları olarak)
- Varyantların tanımlanması - varyant listesi olarak çıktı (dosya genellikle metin veya excel biçiminde referans genomla farklılıklar görülebilir)

Günümüze kadar SEP'in genetik kökenini aydınlatmak amacıyla yürütülen birçok çalışmaya rağmen ilişkili genlerde bildirilen patojenik varyant saptama oranının azlığı halen bu genlerde saptanabilecek SEP ilişkili yeni varyantların ve puberte zamanlamasına etki eden yeni genlerin olasılığına işaret etmektedir. Araştırmamızın, kohortumuzda SEP ilişkili bilinen genlerin incelenmesi, klinik ilişkili varyantların saptanmadığı olgularda TED analizi ile fenotip ilişkili yeni genlerin araştırılmasının pubertede yeni yolların keşfine katkı getirmesi beklendi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

2007-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi (İ.Ü.), İstanbul Tıp Fakültesi (İ.T.F.), Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı (AD), Büyüme-Gelişme ve Pediyatrik Endokrinoloji Bilim Dalı Polikliniği'nden, İ.Ü., İ.T.F., Tıbbi Genetik AD Polikliniği'ne yönlendirilen, çalışmaya katılım için gönüllü onam formunu imzalayan, SEP tanılı farklı ailelerden 18 indeks olgu ve patojenik / olası patojenik varyant saptanan olguların ulaşılabilen ve çalışmaya katılmayı kabul eden 33 aile bireyi projeye dahil edildi. Olgular Tıbbi Genetik AD polikliniğinde klinik genetik olarak muayene edildi. Dismorfik bulgusu olmayan, herhangi bir sendromla ilişkilendirilmeyen olgularda ilk aşamada SEP ile ilişkisi bilinen beş gen Sanger dizi (SD) tekniği ile incelendi. Patojenik / olası patojenik varyant saptanan olgularda doğrulama ve segregasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Herhangi bir patojenik varyant saptanmayan olgulardan SEP patogeneğinde rol oynayan olası diğer genlerdeki değişimlerin araştırılması amacıyla iki indeks olgu ve ailesinde TED analizi planlandı. Birinde etkilenmiş 1. derece kuzen, diğerinde ise etkilenmiş anne ve kız kardeş olmak üzere toplam iki farklı aileden beş bireyde TED tekniğiyle çalışma yapıldı.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından değerlendirildi ve 10.08.18 tarih ve 13 sayı ile onaylandı.

3.1.1. Klinik İncelemeler

Projeye katılan 18 indeks olgunun 16'sı kız ve 2'si erkek cinsiyette, Pediyatrik Endokrinolojide SEP kliniği ile takip edilmekte idi. Olguların fizik muayeneleri ve laboratuvar verileri kayıtlı dosyalarından retrospektif ve prospektif olarak incelendi. Puberte bulguları ve antropometrik ölçümleri (boy, ağırlık) değerlendirildi. Ağırlık, boy, vücut kitle indeksi (VKİ), öngörülen erişkin boy (ÖEB), hedef boy SDS'leri ulusal verilere göre hesaplandı. Kemik yaşı, aynı klinisyen tarafından Bayley-Pinneau yöntemi ile tayin edildi. Başvuru ve izlem sırasındaki antropometrik ölçümleri ve ek klinik bilgiler incelenerek not edildi.

Tıbbi Genetik Polikliniği'ne yönlendirilen olgular, ayrıntılı öykü, klinik genetik muayene, radyolojik ve laboratuvar bulguları ile değerlendirildi ve en az üç kuşak sorgulanarak aile ağaçları çizildi. Projeye katılmaya yazılı onam veren olgu ve ailelerinden DNA izolasyonu için K₃EDTA'lı tüplere 2 ml periferik kan örneği alındı. TED için olgu seçiminde ailede en az 2 ve daha fazla bireyde benzer klinik bulguların olmasına dikkat edildi.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. DNA Eldesi

DNA izolasyonları, steril 2 ml K₃EDTA'lı periferik venöz kan örneklerinden 400 µl kan kullanılarak özgün kit (solüsyon / manyetik boncuk bazlı sistemle) ile firma protokollerine uygun olarak yapıldı (*MagPurix Blood DNA Extraction Kit 200, kat.Op02001-48*).

3.2.2. DNA kalite araştırması

İzolasyon sonrası çalışmaya alınacak DNA örneklerinin konsantrasyonları (ng/µl), kalite değerleri (A_{260/280}) (1,80 - 1,89) spektrofotometre ile ölçülerek kayıt edildi (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific). PZR çalışmasında kullanılacak DNA miktarı reaksiyon başına 50-80 ng/µl'ye ayarlandı. Kalite değerleri spektrofotometrede ölçüldü ve kayıtlar yapıldı.

İndeks olgu ve aile bireylerinin periferik kanından izole edilen DNA konsantrasyon ve NANODROP 2000c cihazı (Thermo Scientific) spektrofotometresindeki diğer ölçüm değerleri **Tablo 2**'deki gibidir.

Tablo 2; İndeks ve çalışmaya katılan aile bireylerinin DNA ölçüm bilgileri.

Aile No SEP#	Olgu no	DNA yoğunluk (ng/µl)	260/280	260/230	µgr
SEP#01	01 - III:4	72,9	1,75	1,73	14,58
	01 – II:4	43,1	1,72	1,60	8,62

	01 – II:5	69,2	1,72	1,68	13,84
SEP#02	02 – III:1	84,8	1,80	1,86	16,96
	02 – II:2	45,9	1,58	1,69	9,18
	02 – II:3	44,6	1,71	1,71	8,92
	02 – III:2	32,4	1,64	1,69	6,48
SEP#03	03 – III:1	70,3	1,77	1,77	14,06
	03 – III:2	54,7	1,78	1,60	10,94
	03 – II:2	56,3	1,74	1,70	11,26
	03 – II:3	109,5	1,83	1,97	21,9
	03 – III:3	111,3	1,83	2,10	22,26
	03 – I:3	50,3	1,75	1,86	10,06
	03 – I:4	68,4	1,80	1,73	12,27
SEP#04	04 – III:1	55,5	1,80	1,62	11,1
	04 – II:3	59,1	1,74	1,70	11,82
	04 – II:4	72,6	1,77	1,80	14,52
	04 – III:2	60,4	1,68	1,64	12,08
	04 – III:3	96,4	1,79	1,95	19,28
	04 – III:4	88,5	1,80	1,93	17,7
SEP#05	05 – IV:1	44,0	1,78	1,55	8,8
	05 – III:3	32,4	1,75	1,55	6,48
SEP#06	06-III:4	74,1	1,80	1,86	14,82
	06 – II:3	74,3	1,84	1,79	14,86
	06 – II:4	103,4	1,79	1,68	20,68
	06 – III:5	126,8	1,84	2,10	25,36
SEP#07	07-III:4	71,9	1,82	1,87	14,38
SEP#08	08-III:2	74,1	1,84	1,69	14,82
	08 – II:3	70	1,82	1,83	14
	08- III:3	47,9	1,78	1,58	9,58
SEP#09	09-IV:1	35,5	1,75	1,68	7,1
	09 – III:2	40,6	1,78	1,59	8,12
SEP#10	10:III:1	54,2	1,75	1,66	10,84
	11-III:1	80,8	1,79	1,91	8,08

SEP#11	11 – II:2	177,3	1,85	1,72	17,73
	11 – II:3	70,4	1,81	1,86	14,08
	11- III:2	80,3	1,74	1,80	8,03
SEP#12	12-II:1	49,4	1,77	1,56	9,88
	12 – II:2	81,6	1,78	1,63	8,16
	12 – II:3	65	1,82	1,70	7,8
	12- III:2	32,9	1,71	1,62	3,9
SEP#13	13 – IV:1	69,5	1,76	1,79	13,9
	13 –III:2	39,7	1,77	1,87	7,94
	13 - IV:2	64,6	1,78	1,96	12,92
SEP#14	14- IV:1	58,8	1,73	1,78	11,76
SEP#15	15-III:1	74,3	1,76	1,50	14,86
	15 – II:1	55,7	1,75	1,85	11,14
	15 – II:2	68,2	1,78	1,70	13,64
	15- III:2	87,3	1,80	1,98	17,46
	15 –II:5	58,8	1,75	1,84	11,76
	15 –II:4	82,5	1,79	1,89	16,5
	15 - II:3	56,5	1,77	1,89	11,3
	15- III:3	58,9	1,75	1,80	11,78
SEP#16	16- III:4	68,8	1,80	1,92	13,76
	16 – II:4	86,7	1,82	1,92	17,34
	16 – II:5	102,6	1,82	2,04	20,52
	16- III:5	81,1	1,81	1,93	16,22
	16 III:3	86,9	1,81	1,91	17,38
SEP#17	17- III:2	67,8	1,74	1,75	13,56
	17 – II:1	73,5	1,79	1,85	14,7
	17 – II:2	94,7	1,79	1,99	18,94
	17 – II:1	74,1	1,76	1,90	14,82
	17 –II:4	82	1,79	1,86	16,4
	18- III:1	87,8	1,80	1,91	17,56
	18 – II:2	120,9	1,81	2,07	24,18
	18 – II:3	92,9	1,82	2,11	18,58

SEP#18	18 – III:2	82,4	1,80	2,12	16,48
	18 – II:6	98,9	1,81	2,07	19,78
	18- III:3	67,8	1,77	1,89	13,56
Novel varyant saptanan SEP#03 ve #04 olgularında RNA izolasyon ölçümleri					
Aile ve olgu No	RNA izolasyon dokusu	RNA yoğunluk (ng/μl)	260/280	260/230	
SEP#03-III:1	Kan	102	1,9	1,7	
	İdrar	6,5	1,1	0,07	
SEP#04-III:1	Kan	37,1	1,78	0,29	

3.2.3. Primerlerin tasarlanması

Sanger dizileme ve TED de saptanan varyantların doğrulanması amacıyla tasarlanan primerler için dikkat edilen hususlar: dbSNP veritabanında daha önceden saptanmış ve sıklığı >%0,1 olan herhangi bir varyant veya tekrarlayan dizi bölgesinde yer almaması ileri, geri primerlerin bağlanma ısılarının birbirlerine yakın olması (en fazla +/- 2-5°C fark), içerdiği A - T ve C - G nükleotidlerinin olduğunca eşit dağılımlı olması, 18-24 nükleotid içermesi ve gen bölgesinde beklenen mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak derinlikteki intronik bölge içinde bulunması. Primer özgünlüğü, UCSC Genome Browser sitesinden (30,79) “*in silico* PZR” interaktif sistemi ile test edilerek değerlendirildi.

Bu tez kapsamında tasarlanan ve kullanılan primer çiftleri **Tablo 3-9**'da gösterilmiştir.

Tablo 3; Tanımlı SEP genleri için tasarlanan primer çiftleri, kapsadığı ekzon bölgeleri ve amplikon boyları

Primer Adı	Ekzon	Primer Dizisi	Amplikon , bç
KISS1-F1	1_UTR	5'-GGC AGG AGG AGA GGC T-3'	

KISS1-R1		5'-GTT CCC TAG GTC CAT CCA-3'	609
KISS1-F2	2	5'-CCT AGC ATG AAT TCA GCT TTA-3'	802
KISS1-R2		5'-GAA CTG GAG ACA GTT CAT TGT-3'	
KISS1-F3	3	5'-CCT ACC CTG TTT GTT TCC T-3'	778
KISS1-R3		5'-GCC TCA TCA GAG CTG CT-3'	
KISS1R-F1	1	5'- CGC TCT CAC TCC GAC CTT -3'	749
KISS1R-R1		5'-CAG GTG CAG GGA CCA CA-3'	
KISS1R-F2	2	5'-CCC TGA GCC ATC CTG CT-3'	468
KISS1R-R2		5'-CCC CTC CAG CTT CTG AG-3'	
KISS1R-F34	3&4	5'-CAC TCC TCC CAG GAC ACT -3'	987
KISS1R-R34		5'- CAC CAG CCG CGA GAC CT -3'	
KISS1R-F5	5	5'-GGT GGG AGG ACA GCA A-3'	770
KISS1R-R5		5'- CTG CAC CGA ACG TCA CA -3'	
DLK1-F1	1	5'-CGT CTA GCC AAG AGT GCA-3'	713
DLK1-R1		5'-CCT CCT TGC TCA GCG CA-3'	
DLK1-F23	2&3	5'-GAA GTG CCT ACT GTG TGC CA-3'	931
DLK1-R23		5'-GTG CAG GAA TGA GGA AGT GA -3'	
DLK1-F4	4	5'-GCT CCC TAA ACC CTC TTA CT-3'	510
DLK1-R4		5'- CGG GAC TTG AGA ACA TCA -3'	
DLK1-F5	5	5'-GTT TTA AGC ACC TGC CCC TT-3'	1015
DLK1-R5		5'-GTC ACA CAG CAG CAC AAA GA-3'	
MKRN3-F1	1	5'-GGC AGA CAA AAG GGG CT-3'	1929
MKRN3-R1		5'-CAA CAG CCC CTG AAA GCA-3'	
MKRN3-R1Seq	1	5'-CTC CAT GCA GAT GCC ACA-3'	1254
MKRN3-F1Seq	1	5'-GTT CCA GGG CAG CCC TA-3'	1005
MKRN3-F2	1	5'-GGA CAA GGT GTG TGG CAT-3'	681
MKRN3-R1Y		5'-GAG TGT CAA CAC AGG GAA-3'	

Tablo 4; *PROKR2* geni primer çiftleri (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı kayıtları).

Primer Adı	Ekzon	Primer Dizisi	Amplikon, bç
PROKR2-F1	1	5'- CTG GTT AGG CAG TGG GTC T -3'	772
PROKR2-R1		5'- GCA ATG TCA GCC TGT CAG A -3'	
PROKR2-F2	2	5'- GCT GGA TAA CAA GTA CAT GAG GA -3'	926
PROKR2-R2		5'- GGA GGC ATG AAC ACA GAT GT -3'	

Tablo 5; *DLK1*- cDNA primer çiftleri

Primer Adı	Ekzon	Primer Dizisi	Amplikon, bç
cDLK-F1	1&5	5'-GCG ACC GAA GCC CTC CT-3'	725
cDLK-R5		5'-CAG GTG AGA CCT GTG AAC T-3'	

Tablo 6; *ANO4* gen varyantı için tasarlanan primer çiftleri (NM_178826.3)

Primer Adı	Ekzon	Primer Dizisi	Amplikon, bç
ANO4-F27	27	5'-CCT GTC CTA TCA TCT TGC AT-3'	449
ANO4-R27		5'-GAT CCC TGT TAC TGC AAC A-3'	

Tablo 7; *CDHR3* gen varyantı için tasarlanan primer çiftleri (NM_152750.5)

Primer Adı	Ekzon	Primer Dizisi	Amplikon, bç
CDHR3-F10	10	5'-GAT CCT GTG CTG TTG AGC AA -3'	443
CDHR3-R10		5'-CCT AGT ATT GCC CAG CAG A-3'	

Tablo 8; *CDHR3* - cDNA primer çiftleri

Primer Adı	Ekzon	Primer Dizisi	Amplikon, bç
c.CDHR3-F7	7&12	5'-GGA TCC TGA TGA TGA AGG TT-3'	7746

c.CDHR3-R12		5'-GCT GGA GTT CTC CTG TCT T-3'	
-------------	--	---------------------------------	--

Tablo 9; *FGFR1* geni primer çiftleri (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Genetik Laboratuvarı Kayıtları) (NM_023110)

Primer	Ekzon	Primer Dizisi	Band
FGFR1-F1	2	5'-CAG CCA GGA CCT ATG ATC T-3'	435
FGFR1-R1		5'-CCT GCA ACC ATA TCA CCT-3'	
FGFR1-F2	3	5'-GCT CAG TAG CCT CCA GTA AGT-3'	592
FGFR1-R2		5'-GTC ACC TCT CTG AGA GCC AA-3'	
FGFR1-F3	4&5	5'-CTA AGG GAG CAG TGG GA-3'	714
FGFR1-R3		5'-GCA TGT AAT CAG GAC TTC CT-3'	
FGFR1-F4	6	5'-CTC TGA TAT GGA GGG CA-3'	311
FGFR1-R4		5'-CCC TAA GAA ACC TGG ACA-3'	
FGFR1-F5	7	5'-CAT CAC TGG GAA AGC CA-3'	398
FGFR1-R5		5'-AGG AAT GAT CCC ATT CGG-3'	
FGFR1-F6	8	5'-GCA AAG AAG ATG TCA GGG A-3'	370
FGFR1-R6		5'-GCT CTC CTG CCT CTG TGT-3'	
FGFR1-F7	9	5'-GCT AGA ACT TGC CAT GGT-3'	414
FGFR1-R7		5'-GGA CAA TGG AGA GGG CA-3'	
FGFR1-F8	10&11&12	5'- GAC ATG TGC CTC TGC CAT T-3'	1294
FGFR1-R8		5'-CCT CTG CCA AAG CAG CCT -3'	
FGFR1-F9	13	5'-CCT AAG AGG AGG CAG GAG A-3'	410
FGFR1-R9		5'-CAA CGC CAC CAC AAG ATG A-3'	
FGFR1-F10	14&15&16	5'-CAG AGC AGT GTG GCA GA-3'	986
FGFR1-R10		5'-CTG TAA GGT CAG GGA CGT-3'	
FGFR1-F11	17&18	5'-GTA AGC CCG AGG AGA TGT-3'	614
FGFR1-R11		5'-GAC AGG GAC GGA CAG GT-3'	

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Her bir PZR reaksiyonu için 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 1X tampon solüsyonu [10X (NH₄)₂SO₄] (Thermo Scientific), %0-10 DMSO (Biomatik

Coorporation), 200 μ M dNTP (Thermo Scientific), 0,2 - 0,5 μ M ileri ve geri primerler (Sentebiolab) ve 0.5 U Taq polimeraz enzimi (Hibrogen) ve 150-200 ng gDNA kullanıldı. Karışım, bidistile su (dH_2O) ile son hacim 25 μ l'ye tamamlanarak hazırlandı. Tüm çalışmalar soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Her PZR çalışmasında amplifiye edilen bölge DNA içermeyen negatif kontrol PZR ile çalışıldı.

PZR; 94°C de 5 dakika (dk) denatürasyon 1 döngü, ardından 94°C de 30 saniye (sn) denatürasyon, primerlerin Temperature of Melting (T_m)'e göre değişen 52°C den 62°C ye kadar ve 30 sn'lik bağlanma ısılarında ve 72°C'de 45 - 90 sn. (1 kb / 1 dk) uzama basamaklarından oluşan toplam 35 (10 + 25) döngü ve son olarak 72°C de 10 dk'luk uzama ile, termal döngü cihazlarında (SimpliAmp [applied biosystems] ve DNA Engine T100 [BIORAD])) gerçekleştirildi.

Amplifikasyonun sonrasında PZR örneklerinden 5 μ l alınarak, 50 bç'lik merdiven markörü (Sigma) paralelinde %1.2'lik agaroz (Sigma) jelde, 1X TBE tamponunda 160 Voltta, 30 dk. yürütüldü, beklenen bç uzunluğuna göre ayrılması sağlandı. Ultraviyole (U.V.) ışık altında elde edilen bantlar görüntülendi ve kayıt edildi.

3.2.5. PZR Ürünü Saflaştırması

Saflaştırma işlemi için Exonuclease - I (Lot:00716871-Thermo Scientific) enzimi ve Rapid Alkaline Fosfataz (04898141001-Roche) enzimleri kullanıldı. Termal döngü cihazlarında PZR protokolü olarak 37 °C'de 30 dk. , 85°C'de 15 dk. ardından + 4°C ye getirildi. Saflaştırılmış ürünler cihazdan alındı ve bir sonraki işlem için + 4°C'de saklandı.

3.3. Genom Analizatöründe Dizi Analizi

Dizi analizi, PZR yöntemi ile amplifiye olan ve ardından saflaştırılan ampliconlar Tıbbi Genetik AD laboratuvarında bulunan ABI3500 otomatik sekiz kapilerli genom analizatörü (Applied Biosystem) cihazında gerçekleştirildi. Analiz sonuçları değerlendirilmesinde UCSC Genome Browser (79), Ensembl Genome Browser (80) vb. çeşitli web sitelerinden yararlanıldı.

3.3.1. DNA Dizi Analizi

Dizi analizi reaksiyonu, saflaştırılan PZR ürünleri ile termal döngü cihazında yapıldı. Çalışmaların tümü soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi.

3.3.1.1. Dizinin PZR Reaksiyonu

5X tampon solüsyonu olan Big Dye buffer (PZR için gerekli kimyasalları bulunur), BigDye v 3.1 (ddNTP leri ve AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir), Primer (PZR da kullanılan primerlerden biri ya da iki çifti ayrı yönlü olarak (dizi okuma kalitesi için seçilir) saflaştırılmış PZR ürünü ve dH₂O ilavesiyle final hacmi 10µl olacak şekilde plak (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate-N8010560) üzerinde bir kuyucuğa bir ürün gelecek şekilde hazırlandı. Karışım termal döngü cihazında yürütüldü. Protokol toplam 25 döngüde; 96°C’de 10 sn. ile denatürasyon, 50°C’de 5 sn. ile bağlanma ve 60°C’de 4 dk. ile sonlanma basamakları ile oluşturuldu. 4°C’ye gelen cihazdan dizi reaksiyon ürünleri alındı.

3.3.1.2. Dizinin PZR Reaksiyon Ürünlerinin Saflaştırılması

BigDye dizi reaksiyonu ürünlerinin temizliği için plak içerisinde ürün başına 1’er µl, 125 mM EDTA, %2’lik glikojen ve 3M sodyum asetat eklendi ve bu karışımın üzerine her bir kuyucuğa 25 µl %100 ethanol ilave edildi. Plak aliminyum koruyucu yapışkan bantla (seal) kapatılarak oda ısısında 15 dakika beklendi. 3810 rpm’de 60 dak. santrifüj yapıldı. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plak ters çevrilerek 1100 rpm’de 30 sn.’ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 20 µl %70’lik ethanol eklendi. Plak koruyucu yapışkan bant ile kapatıldı ve 3460 rpm’de 15 dk. santrifüj edildi. Plak üzerindeki koruyucu yapışkan bant açıldı ve plak ters çevrilerek 1170 rpm’de 60 sn.’ye kısa santrifüj yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl injeksiyon buffer’ı (dH₂O ya da HiDi formamid [Highly Deionized formamid]) eklendi. Örnekler 95°C’de 5 dk. denatüre edildi, 2 dk. soğuk blok üzerinde bekletildi ve ABI3500 (Applied Biosystem) genetik analiz cihazına yükleme için hazırlığa başlandı.

3.3.1.3. Genom Analizatörüne Yükleme

Saflaştırılan örnekler ABI3500 cihazı için uygun olan plak (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate-N8010560) her bir kuyuya bir örnek gelecek şekilde yerleştirildi. Plak santrifüjünde (Biosan LMC3000) 1200 RPM'de 2 dakika çevrildi. Santrifüj bitince, plak ABI3500 cihazına yerleştirilip yürütme işlemi geçildi. Cihaz yürütme işleminde kalibrasyonu yapılmış dizileme boya seti olan Z Dyeset seçildi. Ön yürütme voltajı: 15 kVolts, ön yürütme süresi: 180 sn., yürütme voltajı: 13,4 kVolts, yürütme süresi: 2.520 sn., injeksiyon voltajı: 1,6 kVolts, injeksiyon zamanı: 8 sn. ve veri gecikmesi (data delay): 250 sn.'ye ayarlanarak ürünler yürütüldü.

3.3.1.4. Elektroferogramların Değerlendirilmesi

Kapiller elektroforezi sonucunda alınan ab1 dosyasındaki piklerin rengine göre değerlendirme yapıldı. Elektroferogramda pik rengi, Adenin ise yeşil, Guanin ise siyah, Sitozin ise mavi ve Timin ise kırmızı ile gösterildi. Pikler ABI Sequencing Analysis v5.4 yazılım ve SeqScape v3.0 (ABI) programlarında bilgisayar ortamında analiz edildi ve değerlendirildi.

SeqScape v3.0 programında analiz aşamasına geçmeden önce programa referans dizi yüklendi ve tanıtılan transkriptin ekzon ve intronik bölgeleri program içerisinde gösterildi. Dizileme işleminden sonra Fasta formatına alınan olgu dizisi programa yüklendi ve analiz komutu verildi. Bu işleminden sonra, olgu dizisinin hedef gen bölgesi üzerindeki yeri, dizilendiği primerin yönünün doğruluğu (ileri ya da geri primer veya her ikisi), saflaştırma kalitesi, dizilenen baz sayısı, görüntülenen pik kalitesi, pik yüksekliği ve arka alan kirliliği olup olmadığı kontrol edilerek değerlendirildi. Belirtilen kontrollerden sonra herhangi birinde farklılık var ise çalışma PZR aşaması veya yeterli örnek mevcutsa, dizi saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlandı. SeqScape v3.0 programında analiz aşamasında, elde edilen olgu dizisi ile referans dizi karşılaştırılarak tanımlanmış değişimler *NCBI Entrez SNP* (81), *Ensembl GeneSNPView* (80) ve *HGMD* (82) gibi veri tabanları kullanılarak programda işaretlendi. Daha önce karakterize edilmemiş değişimlerin *in silico* olarak patolojik olup olmadığı, *Mutation Taster* (83) ve

Prediction of functional effects of human nsSNPs (PolyPhen-2) (84) *Protein Variation Effect Analyzer* (PROVEAN) (<http://provean.jcvi.org/>) veri tabanları kullanılarak değerlendirildi. SeqScape v3.0 programında, olguda çalışılan ilgili gen bölgesinin değişimlerinin gösterimini yapan analiz genel dökümü alındı. Varyantların sınıflandırılmasında VarSome veri tabanında interaktif analizlerden yararlanıldı (85). Varyantların sıklıklarının belirlenmesinde GnomAD veri tabanından yararlanıldı (86). Olguda patojenik / olası patojenik varyant saptanmış ise bağımsız örnek çalışması ile doğrulandı. İlişkili olduğu öngörülen varyantlar için aile ağacına göre informatif düşünülen aile bireylerinde segregasyon analizi yapıldı.

3.4. Tüm Ekzom Dizileme (TED) Çalışması

Projemizde iki aileden toplam beş bireyde TED çalışması yapıldı; SEP#11-II:2, III:1, III:2 ve SEP#15-III:1, III:2. Çalışmada Ion AmpliSeq Exome Kit Ion 540 çip (60-80M. reads) kullanılarak kütüphane hazırlandı. Dizileme işlemi Ion GeneStudio S5 platformunda yapılırken, haritalama, kalite analizleri Torrent Server suit™ programında, varyant belirleme, anotasyon ve filtreleme işlemleri ise Ion Reporter programından yararlanılarak gerçekleştirildi.

TED analizi öncesinde teste alınacak olgu örneklerinde DNA yoğunluğu 1,6-2 ng/μl olacak şekilde mili Q (18MΩ) su ile gerekli seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme sonrası, her bir olgunun DNA örnekleri özgün kit kullanılarak (Qubit dsDNA HS Assay Kit) florometrik yöntemle (Qubit Fluorometre) tekrar ölçüldü ve final DNA yoğunluklarının TED için hedef aralıkta (1,6-2 ng/μl) olması sağlanana kadar gerekli işlemler tekrarlandı.

3.4.1. TED için Kütüphane Hazırlığı

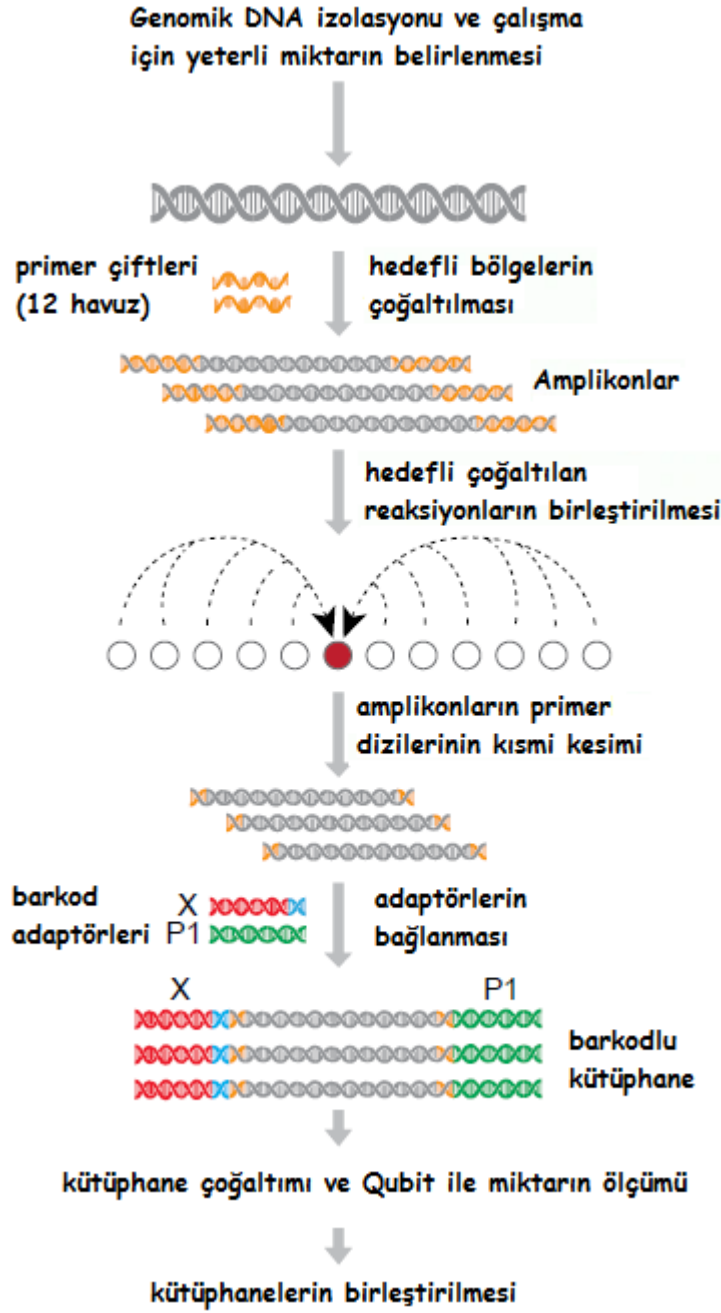
Firma protokollerine uygun şekilde, Ion GeneStudio S5 platformunda YND tekniğiyle genomik DNA'yı dizilemek üzere ekzom kütüphanelerinin hazırlanması amacıyla Ion AmpliSeq Exome RDY Kit 1×8 (kat. No. A35907) kullanıldı. Ion Xpress Barcode Adapters Kit (kat. No. 4471250); 1 - 96 arası tüm adaptör seti ile barkotlu

kütüphane oluşturuldu. Oluşturulan barkotlu kütüphaneler birleştirilerek tek bir Ion Chip'e yüklendi, dizilendi ve veri analizi gerçekleştirildi (**Şekil 41**).



Şekil 41; Ion AmpliSeq™ Exome RDY kit ile ekzom dizileme basamaklarının şematik gösterimi (<http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CSD/Flyers/ion-ampliseq-exome-rdy-flyer.pdf>)

Ion Torrent (*Thermo Fisher Scientific*) platformunda kütüphane oluşturmak için DNA parçalarının ekzonik gen bölgelerini hedefleyen primerler ile multipleks olarak çoğaltıldı. Enzimatik reaksiyonlarla elde edilen fragmanların uçlarının kesilmesi ve adaptörlerin bağlanmasından sonra bu ürünler için emülsiyon temelli polimeraz zincir reaksiyonu (emPZR) metodu kullanıldı. Bu işlem nano boyuttaki küreler etrafında ve mikroyağ reaktörleri içerisinde gerçekleştirildi. Elde edilen ürünler firma protokollerine göre dizilendi ve çıkan veri uygun programlar aracılığıyla analiz edildi. Aşağıdaki basamaklar ile işlemler açıklanmaktadır (**Şekil 42**).



Şekil 42; Ion AmpliSeq için Ekzom RDY iş akış şeması (<https://www.thermofisher.com/>)’dan düzenlenmiştir.

3.4.1.1. Hedef DNA bölgelerinin çoğaltılması aşamaları

Her örnek için **Tablo 10**’daki malzemeler ile stok karışımı hazırlandı.

Tablo 10; Hedef bölgelerin çoğaltılması için hazırlanan karışım

İçerik	Miktar
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	14 µL
50–100 ng gDNA	≤ 56 µL
Nükleazlardan serbest su	70 µL'ye tamamlanır

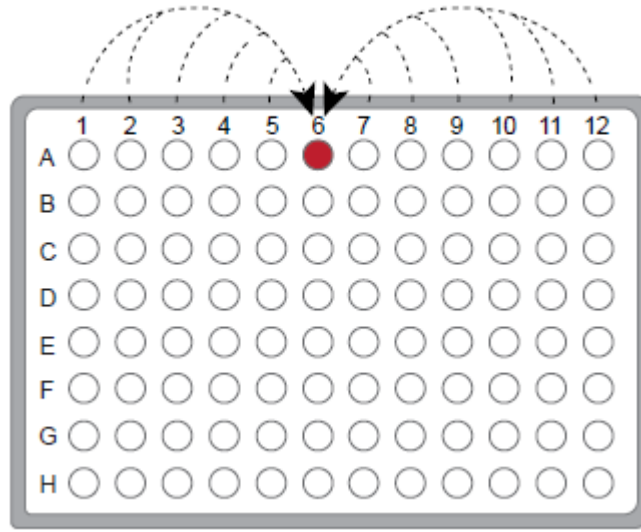
Stok solüsyon karıştırılarak kısa süre santrifüj edildi. Ion AmpliSeq™ Exome RDY plate (plak/plaka/tepsi) çıkartıldı. Her örnek için, stok karışımdan 5 µL alınarak plak üzerinde tek bir yatay satırına sırasıyla (yatayda 12 kuyu) içine dağıtıldı. Bir adet MicroAmp™ şeffaf yapışkan film (seal) ile plakanın üzeri sıkıca kapatılarak sızdırmazlık sağlandı ve ardından plak kısa süreli santrifüj edildi. Termal döngü cihazında **Tablo 11**'de gösterilen koşullar kullanılarak PZR çalışması yapıldı.

Tablo 11; Hedef bölgelerin çoğaltılması için PZR döngü koşulları

Basamak	Adım	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	Enzimi aktivasyonu için	99°C	2 dk
Döngü (10 döngü)	Denatürasyon için	99°C	15 sn
	Bağlanma ve Uzatma için	60°C	16 dk
Bekleme	-	10°C	Bekleme

3.4.1.2. Hedefli çoğaltılan reaksiyonların birleştirilmesi

Damlacıkları plak üzerindeki kuyuların dip tarafına toplamak için plak kısa süreli santrifüj edildi, sonrasında şeffaf yapışkan film çıkarıldı. Plak sırasındaki her bir örnek için 12 hedef amplifikasyon reaksiyonu, 1–5 ve 7–12. kuyularından 6. kuyucuğa aktarılarak birleştirilmesi sağlandı (**Şekil 43**).



Şekil 43; Hedefli çoğaltılan reaksiyonların birleştirilmesi

3.4.1.3. Amplikonların kısmen kesilmesi

Birleştirilmiş her bir hedef amplifikasyon reaksiyonuna 6 μL FuPa Reaktifi eklenerek toplam hacim yaklaşık 60 μL 'ye tamamlandı. Böylece amplikonların primer, adaptör ve barkotlara bağlanmasını sağlamak için uçların kısa kesilmesi ve yapışkan uç (Sticky end) haline gelmesi sağlandı. Plak, MicroAmp™ şeffaf yapışkan film ile kapatıldı, pipetaj ve vorteks ile karıştırıldı, ardından damlacıkları toplamak için kısa süre santrifüj edildi. Termal döngü cihazı koşulları ayarlandı ve enzimatik reaksiyon uygulandı (**Tablo 12**).

Tablo 12; Amplikonların kesilmesi amacıyla uygulanan PZR koşulları

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

3.4.1.4. Adaptörlerin bağlanması, barkodlaması ve saflaştırılma işlemi

Her barkot ve adaptör için seyreltilme, 1:4 olacak şekilde Ion P1 Adaptörü ve Ion Xpress Barkod X karışımı hazırlandı ve bu karışımdan 6 µL ligasyon reaksiyonuna eklendi. (Tablo 13).

Tablo 13; Barkod ve adaptör karışımı için gerekli içerik ve hacimlerini gösteren tablo (x:seçilmiş olan örnek)

İçerik	Hacim
Ion P1 Adaptör	2 µL
Ion Xpress Barcode X [1]	2 µL
Nuclease-free su	4 µL
Toplam	8 µL

Ligasyon (bağlanma) amacıyla plak üzerinde içeriğin toplanması için kısa süre santrifüj edildi ve üzerindeki yapışkan film çıkarıldı. Daha sonra kesilmiş ampliconları içeren her bir kuyuya **Tablo 14**'deki içerikler eklendi.

Tablo 14; Barkod ve adaptör ligasyonu için karışım hazırlama malzemeleri ve hacimlerini gösteren tablo

Malzemeler	Miktar
Switch Solution	12 µL
Ion Xpress Barcode Adapters mix (barkodlu kütüphane)	6 µL
DNA Ligase	6 µL
Total miktar (kesilmiş ~ 60 µL amplicon dahil)	~ 84 µL

Plak üzeri yeni bir MicroAmp şeffaf yapışkan film ile kaplandı ve vorteks yapıldı. Damlacıkların toplanması için kısa süre santrifüj edildi. Plak üzerine MicroAmp Optik Film Sıkıştırma Pedi yerleştirildi ve termal döngü cihazına yüklendi ve ardından aşağıdaki koşullarda PZR reaksiyonu gerçekleştirildi (**Tablo 15**).

Tablo 15; Ligasyon işleminde uygulanan PZR koşullarını gösteren tablo

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

Barkodlanan ürünlerin saflaştırılması için, plak üzerindeki sıkıştırma pedi çıkarıldı ve her kütüphaneye 80 µL (yaklaşık 1X numune hacmi) Agencourt AMPure XP reaktifi eklendi. Boncuk süspansiyonuyla DNA'nın iyice karışması amacıyla pipetaj uygulandı. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plak, bir DynaMag 96 mıknatıs rafa (Kat. No. 12331D) yerleştirildi ve 5 dakika süresince ya da çözelti berraklaşmaya kadar inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde boncuk pellete zarar vermeden süpernatant çekilerek atıldı. %70'lik yeni hazırlanmış etanolden 150 µL eklendi, boncukları yıkamak için plak mıknatıs raf içinde yan yana hareket ettirildi ve 5 dakika/çözelti berraklaşana kadar inkübe edildi. Pellete dikkat edilerek süpernatant atıldı. Boncuklarda etanol kalıntılarını ortadan kaldırmak için plak, mıknatıs rafta inkübe edildi ve oda ısısında beş dakika boyunca hava ile kurutulması sağlandı.

3.4.1.5. Kütüphanenin çoğaltılması ve purifikasyonu

IonAmpliSeq Exome RDY kütüphaneleri, yeterli materyal sağlanması için ilk önce çoğaltılmaktadır. Bunun için Ion AmpliSeq™ kütüphanesini içeren plak mıknatıstan çıkarıldı, her bir boncuk peletine 50 µl 1X Library Amp mix ve 2 µL 25X Library Amp primeri eklendi. Karıştırılma için pipetaj yapıldı, MicroAmp şeffaf yapışkan film ile kapatıldı ve santrifüj edildi. Plak üzerine MicroAmp optik film sıkıştırma pedi yerleştirildi ve **Tablo 16**'da belirtilen program ile PZR yürütülmesi gerçekleştirildi.

Tablo 16; Kütüphane çoğaltımı için PZR protokolünü gösteren tablo

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	98°C	2 dakika

5 döngü	98°C	15 saniye
	64°C	1 dakika
Bekleme	10°C	Bekleme

PZR ile çoğaltılan kütüphanenin saflaştırılması amacıyla, plak kısa süre santrifüj edildi, üzerindeki sıkıştırma yapışkan bant pedi çıkarıldı ve iki aşamalı saflaştırma işlemine başlandı. Agencourt AMPure XP reaktifi oda sıcaklığına getirildi ve kullanmadan önce boncukları dağıtmak için iyice vortekslenerek çözelti dikkatle pipetlendi. Yeni hazırlanmış %70 etanolden 230 µL ile örnek başına 100 µL nükleaz içermeyen su ile birleştirildi. Purifikasyonun ilk aşamasında her bir 50 µL örnek içeren plak kuyucuklarına 25 µL (0.5X örnek hacmi miktarı) oda sıcaklığına getirilmiş Agencourt AMPure XP reaktifi eklendi, boncuk süspansiyonun ve DNA'nın karışması için pipettaj uygulanarak 5 dakika oda ısısında beklendi.

Plak DynaMag 96 mıknatıs rafa yerleştirildi ve çözelti berraklaşana kadar beklendi. Süpernatant yeni bir PZR plağına alındı ve üzerine 60 µL (1.2X orijinal örnek hacmi miktarı) Agencourt™ AMPure XP reaktifi eklenerek pipetaj yapıldı. Oda ısısında beş dakika inkübe edilen plak bir DynaMag 96 mıknatısa yerleştirildi ve çözelti berraklaşana kadar beklendi. Amplikonların bağlı olduğu pellete dikkat edilerek süpernatant çekilerek uzaklaştırıldı. Boncukların yıkanması için her bir kuyucuğa %70 etanolden 150 µL dağıtıldı ve plak mıknatıs raf içinde hareket ettirilerek çözeltinin berrak hale gelmesi beklendi ve süpernatant atılarak uzaklaştırıldı. Plak, mıknatıs rafta bekletildi ve boncuklar oda ısısında 5 dakika bekletilerek kurutuldu. Plak, mıknatıslı raftan alınarak üzerine 50 µL TE eklendi ve karışıma pipet ile karıştırıldı. Plak, şeffaf yapışkan bir film ile kapatıldı, karıştırılarak santrifüj edildi. Daha sonra oda ısısında iki ila üç dakika inkübe edilen plak bir mıknatıslı rafa yerleştirildi. Süpernatant içerisinde bulunan amplikonlar Qubit™ 3.0 fluorometre kullanımı ile kütüphanenin miktar ölçümü ve sulandırma faktörü hesaplandı.

Ekzom kütüphaneleri genellikle 300 - 1500 ng/mL arasında olmaktadır. Çoğaltılmış her kütüphanenin 10 µL'si Qubit dsDNA HS test kiti (Kat. No. Q32851 veya Q32854) ve Qubit™ 3.0 fluorometre (Kat. No. Q33226) kullanımıyla analiz edildi. Çoğaltılmış kütüphanenin konsantrasyonu saptanmasında; Qubit dsDNA HS tampon ile

Qubit dsDNA HS reaktifi kullanılarak 1:200 oranında seyreltmesi yapıldı. 190 µL seyreltilmiş Qubit dsDNA HS reaktifi ile 10 µL amplifiye edilmiş Ion AmpliSeq ekzom kütüphanesi birleştirildi ve karıştırıldı. İki dakika inkübasyon süresi sonrasında Qubit 3.0 fluorometre ile konsantrasyon ölçümü yapıldı. Konsantrasyon değerlerine göre, ~ 22 ng/mL (~ 100 pM) seyreltilme ile kütüphaneleri birleştirme ve taslak (*template*) hazırlığına geçildi.

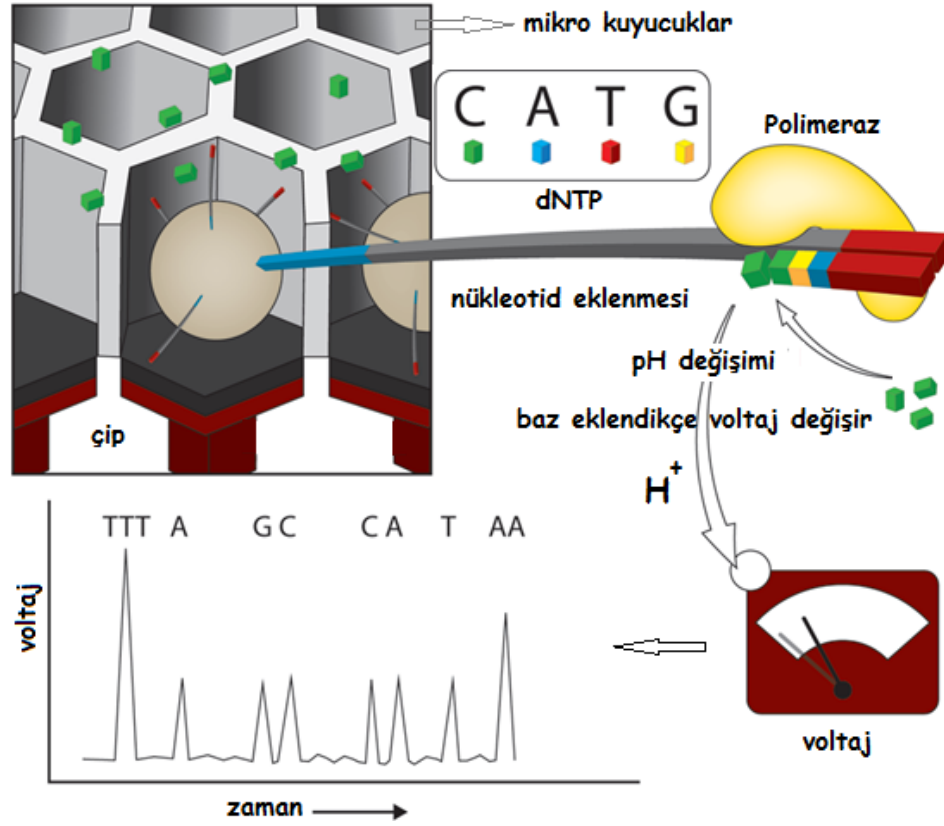
3.4.2. Ion S5 ile taslak oluşturma ve dizileme

Ion GeneStudio S5 (**Şekil 44**) dizileme için taslak oluşturma işleminde emPZR metodu kullanılmaktadır (**Şekil 45**). Bu yöntemde stok kütüphanenin oluşturulmasından sonra barkot ve adaptör bağlanan DNA parçaları, özgün oligoları içeren manyetik özellikteki boncuklar ile yakalanır. Daha sonra yağ süspansiyonu içerisinde karıştırılarak ortalama her bir boncuk için bir mikro kuyu düşecek şekilde düzenlenir. Gerekli reaktifler ve polimerazın bulunduğu yağ damlacıklı mikro kuyucuklar içerisinde PZR işlemi gerçekleşir.

Dizileme işlemi, pH değişimini ölçen iyon sensörüyle kaplı mikro kuyucuklar taşıyan yarı iletken çip ile gerçekleşir. Kalıp DNA ipliği, polimerizasyon için boncuklara bağlanır ve her bir kuyuyu doldurur ardından dNTP'ler sırayla ortama verilerek akış gerçekleşir. dNTP'nin kalıp DNA'daki karşılığı yok ise nükleotid eklenmez ve biyokimyasal reaksiyon ve pH değişimi olmaz. Kalıp ipliğe tamamlayıcı bir nükleotid varlığında ise ipliğe dahil olur ve bu esnada açığa çıkan Hidrojen (H^+) iyonu ortama salınır (**Şekil 46**). Bu iyon, dijital sensörler aracılığıyla algılanır ve pH değerindeki değişimin ölçümü ile çip yardımıyla okuma sağlanarak ham veriye dönüştürülür. Bu işlemde hangi kuyucuklarda hangi dNTP kaç tekrar ile bağlandığı saptanabilmektedir. Ancak bu sistemde 8 tekrardan uzun homopolimer bölgelerin baz sayısı doğru saptanamayabilir. Kalıp DNA'nın karşı ipliği yapılırken eş zamanlı olarak dizileme ile okumalar yapılmaktadır, işlem paralel olarak çevrimiçi yapıldığından doğruluğu ve çıktısı yüksek dizileme gerçekleşir.

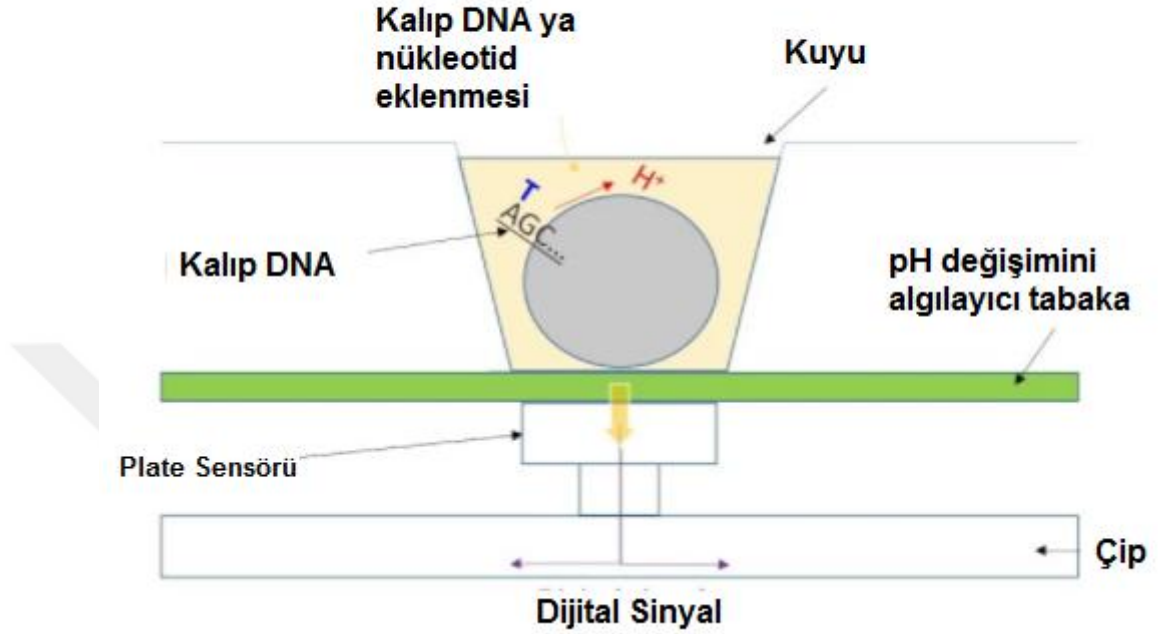


Şekil 44; Ion GeneStudio™
S5(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A27212#/A27212>)



Şekil 45; Escalante, Next generation sequencing technologies'den düzenlenmiştir

ION TORRENT DİZİLEME



Şekil 46; Ion Torrent dizilemede çipe verinin gönderiminin şematize edilmesi (<https://researchcrunch.org/an-in-depth-guide-to-next-generation-sequencing/> den modifiye edilerek düzenlenmiştir.)

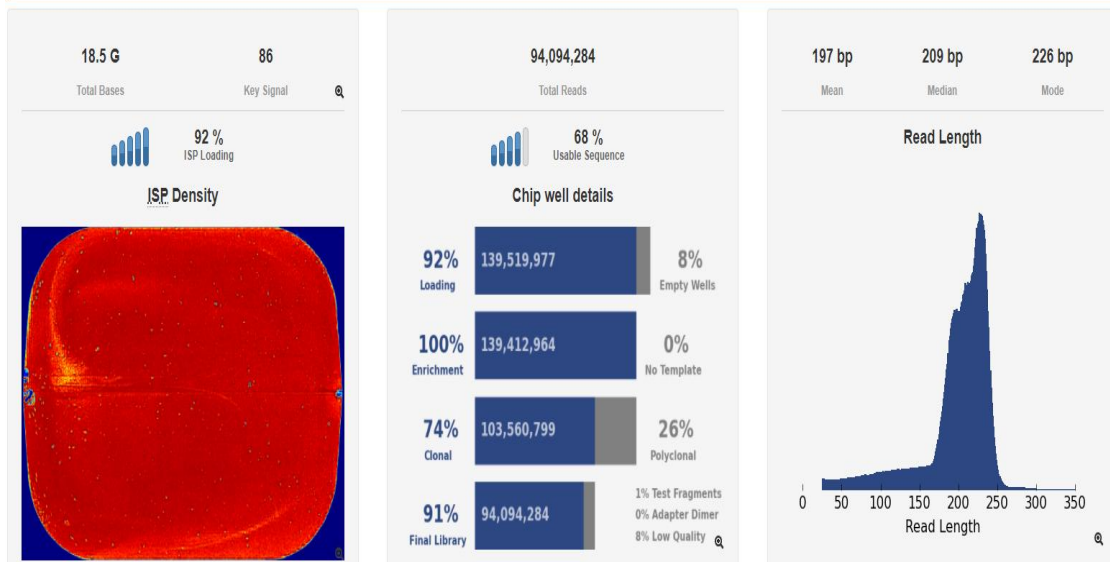
Bu işlemlerin gerçekleştirilmesinde otomatik bir robotik sistem olan Ion Şef / Chef (Kat. No. 4484177) (Şekil 47) kullanıldı. Sistem kullanımı ile verimi yüksek taslak hazırlama ve çip yüklenmesi sağlanmaktadır. Sistemde Ion 540 kit, Chef / Şef (Kat. No. A30011) kullanıldı. 100 pM'a getirilen Ion Ampli Seq Exome RDY Kütüphanesi örnekleri, eşit hacimlerde birleştirildi. Nükleaz içermeyen su ile konsantrasyon 50 – 100 pM olacak şekilde seyreltilerek yükleme yapmadan önce - 20 reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra kütüphane örnekleri Ion 540 Şef Reagents içerisine eklendi. Taslak ve dizileme için gerekli olan materyaller, çözeltiler ve 25 µL seyreltilmiş kütüphane içeren tüpler ile kullanılacak çipler Ion Şef cihazına yüklendi ve dizileme işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 47; Ion Şef / Chef Cihazı
(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4484177#/4484177>)

Torrent Server programı ile dizileme sonunda ortaya çıkan verinin işlenerek bazların isimlendirmesi, haritalanması, varyantların isimlendirmeleri, değerlendirmeleri ve yorumlanmaları gerçekleştirilir (Şekil 48).

Unaligned Reads



Şekil 48; Torrent Server ın üzerinde okuma özetleri ve uzunluk bilgilerinin gösterimi

Belirlenen sinyallerin işlenmesi (baz eklenmesi ile voltaj değişimi) ve bazların isimlendirmesi (hangi kuyularda hangi dNTP'lerin kaç tekrarla bağlandığı) ile oluşan veriler (ionogram), haritalanmamış Binary Alignment Map (BAM) dosyası formatına dönüştürülür. Bu işlemde ham veri kontrol edilir, düşük kalitede okuması olan bazlar ve hatalı diziler 3' uçlardan kırpılır (trimleme işlemi) ve uzaklaştırılır. Geriye kalan diziler yüksek kalitede bazları içermektedir. BAM formatına dönüştükten sonraki adımda elde edilen dizilerin haritalama ve hizalamaları (Torrent Mapping Alignment Program/TMAP) yapılır. Bu işlemde sonra ise referans genoma göre hizalanan haritalanmış ve yerleşimlerin (ortalama baz sayısı, derinlik ve yüzde değerleri) belirlendiği BAM - BAI formatında dizi dosyaları elde edilir. Dizileme sonrasında Torrent Server yazılımına aktarılan verilere ait BAM dosyaları, analiz için Ion Reporter programına aktarılır ve analiz edilebilir. Bu işlemde Torrent Server'a yüklü olan varyant saptama programı ile VCF (Variant Caller Format) uzantılı dosyalar olarak kaydedilir.

Ion Reporter yazılımında olguların analizi tek veya birden fazla olarak gerçekleştirilebilir. Analizin tamamlanması ile tanımlanan varyantlar, görselleştirilme ile analiz sonuçlarında özetlenmektedir. Analiz sonuçları, tablo verileri olarak, grafiklerde, etkileşimli çizelgelerde, çizimlerde veya histogramlarda görsel olarak görüntülenebilir. Yalnızca ilgilenilen verileri içeren sonuçlar görüntülenebilir ve zararsız veya muhtemel patojenik gibi ilgili varyantları sıralanabilir. Ion Reporter Genomic Viewer (IRGV) ve Integrative Genomics Viewer (IGV) gibi programlar ile analiz sonuçları, genomik düzeyde grafiklerde ve tablolarda görüntülenen analizler arasındaki karşılaştırmalar görsel olarak görüntülenebilmektedir (<https://ionreporter.thermofisher.com/ionreporter/help/GUID-77991AF4-FBD3-43D0-AE60-2BB8B420016E.html>).

Biyoinformatik analizleri için Ion reporter v5.12.2.0 programı kullanıldı. Olgularda saptanan değişimler ilk basamakta ekzom filtresi uygulanarak değerlendirildi. SEP sıklığının nadir olması sebebiyle filtrenin içeriğinde Minör Allel Frekansı (MAF) <0.01, yaygın SNP'lerin dışlanması (UCSC Genome Browser, 1000 Genom, vb), varyant tipleri gibi parametreler kullanıldı. Ailelerdeki bireylerde ortak saptanan varyantların özelliklerine göre de (zararlı / olası zararlı / VUS) ayrı filtrelemeler gerçekleştirildi. Çalışmanın içerisinde manuel oluşturulan filtrelerde imprinted gen

listesinde olan genleri içeren, ayrıca erken puberte ile ilişkili daha önce bildirilen bazı genler (10) ile çalışmamızda yer alan aday genlerin içinde olduğu filtreler hazırlandı. İncelenen genlerin tam kapsandığı ve ekzon/intron bağlantı bölgelerinin ± 10 baz içerip içermediği kontrol edildi. PROVEAN, SIFT, PolyPhen-2, *Human Splice Finder*, *MutationTaster* gibi matematiksel hesaplamaya dayalı *in silico* tahmin araçlarındaki "zararlı" etki göstermesi yönünden inceleme yapıldı (**Tablo 21**). Bu çevrimiçi araçlardan sık kullanılan *MutationTaster* ile 3 farklı öngörü gerçekleştirilebilmektedir. İntronik alandaki değişimler veya aa değişimine yol açmayan sinonim/sessiz değişimler, diğer küçük aa dizisinde kompleks değişimlere neden olan varyantlar (genellikle 12 bazla sınırlı insersiyon veya delesyon) patojenite tahmini için kullanılmaktadır (83). PROVEAN ve SIFT benzer algoritmalar ile çalışan, aa değişimlerinin ve insersiyon ya da delesyonların fonksiyonel etkisi için öngörü verir. (87). PolyPhen-2 ise basit fiziksel ve karşılaştırmalı hususları kullanarak bir yanlış anlamlı değişimlerin insan proteininin yapısı ve işlevi üzerindeki olası etkisini tahmin eder. Saptanan varyantın HumVar patojenite skorlaması 0 ila 1 arasında gösterilir, 0 ve yakın değerler zararsız, 1 ve yakın değerler ise zararlı bir değişim olduğu yönünde öngörü vermektedir (84). Projemizde kullanılan diğer bir karşılaştırma ve filtrelemede ise ITF-Tıbbi Genetik AD'daki tüm anonim ekzom verilerinden oluşturulmuş varyant verileri (*in - house data*) kullanıldı. Ensembl veritabanında VEP (Variant Effect Predictor) ile orta ila yüksek görülme ihtimalli varyantlar filtrelendi. Tüm filtreleme işleminden sonra saptanan varyantlar olası okuma hatalarının varlığını dışlamak amacıyla IGV dosyalarıyla değerlendirildi. Yapılan filtrelemelerin sonunda saptanan varyantların analizlerinde, protein düzeydeki etkisine, türler arasındaki korunmuşluğuna, ekspresyon paternine göre ve yollarla etkileşimleri gibi çeşitli parametreler eşliğinde değerlendirildi. HGMD, OMIM, Ensembl, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Genecards, Varsome, ClinVar ve UCSC vb. veri tabanları kullanılarak aday genler incelendi. Varyant çeşitleri dur kodonu, çerçeve kaymasına neden olan insersiyon ve delesyonlar, kırılma hatası ve yanlış anlamlı değişimler olmasına göre ayrı ayrı gruplandı.

Varyant sıklıkları için GnomAD (v2.1.1) veri tabanından yararlanıldı (86). Daha önce klinik ilişkisi bilinmeyen genleri pLI (the probability of being loss-of-function intolerant) puanları, heterozigot fonksiyon kaybı değişimlerine toleransın olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla kullanıldı. Yüksek olasılık sınırı için $pLI \geq 0,9$ alındı (88-90). Varyant seçiminde ayrıca zararlı / olası zararlı / VUS kategorisinde

olmamasına karşın dört *in silico* analizin ikisinde ‘zararlı’ öngörüsü verilen varyantlarda filtrelemeler ile değerlendirmeye dahil edildi. Klinik etkiye neden olduğu düşünülen varyantlar için SD ile doğrulanması ve segregasyon çalışmaları tasarlandı.

Varyant sınıflandırılmasında American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (91)’in varyant değerlendirmelerinde kullandığı 5 kategori dikkate alınarak kullanıldı.

ACMG standartlarına göre varyant etkilerinin belirlenmesinde kullanılan bazı değerlendirme kriterleri aşağıdaki tablolarda (**Tablo 17–21**) açıklanarak sunulmaktadır (91).

Tablo 17; Varyant Puanlama Tablosu (91)

Patojenik (<i>Pathogenic</i>)	i) 1 çok güçlü (PSV1) ve (a) ≥ 1 güçlü (PS1-4) ya da (b) ≥ 2 orta (PM1-6) ya da (c) 1 orta (PM1-6) ve 1 destekleyici (PP1-5) ya da (d) ≥ 2 destekleyici (PP1-5) (ii) ≥ 2 güçlü (PS1-4) ya da (iii) 1 güçlü (PS1-4) ve (a) ≥ 3 orta (PM1-6) ya da (b) 2 orta (PM1-6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-5) ya da (c) 1 orta (PM1-6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-5)
Olası patojenik (<i>Likely pathogenic</i>)	(i) 1 çok güçlü (PSV1) ve 1 orta (PM1-6) ya da (ii) ≥ 1 güçlü (PS1-4) ve 1-2 orta (PM1-6) ya da (iii) 1 güçlü (PS1-4) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-5) ya da (iv) 2 orta (PM1-6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-5) ya da (v) 1 orta (PM1-6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-5)
Zararsız (<i>Benign</i>)	(i) 1 tek başına (BA1) ya da (ii) ≥ 2 güçlü (BS1-4)
Önemi bilinmeyen değişim - (<i>VUS: Variant Uncertain Significance</i>)	(i) Diğer değerlendirmelerin hiçbirine dahil olamayan yada (ii) Zararsız ya da patojenik değerlendirmesi çelişkili
Olası zararsız - (<i>Likely benign</i>)	(i) 1 güçlü (BS1-4) ve 1 destekleyici (BP1-7) ya da (ii) ≥ 2 destekleyici (BP1-7)

Tablo 18; Patojenik olduğu öne sürülen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler

Patojenite Olasılığı	Kategorisi
Çok güçlü	PSV1 null varyant (Anlamsız mutasyon, çerçeve kayması, ± 1 veya 2 kırılma bölgesi, başlangıç kodonu, tek ya da çoklu ekzon delesyonları) hastalıkla ilişkisi mekanizması bilinen bir gende fonksiyon kaybına yol açan değişim.
Güçlü	PS1 Nükleotid değişiminden bağımsız olarak önceden bildirilmiş patojenik varyantla aynı aa değişimi (örneğin aynı kodondaki G>C ya da G>T nin Val >Leu değişimine yol açması) PS2 Aile öyküsü olmayan, hastada saptanılan de novo değişim (hem maternal hem de paternal doğrulanmış) PS3 Genin ya da gen ürününün üzerindeki zararlı etkiyi destekleyen in vitro ya da in vivo fonksiyonel çalışmalar yapılmış olması PS4 Etkilenmiş bireylerdeki varyant prevalansının kontrol gruplarına göre anlamlı derecede fazla olması
Orta	PM1 Mutasyonel hotspot noktada ve/veya kritik ve iyi bilinen fonksiyonel domainde bulunan zararsız olmayan değişim (örneğin bir enzimin aktif bölgesi) PM2 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu, Ekzom Dizileme Projesi gibi büyük çalışmalarda kontrollerde bulunmaması veya resesif durumda frekansı çok düşük olması PM3 Resesif hastalıklarda patojenik bir varyantın trans allelde saptanması PM4 Tekrarlamayan bölgelerdeki çerçeve içindeki delesyon/insersiyon ya da dur kodonu kaybının proteininin uzunluğunda değişimle sonuçlanması PM5 Yeni bir yanlış anlamlı değişimin, daha önce patojenik olduğu tanımlı amino asit rezidüsünde görülmesi PM6 De novo olduğu varsayılan fakat ailede segregasyon çalışması ile doğrulanması yapılmamış değişim
Destekleyici	PP1 Hastalığa neden olduğu kesin bilinen bir gende varyantın birden fazla etkilenmiş aile üyesinde gösterilmesi PP2 Hastalıkla ilişkisi bilinen yanlış anlamlı varyantlar ve düşük orana sahip zararsız yanlış anlamlı varyasyonların olduğu gendeki yanlış anlamlı değişim PP3 Gen ya da gen ürünündeki zararlı etkinin (korunmuşluk, evrimsel, kırılma etkisi vb.) çeşitli istatistiksel hesaplamalar ile desteklenmesine dair bulgular PP4 Hasta fenotipi ya da aile öyküsü yüksek oranda tek bir genetik etiyolojisi olan hastalığa özgüdür. PP5 Laboratuvar ortamında bağımsız olarak patojenitesi kanıtlanmamış ancak saygınlığı bulunan bir kaynakca varyantın patojenik olarak rapor edilmesi

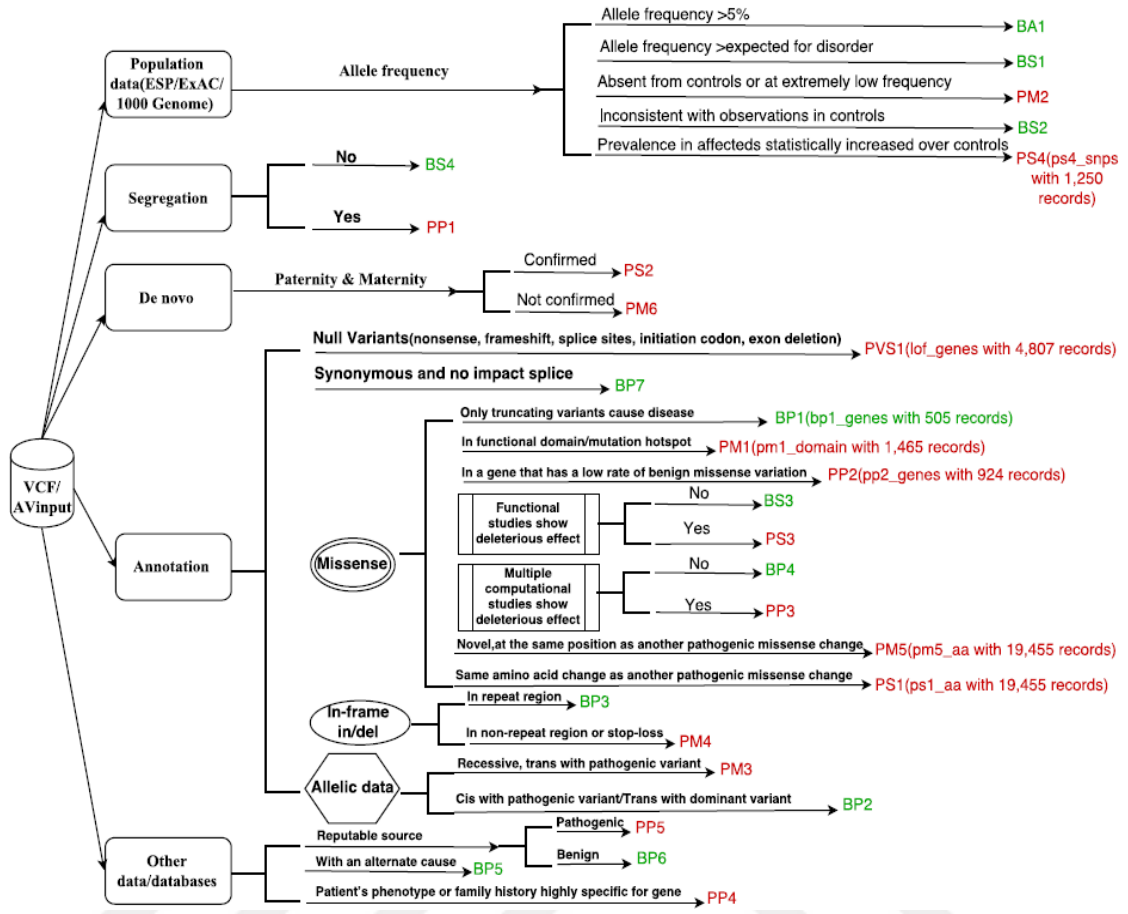
(Kısaltmalar: PSV, pathogenic very strong; PS, pathogenic strong; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting)

Tablo 19; Zararsız tariflenen varyantların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler

Zararsızlık olasılığı	Kategorisi
Tek başına	BA1 1000 Genom Projesi, Ekzom Toplama Konsorsiyumu, Ekzom Dizileme Projesi gibi büyük çalışmalarda allel frekansı >%5 ise
Güçlü	BS1 Allel sıklığının hastalığın görülme sıklığından fazla olması BS2 Sağlıklı bir yetişkin bireyde, erken yaşta tam penetrans beklenen (resesifler için homozigot, dominant için heterozigot ve X'e bağı kalıtım için hemizigot) değişimler BS3 İn vitro ya da in vivo fonksiyonel çalışmalarda protein fonksiyonunda ya da kırılma etkisinde zararlı etkinin bulunmadığının gösterilmesi BS4 Ailenin etkinlenmiş bireylerinde segregasyonun bulunmadığı değişimler
Destekleyici	BP1 Hastalığa yol açan güdük varyantlarla ilişkili olduğu bilinen gendeki yanlış anlamlı varyant BP2 Tam penetrans görülen dominant bir gen / hastalıkta ya da patojenik varyantın trans durumda bulunmaseı yahut herhangi bir kalıtım paterni için ise varyantın cis durumda bulunmasının görülmesi BP3 Fonksiyonu bilinmeyen tekrar bölgelerinde yer alan çerçeve içi delesyon / insersiyon varlığı BP4 Gen veya gen ürünündeki zararlı etkinin olmadığının (korunmuşluk, evrimsel, kırılma etkisi vb.) çeşitli istatistiksel hesaplamalar ile desteklenmesine dair bulgular BP5 Hastalık için alternatif moleküler temeli olan bir vakada bulunan varyant BP6 Laboratuvar ortamında bağımsız olarak kanıtlanmamış ancak saygınlığı bulunan bir kaynakca varyantın zararsız olarak rapor edilmesi BP7 Kırılma hatasına yol açmayan ya da yeni kırılma bölgesi oluşturmayan ve yüksek korunmuş alanda bulunmayan ve sessiz değişimler

(Kısaltmalar: BA, benign alone; BS, benign strong; BP, benign supporting)

Li ve ark., 2017 yılında ACMG ve AMP (Association for Molecular Pathology)'nin 2015 yılında oluşturduğu 28 kriter için, yorumlayıcılar arasındaki farklı değerlendirmeler ve standart algoritmaların olmaması gibi nedenlerden dolayı varyantların yorumlamalarına yardımcı olmak amacıyla önerilerde bulunmuşlardır (92) (Şekil 49).



Şekil 49; 2015 yılı ACMG-AMP yönergelerinden 28 kriterin gösterimi. Bazı kriterler için, veri tabanının adı ve boyutu parantez içinde belirtilmiştir (Li 2017).

Tablo 20; Hastalıkların araştırılmasında kullanılan veri tabanları

Hastalıklar özgü kullanılan veri tabanları	
ClinVar https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	İnsan varyasyonlarının klinik önemi ve fenotip ilişkisi hakkında bilgi sağlayan bir veri tabanıdır.
OMIM https://omim.org/	Hastalıkla ilişkili genetik varyantları, insan genleri ve genetik koşullarını içeren bir veri tabanıdır.
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php	Literatürde yayınlanmış varyantlar hakkında bilgiler içerir. İçeriğin çoğuna erişmek için ücrete dayalı abonelik gerektirir.
Human Genome Variation Society https://www.hgvs.org/	Toplum, nüfus dağılımı ve fenotipik ilişkiler de dahil olmak üzere genomik varyasyon bilgilerine ücretsiz ulaşımın sağlanmasının, metodoloji ve enformatik gelişimin teşvik edilmesini amaçlayan bir kuruluştur.

Sequence Variant Nomenclature https://varnomen.hgvs.org/	Bu site moleküler varyantların isimlendirmelerinin standardize edilmesi için açıklamalar ve öneriler sunar.
DECIPHER https://decipher.sanger.ac.uk/	Ensembl genom tarayıcısını kullanarak genomik mikroarray verilerini klinisyenler ve araştırmacılar için fenotiple ilişkilendiren moleküler sitogenetik veri tabanıdır.

Tablo 21; Bu tez kapsamında yararlanılan bazı veri tabanları ve çevrimiçi bağlantıları

PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Gene Expression Atlas	https://www.ebi.ac.uk/gxa/home
The Human Protein Atlas	https://www.proteinatlas.org/
KEGG Pathway	https://www.genome.jp/kegg/pathway.html
Mouse Genome Informatics	http://www.informatics.jax.org/
PolyPhen-2	http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2
Mutation Taster	http://www.mutationtaster.org/
wInterVar	http://www.wintervar.wglab.org/
PROVEAN	http://www.provean.jcvi.org/index.php
UniProt	https://www.uniprot.org/
The Human Splicing Finder	http://www.umd.be/Redirect.html

Çalışmamızda filtrelenen imprinted gen listesi **Tablo 22**'de gösterilmiştir. (<https://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Homo+sapiens.imprinted-All>), Hipofiz bezi ile ilişkili olduğu bilinen ve filtreleme aşamasında kullanılan genler ise **Tablo 23**'de gösterilmiştir.

Tablo 22; Veri filtrelemede kullanılan imprinted genlerin isimleri, kromozomal lokasyonları ve anlatım yapılan parental alleli (93,94)

Gen	Kromozomal lokasyon	Eksprese olduğu allel
<i>DIRAS3</i>	1p31 AS	Paternal
<i>RNU5D-1</i>	1p34.1 AS	Paternal
<i>TP73</i>	1p36.3	Maternal
<i>LRRTM1</i>	2p12 AS	Paternal
<i>GPR1</i>	2q33.3 AS	Paternal
<i>ZDBF2</i>	2q33.3	Paternal

Gen	Kromozomal lokasyon	Eksprese olduğu allel
<i>IGF2</i>	11p15.5 AS	Paternal
<i>ANO1</i>	11q13.3	Maternal
<i>ZC3H12C</i>	11q22.3	Paternal
<i>NTM</i>	11q25	Maternal
<i>RBP5</i>	12p13.31 AS	Maternal
<i>LRP1</i>	12q13.3	Maternal

<i>NAP1L5</i>	4q22.1 AS	Paternal
<i>ERAP2</i>	5q15	Paternal
<i>VTRNA2-1</i>	5q31.1 AS	Paternal
<i>TNDM</i>	6	Paternal
<i>ADTRP</i>	6p24.1 AS	Maternal
<i>FAM50B</i>	6p25.2	Paternal
<i>LIN28B</i>	6q21	Paternal
<i>AIM1</i>	6q21	Paternal
<i>PLAGL1</i>	6q24-q25 AS	Paternal
<i>HYMAI</i>	6q24.2 AS	Paternal
<i>SLC22A2*</i>	6q26 AS	Maternal
<i>SLC22A3*</i>	6q26-q27	Maternal
<i>GRB10</i>	7p12-p11.2 AS	İzoforma bağlı
<i>DDC</i>	7p12.2 AS	İzoforma bağlı
<i>PEG10</i>	7q21	Paternal
<i>MAGI2</i>	7q21 AS	Maternal
<i>SGCE</i>	7q21-q22 AS	Paternal
<i>PPP1R9A</i>	7q21.3	Maternal
<i>TFPI2</i>	7q22 AS	Maternal
<i>DLX5</i>	7q22 AS	Maternal
<i>MEST</i>	7q32	Paternal
<i>CPA4</i>	7q32	Maternal
<i>COPG2IT1</i>	7q32	Paternal
<i>MESTIT1</i>	7q32.2 AS	Paternal
<i>KLF14</i>	7q32.3 AS	Maternal
<i>DLGAP2</i>	8p23	Paternal
<i>KCNK9</i>	8q24.3 AS	Maternal
<i>ZFAT-AS1</i>	8q24.22	Paternal
<i>PEG13</i>	8q24.22	Paternal
<i>ZFAT</i>	8q24.22 AS	Paternal
<i>GLIS3</i>	9p24.2 AS	Paternal
<i>INPP5F V2</i>	10q26.11	Paternal
<i>WT1-AS</i>	11p13	Paternal
<i>WT1</i>	11p13 AS	Paternal
<i>KCNQ1OT1</i>	11p15	Paternal
<i>OSBPL5</i>	11p15.4 AS	Maternal
<i>KCNQ1DN</i>	11p15.4	Maternal
<i>KCNQ1</i>	11p15.5	Maternal
<i>H19</i>	11p15.5 AS	Maternal
<i>CDKN1C</i>	11p15.5 AS	Maternal
<i>PHLDA2</i>	11p15.5 AS	Maternal
<i>IGF2AS</i>	11p15.5	Paternal
<i>SLC22A18</i>	11p15.5	Maternal
<i>INS</i>	11p15.5 AS	Paternal

<i>ATP5F1EP2</i>	13q12.2	Maternal
<i>RB1</i>	13q14.2	Maternal
<i>SMOC1</i>	14q24.2	Maternal
<i>DLK1</i>	14q32	Paternal
<i>MEG3</i>	14q32	Maternal
<i>RTL1</i>	14q32.31 AS	Paternal
<i>SNORD114-1</i>	14q32.31	Maternal
<i>MEG8</i>	14q32.31	Maternal
<i>SNORD113-1</i>	14q32.31	Maternal
<i>MAGEL2</i>	15q11-q12 AS	Paternal
<i>MKRN3</i>	15q11-q13	Paternal
<i>UBE3A</i>	15q11-q13 AS	Maternal
<i>NPAP1</i>	15q11-q13	Paternal
<i>SNORD109A</i>	15q11.2	Paternal
<i>SNORD108</i>	15q11.2	Paternal
<i>SNORD107</i>	15q11.2	Paternal
<i>SNORD109B</i>	15q11.2	Paternal
<i>ATP10A</i>	15q11.2 AS	Maternal
<i>SNRPN</i>	15q11.2	Paternal
<i>SNORD116@</i>	15q11.2	Paternal
<i>SNORD115-48</i>	15q11.2	Paternal
<i>SNORD115@</i>	15q11.2	Paternal
<i>PWCR1</i>	15q11.2	Paternal
<i>NDN</i>	15q11.2-q12 AS	Paternal
<i>SNURF</i>	15q12	Paternal
<i>SNORD64</i>	15q12	Paternal
<i>IRAIN</i>	15q26.3 AS	Paternal
<i>ZNF597</i>	16p13.3 AS	Maternal
<i>NAA60</i>	16p13.3	Maternal
<i>DGCR6L</i>	22q11.21 AS	Paternal
<i>TCEB3C</i>	18q21.1 AS	Maternal
<i>DNMT1</i>	19p13.2 AS	Paternal
<i>ZIM2</i>	19q13.4 AS	Paternal
<i>PEG3</i>	19q13.4 AS	Paternal
<i>MIMT1</i>	19q13.4	Paternal
<i>NLRP2</i>	19q13.42	Maternal
<i>MIR371A</i>	19q13.42	Paternal
<i>PSIMCT-1</i>	20q11.2	Paternal
<i>BLCAP</i>	20q11.2-q12 AS	İzoforma bağlı
<i>NNAT</i>	20q11.2-q12	Paternal
<i>MCTS2</i>	20q11.21	Paternal
<i>GDAP1L1</i>	20q12	Paternal
<i>SGK2</i>	20q13.2	Paternal
<i>GNAS</i>	20q13.3	İzoforma bağlı

<i>MIR298</i>	20q13.32 AS	Paternal
<i>MIR296</i>	20q13.32 AS	Paternal
<i>DGCR6</i>	22q11.21	Paternal
<i>DGCR6L</i>	22q11.21 AS	Paternal

<i>L3MBTL</i>	20q13.12	Paternal
<i>SANG</i>	20q13.32	Paternal
<i>GNASAS</i>	20q13.32 AS	Paternal

Tablo 23; Veri filtrelemede kullanılan hipofiz bezi ilişkili genlerin listesi.

Gen	
<i>ADCYAP1</i>	<i>MYO15A</i>
<i>ARHGAP36</i>	<i>NEUROD4,</i>
<i>AVPR1B</i>	<i>NPHP1</i>
<i>CCDC66</i>	<i>NPTX2</i>
<i>CGA</i>	<i>NPW</i>
<i>CHGB</i>	<i>PCSK1N</i>
<i>CHST14</i>	<i>PEX5L</i>
<i>CHST8</i>	<i>POMC</i>
<i>CNR1</i>	<i>POU1F1</i>
<i>COL22A1</i>	<i>PRL</i>
<i>CRHR1</i>	<i>PRLHR</i>
<i>CSH2</i>	<i>PROP1</i>
<i>CSH1</i>	<i>PTN</i>
<i>CSHL1</i>	<i>PTPRN</i>
<i>DLK1</i>	<i>QPCT</i>
<i>FBXO16</i>	<i>PTPRN2</i>
<i>FSHB</i>	<i>SCG2</i>
<i>FST</i>	<i>SCG5</i>
<i>GATA2</i>	<i>SIX6</i>
<i>GH1</i>	<i>TBX19</i>
<i>GH2</i>	<i>TGFBR3</i>
<i>GNRHR</i>	<i>TRHR</i>
<i>GPR50</i>	<i>TSHB</i>
<i>IGSF1</i>	<i>VGF</i>
<i>LHB</i>	<i>WDR19</i>
<i>MIA</i>	<i>ZBTB8B</i>
<i>MTHFR</i>	

3.5. TED ile saptanan varyantların SD ile doğrulanması ve segregasyon çalışmaları

Olgularda saptanan varyantların doğrulanması amacıyla ve aile içi segregasyon çalışmalarında kullanılmak üzere primerler (başlık 3.2.4'e göre) tasarlandı. SD yöntemi ile çalışma gerçekleştirilerek sonuçlar YND ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı ve değerlendirildi.

3.6. Periferik kan örneğinden RNA izolasyonu ve cDNA Sentezi

Kırılma hatasına ya da çerçeve kaymasına yol açması öngörülen varyantların, mRNA düzeyinde etkisi veya alternatif transkripti göstermek amacıyla kandan veya idrar örneklerinde hücre izolasyonu, total RNA izolasyonu ve “random” heksamer primerleri kullanılarak reverse transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi yapıldı. Bu aşamadan önce ise başlık 3.2.3'de belirtilen primer tasarımları gerçekleştirildi. RNA izolasyonu üretici firma protokolüne uygun olarak QIAamp RNA Blood Mini kit RNA izolasyonu kiti, RNA pürifikasyonu esnasındaki DNA yıkımı için QIA RNase-Free DNase seti kullanıldı. cDNA sentezi, firma protokolüne (Revert Aid First Strand, K 1621 Fermentas) uygun olarak gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar spesifik bölgeler için tasarlanan primerler ile uygun PZR koşulunda çalışıldı.

3.7. Proteinin üç boyutlu modellemesi

I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) *in silico* tahmin programı kullanımı ile protein üç boyutlu yapısının beş farklı modellemesi gerçekleştirildi. Seçilen proteinin normal aa dizisi ile, zararlı etkiye yol açması beklenen mutant proteinin aa dizisinin üç boyutlu modellemesi ayrı ayrı değerlendirildi. Modellerin seçiminde, B faktör değeri göz önüne alındı. Bu değer aminoasitlerin / atomların tahmini termal hareketin (*mobility*) değerini gösterir, değerin negatif olması modelin kararlılığını arttırmaktadır. Ayrıca önerilen farklı puanlama sistemi (-5 ila +2 arasında) ile modellerin arasından en yüksek puan verilen proteinin modelin seçimi sağlandı. 2'ye yakın puan daha güvenilir modele işaret eder. Proteinlerin öngörülen ikincil yapılarında incelendi, 0-9 ortalama puan arasında yüksek puanlı model güvenilir

kabul edildi (31). Seçilen modelin grafik görüntülemesi ise *The Pymol* programı ile sağlanmıştır (95). Proteinin kendisi veya hedef bölgesi üzerinde detaylı görüntüleme ve grafiksel renklendirme gibi görsel değişikliklerin vurgulanması sağlandı.



4. BULGULAR

Bu projede SEP tanısı ile takip edilen 16 kız ve 2 erkek olgu ile 33 aile üyesi olmak üzere toplam 51 bireyde moleküler genetik inceleme yapıldı. Tez kapsamında değerlendirilen 18 olgunun 3'ünün ebeveynleri arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu.

4.1. Endokrin Bulgular

İndeks olguların başvuru yaş ortalaması kızlarda 7,5 (alt-üst sınır; 1,3-9,2), erkeklerde ise 5,6 ve 6,7 (SEP-07 ve SEP-08) idi. On altı olgu SEP, iki olgu (1K;SEP-16, 1E;SEP-08) diğer endokrinolojik sorunlar nedeniyle başvurmuştu. SEP-16'nın 1.7 yıl, SEP-08'in 3.2 yıl izlem sonrası pubertesi başlamıştı. Kızlarda puberte başlama yaşı 7,3 yıl (alt-üst sınır; 6,38- 7,58), erkeklerde ise 6,7 ve 8,8 yıl idi. Olguların doğum haftası ortalaması 39 hafta (alt-üst sınır; 35-42) olup, doğum ağırlığı SDS'si -0,6 (alt-üst sınır; -1,3-0,9) idi. Başvuru sırasında; olguların boy SDS'si +0,3 (alt-üst sınır; -1,2-2,6), vücut kitle indeksi (VKİ) SDS'si -0,5 (alt-üst sınır; -1,1-3,2) idi. Kemik yaşı 8,8 yıl (alt-üst sınır; 7,8-10,5) olup, kronolojik yaş-kemik yaşı farkı 3 yıl (alt-üst sınır; 1,6-4,9) idi. Kızlarda ÖEB 156,7 cm (147-171,6), erkeklerde 167.9 ve 181.7 cm iken, kızlarda hedef boy SDS'si -0,7 (alt-üst sınır; -2,18 ve -0,1), erkeklerde -0,7 ve 0,32 idi. Tüm olguların kraniyal-hipofiz MRI'si normaldi. On beş olguya GnRH analog tedavisi başlanmıştı; tedavi başlama yaşı kızlarda 8,9 yıl (alt-üst sınır; 7,2-9,8), erkeklerde 6,8 ve 9,7 yıl idi. Tedavi kesilme yaşı kızlarda 11,2 yıl (alt-üst sınır; 10,8-12,6); erkeklerde 11,5 yıl (alt-üst sınır; 10,2-12,8) idi.

Çalışmaya onam vererek katılan olguların endokrin bulguları ile klinik ve hormonal bazı özellikleri aile ağacı ve moleküler sonuç verileri ile birlikte sunulmaktadır. Ayrıca toplu olarak **Tablo 24-26'**de gösterilmiştir.

Tablo 24; Olguların demografik özellikleri

Olgu no (SEP#)	Cinsiyet	PBY (yıl)	Tanner Evre	Başvuru şikayeti	Hedef Boy (cm)	Anne boy (cm)	Baba boy (cm)	Anne menarş yaşı (yıl)
----------------	----------	-----------	-------------	------------------	----------------	---------------	---------------	------------------------

01	K	7,50	2	MB, KK	161,0	158,5	173	12
02	K	6,78	2	GT	162,5	161,8	176,2	13
03	K	7,00	4	MB, KK	160	161,1	171	12
04	K	7,00	4	MB, KK	162,3	154,1	183,5	12
05	K	7,50	3	MB, KK, KA	161,6	159,3	177	12
06	K	7,00	3	MB	158,4	171,6	172	9
07	E	8,84	2	Tip1 DM	178,8	161,7	183	14
08	E	6,72	2	GT, KK	171,5	164,1	166	15
09	K	7,50	2	MB, GT	160,9	163	171,9	14
10	K	7,50	2	MB,GT	148,9	151,8	159	9,5
11	K	6,38	2	MB	158,7	152,5	178	11
12	K	7,50	2	MB	160,5	157,5	165	12,5
13	K	7,50	2	MB, GT	158,5	153,3	174,7	12
14	K	7,22	2	MB	159,7	158,5	172	12
15	K	7,14	2	MB	154,2	156,5	164,9	12
16	K	7,58	1	Hipotroidi	155	155	168	12,5
17	K	7,33	2	MB	154,5	155	167	12
18	K	6,50	4	MB	158	156,1	173	14

PBY: Puberte başlangıç yaşı, MB:Memede büyüme, KK:Koltuk altında kıllanma, GT: Genital bölgede tüylenme, KA:kilo alımı, DM: diabetes mellitus

Tablo 25; Olguların başvuru sırasındaki antropometrik ölçümleri ve klinik özellikleri

Olgu no	Yaş (yıl)	Boy SDS	Ağırlık SDS	VKİ SDS	Pubik evre	Aksilller evre	Tedavi başlama yaşı(yıl)	Tedavi kesilme yaşı(yıl)
01	9,17	0,2	2,20	2,40	2	1	-	-

02	6,78	-0,4	0,01	0,31	2	1	9,62	12,6
03	7,43	2,5	2,19	1,41	2	2	7,43	Devam
04	8,41	1,82	0,84	0,08	3	3	8,65	10,8
05	9,04	0,29	0,44	0,47	2	1/1	9,2	10,8
06	7,54	1,95	2,50	1,97	1/2	1/1	9,78	Devam
07	5,64	0,53	0,93	0,88	2	2	9,72	10,2
08	6,72	2,6	3,70	3,20	2	2	6,77	12,8
09	8,80	0,3	0,40	0,40	2	1	-	-
10	8,35	0,18	0,06	0,03	3	1/1	8,85	Devam
11	1,28	-0,52	-1,00	-1,05	1/1	1	8,91	11,1
12	7,67	0,54	0,97	0,90	1/1	1	8,99	Devam
13	8,39	0,3	1,30	1,40	2	1	8,66	11,0
14	7,3	0,4	0,9	0,8	1/2	1	-	-
15	6,01	0,43	0,93	0,95	1	1	7,24	12,1
16	5,93	-1,2	-0,57	0,19	1	1	8,87	11,9
17	7,33	-0,4	1,01	1,50	1	1	8,18	11,2
18	7,21	0,3	0,40	0,30	3/4	1	8,43	11,6

VKI:Vücut kitle indeksi

Tablo 26; Olguların tanı sırasındaki laboratuvar bulguları

Olgu No/ (♀)/(♂)	LH (IU/L) <0,02-0,3 (♀) <0,02-0,5 (♂)	FSH (IU/L) <0,6-4,1 (♀) <1,5 (♂)	E2 – pg/ml 10<(♀,♂) T -ng/ml <0,07-0,2 (♀,♂)	GNRH testi				
				Bazal LH (IU/L)	Bazal FSH (IU/L)	E2-T pg/ml- ng/ml	pik LH (IU/L)	pik FSH (IU/L)
01/(♀)	-	-	-	0,1	2,7	6,7	2,2	16,6
02/(♀)	0,10	1,30	19,10	-	-	-	-	-
03/(♀)	0,55	1,25	5,00	0,03	1,4	15,0	3,3	12,8
04/(♀)	1,59	6,57	76,00	5,9	7,5	56,0	37,8	19,2
05/(♀)	1,99	4,20	6,64	2,73	6,9	83,1	34,2	16,9
06/(♀)	0,13	2,66	9,50	2,64	1	5,0	8,0	13,5
07/(♂)	2,17	0,93	0,32	-	-	-	-	-
08/(♂)	0,10	0,54	0,20	0,1	1,6	0,2	5,5	5,2
09/(♀)	0,80	4,00	40,40	-	-	-	-	-
10/(♀)	0,10	1,19	13,76	0,73	4,0	47,4	6,2	10,8
11/(♀)	0,30	6,70	8,30	0,5	2,6	5,0	9,6	21,0
12/(♀)	-	-	-	-	-	8,3	6,6	8,0
13/(♀)	-	-	-	0,7	1,3	50,3	12,4	10,0
14/(♀)	-	-	-	0,72	3,8	35	10	12
15/(♀)	0,60	1,30	15,50	-	-	-	-	-
16/(♀)	0,20	4,00	39,70	0,1	1,9	5,0	5,0	12,0
17/(♀)	0,10	1,20	5,00	0,1	1,9	5,0	6,2	15,4
18/(♀)	0,40	3,10	10,00	0,2	7,8	2,6	15,1	11,0

4.2. Moleküler Genetik Analiz Bulguları

Genetik analizlerde SEP ilişkisi bilinen genlerde SD ile olgular tarandı. *DLK1* geninde, iki farklı olguda (SEP#04, #03) iki farklı tanımlanmamış heterozigot varyant saptandı. Birinci varyant intron 1'de c.67+78C>T, ikinci varyant ise ekzon 4'de c.357C>G (p.(Tyr119Ter)) idi. Aile segregasyon çalışmasında her iki varyantın da paternal kökenli olduğu belirlendi.

MKRN3 geninde bir olguda (SEP#18) c.982C>T (p.(Arg328Cys)) saptandı. Aile segregasyon çalışmasında varyantın paternal kökenli olduğu gösterildi.

Bununla beraber olgu grubumuzdan iki indekste (SEP#06 ve SEP#17) *KISS1R* geninde iki farklı varyant belirlendi. İlk varyant SEP#06 ailesinde saptanan c.565G>A (p.(Ala189Thr)) değişimi idi. *KISS1R* geninde saptanan diğer bir değişim ise literatürde GnRH eksikliği ile ilişkilendirilmiş c.1167C>A (p.(Cys389Ter)) idi.

Çalışmamızda, Sanger analizlerinde mutasyon saptanmayan olgulardan ileri çalışmaya onam veren (SEP#11) kodlu olgu ve etkilenmiş 2 aile bireyi (anne ve kızkardeş) ile (SEP#15) kodlu olgu ve 1 aile bireyinde (kuzen) Tüm Ekzom Dizileme (TED) çalışması yapıldı. IonReporter v5.16 programı ile filtreleme ile değerlendirildi. Filtrelenen varyantlar, Mendel kalıtım modeli ile uyumlu genler (GAD: Gene associated with Mendelian Disorders) üzerinde, ACMG kriterlerine göre, tıbbi öykü, OMIM bilgileri, klinik bulgular, ClinVar verileri ve İnsan Mutasyon veri bankasında gösterilen transkript varyantları gözetilerek gerçekleştirildi. Belirlenen varyantların tekrar *in silico* analizlerle detaylı değerlendirilmeleri gerçekleştirildi.

Bugüne kadar literatürde puberte ilişkisi bildirilmiş genler (41 gen/HGMD) ve literatürden derlenen muhtemel ilişkili (101 gen) genleri içeren filtre, HHG aksında protein atlas veritabanından yararlanarak hipofiz bezi ilişkili genleri (52 gen, <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/pituitary+gland>) içeren filtre, SEP olgularında mutasyon bildirilen iki imprinted genin (*DLK1* ve *MKRN3*) varlığından dolayı imprinted genleri (102 gen, <https://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Homo+sapiens.imprinted-All>) içeren filtre de uygulandı.

Bununla birlikte saptanan varyantlarda (dur kodonu, yanlış anlamlı, çerçeve kayması ve kırılma hatası) türler arasındaki korunmuşluk ve protein üzerine etkisi vb. özellikler dikkate alınarak değerlendirildi, dbSNP'de önceden tanımlanmış, MAF'ı

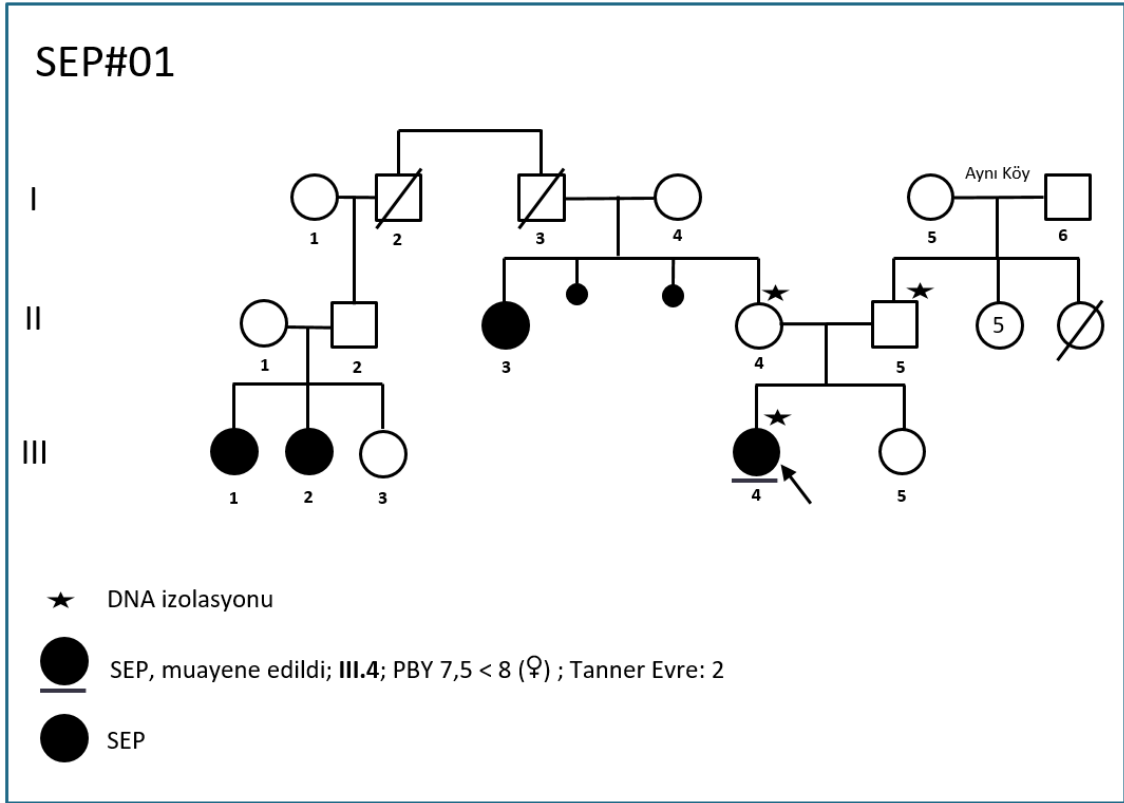
yüksek ($>0,01$) olan varyantlar ve 'in house' verimizde sıklığı yüksek varyantlar karşılaştırılarak elendi. Geriye kalan varyantlarla ilişkili aday genler HGMD, OMIM, NCBI vb. veritabları yardımıyla hastalık ilişkisi açısından incelendi. ACMG kriterlerine göre, saptanan önemi bilinmeyen, olası patojenik ve patojenik varyantların doğrulanması ve seçilen genlerde segregasyon analizleri özgün primerler tasarlanarak, SD yöntemiyle gerçekleştirildi.

Özet olarak bu çalışmada SEP ile ilişkisi bilinen genlerin Sanger dizilemesi gerçekleştirildi ve SD'de patojenik varyant saptanmayan olgular arasından seçilen ailelerden (SEP#11 VE SEP#15) 2 indeks ve 3 aile bireyinde ise yüzlerce geni eş zamanlı inceleme olanağı sağlayan YND ile tüm ekzom dizileme (TED/WES) tekniği uygulanarak çalışıldı.

Olguların endokrinolojik ve moleküler genetik analiz sonuçları ile aile ağaç çizimleri aşağıda sunulmaktadır.

4.2.1. SEP#01 olgu ve ailesi

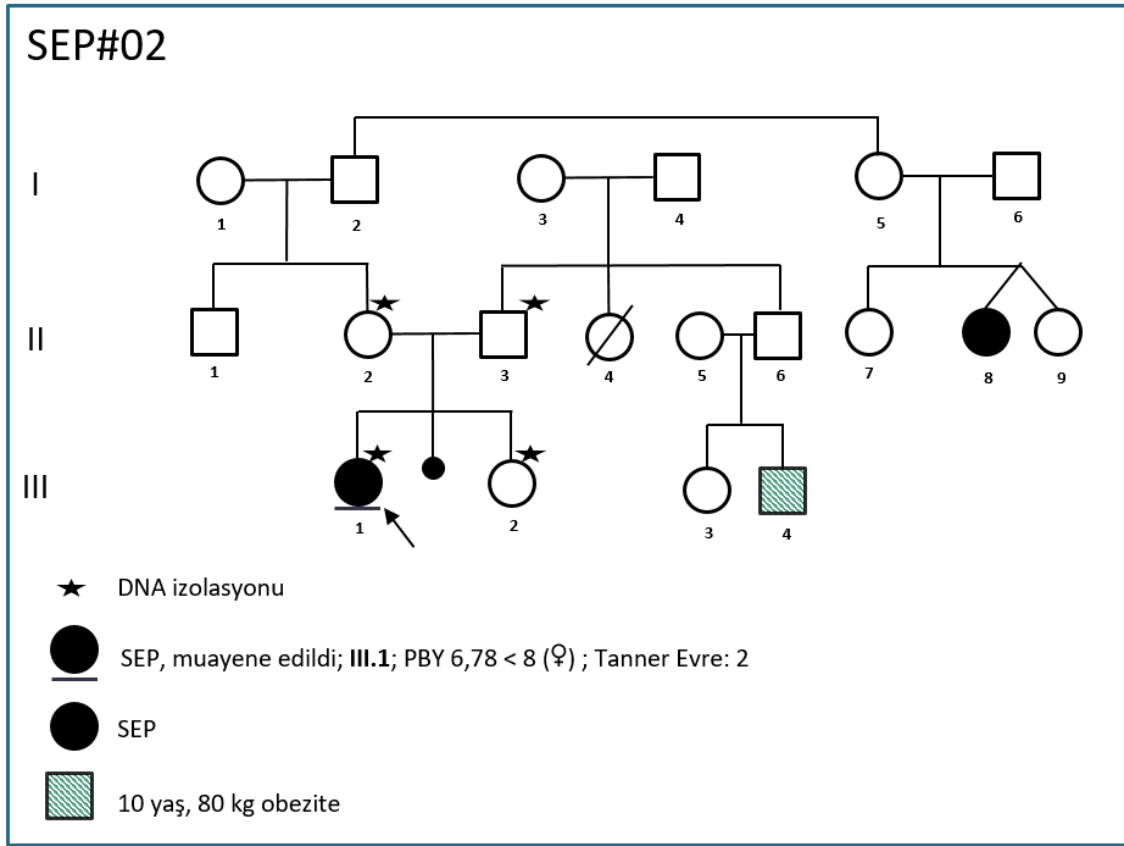
İndeks olguda (III:4) ilişkili genlerde SD analizinde klinik ile ilişkili patojenik bir varyant saptanmadı. Aileden alınan bilgiye göre indeksin teyzesinde (II:3) ve anne tarafından babasının erkek kardeşinin iki torununda (III:1 ve III:2) da SEP öyküsü mevcuttu. TED için aday olarak değerlendirilen ailede etkilenmiş olduğu bildirilen bireylerinin klinik muayenesi ve SEP açısından takibi önerildi (**Şekil 50**).



Şekil 50; SEP#01'in aile ağacı

4.2.2. SEP#02 olgu ve ailesi

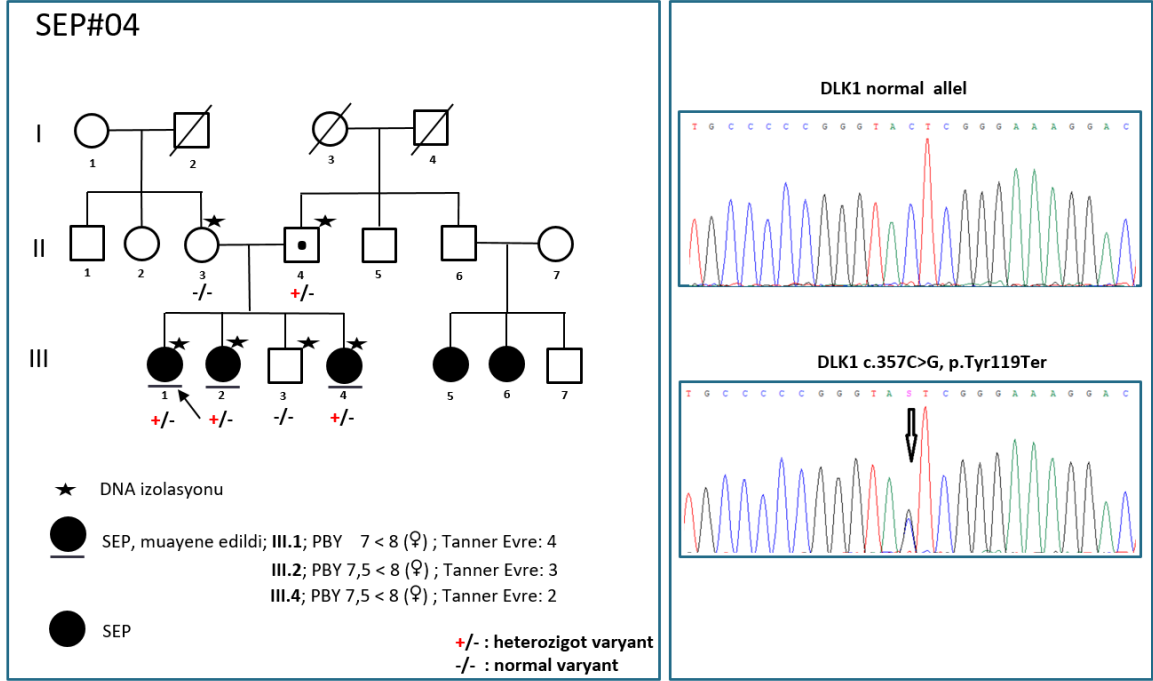
Aralarında akrabalık bulunmayan anne ve babanın iki kızından biri etkilenmiş indeks olgumuz (III:1), diğeri ise SEP açısından normal (III:2) kız kardeşi idi. İndeks olgunun annesinin halasının ikiz kız çocuklarından birinde (II:8) ailenin verdiği bilgiye göre SEP ile uyumlu bulgular, indeks olgunun babasının erkek kardeşinin (II:6) 10 yaşındaki erkek çocuğunda (III:4) ise obezite öyküsü mevcuttu. SEP#02 indeks olgusunda ilişkili genlerde SD analizinde klinik ile ilişkili herhangi patojenik bir varyant saptanmadı. Ailedeki SEP bulgulu bireylerin varlığı nedeniyle ailenin ileri çalışmalarda aday olabileceği düşünüldü (**Şekil 51**).



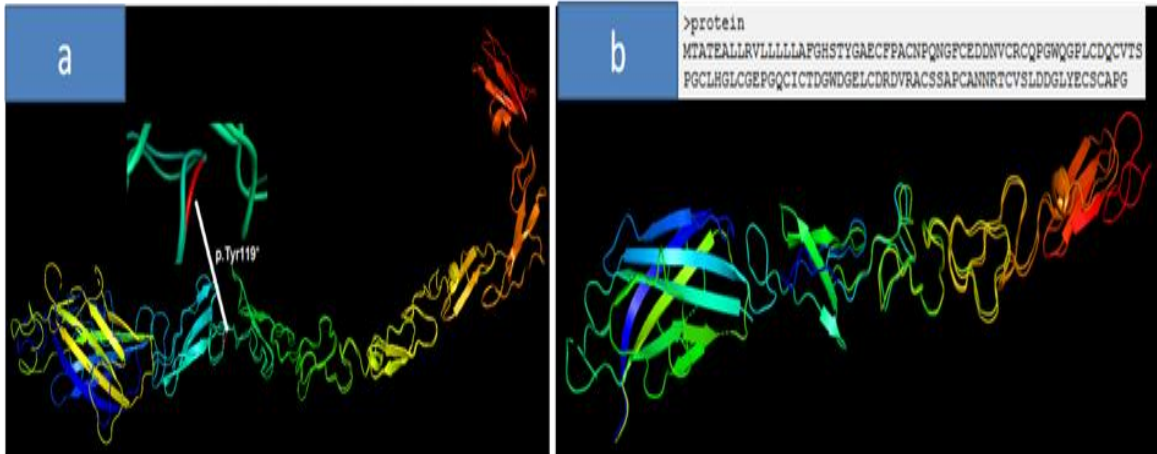
Şekil 51; SEP#02'in aile ağacı

4.2.3. SEP#03 olgu ve ailesi

Puberte başlangıç yaşının 7 ve Tanner evresi 4 olan SEP#03 indeks olgusunun (III:1) biri klinik etkilenmiş, diğeri ise henüz iki yaşında olması nedeniyle klinik bulguları değerlendirilemeyen iki kız kardeşi vardı. Anne-baba arasında akrabalık bildirilmemekteydi. İndeks olguda *DLK1* geninde, daha önce tanımlanmamış intron 1'de c.67+78C>T değişimi heterozigot olarak saptandı. Varyantın *in silico* analizi patojenik öngörüsü vermemekteydi. Varyantın klinik ilişkisinin aydınlatılması amacıyla aile içi segregasyon analizleri yapıldı ve I:4, II:3, III:1, III:2, III:3 bireylerinin değişimi taşıdığı ve klinik etkilenme bildirilmeyen I:3 ve II:2 bireylerinin ise bu varyantı taşımadığı gösterildi. Olgu *II:3 henüz iki yaşında olduğundan asemptomatik taşıyıcı olarak değerlendirildi ve SEP açısından klinik izlemi önerildi (Şekil 52).



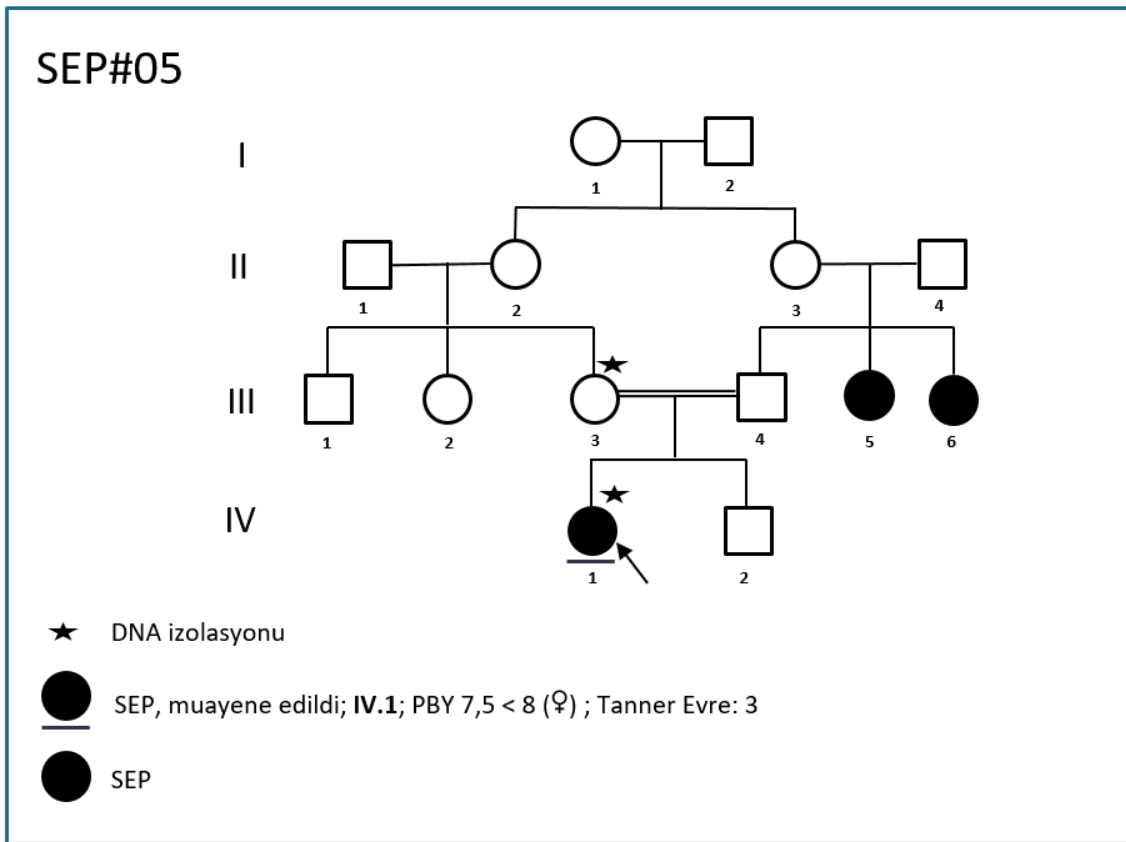
Şekil 53; SEP#04 'ün aile ağacı



Şekil 54; SEP#04 olgusunda *DLK1* geninin normal (4xbmB, 383aa) (a) ve kodladığı peptidde oluşması beklenen p.(Cys389Ter) değişiminin (4cbzA, 119 aa) (b) I-Tasser (31) ve PyMOL Viewer (95) da tasarlanan 3D modeli (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>'dan modifiye edilerek düzenlenmiştir.)

4.2.5. SEP#05 olgu ve ailesi

Aralarında 1. derece kuzen evliliği bulunan anne-babanın, biri SEP tanılı indeks olgumuz, kızı (IV:1) ve diğeri SEP öyküsü bulunmayan erkek (IV:2) çocuğu vardı. Aile öyküsünde babanın 2 kız kardeşlerinde (III:5 ve III:6) SEP bulguları olduğu belirtilmişti. SEP#05 indeks olgusunda incelenen genlerde SD analizinde klinik ile ilişkili herhangi patojenik bir varyant saptanmadı. Ailede bildirilen klinik olarak etkilenmiş bireylerin takibi önerildi ve gelecekte TED analizleri için uygun bir aday aile olduğu kararla varıldı (Şekil 55).

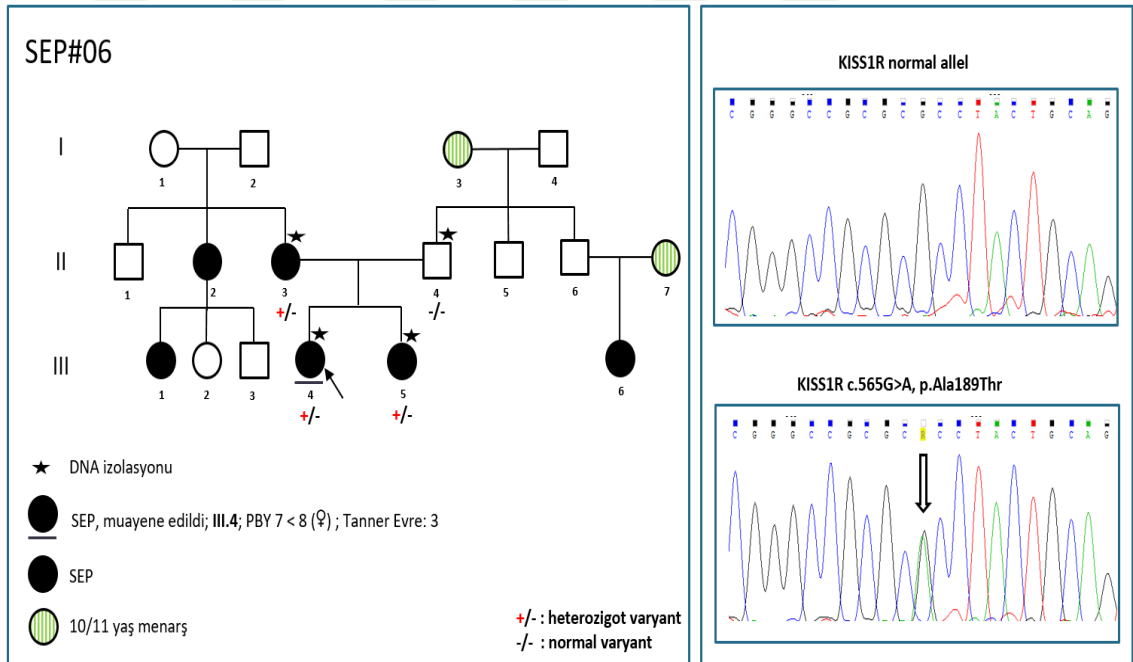


Şekil 55; SEP#05'in aile ağacı

4.2.6. SEP#06 olgu ve ailesi

Aralarında akrabalık bulunmayan anne ile babanın SEP tanılı iki kız çocuğundan III:4 indeks olgumuz idi. Aileden alınan bilgiye göre anne, kardeş, teyze, teyze kızı ve amca kızında (II:2, II:3, III:1, III:5 ve III:6) SEP bulgusu mevcuttu. SEP#06 indeks

olgusunda *KISS1R* geninde ekzon 4'de c.565G>A (p.(Ala189Thr)) (rs73507527/CM1010039) değişimi heterozigot olarak saptandı. Segregasyon çalışmasında bu varyant II:3, III:4 ve III:5 bireylerinde saptanırken II:2 de saptanmadı. *KISS1R*'de saptanan bu varyant literatürde izole GnRH eksikliği ile ilişkili bir olguda *FGFR1* genindeki c.682T>G değişimi ile birlikte bildirilmişti (96). Bu nedenle, saptanan varyantın SEP ilişkisinin araştırılması amacıyla indeks olguda *FGFR1* geni dizilendi, ancak patojenik bir varyant saptanmadı. Ailede segregasyon çalışmasının genişletilmesiyle II:2, III:1 ve III:6 bireylerine *KISS1R* geninde hedef değişimin taranması planlandı (Şekil 56).

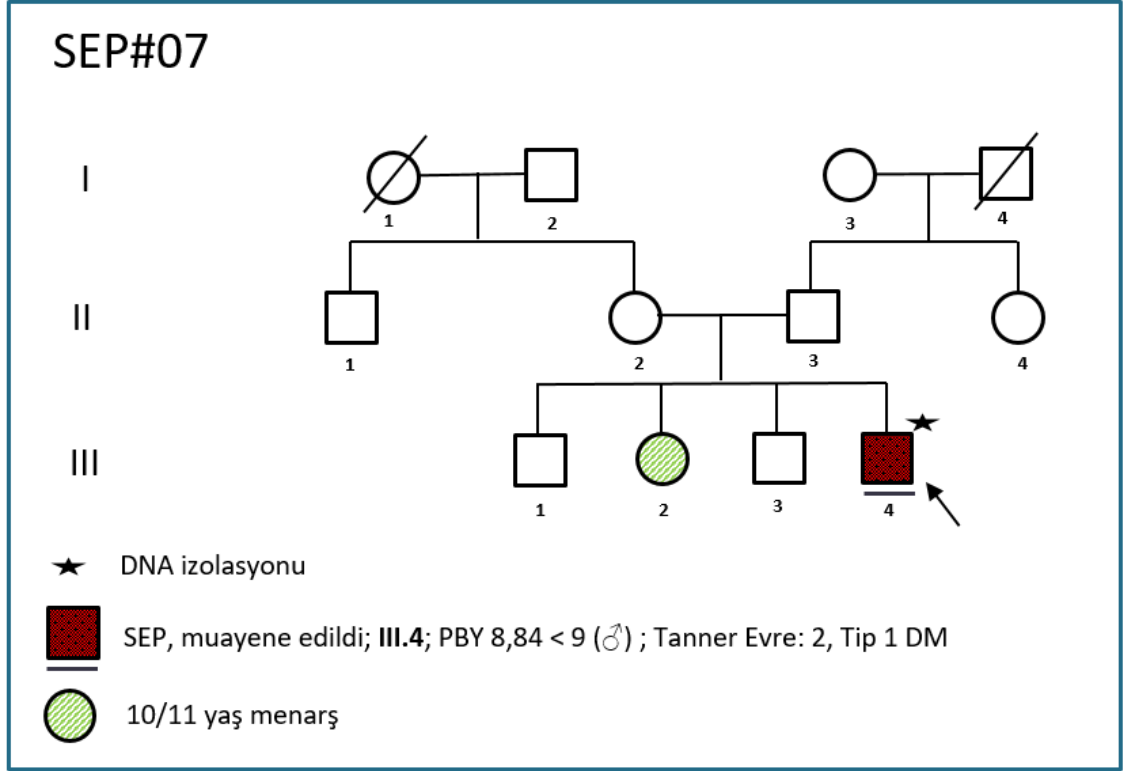


Şekil 56; SEP#06'ın aile ağacı

4.2.7. SEP#07 olgu ve ailesi

Aralarında akrabalık olmayan anne–babanın dört çocuğundan (üç erkek ve bir kız) en küçüğü (III:4) SEP ve Tip 1 DM tanılı indeks olgumuzdu. Aileden alınan bilgiye göre indeks olgunun menarş yaşı 10/11 olarak bildirilen kız kardeşinin de SEP olgusu

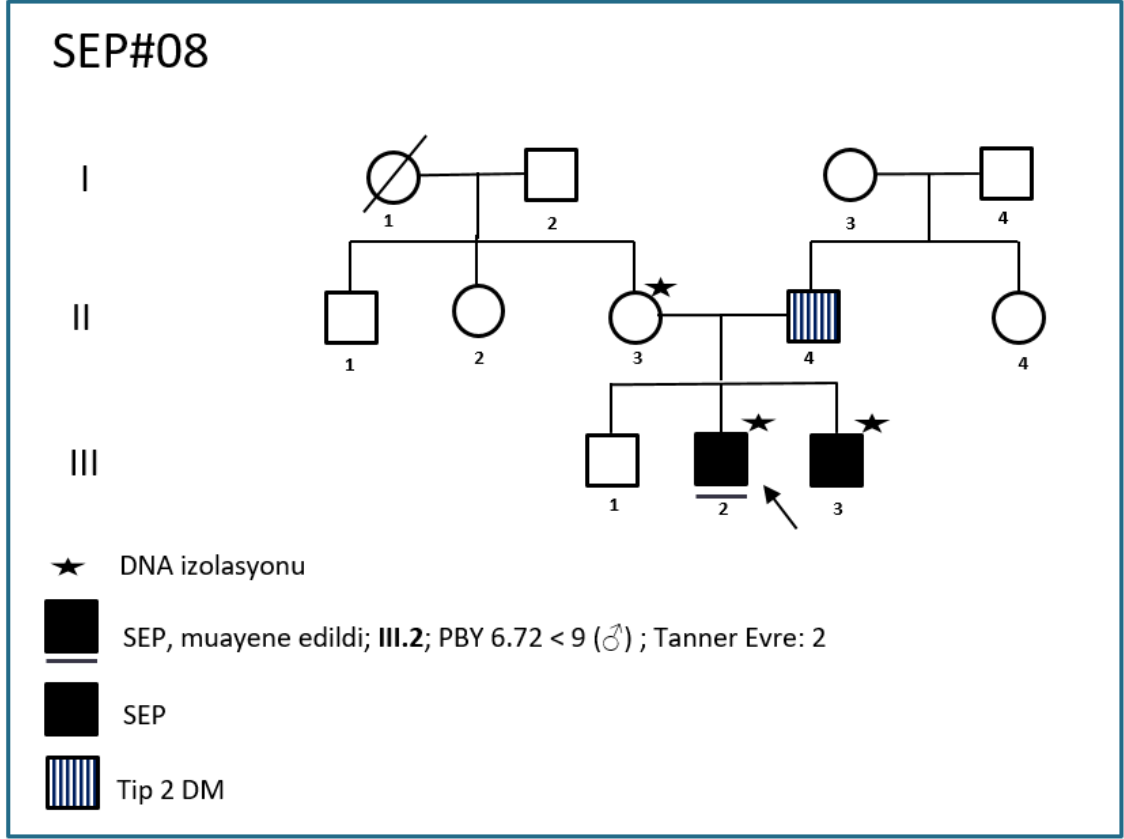
olarak değerlendirildi. SEP#07 indeks olgusunda beş gende klinik ile ilişkili herhangi patojenik bir varyant saptanmadı. Ailenin TED analizi için aday olup olamayacağının değerlendirilebilmesi için III.2 nin klinik değerlendirilmesi planlandı. (Şekil 57).



Şekil 57; SEP#07 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi

4.2.8. SEP#08 olgu ve ailesi

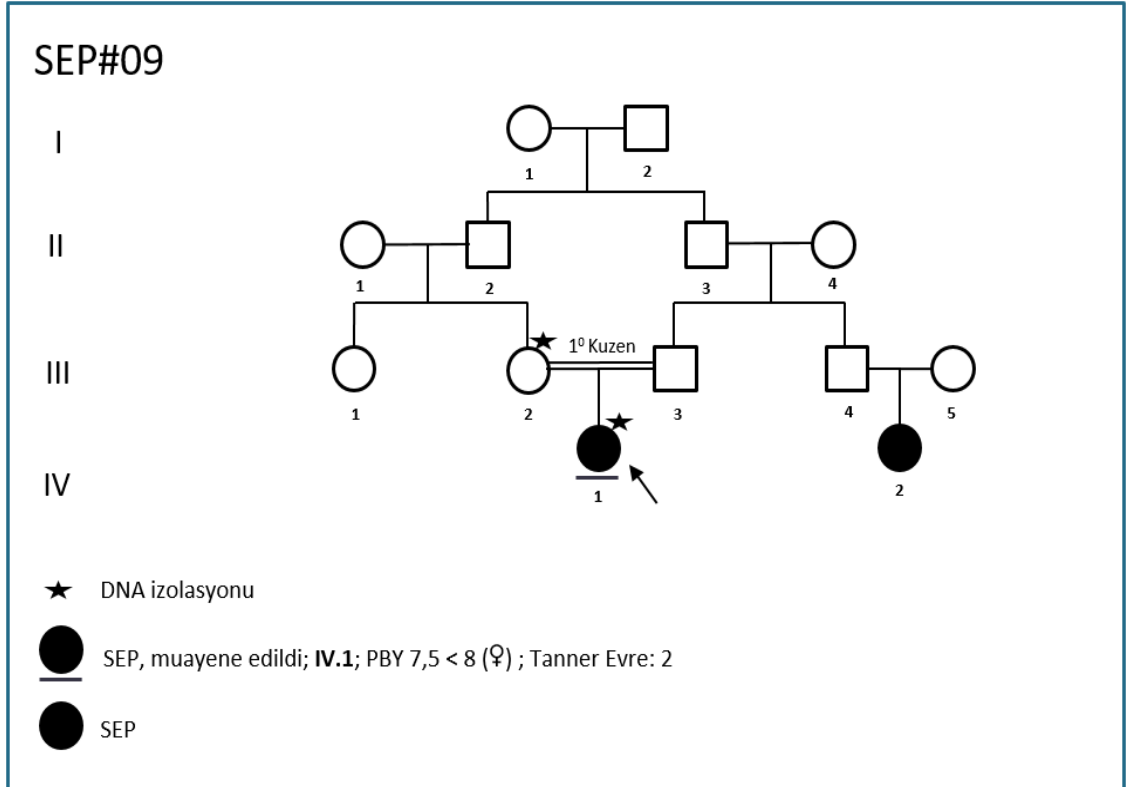
SEP bulgusu olan iki erkek kardeş bulunan SEP#08 ailesinde, indeks olguda (III:2) ilişkili beş gende klinik ile ilişkili herhangi patojenik bir varyant saptanmadı. Babanın tip 2 DM tanılı olduğu ve klinik olarak etkilenmiş başka birey olmadığı bildirilmişti. Ailede klinik etkilendiği bildirilen diğer erkek kardeşin (III:3) klinik muayenesi ve izlemi önerildi. Ailede birden fazla klinik etkilenmiş erkek bireyin varlığı nedeniyle TED analizi ile olası diğer genlerin araştırılması amacıyla aday aile olabileceği düşünüldü (Şekil 58).



Şekil 58; SEP#08 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi

4.2.9. SEP#09 olgu ve ailesi

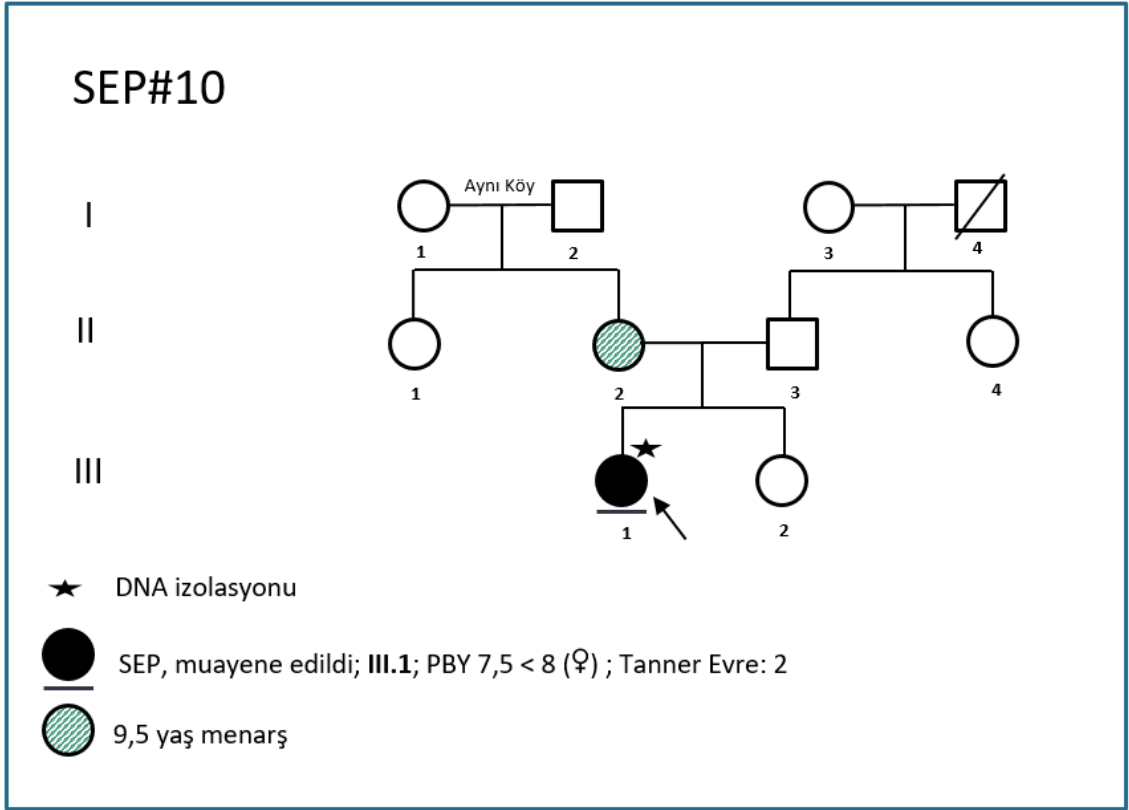
Aralarında 1. derece kuzen evliliği olan ailenin tek kızı indeks olgumuzdu (IV:1). Ailede indeks olgunun amcasının kızı da SEP bulgusu bildirilmekteydi. SEP#09 indeks olgusunda araştırılan genlerde klinik ilişkili herhangi patojenik bir varyant saptanmadı. Ailede akrabalık ilişkisinin bulunması ve klinik etkilenmiş kuzenin varlığı nedeniyle aile TED çalışması için aday aile olarak değerlendirildi (Şekil 59).



Şekil 59; SEP#09 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi

4.2.10. SEP#10 olgu ve ailesi

Aralarında akrabalık olmayan anne babanın iki kız çocuğundan, ilki indeks olgumuzdu (III:1) ve 7 yaşındaki kız kardeşinde ise SEP bulgusu yoktu. SEP#10 indeks olgusunun annesinde 9,5 yaşta menarş öyküsü bulunmaktaydı. İndeks olguda araştırılan genlerde klinik ilişkili herhangi patojenik bir varyant saptanmadı. Ailede indeks olgu dışında, annenin de menarş yaşının erken olması nedeniyle SEP olgusu olabileceği değerlendirildi ve TED çalışması için aday olabileceği düşünüldü (Şekil 60).



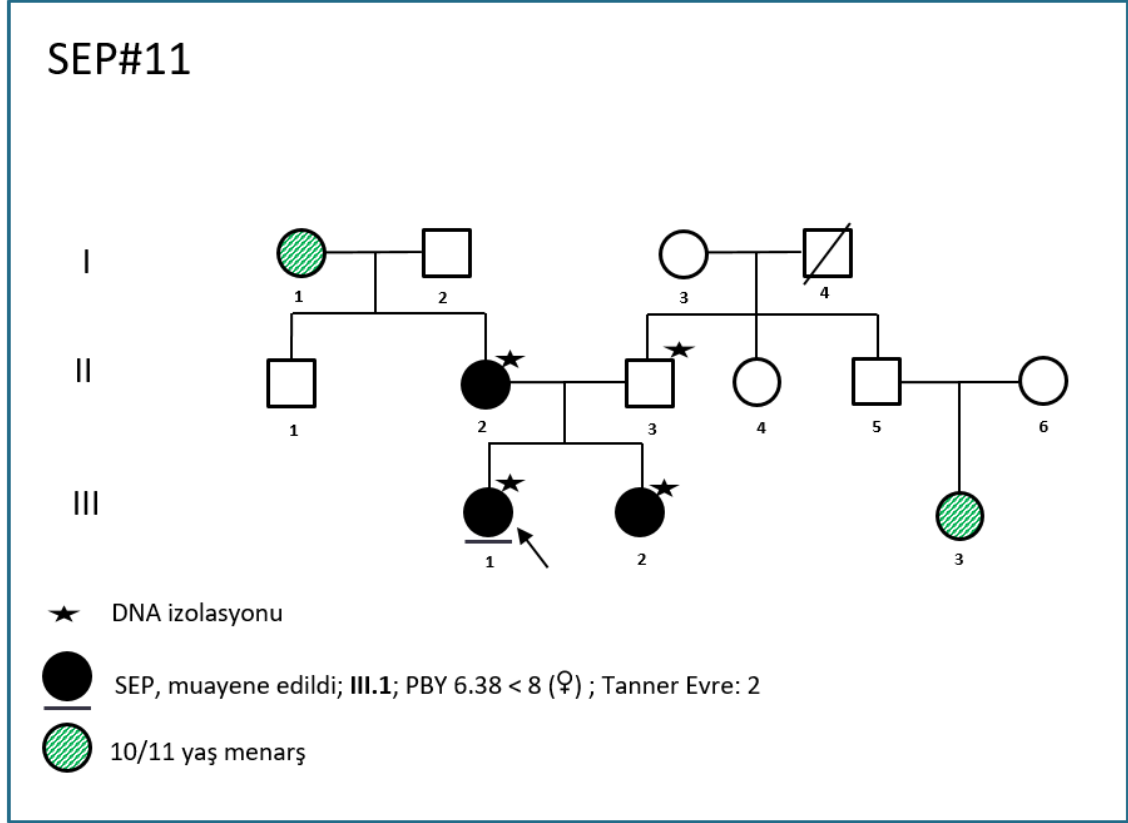
Şekil 60; SEP#10 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi

4.2.11. SEP#11 olgu ve ailesi

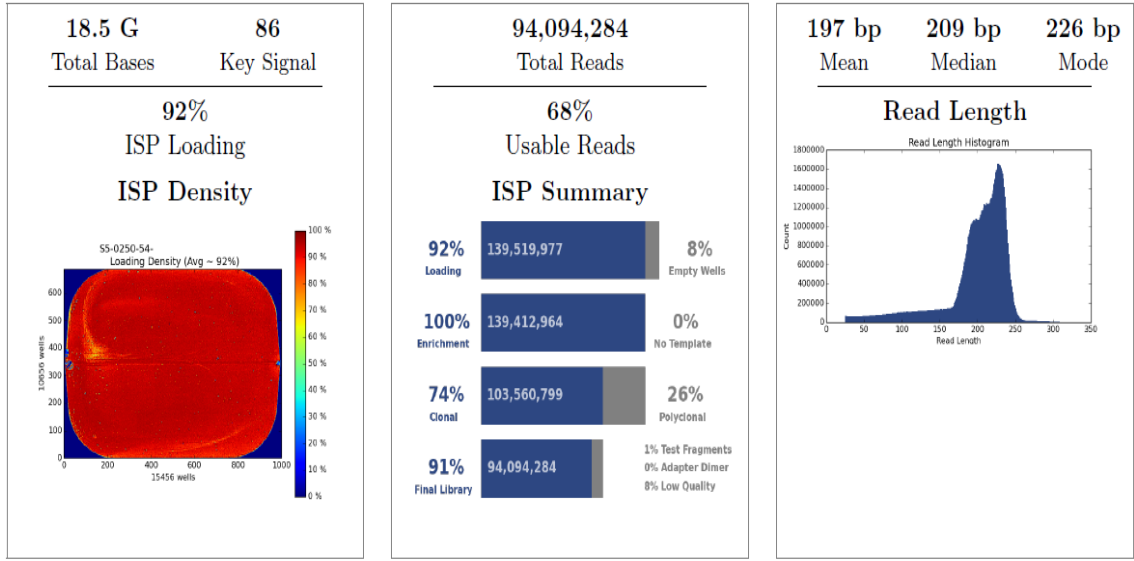
SEP#11 ailesinde SEP bulgulu iki kızkardeşin yanı sıra öyküde annenin, anneanneninin ve babanın erkek kardeşinin kızı da SEP bulgusu olduğu öğrenildi (Şekil 61). İndeks olguda incelenen beş gende klinik ilişkili herhangi bir varyant saptanmadı. Ailede indeks olgu, etkilenmiş kızkardeş ve anne Trio-TED tekniği ile incelendi. Torrent server üzerinde çalışmamızda, kodlayan bölgelerin kapsam ve derinlikleri incelendi, hedef DNA dizilerin >%97 sini içeren bölgelerde hedef bazların %93 den fazlası >%90 kapsam ile ortalama okuma derinliği 95X ile değerlendirildi (Şekiller 62-64). Toplam 71442 varyantlar (Şekil 65) ile *in silico* veri tabanlarında ve 'in house data' verisi ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde olası patojenik/ patojenik/ VUS olarak 6 farklı gende 6 varyant saptandı. Bunların dördü yanlış anlamlı, ikisi ise

çerçeve kayması değişimleri (Tablo 28). ACMG sınıflandırmasına göre bu varyantlardan dördü VUS, biri olası zararsız, diğeri ise zararlı grubunda idi.

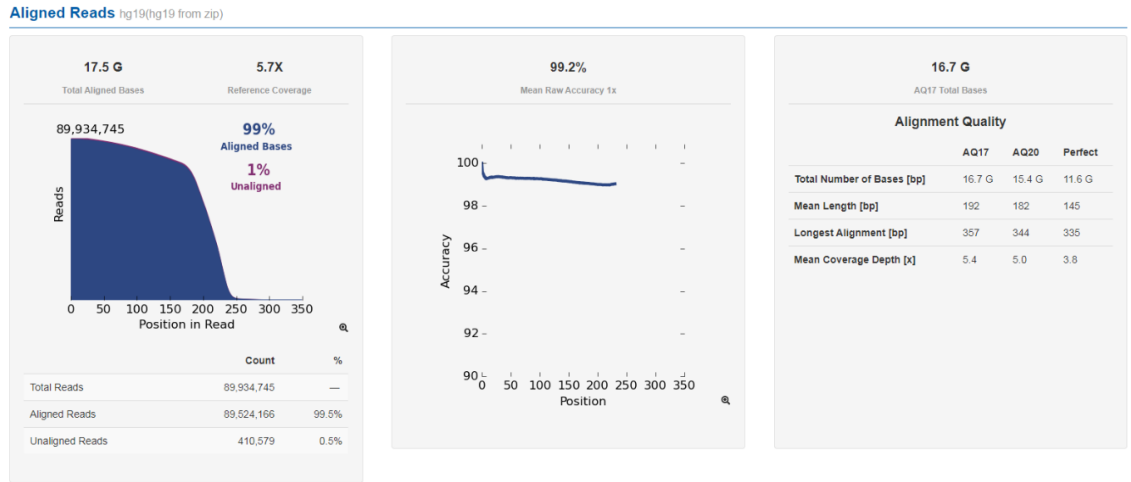
SEP#11 olgusunda aile ağacı (Şekil 60) ve saptanan değişiminin IGV görüntüsü, ve diğeri bulguları Tablo 27 – 28 ve Şekil 61-67 de gösterildi.



Şekil 61; SEP#11 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi



Şekil 62; SEP#11 ailesinde yapılan TED analizinin Torrent Server üzerindeki okuma özetleri ve uzunluk bilgileri.



Şekil 63;Torrent Server üzerinde SEP#11 ailesinde haritalama sonuçlarının gösterimi

Output Files

File Type		Unaligned Reads		Aligned Reads	
Library		UBAM		BAM BAI	

Barcode Name	Sample	Bases	>=Q20 Bases	Reads	Mean Read Length	Read Length Histogram	Files
IonXpress_001	1. indeks	7,642,264,749	6,690,989,246	39,190,869	195 bp		UBAM BAM BAI
IonXpress_002	2. etkilenmiş kızkardeş	4,037,513,099	3,547,662,678	20,403,395	197 bp		UBAM BAM BAI
IonXpress_003	3. Anne	6,008,298,269	5,311,737,059	30,340,481	198 bp		UBAM BAM BAI

10 items per page 1 - 4 of 4 items

Plugins

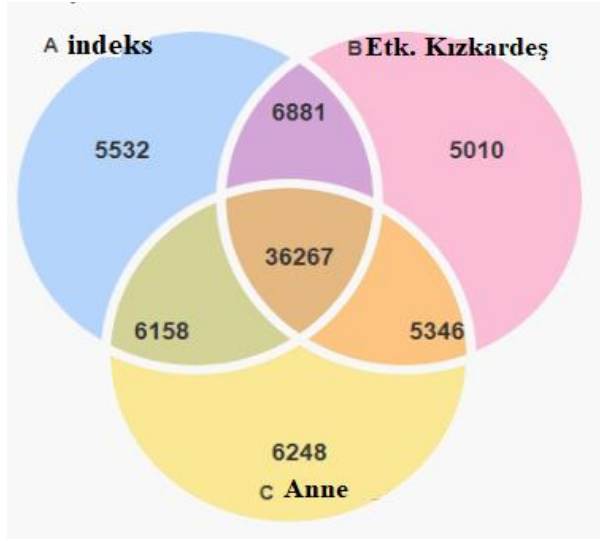
coverageAnalysis v5.12.0.0 (950)							View Log	Delete
Completed 801 MB								
•coverageAnalysis.html								
Library type: AmpliSeq Exome								
Target regions: AmpliSeqExome.20131001.designed								
Read filters: Sample tracking								
Barcode Name	Sample	Mapped Reads	On Target	SampleID	Mean Depth	Uniformity		
IonXpress_001	1. indeks	38,966,050	93.92%	0.00%	121.6	95.93%		
IonXpress_002	2. etkilenmiş kızkardeş	20,315,482	95.52%	0.00%	65.04	94.20%		
IonXpress_003	3. anne	30,242,634	94.97%	0.00%	96.44	95.27%		

20 items per page 1 - 3 of 3 items

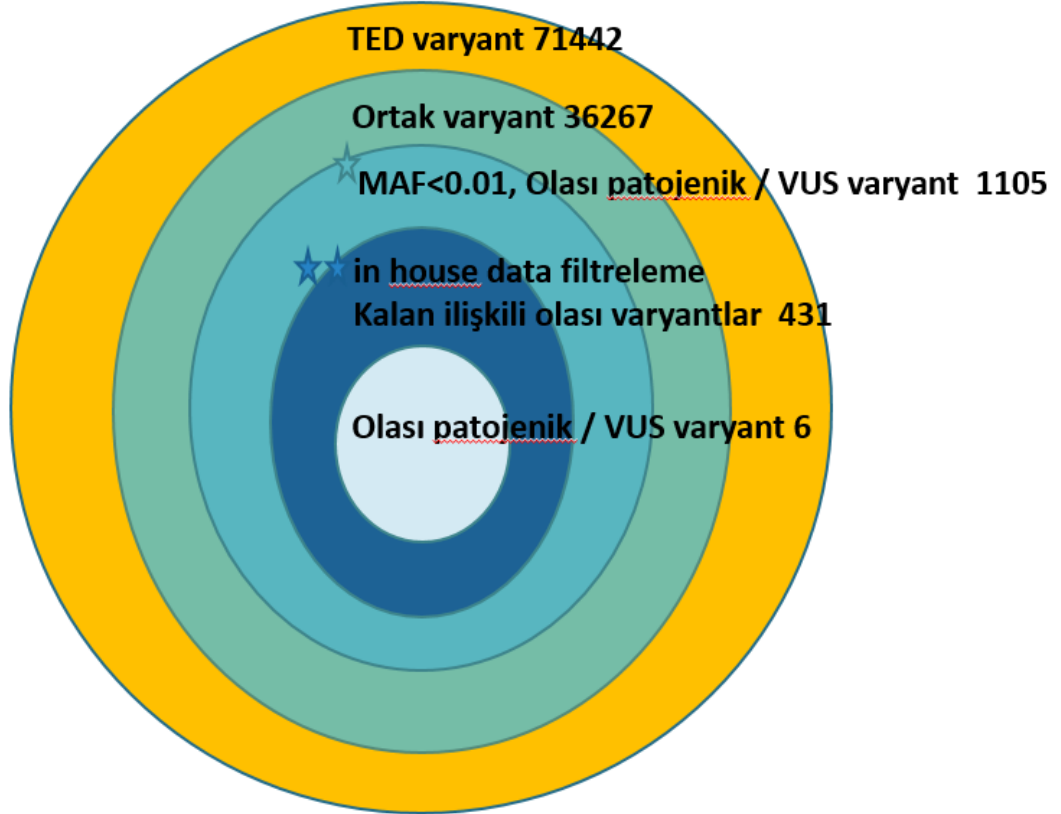
Şekil 64;Torrent Server üzerinde SEP#11 ailesinde kapsam ve derinlik analizlerinin gösterimi

Tablo 27 TED çalışmasında SEP#11, indeks olguda (III:1) etkilenmiş kız kardeş (III:2) ve annede (II:1) saptanan varyant sayıları

TED	Varyant sayısı
Toplam	71442
III:1, III:2 ve II:1'de ortak varyantlar	36267
Sadece III:1	5532
Sadece III:2	5010



Şekil 65; SEP#11 ailesindeki varyantların bireylerdeki dağılımı



Şekil 66; SEP#11 ailesinde TED’de filtrelenen varyantların gösterimi

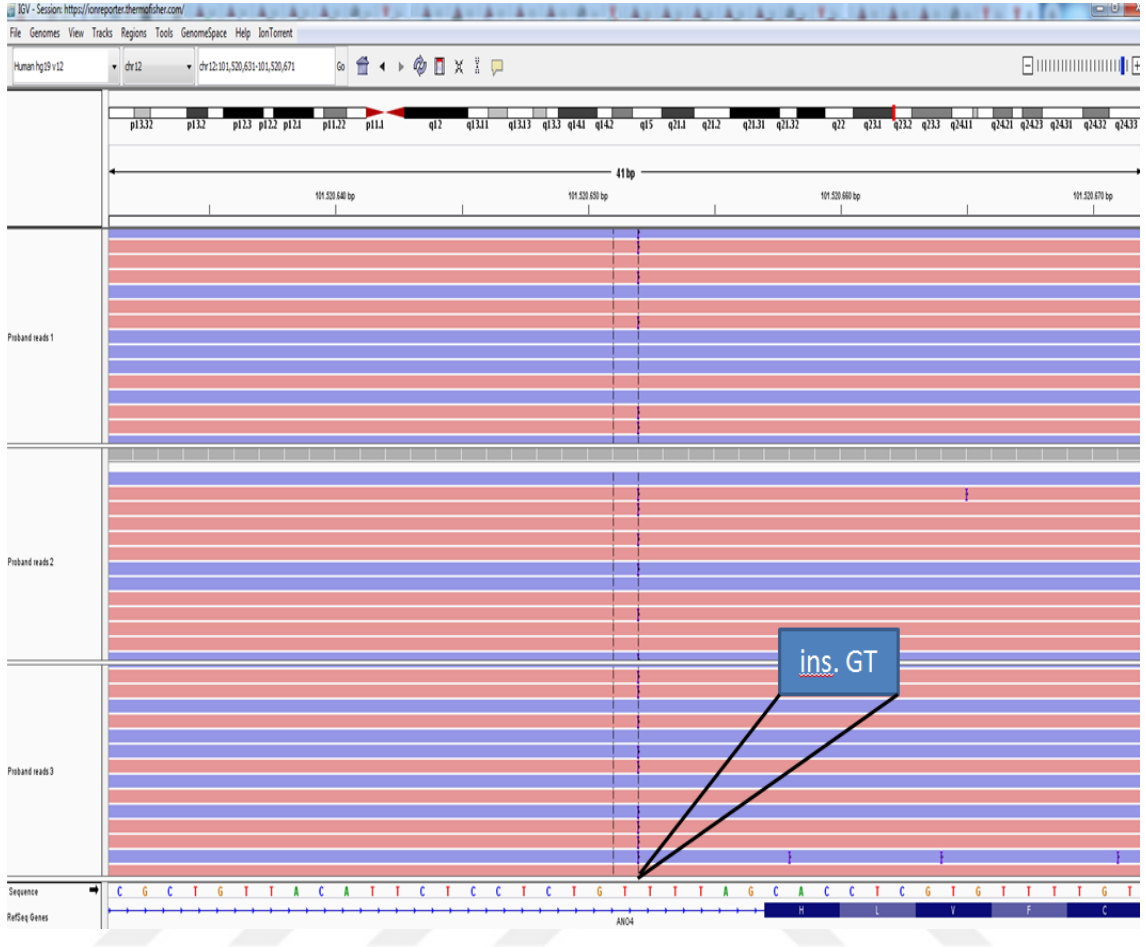
★ MAF<0.01, İmprinted Genler (102 gen), Literatür taraması ile puberte ilişkili genlerin araştırması (142 gen), Hipofiz ilişkili genler (52 gen) ile filtrelemeler



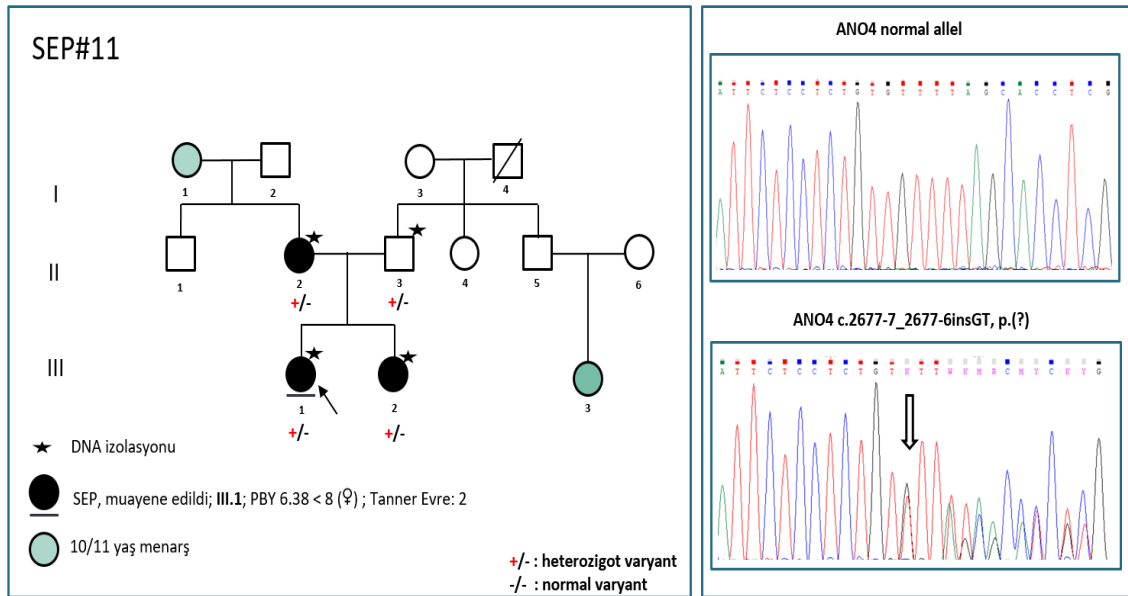
in house 110 Ekzomda data filtreleme ile ilişkili olası varyantlar

Tablo 28; TED çalışmasında elde edilen varyantların filtrelenmesi sonrasında belirlenen patojenik/olası patojenik/VUS statüsündeki veya en az iki *in silico* analizde zararlı öngörüsünde bulunan varyantlar

Gen/Lokasyon/ Transkript no/ peptid no	Varyant Nükleotid/peptid	dbSNP/GnomAD frekansı; ekzom/genom	Varyant sınıfı	Patojenite skoru	GnomAD pLI	<i>In silico</i> analiz			
						PolyPhen (HumVar) (0-1)	SIFT (cutoff=0.05)	PROVEAN (cutoff=-2.5)	Mutation Taster
<i>PIF1</i> /15q22.31/ NM_025049.3/ NP_079325.2	c.850T>C/ p.(Cys284Arg)	rs118062397/ 0.03846/0.01284	Olası zararsız	13/19	0	Olası zararlı (0.997)	Zararlı (0.002)	Zararlı (-8.42)	Hastalık yapıcı
<i>ANO4</i> /12q23.1/ NM_178826.3/ NP_849148.2	c.2572-7_2572- 6insGT/ p.(?)	rs72517905/- rs3832861/ 0.3956/ 0.4558	VUS	-	0 (0.44)	-	-	-	Hastalık yapıcı
<i>THNSL2</i> /2p11.2/ NM_018271.4/ NP_060741.3	c.361A>G/ p.(Thr121Ala)	rs143018511/ 0.00003182/ 0.00003184	VUS	0/20	0	Zararsız (0.000)	Tolere (0.850)	Neutral (1.78)	Polimorfizm
<i>MAPK7</i> / 17p11.2/ NM_002749/ NP_002740	c.1187G>A/ p.(Arg396His)	rs55733844/ 0.0001157/ 0.00003979	VUS	4/20	0 (0.61)	Olası zararlı (0.994)	Zararlı (0.001)	Nötr (-0.97)	Hastalık yapıcı
TARS3(TARSL2)/ NM_152334.2/ NP_689547.2	c.1987_1989delAAG/ p.(Lys663del)	rs776691540/ 0.000008155/ 0.00003193	VUS	0/21	0 (0.89)	-	-	-	Hastalık yapıcı
BTD/ NM_001370658.1 /NP_001357587.1	c.1595C>T/ p.(Thr532Met)	rs104893688/ 0.00006928/ 0.0001592	Zararlı	18/20	0	Olası zararlı (0.994)	Zararlı (0.025)	Zararlı (-4.11)	Hastalık yapıcı



Şekil 67; TED analizinde SEP#11 ailesinde ANO4 geninde intron 26 da saptanan ve in silico analizlerde kırılma hatasına yol açtığı tahmini verilen c.2677-7_2677-6insGT değişimin IGV görüntüsü.

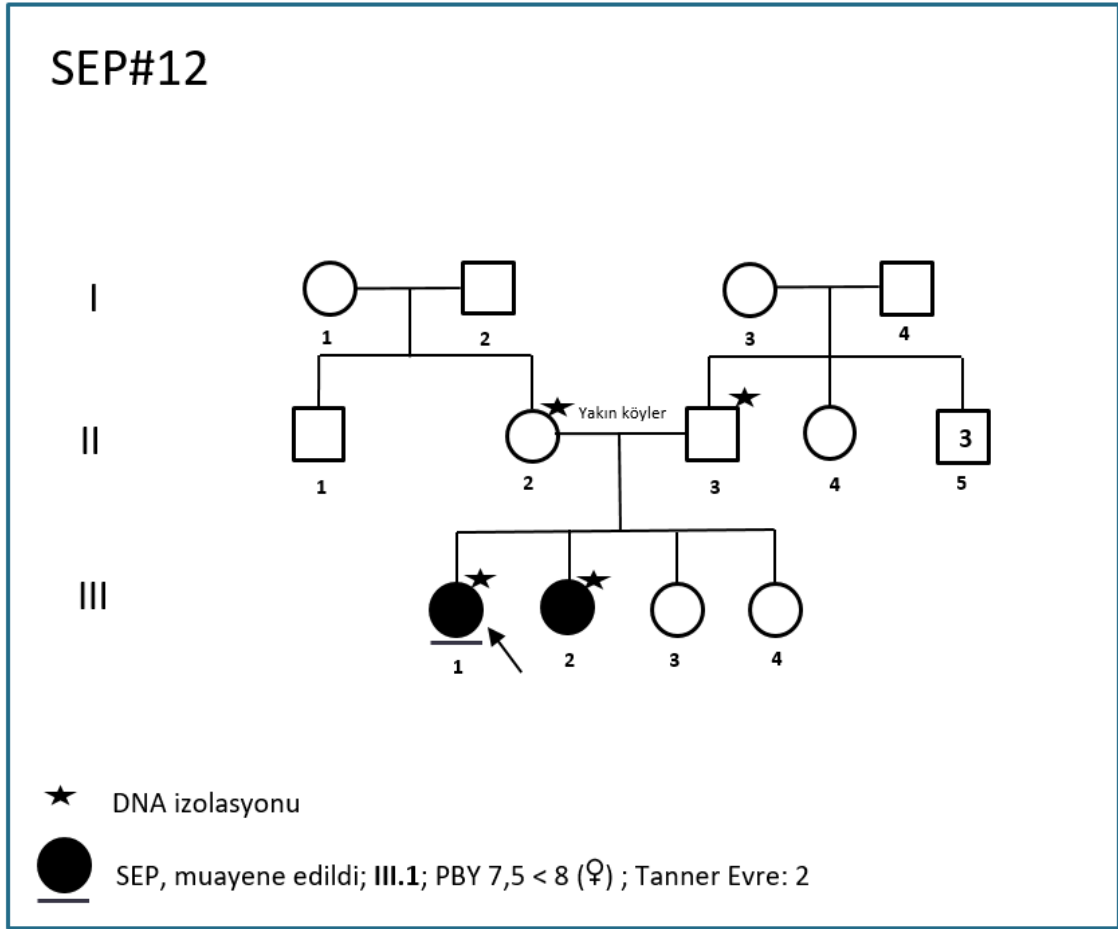


Şekil 68; SEP#11 ailesinde ANO4 geninde intron 26'da saptanan değişimin SD sonuçlarının aile ağacı üzerinde gösterimi

Bu varyantlardan biri *ANO4/TMEM16D* (Anoctamin 4) genindeki c.2572-7_2572-6insGT/ p.(?) (rs72517905) varyantı heterozigot olarak anne ve etkilenmiş 2 kız kardeşte saptandı. Bu genin anlatımının HHG eksenin üzerindeki bölgelerle ilişkili olması sebebiyle erken puberte ile ilişkili olabileceği değerlendirildi. Hedef değişim için primerler tasarlandı ve varyantın varlığı SD ile doğrulandı. Aile içi segregasyon çalışmasında klinik olarak etkilenmemiş babanın da aynı varyantı taşıdığı belirlendi. Ayrıca, belirlenen varyantlardan bir diğeri zararlı olarak sınıflanan *BTD* geninde c.1595C>T (p.(Thr532Met)) değişimi idi. Biotinidaz eksikliğine yol açması beklenen değişim için babanın incelenmesi planlandı. Diğer varyantlar için SEP ilişkili olmaması ve VUS sınıfında değerlendirilmesi nedeniyle doğrulama çalışması yapılmadı.

4.2.12. SEP#12 olgu ve ailesi

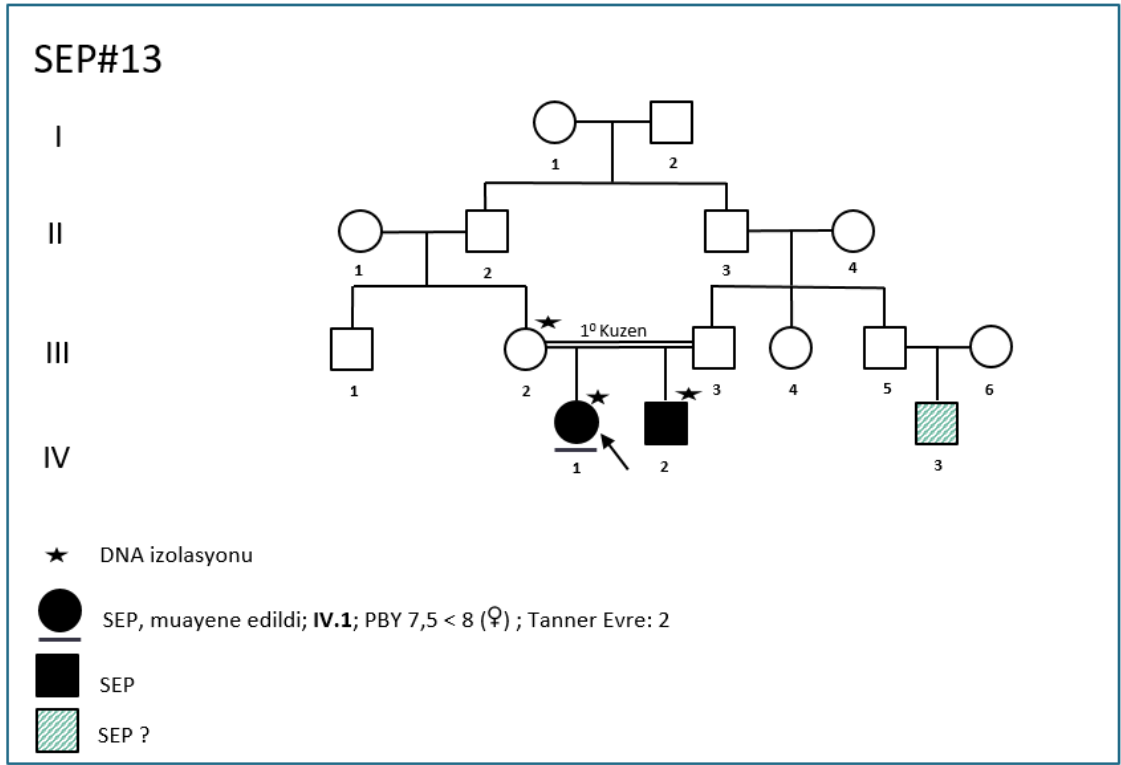
Anne-baba arasında akrabalık ilişkisi olmayan, ancak yakın köyden oldukları bildirilen ailenin dört kız çocuğundan ilk ikisinde SEP bulguları tariflenmişti. En büyük çocuk olan III:1 indeks olgumuzdu. Klinik muayenesi yapılmayan diğer etkilenmiş kızkardeş dışında ailede başka bir bireyde SEP bildirilmemişti. İndeks olguda ilişkili beş gende yapılan SD analizinde klinik ile ilişkili herhangi bir patojenik varyant saptanmadı. III:2 nin SEP bulgularının gösterilmesi amacıyla muayene edilmesi önerildi ve ailenin TED çalışması için aday aile olup olmadığına karar verilmesi planlandı(**Şekil 69**).



Şekil 69; SEP#12 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi

4.2.13. SEP#13 olgu ve ailesi

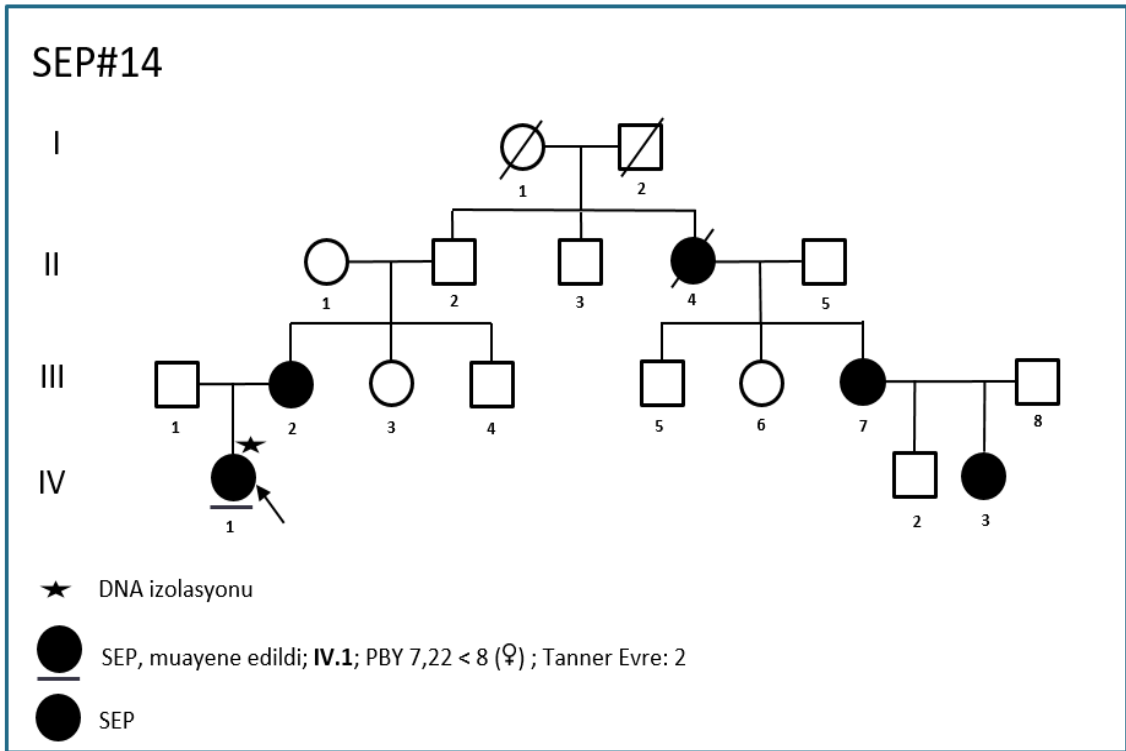
Aralarında 1. derece kuzen evliliği bulunan ve biri kız (IV:1) ve diğeri erkek (IV:2) etkilenmiş 2 çocuğundan klinik olarak değerlendirilen kız çocuğu indeks olgumuzdu (**Şekil 70**). Aile tarafından verilen bilgiye göre babanın erkek kardeşinin oğlu da (IV:3) SEP bulgusu göstermekteydi. İndeks olguda incelenen genlerde klinik ile ilişkili olabilecek herhangi bir patojenik varyant saptanmadı. Ailede IV:2 ve IV:3 ün klinik takibi ve TED çalışması önerildi.



Şekil 70; SEP#13 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi

4.2.14. SEP#14 olgu ve ailesi

Aralarında akrabalık ilişkisi olmayan ailenin kız çocuğu indeks olgumuzdu (IV:1). İndeks olgunun annesinde, annenin halasında, halanın kızı ve halanın torununda SEP öyküsü vardı. SEP#14 indeks olgusunda, ilişkili genlerde klinik ile ilişkili olabilecek herhangi patojenik bir varyant saptanmadı. Ailedeki 5 olgunun klinik olarak etkilenmiş olması ailenin TED analizi ile değerlendirilmesinin SEP ilişkili yeni genlerin belirlenmesi için güçlü bir aile olduğu düşünüldü (Şekil 71).

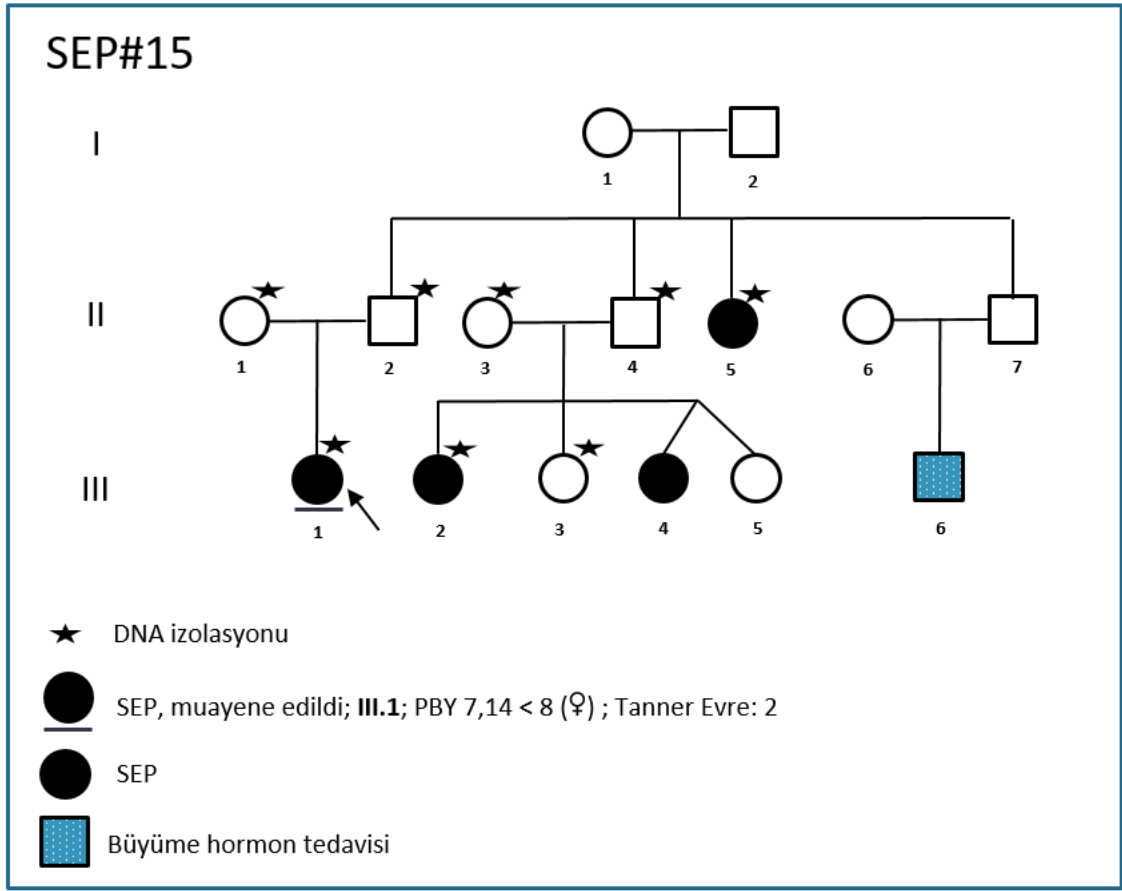


Şekil 71; SEP#14 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi

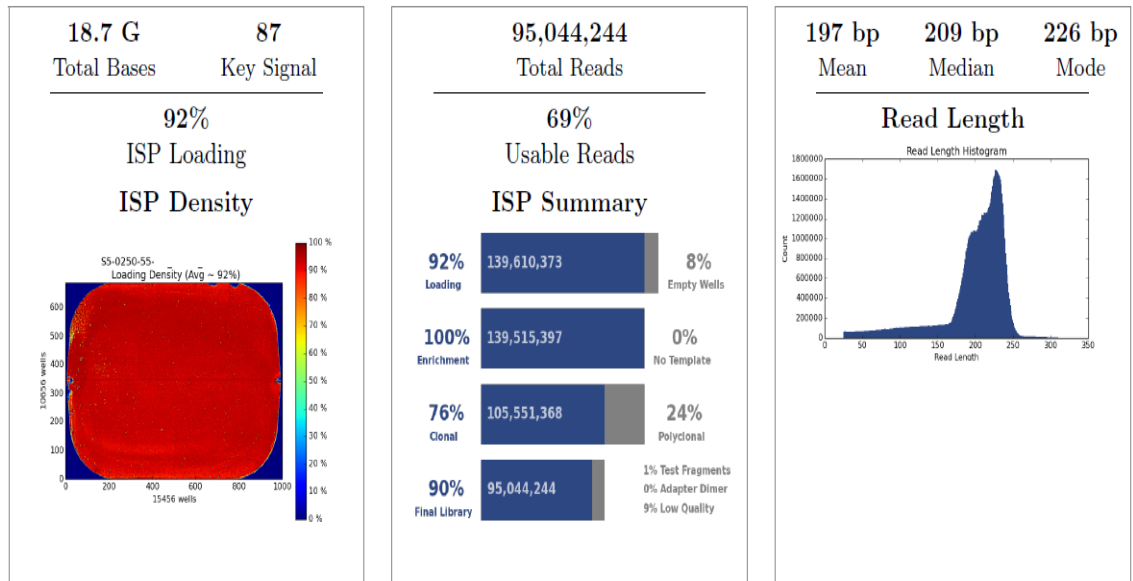
4.2.15. SEP#15 olgu ve ailesi

Aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan anne ile babanın kızları SEP bulgusu olan indeks olgumuz idi (III:1). SEP#15 ailesinde öyküde indeks olgunun amcasının iki kızında ve indeksin halasında SEP bulgusu olduğu öğrenildi (**Şekil 72**). İndeks olguda incelenen beş gende herhangi bir patojenik varyant saptanmadı. Ailede TED tekniği ile indeks olgu ve etkilenmiş kuzen (III:2) incelendi.

Torrent server üzerinde çalışmamızda, kodlayan bölgelerin kapsam ve derinlikleri incelendi, hedef DNA dizilerin >%97 sini içeren bölgelerde hedef bazların %95 den fazlası >%90 kapsam ile ortalama okuma derinliği 143X ile değerlendirildi (**Şekiller 73-75**). Toplam 70349 varyanttan filtrelemeler ile, ile *in silico* veri tabanlarında ve '*in house data*' verisi ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde ACMG sınıflandırmasına göre VUS ve olası zararsız sınıfta 7 farklı gende 7 varyant saptandı (**Şekil 76**). Bunların beşi yanlış anlamlı, biri ise çerçeve kayması ve diğeri ise kırılma noktası değişimleriydi (**Tablo 30**). *CDHR3* (cadherin related family member 3) ve *NUMBL* (NUMB like endocytic adaptor protein) genlerindeki değişimlerin SEP ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu iki gende saptanan değişimlerin doğrulanması amacıyla primer tasarımları gerçekleştirildi. *NUMBL* genindeki değişim SD ile doğrulanamadı. *CDHR3* genindeki değişim ise indeks olguda doğrulandı ve aile içi segregasyon analizi gerçekleştirildi. Varyant, indeks olgunun babasında (II:2), halasında (II:5), amcasının eşinde (II:3) amcasının klinik etkilenmiş (III:2) kızında saptandı. Varyantın etkisinin gösterilmesi amacıyla indeks olgudan RNA izolasyonu ve cDNA eldesi gerçekleştirildi, kırılma hatasına yol açması öngörülen değişim için tasarlanan primerler ile yapılan çalışmada ise ürün eldesi gerçekleştirilemedi. *CDHR3* genindeki c.1225-1G>A (p.(?)) değişimin aile içi etkilenmiş bireyler ve üst kuşakta segregasyonun genişletilmesine karar verildi. Diğer genlerde saptanan varyantların *in silico* analizleri patojenik uyarısı vermemesi GnomAD pLI ve patojenite skorlarının 0 ya da çok düşük olmasından dolayı doğrulama çalışması gerçekleştirilmedi.

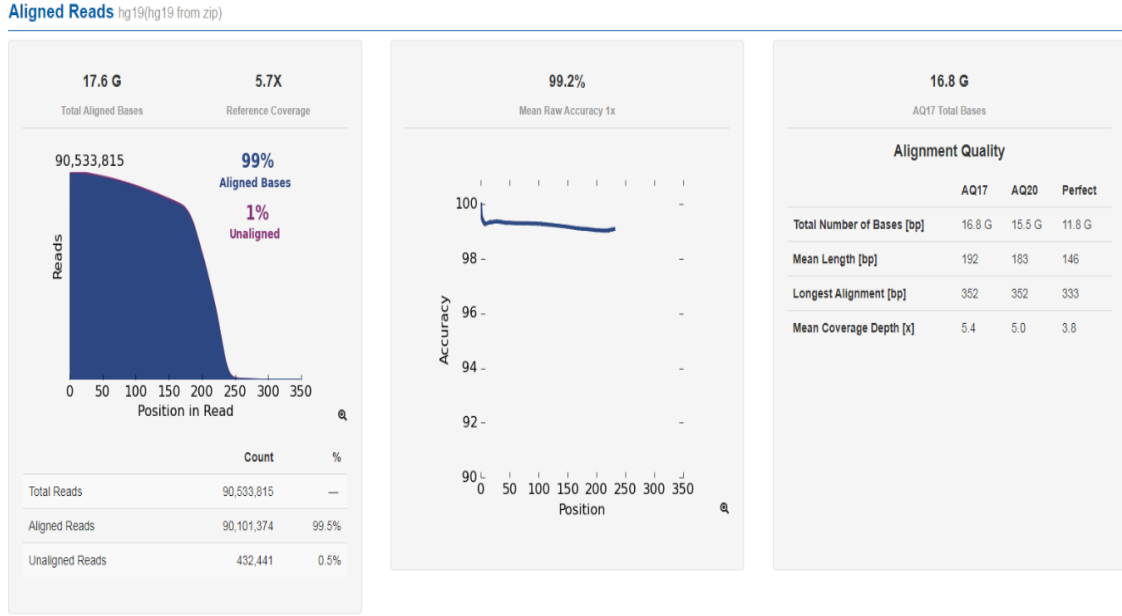


Şekil 72; SEP#15 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi



Şekil 73; SEP#15 ailesinde yapılan TED analizinin Torrent Serverın üzerindeki okuma özetleri ve uzunluk bilgileri.

SEP#15 ailesinde haritalama sonuçları ile baz kalite ve yüzde değerlerinin gösterildiği sonuçlar **Şekil 74** de yer almaktadır.



Şekil 74; Torrent Server üzerinde SEP#15 ailesinde haritalama sonuçlarının gösterimi

SEP#15 ailesinde coverage (kapsam) ve coverage deep (derinlik) bölgelerin kaç tekrarla okunduğunun ve yüzde kaçının kapsandığının gösterimi (**Şekil 74**).

Output Files

File Type		Unaligned Reads		Aligned Reads	
Library		UBAM		BAM BAI	

Barcode Name	Sample	Bases	>=Q20 Bases	Reads	Mean Read Length	Read Length Histogram	Files
IonXpress_004	4. indeks	7,505,300,828	6,587,511,819	38,032,252	197 bp		UBAM BAM BAI
IonXpress_005	5. etkilenmiş kuzen	10,317,720,490	9,065,996,644	52,501,563	196 bp		UBAM BAM BAI

10 items per page 1 - 3 of 3 items

Plugins

coverageAnalysis v5.12.0.0 (947)

Completed 621 MB

[coverageAnalysis.html](#)

Library type: AmpliSeq Exome

Target regions: AmpliSeqExome.20131001 designed

Read filters: Sample tracking

View Log

Delete

Barcode Name	Sample	Mapped Reads	On Target	SampleID	Mean Depth	Uniformity
IonXpress_004	4. indeks	37,864,288	95.35%	0.00%	120.9	95.49%
IonXpress_005	5. etkilenmiş kuzen	52,237,086	94.68%	0.00%	165.2	95.79%

◀

1

▶

⌂

20

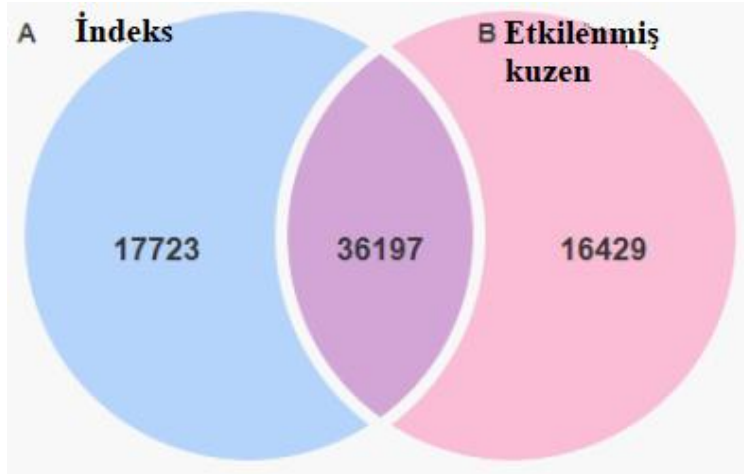
Items per page

1 - 2 of 2 items

Şekil 75; Torrent Server üzerinde SEP#15 ailesinde kapsam ve derinlik analizlerinin gösterimi

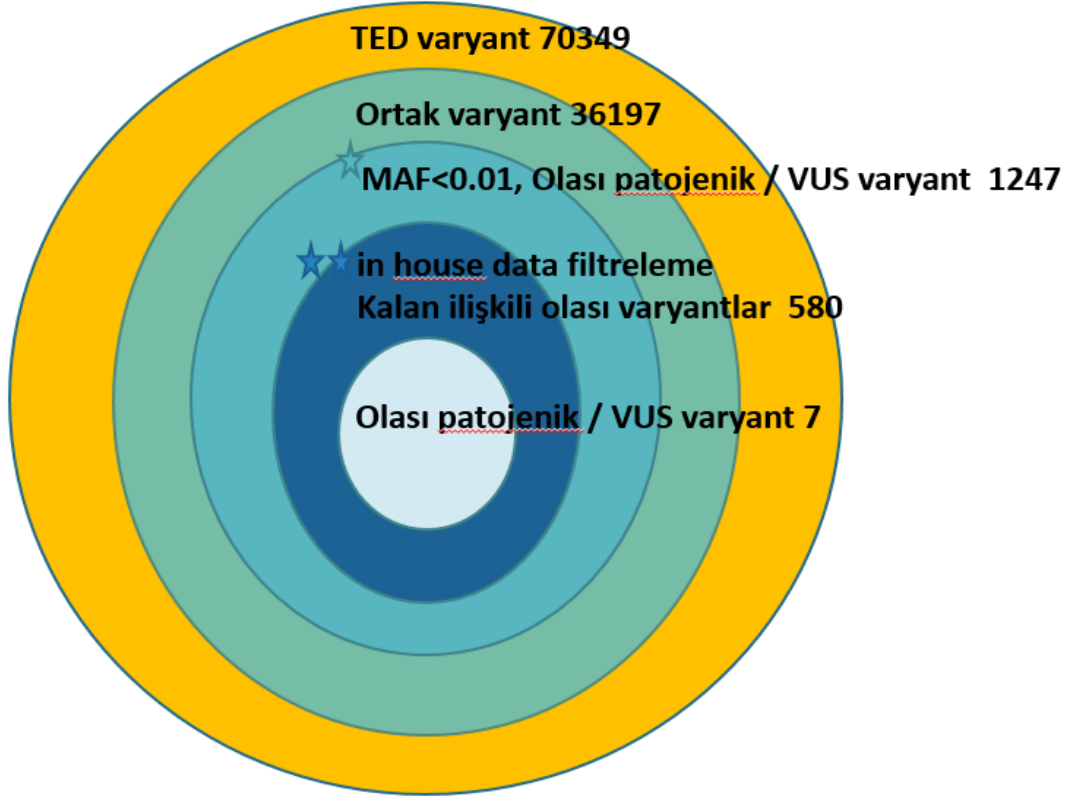
Tablo 29; TED çalışmasında SEP#15 ve etkilenmiş kuzende saptanan varyant sayıları

TED	Varyant sayısı
Toplam	70349
III:1 ve III:2 de ortak varyantlar	36197
III:1	17723
III:2	16429



Şekil 76; SEP#15 ailesindeki varyantların bireylerdeki dağılımı

III:1 ve III:2 de TED ile saptanan varyantlar Şekil 76’da gösterilmektedir.



Şekil 77; SEP#15 ailesinde TED’de filtrelenen varyantların gösterimi



MAF<0.01, İmprinted Genler (102 gen), Literatür taraması ile puberte ilişkili genlerin araştırması (142 gen), Hipofiz ilişkili genler (52 gen) ile filtrelemeler

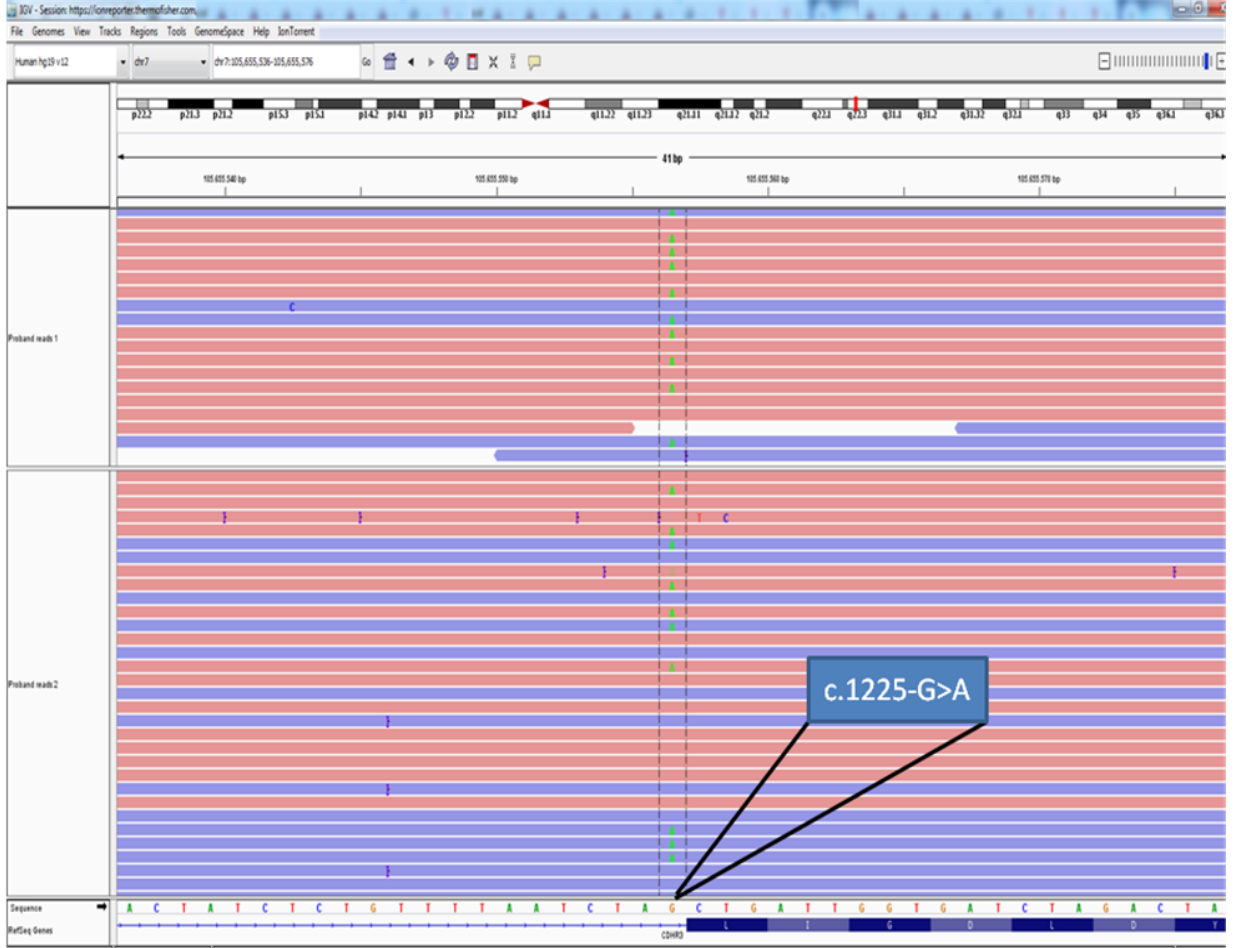


in house 110 Ekzomda data filtreleme ile ilişkili olası varyantlar

Tablo 30; SEP#15 ailesinde TED çalışmasında elde edilen varyantların filtrelenmesi ardından belirlenen patojenik/olası patojenik/VUS statüsündeki veya en az iki *in silico* analizde zararlı öngörüsünde bulunan varyantlar

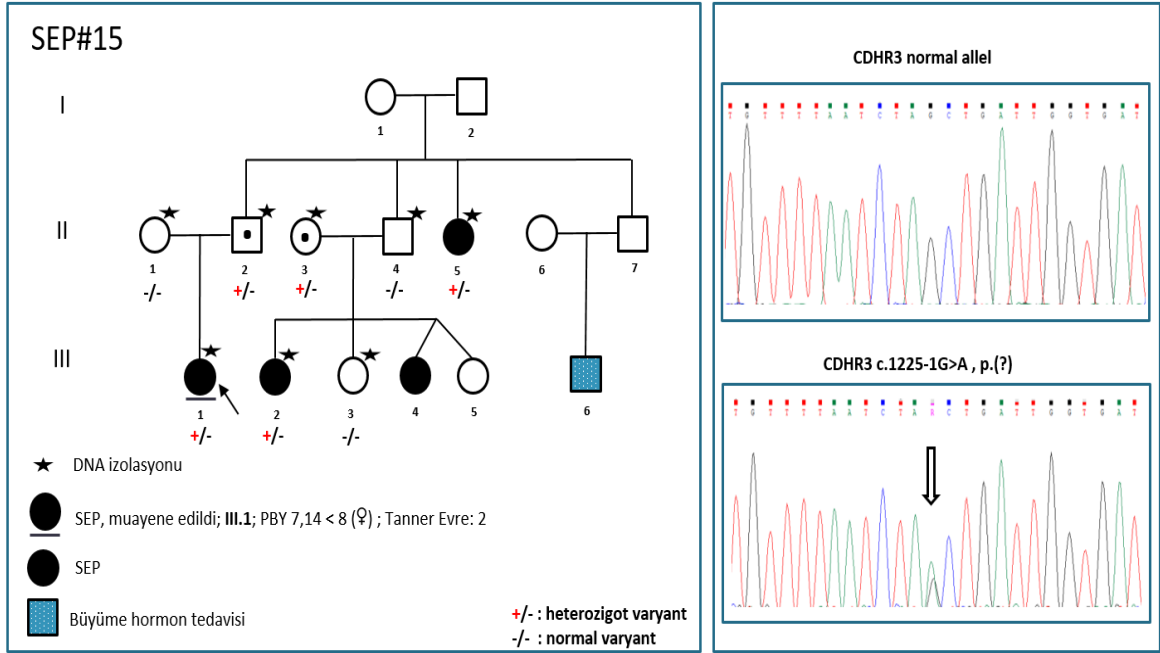
Gen/Lokasyon/ Transkript no/peptid no	Varyant Nükleotid/peptid	dbSNP/ GnomAD frekansı; ekzom/genom	Varyant sınıfı	Patojenite Skoru	GnomAD pLI	In silico analiz			
						PolyPhen (HumVar) (0-1)	SIFT (cutoff=0.05)	PROVEAN (cutoff=-2.5)	Mutation Taster
CDHR3/7q22.3/ NM_152750.5/ NP_689963.2	c.1225-1G>A / p.(?)	rs767624442/ 0.00002607/ 0.00003184	VUS	6/6	0	-	-	-	Hastalık yapıcı
NUMBL/ 19q13.2/ NM_004756.5/ NP_004747.1	c.1314_1337del GCAGCAGCAGCA GCAACAGCAGCA p.(Gln439_Gln446del)	rs781582699/ 0.00005459/ 0.0002057	VUS	-	1	-	-	-	Polimorfizm
SLC35F6/2p23.3/ NM_017877.4/ NP_060347.2	c.925G>T p.(Ala309Ser)	rs755280937/ 0.00003182/-	VUS	6/20	0	Benign 0.104	Tolere (0.140)	Nötr (-1.48)	Hastalık yapıcı
FCRL2/1q23.1/ NM_030764.4/ NP_110391.2	c.605T>C p.(Ile202Thr)	rs16839100/ 0.0002762/ 0.0001274	Olası zararsız	4/22	0	Benign (0.090)	Zararlı (0.003)	Zararlı (-2.60)	Polimorfizm
CCDC112/ 5q22.3/ NM_001040440.3/ NP_001035530.1	c.895G>T p.(Ala299Ser)	rs754812062/ 0.00002845/-	VUS	0/21	0,85	-	Tolere (0.685)	Nötr (0.41)	Polimorfizm
ZNF296/19q13.32/ NM_145288.2/ NP_660331.1	c.371A>G p.(Glu124Gly)	-	VUS	1/20	0.96	Benign (0.011)	Tolere (0.521)	Nötr (0.11)	Polimorfizm
PARP14/3q21.1/ NM_017554.2/ NP_060024.2	c.1973A>C p.(Tyr658Ser)	rs942512679 0.000008846	VUS	1/20	0.01	Benign (0.198)	Tolere (0.349)	Zararlı (-3.29)	Polimorfizm

SEP#15 indeks olgu ve etkilenmiş kuzende saptanan değişiminin IGV görüntüsü, aile ağacı ve diğer bulgular tablolar (**Tablo 29 – 30**) ve şekiller (**Şekil 71 – 79**) üzerinde gösterildi.



Şekil 78; TED analizinde SEP#15 ailesinde *CDRH3* geninde saptanan c.1225-1G>A değişiminin IGV görüntüsü.

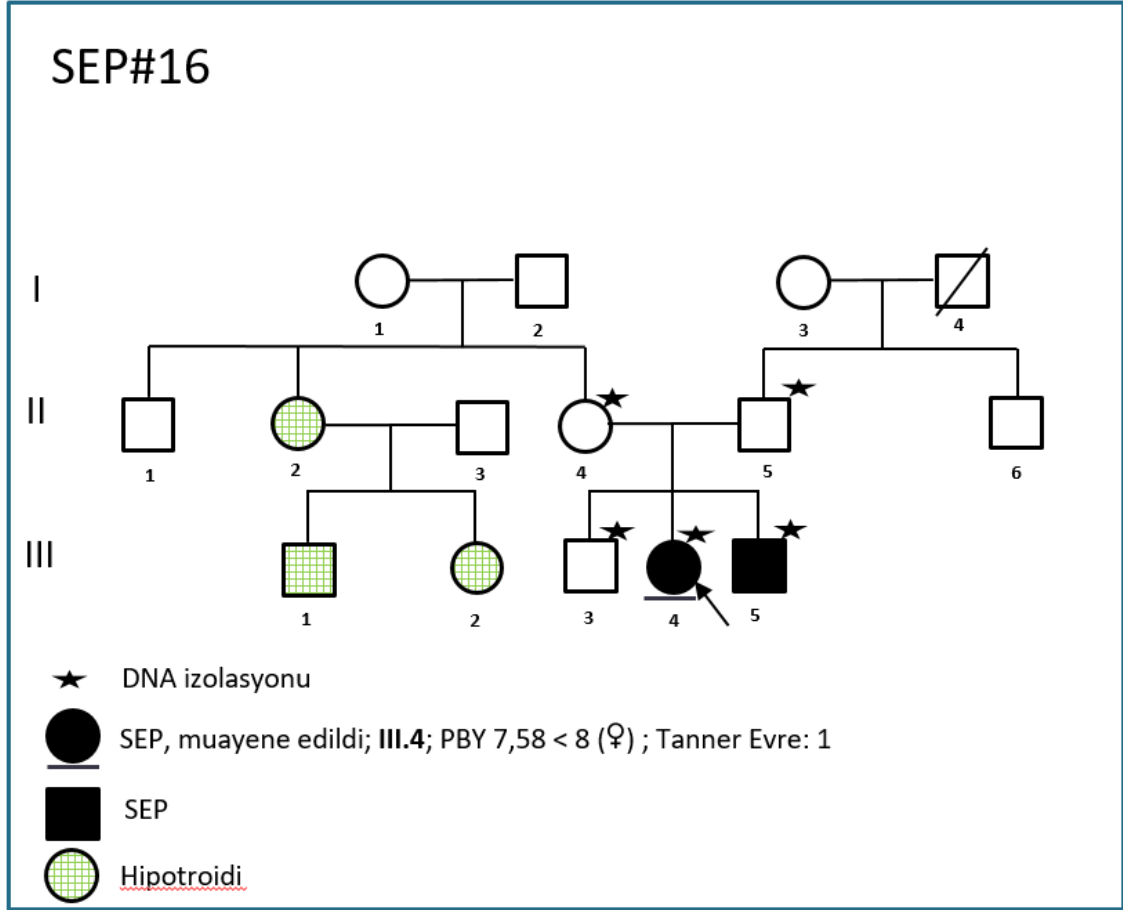
CDHR3 varyantının SD ile doğrulanması ve aile bireylerindeki dağılımı **Şekil 79**'da gösterilmiştir.



Şekil 79; SEP#15 aile ağacı ve CDHR3 varyantının ailedeki segregasyonu. CDHR3 geninde intron 9 da saptanan c.1225-1G>A kırılma bölgesi değişiminin aile ağacı üzerinde gösterimi. II.2, II.3, II.5, III.1 ve III.2 bireylerinde saptanan değişim II.1, II.4 ve III.3 de saptanmamıştır.

4.2.16. SEP#16 olgu ve ailesi

Aralarında akraba evliliği bulunmayan anne-babanın iki erkek (III:3 ve III:5) ve bir kız çocuğundan (III:4) ikisi SEP tanısı almıştı. Bunlardan kız olgu indeks olgu olarak incelemeye alındı. SEP#16 indeks olgusunda ilişkili 5 gende SD analizinde klinik ilişkili herhangi bir patojenik varyant saptanmadı, III:5 in klinik muayenesinin tamamlanarak ailede TED analizi planlandı (Şekil 80).

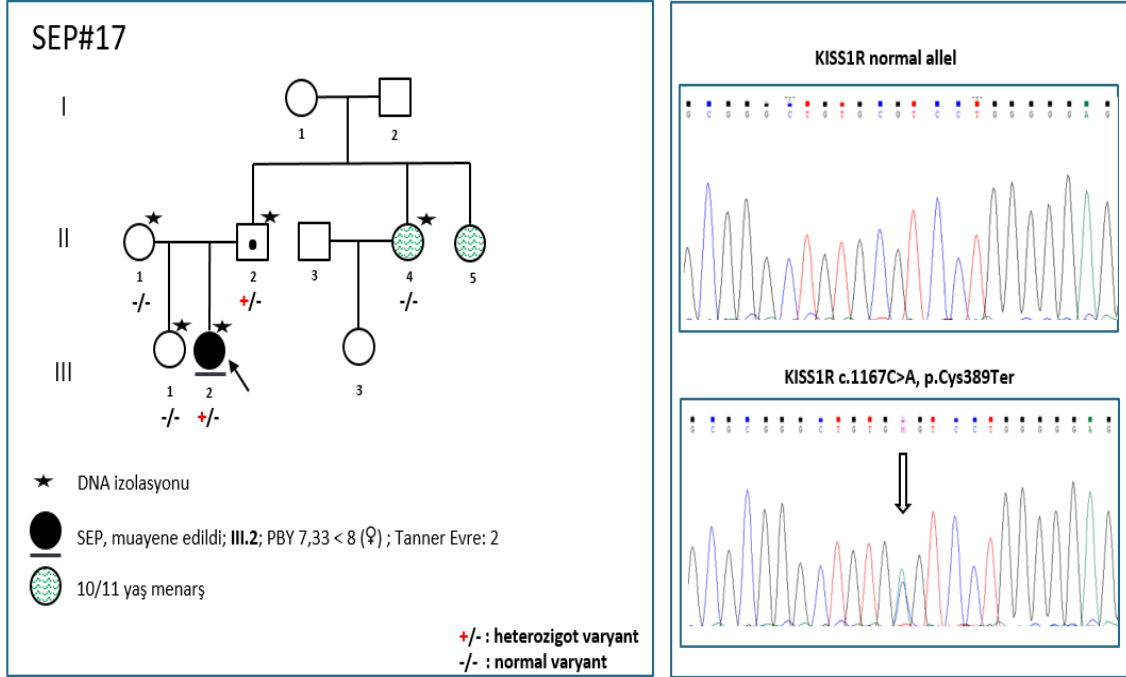


Şekil 80; SEP#16 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi

4.2.17. SEP#17 olgu ve ailesi

Aralarında akraba evliliği bulunmayan anne-babanın iki kızından birinde (III:2) SEP tanısı konulmuştu. İndeks olgunun iki halasında menarş yaşı 10/11 ile olası SEP tanısı düşünülerek aile bu çalışmaya dahil edildi. İndeks olguda ilişkili genlerde yapılan analizde *KISS1R* geninde olası patojenik daha önce tanımlanmış bir varyant saptandı. İndeks olguda *FGFR1* geninin literatürde bu klinikle ilişkilendirilmesinden dolayı *FGFR1* geni de dizilendi ancak herhangi bir patojenik varyant saptanmadı. *KISS1R* geninde ekzon 5’de c.1167C>A (p.(Cys389Ter)) heterozigot varyantı için aile içi segragasyon analizi yapıldığında babasında (II.2) da aynı varyant saptandı. İndeks

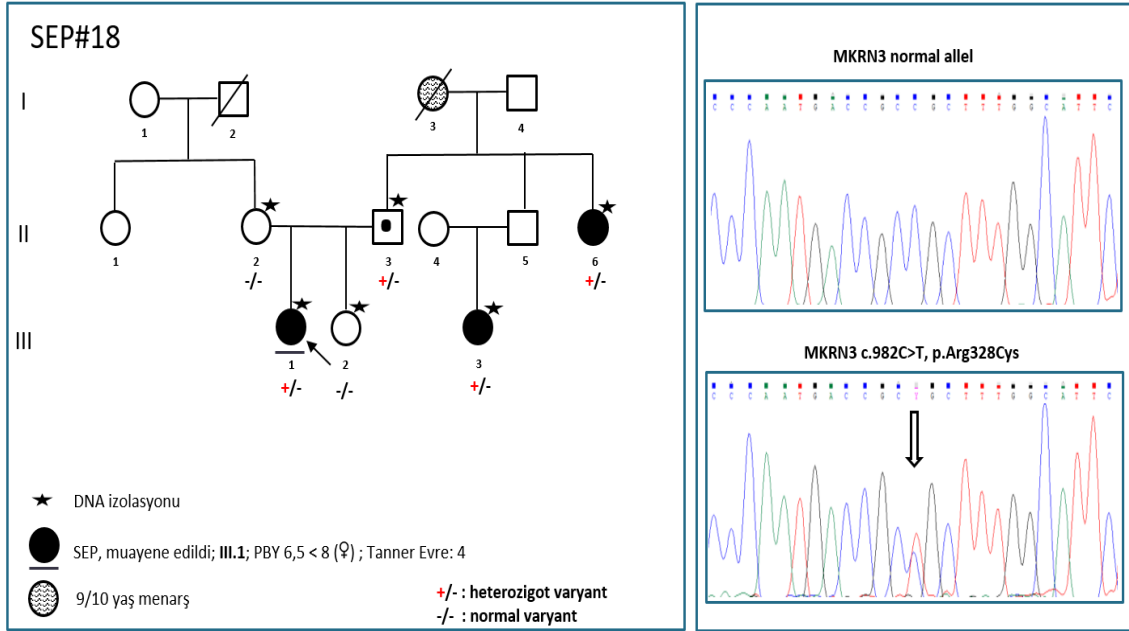
olgunun annesi (II.1), etkilenmemiş kızkardeşi (III:1) ve menarş yaşı 10/11 olan halada (II:4) bu varyant saptanmadı (**Şekil 81**). Ailede segregasyon çalışmasının genişletilmesi ve menarş yaşı 10/11 olan diğer halanın (II:5) taranması planlandı.



Şekil 81; SEP#17 aile ağacı ve KISS1R varyantının ailedeki segregasyonu.

4.2.18. SEP#18 olgu ve ailesi

Aralarında akrabalık bulunmayan anne-babanın biri etkilenmiş (III :1) diğeri ise etkilenmemiş iki kızı bulunmaktaydı. Ailenin verdiği bilgiye göre babaanne (I:3), hala (II:6) ve amcanın kızında (III :3) SEP bulgusu mevcuttu. İndeks olguda ilişkili beş gende SD gerçekleştirildi. Bu genlerden *MKRN3* geni ekzon 1’de daha önce tanımlanmış c.982C>T (p.(Arg328Cys)) varyantı heterozigot formda saptandı. Bu varyant için yapılan segregasyon çalışmasında indeks olgunun babasının (II:3) ve etkilenmiş hala ve kuzenin de varyantı taşıdıkları belirlendi. İndeksin annesi ve etkilenmemiş sağlıklı kardeşi ise varyantı taşımamaktaydı. Aileye genetik danışma verildi (**Şekil 82**).



Şekil 82; SEP#18 indeks ve aile bireylerinin aile ağacı üzerinde gösterimi. SEP#18 olgusunda saptanan MKRN3 gen varyantının ailedeki dağılımı; II:3, II:6, III:1, III:3’de heterozigot saptanan varyantı II:2 ve III:2 bireyleri taşımamaktadır.

Serimizde *KISS1* geninde saptanan polimorfik varyantlar:

Serimizde *KISS1* geninde herhangi bir patojenik değişim saptanmadı. Ancak daha önce literatürde SEP ile ilişkilendirilen bazı polimorfik varyantların bulunduğu gözlemlendi. Bu varyantlar ve olgu grubumuzda *KISS1* geninde saptanan diğer değişimler **Tablo 31**’de gösterildi (16).

Tablo 31; SEP olgularında *KISS1* geninde saptanan polimorfik varyantlar ve literatürde bildirilmiş SEP ilişkili polimorfik varyantlar.

SEP OLGU NO	<i>KISS1</i> POLİMORFİZM (2015 Mazahari)				BU ÇALIŞMA	
	5'UTR	5'UTR	5'UTR	EKZON 2	EKZON 3	EKZON 3
	c.-148 T>A	c.-145delT (rs5780218)	c.-89G>A (CR156684; rs3924587)	c.58G>A,p.(E20K) (CM156681; rs12998)	c.107A>G; p.(Q36R) (rs35431622)	c.242C>G; p.(P81R)(rs4889)
1	-	Heterozigot	-	-	-	Heterozigot

2	-	-	-	-	-	-
3	-	Heterozigot	-	-	-	Homozigot
4	-	-	-	-	Heterozigot	-
5	-	Heterozigot	Heterozigot	-	Heterozigot	-
6	-	Heterozigot	-	-	-	Heterozigot
7	-	Homozigot	-	-	-	-
8	-	Heterozigot	-	-	-	Heterozigot
9	-	Homozigot	-	-	-	Homozigot
10	-	-	-	-	-	-
11	-	Heterozigot	-	-	-	Heterozigot
12	-	Heterozigot	-	-	-	Heterozigot
13	-	-	-	-	-	-
14	-	Homozigot	Heterozigot	-	-	-
15	-	Heterozigot	Heterozigot	-	-	Heterozigot
16	-	Heterozigot	-	-	-	-
17	-	Homozigot	Heterozigot	Heterozigot	-	Heterozigot
18	-	Heterozigot	-	-	-	-

5. TARTIŞMA

Pubertal gelişim, çocukluktan yetişkinliğe geçişi gösteren ve nihayetinde bireyin üreme yeteneğiyle sonuçlanan önemli bir biyolojik süreçtir. İnsanlarda ergenlik, HHG ekseninin aktivasyonu ile başlamaktadır, GnRH'nin pulsatil salgılanması ile gonadal büyümeyi, gametogenezi ve steroidogenezi uyaran iki gonadotropin, LH ve FSH ön hipofizden pulsatil olarak salgılanır. Bu sayede cinse bağlı ikincil özelliklerin gelişimi ortaya çıkar (9,18). HHG ekseninin erken aktivasyonu kızlarda 8 yaş öncesinde telarş veya erkeklerde 9 yaşından önce testis büyümesi, santral erken puberte ile sonuçlanır. SEP için yaş sınırı, bazı çalışmalarda kızlar için beyazlarda 8, Hispaniklerde ve Afrika kökenli Amerikalılarda ise 7,5 yaş olarak, erkekler için tüm etnik gruplarda 9 yaş olarak kabul edilmektedir (44). SEP, serebral konjenital malformasyonlar, edinsel travmalar veya genetik değişikliklerle de ilişkili olabilen puberte bozukluğu olarak değerlendirilmektedir. Erken yaştaki menarşın, meme kanseri, kardiovasküler hastalıklar, depresyon, davranış bozuklukları, diyabet gibi hastalıklar için artmış risk oluşturduğu da bildirilmektedir. Bu nedenle puberte başlangıcını kontrol eden mekanizmaların anlaşılması önem taşımaktadır (1,12,18,42).

Genetik süreç pubertal anahtarın bir parçası olarak da kabul edilmektedir. Günümüzde beş farklı gen SEP ile ilişkilendirilmiştir (10,12). *KISS1* ve *KISS1R* genlerindeki fonksiyon kazanım mutasyonlarının SEP'in genetik nedeni olduğunun anlaşılmasını takip eden yıllarda bu genlerin sporadik olgularla ilişkisi çok nadir olarak bildirilmiştir (12,27). *MKRN3* ve *DLK1* genlerindeki fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar ise hem sporadik hem de ailevi olgularda gösterilmiştir (12,40). Diğer bir gen olan *PROKR2*'de ise bugüne kadar sadece bir olguda mutasyon gösterilmiştir (39).

SEP ile ilişkisi gösterilen ilk gen *KISS1R*'dir (24). Günümüzde *KISS1* geninin peptid ürünü olan kisspeptin ve reseptörü *KISS1R* sinyal kompleksi, pubertal aktivasyonun temel bekçileri olarak değerlendirilmektedir. İnsanlarda ve hayvan modellerinde yapılan fizyolojik ve farmakolojik çalışmalar, GnRH'ye bağımlı LH sekresyonu için kisspeptinin bilinen çok güçlü bir regülatör olduğunu göstermektedir (18,35). 2008 yılında Teles ve ark.'ı SEP'nin patogenezi araştırmak amacıyla 13'ünün ailesel olduğu toplam 67 Brezilyalı SEP'li olguda *KISS1R* genini incelemişlerdir. Bu çalışmada evlat edinilmiş SEP'li bir kız olguda *KISS1R*'de yanlış anlamalı değişime yol

açan bir varyantı (p.(Arg386Pro)) heterozigot formda saptamışlardır. *In vitro* çalışmalar p.(Arg386Pro)'nun, hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu gösterecek nitelikte, uzun süreli hücresel yanıtın oluşmasına ve dolayısıyla kisspeptine yanıt olarak artan GnRH'nin pulsatil salınımına neden olduğu göstermiştir (24). Bianco ve ark.(2011) p.(Arg386Pro) varyantının, hücre içi plazma membran trafiğinde kisspeptine verdiği yanıtın uzamasını yabanıl tip ile karşılaştırmışlar ve varyantın membran trafiğini etkilemediğini ancak KISS1R degradasyonunu azaltarak kisspeptine duyarlılığı uzattığı sonucuna varmışlardır (97). Bu gendeki fonksiyon kaybı mutasyonları ise 2003'den beri OR kalıtım görülen anosmili ya da anosmisiz hipogonadotropik hipogonadizm veya Kallmann Sendromu ile ilişkilendirilmiştir (34,98,99).

Teles ve ark'larının (2008) çalışmasından sonra *KISS1R* geninde SEP ile ilişkili başka olgu ya da patojenik varyant bildirilmemiş ancak bazı polimorfizmlere dikkat çekilmiştir. Bu polimorfizmler arasında Luan ve ark.'ı (2007) ekzon 4'deki c.587C>A (p.(Pro196His), rs572007403) varyantını 272 idiyopatik SEP'li olgu kohortu içinden raslantısal olarak belirlenen 7.3 ± 0.9 yaş aralığındaki 24 olguda *KISS1R* geninin taranmasıyla bir olguda saptadıklarını bildirmişlerdir (100). 2018 yılında ise Zhou ve ark.'ı 148 idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (İHH) olgusu ve 100 sağlıklı kontrolde 83 geni YND ile tarayarak yaptıkları bir çalışmada bu varyantı bir Çinli erkek olguda göstererek İHH ile ilişkilendirmişlerdir (101). Bu iki çalışmanın çelişkili yorumları nadir p.(Pro196His) varyantının (gnomAD v2.1.1, 64:102.665 birey) klinik ilişkisinin kesinlik kazanmadığını sergilemiştir. Bu varyant serimizde saptanmamıştır.

2017 yılında Oh ve ark. Koreli 199 SEP olgusu ve 99 kontrol yaptıkları çalışmada *KISS1R*'de ekzon 5'de c.1091T>A (p.(Leu364His), rs350132) değişimini SEP olgularında (%30,7), kontrole (%22,2) göre anlamlı derecede yüksek saptadıklarını bildirmişlerdir (102). Aynı varyantın 19 SEP olgusunun 10'unda homozigot ve beşinde heterozigot formda saptanarak olgu gruplarındaki frekansının %79 olduğu Pagani ve ark. (2020) tarafından, bildirilmiştir (35). Bu değişim çalışmamızdaki 10 olguda homozigot, 8 olguda ise heterozigot olarak görülmüş ve frekansı %100 olarak belirlenmiştir. Varyantın genom verisindeki (gnomAD v3.1.1) frekansı 0.7959 olarak bildirilmiştir. Yüksek popülasyon sıklığı varyantın SEP kliniği ile direkt ilişkisini desteklememektedir.

Çalışmamızda *KISS1R* geninde iki olguda (SEP#06 ve SEP#17) iki farklı varyant gözlemlendi. SEP#06'da gösterilen c.565G>A (p.(Ala189Thr)) değişimi literatürde izole GnRH eksikliği ile giden ve İHH'de (MIM#147950; Kallmann sendromu, KS) gösterilmiştir (103). Monogenik veya oligogenik faktörlerin rol aldığı izole GnRH eksikliği, sporadik olabileceği gibi OD, OR ya da X'e bağlı kalıtım ile de görülmektedir. Hastalık, normal koku alma duyusu (normosmik İHH; nİHH) veya anosmi/hiposmi KS ile ve değişken olarak tek taraflı böbrek agenezisi, iskelet anomalileri, yarık damak, orta hat malformasyonları ve işitme kaybı gibi ek fenotiplerle ilişkili olabilmektedir. İzole GnRH eksikliği, hipotalamik GnRH'nın salgılanmasındaki veya hareketindeki kusurlar nedeniyle, infertilite, puberte yokluğu ya da geç puberteye neden olarak kendini fenotipte gösterebilmekte ve bazen klinik olarak İHH tanısı ile de örtüşebilmektedir (103). Literatürde ilk olarak erkek bir KS olgusunda saptanan varyant (103) daha sonra yapılan farklı bir çalışmada ise nİHH tanılı kadın bir olguda ve başka bir çalışmada da GnRH eksikliği olan bir kadında *FGFR1* geni c.682T>G (p.(Tyr228Asp)) değişimi ile birlikte bildirilmiştir (96,104). Literatürde bildirilmiş *FGFR1* geninde saptanan bu yanlış anlamalı değişim İHH ile ilişkili ve patojenik olarak tanımlanmıştı (105). Olgumuzda bu gende tüm gen dizi analizi gerçekleştirildi ancak herhangi patojenik bir varyant saptanmadı (106). SEP#06 olgu ve ailesinde *KISS1R*'de saptanan varyant için yapılan segregasyon çalışmasında öyküye göre etkilenmiş anne ve henüz bir yaşında olan kız kardeşin heterozigot taşıyıcı oldukları belirlendi. Etkilenmemiş baba ise varyantı taşıymıyordu. Bu sonuçlar *KISS1R* geninde gösterilen c.565G>A (p.(Ala189Thr)) varyantın SEP'le ilişkili olabileceğini desteklemiştir.

KISS1R geninde SEP#17 olgusunda saptanan 1167C>A; (p.(Cys389Ter)) değişimi polimorfizm veri tabanlarında yer alan (rs371771794) ancak toplumlarda nadir görülen (gnomAD, v2.1.1, 0.0003832) anlamsız bir değişimdir. Literatürde 116'sı KS, 132'si nİHH tanılı toplam 248 kadın olgunun dahil edildiği bir çalışmada GnRH eksikliği olan nİHH tanılı bir olguda saptanmıştır (96). Aynı değişim 2014'de Finlandiya'da yürütülen 34 KS'li ve 16'sı nİHH'li 50 olgunun ve 200 sağlıklı kontrolün dahil edildiği bir çalışmada bir erkek olguda *SEMA7A* geninde c.452C>T (p.Arg148Trp) değişimi ile birlikte gösterilmiştir. *SEMA7A* geni bir membran proteini olan semaphorin 7A'yı kodlamaktadır ve mutant farelerle yapılan bir çalışmada GnRH nöron sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (107). SEP#17 ailesinde yapılan segregasyon çalışmasında, olgunun babasının varyantı taşıdığı, anne ve kız kardeşinin

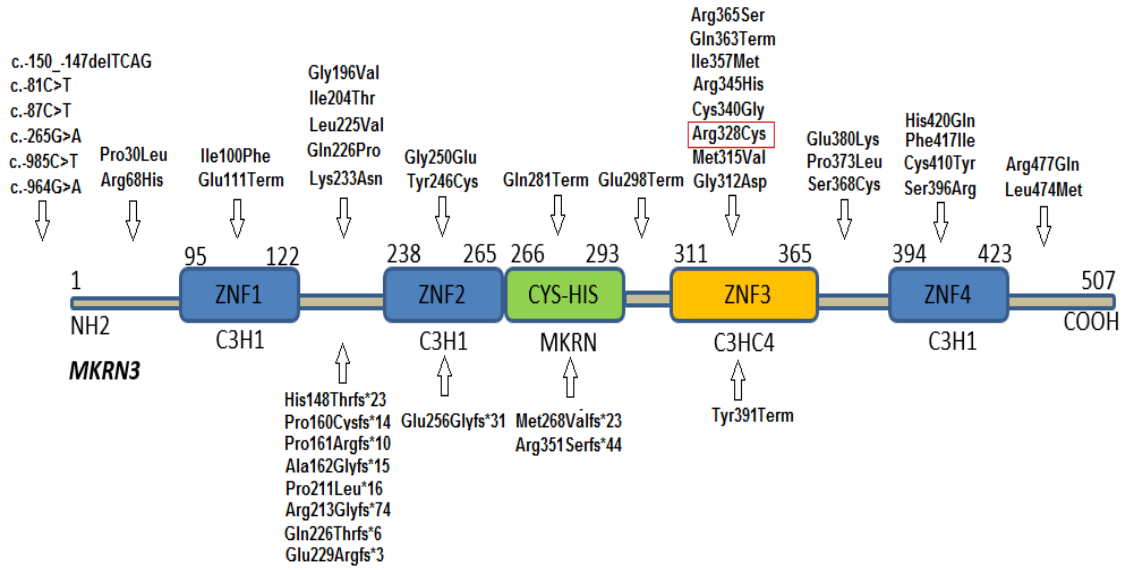
ise taşımadığı belirlendi. Menarş yaşı 11 olan indeksin halasının değişimi taşımadığı gösterildi. Bu olguda da *FGFR1* geni dizilendi ve patojenik bir değişim saptanmadı. Bu sonuçlar, *KISS1R* geninde gösterilen 1167C>A; (p.(Cys389Ter)) varyantının SEP ile ilişkisini destekler nitelikte bulundu. Ancak SEP'in *KISS1R* ile ilişkisinin fonksiyon kazanımı temeline dayandırılması ve buna karşın SEP#17'deki varyantın fonksiyon kaybı niteliğinde olması, saptadığımız varyantın fonksiyon analizi çalışmasının önemli olduğu kanaatini oluşturdu.

KISS1 geninde bugüne kadar SEP ilişkili bildirilen tek mutasyon c.220 C>T (p.(Pro74Ser), rs587777843)'dir. Bu varyant, Silveira ve ark.'ın (2010) 83 SEP (77 kız ve altı erkek) olgusunda yaptıkları çalışmada sporadik 1,6 yaşındaki Brezilyalı erkek olguda heterozigot olarak saptanmıştır. Kemik yaşı 3 yaş ile uyumlu olguda, penis ve testis büyümesi, pubik kıllanma Tanner evre III, LH, FSH ve testosteron düzeyleri ergenlik ile uyumlu, nörolojik semptomu yoktu ve beyin MR bulguları normaldi. Segregasyon analizinde, varyantın olgunun menarş yaşı 10 olan (alt sınır) anne ve menarş yaşı normal anneannesinde heterozigot olarak bulunduğu, 400 kişilik kontrol grubunda ise saptanmadığı bildirilmişti (28). Nadir bildirilmiş olan bu değişim (gnomAD v2.1.1, 0.00001981) başka çalışmalarda olduğu gibi (16,108) olgu grubumuzda da saptanmamıştır. Serimizde *KISS1* geninde klinik ilişkili herhangi bir varyant saptanmamış olması SEP'de *KISS1* gen mutasyonlarının sık görülmediğini desteklemektedir.

SEP olgularında bugüne kadar *KISS1* geninde tek bir mutasyon bildirilmesine rağmen, çeşitli literatürlerde bu gendeki bazı polimorfik varyantların SEP ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Luan ve ark.'ları (2007) 272 SEP kliniği olan Çinli kızdan oluşan grupta yaptıkları çalışmada 4'ü intergenik, 2'si ekzon 1'de kodlama yapmayan bölgede ve 2'si de kodlama yapan ekzon 3'de heterozigot yanlış anlamlı iki değişim (p.(Pro110Thr) ve p.(ProP81Arg)) olmak üzere toplam 8 polimorfik varyant bildirmişlerdir (33). 2010 yılında ise Ko ve ark. 101 Koreli kızda aynı genin taranmasıyla 3'ü yanlış anlamlı değişim (p.(Glu20Lys), p.(Pro110Thr) ve p.(Pro81Arg)) toplamda 8 polimorfik varyant bildirmiştir (109). Mazaheri ve ark.'nın (16) 2015 yılında idiyopatik EP'li 33 olgu ve 30 kontrol ile yaptıkları çalışmada, dokuz olguda (4 kız, 5 erkek) (%27,5) üçü UTR bölgesinde (c.-148T>A, c.-145delT; rs5780218, c.-89G>A; rs3924587)) bir değişim ise ekzon 2'de (c.58G>A;p.(Glu20Lys), rs12998))

olan polimorfik varyantların klinik ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu varyantlardan c.-148T>A serimizdeki olgularda saptanmazken, c.-145delT serimizde 14 olguda (%77,7), c.-89G>A serimizde dört olguda (%22,2), c.58G>A ise bir olguda (%0,5) gösterilmiştir. Bu varyantların gnomAD'deki allel frekansı genom verilerinde rs5780218 için 0.7449, rs3924587 için 0.1178 ve rs12998 için 0.04179 olarak bildirilmektedir. Olgularımızda gösterilen bu *KISS1* polimorfizmlerinin allel frekanslarının yüksek olması nedeniyle olası klinik ilişkisini dışladığı kanaatindeyiz.

Menarş yaşı kadınlarda ergenliğin bir göstergesi olarak bilinmektedir. Pubertal zamanlamayı belirleyen mekanizmaların ve hastalık riskiyle bağlantıların belirsizliğini aydınlatmak amacıyla Perry ve ark. (2014) 57 GWAS çalışmasındaki verilerin metaanalizi sonrasında Avrupa kökenli 182.416 kadında menarş yaşıyla ilgili 106 genomik bölgeden 123 istatistiksel olarak ilişkili varyant sinyali alındığını bunlar arasında üç farklı imprinted gen bölgesinin (*DLK1-WDR25*, *MKRN3-MAGEL2* ve *KCNK9*) de yer aldığını göstermiştir (110). Çalışmamızda, bir olguda (SEP#18) maternal imprinted bir gen olan *MKRN3*'de literatürde bildirilmiş olan (27) heterozigot yanlış anlamlı c.982C>T (p.(Arg328Cys), rs1264639964) mutasyon gösterildi. Segregasyon çalışmasında olgunun babasında, halasında ve kuzeninde de bu varyantın heterozigot formda bulunduğu belirlendi (**Şekil 83**). *MKRN3*'ün kodladığı Makorin ring finger protein 3'ün GnRH sekresyonu üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (111). Simon ve ark.'ları (2016) çalışmasında saptanan c.982C>T varyantının fonksiyon kaybına yol açtığı, *MKRN3* proteininin yapısını değiştirerek puberte kontrolünü yerine getiremediği ve HHG ekseninin prematüre aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (27). Çalışmamızda SEP#18 (III.1) ailesinde segregasyonun paternal kalıtımla izlenmesi literatürle uyumlu olmakla birlikte, varyantı heterozigot taşıyan ve SEP öyküsü olmayan babanın (SEP#18-II:3) parental kalıtımının incelenmesi ve paternal dedenin (I:4) varyantı taşımadığının gösterilmesi maternal imprinted bir gen olarak *MKRN3*'ün üç kuşaktaki öyküsünün sergilenmesi bakımından literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Bugüne kadar SEP olgularında *MKRN3* geninde 115 hastada 48 farklı mutasyon gösterilmiştir. Mutasyonların 26'sı yanlış anlamlı, dördü anlamsız, sekizi küçük delesyon, dördü küçük insersiyon, sekizi regülatör bölge ve biri de kompleks yeniden düzenlenme olarak bildirilmiştir (**Şekil 83**)(41,112,113).



Şekil 83; MKRN3 proteininde bildirilmiş değişimlerin şekil üzerinde gösterimi, çalışmamızda saptanan varyant kırmızı kare içerisinde gösterilmiştir (Montenegro (2020) ve Valaderes (2019))’den düzenlenmiştir (41).

MKRN3'teki fonksiyon kaybı mutasyonlarının farklı ülkelerdeki etnik gruplarda ailesel ve sporadik SEP olgularında belirlenmesi, pubertenin genetik düzenlemesinin anlaşılmasına önemli bir katkı sağlamıştır. Birden fazla bireyin etkilenmiş olduğu aile serilerinde yapılan çalışmalarda, *MKRN3* mutasyon frekansı %33 – 46 iken, sporadik olgularda yapılan çalışmalarda ise bu oran %0,4 - 3,8 olarak bildirilmiştir (10,12,27). İtalya ve Bulgaristan'dan bildirilen sporadik olgudan oluşan küçük olgu gruplarında ise prevalans %0 - 20 arasında değişmektedir (41,56,114). SEP tanılı olgularda *MKRN3* mutasyon prevalansının %9 olduğunu ve kızların erkeklere göre daha sık etkilendiğini bildirmektedir(112). SEP'li olgularda *MKRN3* mutasyon frekansının belirlenebilmesi için farklı coğrafi bölgelerden daha fazla olgu ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu ileri sürülmektedir(41).

Abreu ve ark.'ları, 2013 yılında SEP tanılı 15 proband ve ailesinde 25 bireyde yaptıkları TED analizinde, ilk olarak *MKRN3* geninde beş ailede dört farklı heterozigot fonksiyon kaybı mutasyonu göstermişlerdir. 32 erken puberte öyküsü olan (27 kız, 5 erkek) ve sekiz normal puberte zamanlaması olan (5 kız ve 3 erkek) birey değerlendirilmiştir. Çalışmada, iki erkek olguda c.482dupC (p.(Ala162Glyfs*15)), üç

kız olguda ise sırasıyla çerçeve kaymasına neden olan c.1172dupA (p.(Tyr391Ter), ve (27)c.637delC (p.(Arg213Glyfs*74)) mutasyonları ile bir yanlış anlamlı c.1095G>T (p.(Arg365Ser)) mutasyonu saptanarak *MKRN3*'de mutasyon saptama oranı %15,6 (5 olgu) olarak bildirilmiş, etkilenen olguların tamamının taşıdıkları mutasyonun maternal imprinted kalıtım modeline uygun olduğu da gösterilmiştir. Aynı makalede, model organizma olarak seçilen üç erkek ve üç dişi farenin arkuat nükleuslarının belli postnatal günlerde hipotalamuslarındaki mRNA seviyeleri gerçek zamanlı PZR ile ölçülerek değerlendirilmiş ve prepubertal farelerdeki *Mkrn3* anlatımı yüksek saptanırken, puberte başlangıcıyla anlatımın hızla azaldığı ve puberte sonrasında da düşük seviyede kaldığı gösterilmiştir. *Mkrn3* anlatım seviyesinin azalmasının *Kiss1* ve *Tac3* anlatım seviyesinin artması ile korelasyon gösterdiği ve saptanan değişimlerin puberteye yol açtığı yönündeki görüşlerin desteklendiği bildirilmiştir (40,115).

MKRN3 geninde SEP olgularında ilk mutasyonun tanımlanmasından sonra yeni mutasyonlar tanımlanmıştır. 2014 yılında Schreiner ve ark. (2014), altısı ailesel ve biri idiopatik SEP'li olgu grubu ile çalışmışlar ve Almanya kökenli iki ailevi SEP olgusunun her ikisinde de saptanan farklı varyantların baba kökenli olduğu gösterilmiştir. Bunlardan ilki Abrue ve ark.'nın daha önce tanımladığı çerçeve kaymasına yol açarak erken dur kodonu oluşturan c.482dupC (p.(Ala162Glyfs*15)) mutasyonu, ikincisi trunke protein oluşuma neden olması beklenen c.331G>T (p.(Glu111Ter)) mutasyonudur (53).

Aynı yıl Macedo ve ark.'nın 207 kız ve sekiz erkek olgudan oluşan çok merkezli çalışmasında, Brezilyalı 8 kız olguda 5 farklı mutasyon (dördü çerçeve kayması ve biri yanlış anlamlı mutasyon) bildirilmiştir. Bu olguların beşinde yapılan segregasyon analizinde saptanan değişimin paternal kalıtıldığı gösterilmiştir. SEP fenotipinin, *de novo* delesyon, maternal uniparental dizomi veya imprinting hataları gibi nedenlerle *MKRN3* genindeki fonksiyon kaybından kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmak amacıyla, *MKRN3* geninde mutasyon saptamadıkları, ailesel ve sporadik SEP'li 52 olguyu kromozom 15q11'in metilasyona özgü multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MS-MLPA) ile araştırmışlar ancak çalışmada, 15q11 lokusunda hiçbir kopya sayısı değişikliği veya metilasyon anormalliği gösterememişlerdir (49). MRC-Holland firmasının MS-MLPA için geliştirdiği, ME028-C1 problemleri PWS/AS bölgesi (15q11-13), *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNRPN*, *UBE3A*, *ATP10A*, *GABRB3*, *OCA2* genleri ile eşleşen oligonükleotidlerden oluşmaktadır (67). Detaylı incelendiğinde

metilasyon bölgelerine özel hedef HhaI enzim kesim bölgesi içerisinde *MKRN3* genine özgü kesim bölgesinin bulunmadığı ancak MLPA delesyon/duplikasyon araştırılması için ekzon 1 c.786-857 pozisyonları üzerinde yerleşik iki ayrı prob tasarlandığı anlaşılmaktadır. Bugüne kadar literatürde taranan hiçbir olguda MS-MLPA ile değişim saptanmamıştır. Bu tekniğin erken pubertenin genetik ilişkisini göstermesi bakımından zayıf ölçekte kaldığı düşünülmüştür.

2015 yılında Danimarka’da yapılan bir çalışmada ise daha önce *KISS1* ve *KISS1R* genlerinde mutasyon saptanmamış, 29 idiyopatik SEP olgusunda *MKRN3* geni dizilenmiştir. Danimarka’da yaşayan, Kafkas kökenli anne ve baba arasında akrabalık bulunmayan 6 yaşında puberte başlamış bir kız olguda c.1034G>A (p.(Arg345His)) değişimini heterozigot olarak saptamışlardır. Aynı değişim olgunun babasında ve erken puberte kliniği olan erkek kardeşinde de gösterilmiştir (116).

2016 yılında İspanya’dan bildirilen bir çalışmada, 20 idiyopatik SEP olgusu (19 kız, bir erkek) klinik ekzom ile araştırılmış ve Latin Amerika kökenli bir kız olguda *MKRN3* geninde heterozigot c.203G>A (p.(Arg68His)) mutasyonu saptanmıştır. Bu çalışma ile kız olgular içinde mutasyon saptama oranı %0.05 olarak bildirilmiştir (26).

Simon ve ark. (2016), *KISS1* ve *KISS1R* genlerinde herhangi ilişkili bir varyant saptanmamış Fransız ve İtalyan kökenli 28’i ailevi ve 18’i sporadik, 45 kız ve bir erkek SEP olgusunu incelediklerinde ailevi olguların 13’ünde (%46), sporadik grupta ise bir olguda (%0,5) *MKRN3* geninde fonksiyon kaybına neden olan değişimler saptadıklarını bildirmişlerdir. Toplamda 46 olgunun 14’ünde saptadıkları varyant ile *MKRN3* varyant frekansının SEP’de %30 olduğu gösterilmiştir. İlişkili değişimlerin tamamı kız olgularda gösterilmiş olup ikisi çerçeve kayması ve beşi yanlış anlamlı tipinde olduğu bildirilmiştir. Bu grupta en sık saptanan varyant sekiz farklı ailede belirlenen c.482dupC (p.(Ala162Glyfs*15)) olmuş bir ailede ise c.802_803del (p.(Met268Valfs*23)) gösterilmiştir. Belirlenen heterozigot yanlış anlamlı beş mutasyonun dördü (c.943A>G (p.(Met315Val)), c.982C>T (p.(Arg328Cys)), c.1118C>T (p.(Pro373Leu)) ve c.89C>T (p.(Pro30Leu)) ailevi SEP olgularında, biri ise (c.737A>G (p.(Tyr246Cys)) sporadik olguda gösterilmiştir. Bu değişimlerin ailevi olguların sekizinde ve sporadik olguda paternal kalıtımla geçtiği gösterilmiştir. Ailevi olgu grubundan bir babada SEP öyküsü

bildirilirken, diğer sekiz babada ise öykü bulunmadığı raporlanmıştır (27). Çalışmamızda mutasyon saptanan olgumuzun ve literatürde aynı mutasyon saptanan indeks olgu ve etkilenmiş kız kardeşin klinik ve hormonal verileri **Tablo 32**'de gösterilmiştir. Puberte başlangıç ve başvuru yaşının uyumlu olduğu görülmektedir.

Tablo 32; MKRN3 geninde ilişkili varyant saptanan olgumuz ile aynı varyantın gösterildiği literatürdeki olgunun klinik verilerinin karşılaştırması (Simon (2016)'dan düzenlenmiştir)

Olgu no	Puberte başlangıç yaşı	Başvuru yaşı	Tanner Evre	VKI SDS	Uterus uzunluğu (mm)	Bazal LH (IU/l)	Pik LH (IU/l)	Bazal FSH (IU/l)	Pik FSH (IU/l)
*indeks olgu	6.0	7.8	3	-0.3	46	2.3	28	5.1	11.5
*etkilenmiş kızkardeş	7.0	7.8	3	-0,5	37	1.1	27	2.1	14
**SEP#18 olgusu	6.5	7.2	4	0,3	33	0,2	15.1	7.8	11

*Simon 2016, **Bu çalışma

Serimizde bir olguda *MKRN3* geninde belirlenen yanlış anlamlı c.982C>T (p.(Arg328Cys)) değişimi bu gende en sık mutasyon saptanan ikinci domain (9/48, % 18.7) olan C3HC4 halka parmak motif bölgesi üzerinde (**Şekil 82**) yer almaktadır. Bu domain E3 ubikuitin-ligaz aktivitesi ve RNA bağlanması ile ilgili olan fonksiyonel olarak önemli bölgelerdir (41,42,117). Bu domain bölgesi üzerinde sıklıkla yanlış anlamlı ve anlamsız değişimler kümelenmiş olmasına rağmen çerçeve kayması mutasyonları bu domainde henüz bildirilmemiştir. İlginç olarak çerçeve kaymasına yol açan mutasyonlar ise sıklıkla amino terminal bölgesindeki iki C3H1 çinko parmak motifi arasındaki ilmek bölgesinde (123.aa-237.aa) yer almaktadır (**Şekil 82**). Günümüzde bu gende bildirilen 48 mutasyonun en sık kümelendiği ZNF1-ZNF2 domainleri arasında yer alan bu bölgede 13 (%27) mutasyon yer almaktadır. Bunların sekizi çerçeve kayması ile protein yapısını etkileyerek fonksiyon kaybına yol açan değişimler, diğer beşi ise yanlış anlamlı mutasyonlardır (41,113). Aynı ilmek bölgesi üzerinde mutasyon bildirilen çalışmalardan biri de Türkiye'den Şimşek ve ark. (2017) tarafından paylaşılmıştır. Çalışmada TED tekniği uygulanan 31 olgudan oluşan iki

ailede altı olguda *MKRN3* geninde iki farklı mutasyon saptanmıştır (118). Bu mutasyonlardan ilki bir ailede iki kız kardeş ve etkilenmiş kuzende saptanan ve daha önce literatürde bildirilen heterozigot c.802_803delAT (p.(Met268Valfs*23)) iken, diğeri ilk kez Şimşek ve ark. tarafından bildirilen heterozigot c.441delG (p.(His148Thrfs*23)) değişimidir. Bu değişim, segregasyon çalışmasında, indekste, etkilenmiş kız kardeş ile etkilenmiş kuzende, asemptomatik taşıyıcılar baba, erkek kardeş, amcada en üst kuşakta ise asemptomatik taşıyıcı babaannede saptanmıştır (118).

Aycan ve ark. (2018) *MKRN3*'ün aynı domaininde Türkiye'den farklı bir mutasyon daha bildirilmiştir. TED tekniği kullanılarak yapılan bu çalışmada 10 ailede 19 (17 kız ve 2 erkek) SEP olgusu incelenmiş ve Tanner evre 2 (testis hacmi > 4 mL) olan bir erkek olguda *MKRN3* geninde çerçeve kaymasına yol açan heterozigot c.630_650delinsGCTGGGC (p.(Pro211Leufs*16)) mutasyonu (%5,3) saptanmıştır. *In silico* analizler ile varyantın patojenik etkisinin desteklendiği ve segregasyonunun paternal kalıtım modeli ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (119). Çalışmamızda *MKRN3* geninde paternal kalıtım modeli ile uyumlu olduğu gösterilen c.982C>T (p.(Arg328Cys)) değişimi daha önce başka çalışmalarda (27,41) bildirilmiş olsa da Türkiye'den bildirilen ilk olgudur.

Valaderes ve ark. (2019) SEP olgularında *MKRN3* genindeki prevalansı ve fenotip – genotip ilişkisini aydınlatmak amacıyla Eylül 2018'e kadar yedi farklı elektronik veri tabanında meta-analiz araştırması gerçekleştirmişlerdir. Toplamda 22 çalışmadan 880 SEP olgusunun bildirildiği çalışmalarda 17 ülkeden (Arjantin, Belçika, Brezilya, Bulgaristan, Güney Kıbrıs, Danimarka, Fransa, Almanya, Yunanistan, İsrail, İtalya, Japonya, Kore, İspanya, Tayvan, Türkiye ve ABD) 89 olguda (76 kız ve 13 erkek) *MKRN3* geninde mutasyon saptandığını belirlemişlerdir. Mutasyonlardan biri genin promotor bölgesinde iken diğerleri genin kodlanan bölgelerinde bulunmaktadır. Ayrıca, puberte başlangıcının kız olgularda erkek olgulara göre daha erken olduğunu (median 6.0 kız, 8.5 erkek), bazal FSH seviyesinin yüksek ve kemik yaşının da ileri olduğunu bildirmişlerdir. 857 hastanın değerlendirildiği toplam 14 çalışmada kantitatif analizle *MKRN3* genindeki genel mutasyon prevalansı %9.0 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada Asya ülkelerinde yapılan çalışmalardaki bazı klinik ve biyokimyasal veriler ile batı toplumlarında yapılan çalışmalardaki veriler puberte başlangıç yaşı, başvuru yaşı ve bazal LH, bazal FSH açısından değerlendirildiğinde batı toplumlarında puberte başlangıç yaşı (median 6.0) ve başvuru yaşı (6.7), Asya ülkelerindeki başlangıç yaşı

(6.8) ve başvuru yaşına (8.0) göre daha erken olduğu gözlenmiştir. Sırasıyla batı ülkeleri ile Asya ülkelerinde bazal LH 1.1 ve 1.6 IU/L ve bazal FSH 4.5 ve 3.0 IU/L olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda tüm olgularımızda puberte başlangıç yaşı ortalaması 7.1, başvuru yaşı ortalaması ise 7.2 idi. Olgu grubumuzda bazal LH ortalaması 1.15 IU/L, bazal FSH ise 3.3 IU/L olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte mutasyon saptanan olgumuzun ise puberte başlangıç yaşı 6.5, başvuru yaşı 7.2, bazal LH 0.2 IU/L, bazal FSH 7.8 IU/L idi. Bu değer aralıkları ile puberte başlangıç yaşı Asya ülkelerindeki olgulara daha yakın olmakla birlikte, LH ve FSH verileri batı toplumundaki olgulara daha yakın bulunmuştur. Türkiye’den mutasyon saptanan diğer olguların da verileri bu karşılaştırmaya dahil edildiğinde Şimşek ve ark. iki farklı kız olgudan p.(His148Thrfs*23) değişimi olan olgunun puberte başlangıç yaşı 6.3, bazal LH 2.6 IU/L, bazal FSH 3.9 IU/L iken, p.(Met268Valfs*23) değişimi bildirilen probandin puberte başlangıç yaşı 5.5, bazal LH 2.2 IU/L, bazal FSH 6.0 IU/L idi. Aycan ve ark.’nın çalışmasında, p.(His148Thrfs*23) mutasyonu saptanan erkek olguda puberte başlangıç yaşı 9, bazal LH 5.41 IU/L, bazal FSH 13.7 IU/L idi. Türkiye’den çalışmamızın da dahil olduğu, mutasyon bildirilen tüm olguların başlangıç yaş ortalaması 6.82 yıl, bazal LH 2.6 IU/L, bazal FSH 7.5 IU/L idi. Böylece sonuçlarımızın Asya ülkelerinin ortalamasına daha yakın olduğu görülmektedir. Literatürde de ailevi olgularda en sık mutasyon saptanan gen *MKRN3*’dür. Türkiye’den ailevi SEP olgularında bugüne kadar sadece *MKRN3* geninde mutasyon saptandığı bildirilmiştir (118,119). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak *MKRN3* geninde mutasyon saptanmıştır. Ancak, literatürde ailevi olgularda *MKRN3* geni mutasyon oranı %33-46’a olarak bildirilmesine (27,41) karşın olgu grubumuzda *MKRN3* geni oranı %5.55 (1/18) olmuştur. Bu düşük oran olgu sayımızın nispeten az olması ile ilişkilendirilebilir. Ülkemizden daha fazla olgunun incelenmesi ile *MKRN3* geninde daha gerçekçi mutasyon oranlarına ulaşılabilecektir.

Perry ve ark.’ları (2014) Avrupa kökenli 57 genom boyu ilişkilendirme çalışmasında ergenliğin bir göstergesi olarak bilinen menarş yaşıyla ilişkili 180 binden fazla kadında 106 genomik bölgenin içinden 123 sinyal belirlemişlerdir. Kadınlardan alınan bu menarş yaşı sinyallerinden yola çıkarak maternal imprinted genler *MKRN3* ve *DLK1* lokuslarından da sinyal saptadıklarını bildirmişlerdir (110). *MKRN3* genindeki mutasyonların SEP olgularında gösterilmesi sonrasında, ilk olarak 2017 yılında Dauber ve ark. tarafından *DLK1* geninde mutasyon gösterilmiştir (12).

Olgu grubumuzda, maternal imprinted gen *DLK1*’de literatürde bildirilmemiş ve *in silico* analizlerin patojenik tahmini verdiği iki farklı varyant iki farklı olguda saptanmıştır. Bu varyantlardan biri SEP#03’de *DLK1*’de kırılma hatasına yol açması ön görülen (Mutation Taster) intron 1’de saptanan c.67+78C>T değişimidir. Bu değişimin transkriptin kırılmasına etkisini, araştırmak amacıyla indeks olguda (SEP#03, III:1) periferik kandan mononükleer hücrelerden (PBMC) elde edilen total RNA’dan *DLK1*-cDNA çalışması yapılmış, 700-800 bp’lik ürün beklenmiş ancak ürün elde edilememiştir. İnsan Protein Atlas veri tabanında hücre tipine göre RNA miktar analizi, *DLK1*’in Leyding hücrelerinde 1.200 NX (Normalised eXpression), ekzokrin bezlerin epitel hücrelerinde 600 NX seviyesinde iken kan dokusunda 72 NX olduğunu göstermektedir (54). Yaptığımız çalışmada kan dokusundan *DLK1* için ürün elde edilememesi olası mRNA oranının çok düşük oranda olması ve deneysel çalışmamızın yeterli hassasiyette olmaması olarak yorumlanmıştır. Bununla birlikte ailedeki çalışmanın genişletilmesi ile olası taşıyıcı ve etkilenmişlerde SEP öyküsünün detaylıca araştırılması varyantın etkisinin gösterilmesinde katkı sağlayacaktır.

DLK1 geninde SEP#04’de saptanan ikinci varyant ise *DLK1*’de ekzon 4’de ve kodlayan bölgede EGF benzeri domain 3’de yer alan, daha önce literatürde tanımlanmamış heterozigot c.357C>G (p.(Tyr119Ter)) değişimiydi. Bu değişim, *DLK1* proteinin 119. pozisyonunda yer alan tirozin amino asidinin TAC kodonundaki sitozin bazının, guanin bazına transversiyonu ile TAG kodonu dönüşümüne ve ‘dur’ kodonu oluşumuna neden olmaktadır. Böylece proteinin erken sonlanmasıyla güdük bir protein oluşumuna yol açmakta ve bunun zararlı bir etkiye neden olması beklenmektedir (83). Segregasyon analizinde varyantın paternal kalıtmalı olduğu etkilenmiş kardeşlerde ve babada heterozigot olarak saptandığı belirlenmiştir. Anlamsız tipteki mutasyonlar mRNA kodlama bölgesinde çerçeve içinde UAA, UAG veya UGA kodonların oluşumuna neden olur, translasyonun erken sonlamasına, kısaltılmış polipeptit ürünlerinin oluşmasına ya da erken mRNA yıkımına yol açtığı bildirilmiştir (120).

Bugüne kadar SEP olgularında *DLK1* geninde bildirilen mutasyon sayısı 4’dür. Bunların ilki 5’UTR bölgesinden başlayarak ekzon 1’i de kapsayan yaklaşık 14 kb’lık büyük bir delesyon iken diğer üçü çerçeve kaymasına neden olan ekzon 5 deki küçük delesyon tipi mutasyonlardır (12,25,62) (Şekil 84).

test sonucunda (kızlar için LH: 6.9 IU / L) HHG ekseninin erken aktivasyonu doğrulanmıştır. Etkilenmiş çocukların babalarının pubertal zamanlamasının normal olması, *MKRN3*'ten etkilenen ailelere benzer şekilde, imprinted gen ilişkisini düşündürmüştür (12,40). Dauber ve ark.'ları çalışmalarında, Abreu ve ark. (2013)'ın daha önce TED uyguladığı ancak mutasyon saptamadığı altı aile bireyinde (etkilenmiş dört kızkardeş, bir normal kardeş ve babaanne) imprinting anomalisini modellemek amacıyla, otozomal dominant bir kalıtım modeli uyumlu bağlantı analizi çalışması gerçekleştirmiş, etkilenen bireylerin babaları zorunlu taşıyıcı olarak işaretlemiş ve 5 kromozom bölgesine bağlantı kurulmuştur. Bu bölgelerden özellikle 14q32 bölgesi, imprinted gen kümesinin içinde yer alıyor olması, kromozom 14'ün maternal uniparental dizomisi veya bu bölgenin paternal delesyonunun kompleks bir hastalık olan SEP bulgusunun da gözlemlendiği Temple Sendromu ile ilişkilendirilmesi, ve GWAS çalışmalarında bu bölgenin menarş yaşı ile bağlantılanmış olması nedeniyle önemli bulunmuştur (12). Aynı çalışmada etkilenmiş dört olgu, 14q32.2 bölgesiyle ilişkili SALSA MS-MLPA prob miks ME032 ile çalışılmış ancak delesyon veya duplikasyon gösterilememiştir. ME032-A1 Prob mix, UPD7-UPD14, metilasyon için *GRB10*, *MEG3*, *MEST* ve *PLAGL1* genleri için bir veya daha fazla prob dizisi içerirken, delesyon/duplikasyon araştırması amacıyla ise *DLK1*, *MIR380* ve *RTL1* genleri üzerinde problemler bulunmaktadır. *DLK1* genindeki problemler ekzon 3 ve 4 üzerinde olup ekzon 1, 2 ve 5'i kapsamamaktadır (67). İlgili kiste *DLK1* geninde sadece iki ekzonda prob bulunması ve literatürdeki bilgiler ışığında, MS-MLPA testinin SEP olgularında etiyolojinin aydınlatılması için yeterli katkıyı sağlayamayacağını düşündürmüştür.

Dauber ve ark., etkilenmiş iki olguda CytoSNP-850K platformu ile mikroarray genotiplemesi gerçekleştirmiş ancak nadir kopya sayısı varyantı saptamamışlardır. Son olarak bu ailenin altı bireyinde TGD gerçekleştirmişler elde edilen veriler, ailevi SEP'in nadir olması göz önünde tutularak, çeşitli filtrelemeler ile (1000 Genom, Exome Aggregation Consortium, dbSNP veya aynı platformda dizilen 1000 kontrol genomunda bulunan tüm varyantlar ile 37 Brezilya genomunda saptanan varyantlar [EPIGENE-Brasil Girişimi projesi]) incelenmiş ve bağlantı analizi bölgesinde 87 novel varyant belirlenmiştir. Ancak varyantlardan hiçbirisi iyi tanımlanmış bir gen promotor bölgesi içinde veya bilinen ya da tahmin edilen puberte ile ilgili transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesinde bulunmadığından SEP ilişkili olarak değerlendirilmemiştir. Yapılan kopya sayısı analizi ile değişimleri incelemek için dokuz (dört etkilenmiş ve

beş etkilenmemiş) bireyin TGD verileri incelenmiş ve analizlerde 14q32.2 bölgesi işaret edilmiştir. Çalışmanın devamında ise etkilenen bireylerde incelenen serum DLK1 seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre saptanamayacak seviyede olduğu, bu durumun SEP lehine değerlendirildiği ve segregasyon analizinin paternal kalıtımı desteklediği bildirilmiştir. Aynı literatürde *DLK1*'de mutasyon saptanan dört kız olgudan ikisi normal kilo ve doğum tartısında iken, diğer ikisinden birinin (III:1) obez, diğeri (II:3) aşırı kilolu olarak bildirilmiştir. Her ikisinin de düşük doğum tartısı ile doğmuş oldukları (III:1 in 3.2 kg (-0.07 SDS) ve III:3'ün yaklaşık 3,0 kg (-0.52 SDS) bildirilmiştir (12). Olgularımızda kırılma hatasına yol açması beklenen derin intronik c.67+78C>T (SEP#03) ile c.357C>G (SEP#04) değişimine sahip olgular normal kiloda iken, doğum tartılarının SEP#03'ün 3,0 kg (-0,4 SDS) ve SEP#04'ün 2,7 kg (-0,7 SDS) idi ve bu bulgular literatür ile uyumlu olarak değerlendirildi.

DLK1 geninde ilk mutasyonun 2017 yılında saptanmasından sonra, SEP olgularında bu genle ilgili çalışmalar literatürde bildirilmeye başlanmıştır. Grandone ve ark. 2017 yılında 23'ü ailesel olmak üzere 60 idiopatik SEP olgusunda *MKRN3*, *DLK1* ve *KCNK9* genlerini dizilemişlerdir. *KCNK9* geni maternal allelden anlatım yapan paternal imprinted bir genidir. *DLK1* ve *KCNK9* genlerinde mutasyon saptanmayan çalışmada ailevi olguların %8,7'sinde (2/23) ve idiopatik olguların %2,8'inde (1/37) *MKRN3* geninde mutasyon saptamışlar (114) ve *DLK1* genindeki mutasyonların SEP'in nadir bir nedeni olduğunu ileri sürmüşlerdir (114). Literatürden farklı olarak, çalışmamızdaki olguların %11,1 (2/18)'inde *DLK1* geninde mutasyon saptanarak *MKRN3*'den sonra SEP'te ikinci sıklıkta mutasyonların gösterildiği gen olduğu anlaşılmıştır.

Gomes ve ark. (2019)'nın serisinde daha önce *MKRN3* mutasyonları dışlanmış 31'i ailevi SEP, 29'u erken menarş öyküsü olan toplamda 60 indekste *DLK1* geni SD ile ve bu gruptan polikistik over sendromu (PKOS) olan indeks olgu, kızkardeş ve etkilenmemiş anne ise TED tekniği ile çalışılmıştır. Ailevi SEP olgu grubundan üç indekste ve iki etkilenmiş aile bireyinde ekzon 5'de farklı çerçeve kayması mutasyonları (p.(Gly199Alafs*11), p.(Val271Cysfs*14) ve p.(Pro160Leufs*50)) saptanmıştır. Genişletilen aile çalışmalarında paternal kalıtımla uygun olarak tüm olgularda mutasyonların babadan geçtiği gösterilmiştir. Mutasyon saptadıkları beş olguda (dördü Brezilyalı ve biri İngiliz) aşırı kilo / obezite, erken başlangıçlı glukoz intoleransı / tip 2

diabetes mellitus ve hiperlipidemi gibi metabolik anormalliklerin normal puberte gösteren kızlara göre daha yaygın olduğu bildirilmiştir. İlginç olarak, p.(Gly199Alafs*11) mutasyonu saptanan indeks olgu ve kızkardeşinde PKOS ve infertilite varlığı da tariflenmiştir (62). PKOS (MIM#184700) ile ilişkili olarak obezite, amenore, hirsutizm ve polikistik over bildirilmesine rağmen obezite ve tip 2 diabetes mellitus bulguları olgularımızda gözlenmemiş ancak literatürdeki çalışmada mutasyon gösterilen olguların yaş aralığı (19 – 56) iken kohortumuzun çok üzerinde olması nedeniyle klinik kıyaslamanın bu evrede yapılmasının uygun olmadığı düşünülmüştür. Olgulara obezite riskinde artış olabileceği bildirilerek klinik takiplerinin, yaşam boyunca sürdürülmesi önerilmiştir.

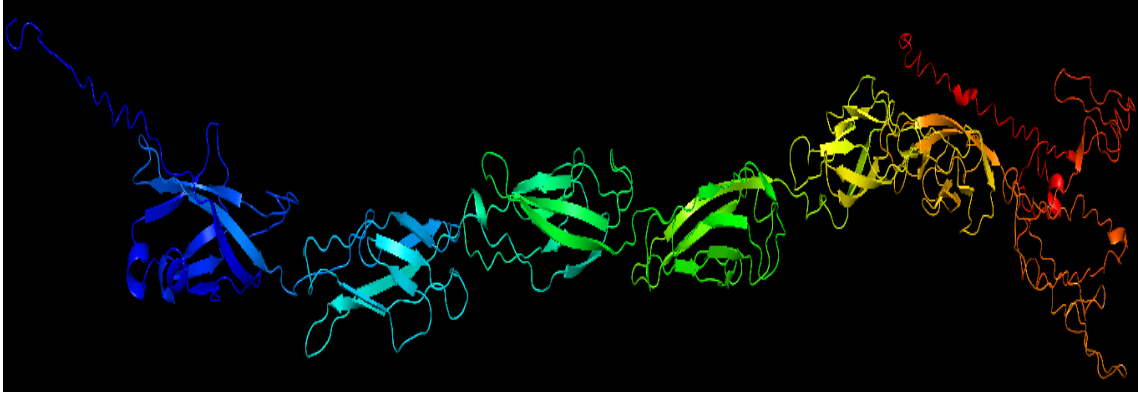
Çalışmamızda iki aileden beş birey TED tekniği ile incelenmişti. Bu ailelerden ilkinde (SEP#11) indeks, etkilenmiş kızkardeş ve anne olmak üzere çalışılan üç etkilenmiş bireyin varyantları ortak filtreleme ile incelendiğinde varyant sınıflaması patojenik ve/veya VUS olarak sınıflandırılan bazı değişimler belirlenmiştir (**Tablo 28**). Bu değişimlerden *PIF1* geninde saptanan rs118062397'nin popülasyon sıklığı (gnomAD, V1.2.2, ekzomda 0,017 ve genomda 0,0108) yüksek bulunmuştur. *THNSL2* geninde ise c.361A>G (p.(Thr121Ala)) varyantı gösterilmiştir. Bu genin anlatımı en fazla paratiroid bez, hipofiz bezi ve kas dokusunda iken diğer birçok dokuda da olduğu gösterilmiştir (54). *THNSL2*'de saptanan değişim nadir bir varyant olmakla birlikte, patojenite skorunun düşük ve tahmin araçlarında zararsız bulunması varyasyonun tesadüfi birliktelik lehine değerlendirilebileceğini düşündürmüştür. Diğer bir değişim *MAPK7*'daki novel bir varyanttır. *MAPK7* geni patojenik değişimleri kalp hastalıklarıyla ilişkilendirilmektedir. Patojenite skorunun düşük olması ve *in silico* tahminlerin hem benign hem de zararlı sonuç verdiği bu varyantın da SEP ilişkili olmadığı kanaatine varılmıştır. SEP#11 olgularındaki diğer bir gen olan *TARSL2*'de saptanan değişim ise nadir bir varyant (rs776691540) olup gen anlatımının iskelet kas sisteminde yüksek olduğu bildirilmekteydi (54) ancak *in silico* tahmin araçlarında varyant benign ve patojenite skoru ise oldukça düşük olarak değerlendirilmekteydi. *BTB* geninde ortak filtrede heterozigot saptanan c.1595C>T değişimi ise Biotinidaz eksikliği (MIM#609019) ile ilişkilendirilmiş bir varyanttır (122). Biotinidaz eksikliği, tedavi edilmediğinde değişen derecelerde nörolojik ve kutanöz semptomlara yol açabilen otozomal resesif bir biyotin metabolizması bozukluğudur. Olgularımızdaki bu varyantın varlığı tesadüfi bulgu olarak değerlendirilmiş olmasına karşın, ilerideki

kuşakları ilgilendirecek bir sağlık sorunu yaratabileceğinden bu varyant için aileye genetik danışma verildi.

SEP#11 olgularında ortak olarak ANO4 / TMEM16D (Anoctamin 4 / Transmembrane protein 16D) geninde c.2572-7_2572-6insGT (rs72517905) değişimi saptandı. Bu değişim *in silico* analizde (Mutation Taster ve Human Splicing Finder) patojenik tahmini vermektedir. değişimin, kırılma hatasına neden olarak proteinin yapısını etkilemesi beklenmektedir. ANO4 12q23.1de yerleşik bir gendir (21). Beyin (spinal kord, beyin sapı ve serebellumda), over ve adrenal bez de yüksek anlatımı vardır (54,123). HHG eksenindeki bölgelerde anlatımının yüksek olması nedeniyle SEP için aday bir gen ve değişim olarak değerlendirildi. SD için primer dizaynı ile doğrulama ve segregasyon çalışması yapıldı. Ancak, sağlıklı babanın da aynı varyantı heterozigot taşıması nedeniyle tesadüfi bir bulgu olasılığı dışlanamadı. HGVS sitesinde bu bölgedeki bazların duplikasyonun insersiyonu için ‘dup’ kısaltması ile yazılması önerilirken, insersiyon bir bölgenin tekrarı değilse ‘ins’ kısaltmasıyla yazılması önerilmektedir. Bu tip tekrar bölgelerinin insersiyonunda görülen bir durum da aynı değişim bölgesinin içerisinde farklı rs numaraları ile bulunabilmesidir (124). Çalışmamızda saptanan rs72517905, rs3832861 ile aynı bölgede yer almaktadır (21,30). rs72517905, insGT ile Varsome’da ACMG sınıflandırmasına göre ‘VUS’ ve toplum sıklığı düşük bir varyanttır. Buna karşın rs3832861, aynı değişim için dupGT ile gösterilmekte ve Varsome’da ‘zararsız’ ve ayrıca toplumda %1 den sık olarak bildirilmektedir. TED filtrelemelerinde varyantın filtrelerden geçmemesi beklenirken geçmiş olması tekrar bölgelerin biyoinformatik analizlerinde bu tip durumlarla karşılaşılabilceğini gösterdi.

TED tekniği uygulanan diğer bir ailede (SEP#15) indeks olgu ve etkilenmiş kuzeninde CDHR3 geninde c.1225-1G>A varyantı heterozigot olarak gösterildi. ACMG kriterlerine göre VUS olarak değerlendirilmesine karşın *in silico* analizler (Mutation Taster, Varsome patojenite skoru 6/6) patojenik tahmini vermekte ve bu değişim toplumlarda çok nadir bildirilmişti (MAF<0,01; GnomAD’da 130794 bireyde dört kadın ve üç erkekte heterozigot). Evrimsel olarak iyi korunmuş bir nükleotidi değiştiren varyantın gen transkriptinde kırılma hatasına yol açması öngörülmektedir. CDHR3 geni, caderin ailesine ait bir proteini kodlamakta olup transmembran yapıda hücre-hücre iletişimi, epitel polaritesi, adhezyonu, hücre gelişimi ve farklılaşması için önemli olduğu

ve silya içeren epitel hücrelerde yüksek anlatım yaptığı bildirilmektedir (Şekil 85) (125,126).



Şekil 85; CDHR3 proteinin I TASSER da oluşturulan 3 boyutlu yapısının gösterimi. Peptid zincirinde N' bölgeden C-terminaline gökkuşağı boyama aracı kullanılmıştır.

Astım olgularında virüs ile ilişkili alevlenmelerin %60'dan fazlasının insan rhinovirüs (HRV) türleri ile ilişkili olduğu, insan primer hava yolu epitel hücrelerinde (AEC, primary airway epithelial cells) CDHR3'ün rhinovirus (HRV)-C'ün hücre içine alınmasında reseptör işlevi gördüğü, pediatrik olgularda bu gendeki bir varyantın (p.(Cys529Tyr), rs6967330) homozigot formda *CDHR3* anlatımını artırarak vücutta HRV-C düzeylerinin ve solunum yolu enfeksiyonunun artmasına neden olduğu bildirilmiştir (126). Aynı çalışmada, primer insan trakeal ve nazal epitel hücrelerinde yapılan incelemelerde CDHR3 yokluğunun silya gelişimini bozmadığı ancak transepitel hücre membran direncini azalttığı gösterilmiştir (126). Bir başka araştırmada allerjik olgularda epitel homeostazın, hormonal regülasyonda önemli olduğu vurgulanmıştır (127). Henüz herhangi bir Mendel hastalığı ile ilişkilendirilmemiş olan *CDHR3* geninin çalışmamızda *CDHR3* gen varyantının SEP#15 ailesinde üç olguda ailevi erken puberte ile segregе olması, CDHR3'ün epitel hücre bariyerinin korunmasında, bu bariyerin hormon regülasyonunda önemli olduğu görüşünü destekler niteliktedir. İnsan Ekspresyon Atlası'nda (EBML-EBI-Expression Atlas; ensg00000128536) genin akciğer epitelinde olduğu kadar bazı üreme organlarında da (fallop tüpleri, over, plasenta) yüksek anlatımı olduğu bildirilmektedir. Bu hipotezin araştırılması için fonksiyonel çalışmaların yapılması önemlidir. TED analizleri yeni ilişkili genlerin tanımlanması için bir fırsat yaratmaktadır. Halihazır bilgilerle *CDHR3*'ün SEP ile ilişkili olabileceği

savunulamaz ya da dışlanamaz. Ancak, TED analizleri ile sonuç alınamayan olguların tüm genom dizileme ve/veya epigenetik değişimlerin araştırılması ile yeni yolların keşfi mümkün olmaktadır.

5.1. Kısıtlılıklar

Proje çalışmalarımızda tespit ettiğimiz kısıtlılıklar aşağıda sunulmaktadır.

- Imprinted genlerden *DLK1* ve *MKRN3*'ün SEP ilişkili olması epigenetik mekanizmaların önemine işaret etmiştir. Kliniğe neden olabilecek varyant saptanmayan olgularımızda metilasyon array testi kullanabilirdik. Bu testler kesin veya potansiyel olarak metillenmiş bölgeleri hedeflediği için varsa ilişkili bölgeleri saptamamıza katkı sağlayabilirdi.
- Olgularımızda saptanan novel varyantların fonksiyonel etkilerini çalışabilirdik. Bu çalışmalar ek bütçe gerektirdiği kadar ek fiziksel alanların da olmasını gerektirdiğinden yapamadık.
- Bilinen genlerde ilişkili varyant saptanmayan sadece iki olguda TED analizi yapabildik. Proje bütçemiz elverişli olsaydı diğer 11 olgumuzda da TED ile inceleme yapabilirdik. Bu durum çalışmamızın bilimsel etki değerini yükseltirdi. Ayrıca di-genik/multi-genik varyantların analizleri de yapılabilirdi. Ancak bu tip analizler daha yüksek sayıda hasta popülasyonuna ihtiyaç gösterirdi ve özel istatistik programlarının kullanılması gerekirdi.

5.2. Sonuçlar

Bu çalışmada 18 ailevi Santral Erken Puberte (SEP) olgusunda ilk aşamada bilinen genler (*DLK1*, *KISS1*, *KISS1R*, *MKRN3*, *PROKR2*) Sanger dizi yöntemi ile, ikinci aşamada ilişkili varyant saptanmayan olgular arasından seçilen iki farklı ailede Tüm Ekzom Dizi (TED) analizi ile yeni ilişkili genlerin araştırılması amaçlandı. TED için aile seçimi yapılırken ailede yatay ve dikey kuşaklarda başka etkilenmiş olguların varlığı tercih edildi. Bu tip bir seçimin, filtreleme ile yapılan varyant saptama oranlarını güçlendireceği öngörülerek bir aileden iki ve diğer ailede üç etkilenmiş olgu TED analizine alındı, ortak varyantlar üzerinde kademeli değerlendirmeler yapıldı.

Çalışmamıza katılan 18 SEP olgusunun beşinde bilinen genlerde ilişkili ya da ilişkili olabileceği düşünülen varyantlar saptandı. Bunlar kısaca *DLK1* geninde iki ailede iki farklı novel (paternal kalıtmı: c.67+78C>T ve c.357C>G), *MKRN3* geninde bir ailede (paternal kalıtmı c.982C>T) ve *KISS1R* geninde ise bir ailede Kallmann sendromu ile ilişkilendirilen bir varyant (c.565G>A) ve bir başka ailede GnRH eksikliği olan hipogonadotropik hipogonadizmi bir olguda tanımlanmış bir varyant (c.1167C>A) heterozigot formda saptandı. Literatürde *KISS1R* geninde bildirilen bu varyantlar *FGFR1* genindeki bir varyant ile dijenik formda sunulmuş olduğundan bizim *KISS1R* varyantı gösterilen olgularımızda da *FGFR1* geni dizilendi ve herhangi bir değişim saptanmadı. *KISS1* ve *PROKR2* genlerindeki taramalarda da herhangi ilişki bir değişim gösterilemedi. *KISS1R* genindeki değişimlerin daha ileri aile segregasyon çalışması ve fonksiyon çalışmaları gerektirdiğinden tanıya katkısını halihazır bilgilerle savunmak olanaklı değildir. Bu durumda tanı yaklaşımında ilk aşamada *DLK1* ve *MKRN3* genlerinin incelenmesinin ailevi SEP'in moleküler genetik tanısına % 17 oranında katkı vereceği, daha geniş olgu serileri ile yapılacak çalışmalarda bu oranın değişebileceği düşünüldü. TED analizinde iki aileden birinde ilişkili olabileceğini düşünülen bir değişim saptanamaz iken diğer ailede *CDHR3* geninde evölüsyonel olarak korunmuş "acceptor site" bölgesinde heterozigot novel değişim (c.1225-1G>A) saptandı ve ailede etkilenmişler ile segrege oldu. İleride yeni projeler kapsamında *CDHR3*'ün SEP ile fonksiyonel ilişkisinin ya da tesadüfi bir durumun olup olmadığının araştırılması planlandı.

Sonuç olarak, çalışmamızda *DLK1* ve *MKRN3* genlerinin SD ile taranmasının SEP olgularında ilk basamak testi olarak kullanılabileceği, *KISS1* ve *KISS1R* genlerinin puberte ilişkisinin nadir olduğu en azından kendi popülasyonumuzda bu nedenle ikinci basamakta taranabileceğine ve *PROKR2* geninin puberte ilişkisinin çok nadir olduğu ve bu yüzden ilk basamakta yer alması gerekmediği kanısına varılmıştır. Bilinen genlerde ilişkili varyant saptanmayan ve birden fazla etkilenmiş olgunun bulunduğu ailelerde, TED analizlerinin bilinen diğer gen ve yeni genlerin araştırılmasına düşük maliyet ve zaman avantajı ile önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2016; **4**(3): 254-264.
2. Canton APM, Seraphim CE, Brito VN, Latronico AC. Pioneering studies on monogenic central precocious puberty. *Arch Endocrinol Metab* 2019; **63**(4): 438-444.
3. Latronico AC, Brito VN, Carel J-C. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2016; **4**(3): 265-274.
4. Berberoğlu M. Erken Puberte / Puberty Precocious. *Türkiye Çocuk Hast. Derg. / Turkish J. Pediatr. Dis.* 2010; **4**: 61-64.
5. Berberoglu M. Precocious puberty and normal variant puberty: definition, etiology, diagnosis and current management. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2009; **1**(4): 164-174.
6. Bradley SH, Lawrence N, Steele C, Mohamed Z. Precocious puberty. *BMJ* 2020; **368**: l6597.
7. Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, Skakkebaek NE, Juul A. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. *Pediatrics* 2005; **116**(6): 1323-1328.
8. Day FR, Elks CE, Murray A, Ong KK, Perry JR. Puberty timing associated with diabetes, cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study. *Sci Rep* 2015; **5**: 11208.
9. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* 2003; **24**(5): 668-693.
10. Zhu J, Kusa TO, Chan YM. Genetics of pubertal timing. *Curr Opin Pediatr* 2018; **30**(4): 532-540.
11. Macedo DB, Silveira LF, Bessa DS, Brito VN, Latronico AC. Sexual Precocity-Genetic Bases of Central Precocious Puberty and Autonomous Gonadal Activation. *Endocr Dev* 2016; **29**: 50-71.
12. Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, ve ark. Paternally Inherited DLK1 Deletion Associated With Familial Central Precocious Puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; **102**(5): 1557-1567.
13. Marshall WA, Tanner JM. Variations in Pattern of Pubertal Changes in Girls. *Arch. Dis. Childh.* 1969; **44**: 291-303.
14. M. B. Erken Puberte / Puberty Precocious. *Türkiye Çocuk Hast. Derg. / Turkish J. Pediatr.* 2010; **4**: 61-64.
15. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(4): 1794-1800.
16. Mazaheri A, Hashemipour M, Salehi M, Behnam M, Hovsepian S, Hassanzadeh A. Mutation of kisspeptin 1 gene in children with precocious puberty in isfahan city. *Int J Prev Med* 2015; **6**: 41.
17. Nathan BM, Palmert MR. Regulation and disorders of pubertal timing. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; **34**(3): 617-641, ix.

18. Leka-Emiri S, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP). *J Endocrinol Invest* 2017; **40**(8): 789-802.
19. Tsutsumi R, Webster NJG. GnRH Pulsatility the Pituitary Response and Reproductive. *Endocr J*. 2009; **56**((6)): 729–737.
20. Naule L, Kaiser UB. Evolutionary Conservation of MKRN3 and Other Makorins and Their Roles in Puberty Initiation and Endocrine Functions. *Semin Reprod Med* 2019; **37**(4): 166-173.
21. Hunt SE, McLaren W, Gil L, Thormann A, Schuilenburg H, Sheppard D, ve ark. Ensembl variation resources. *Database (Oxford)* 2018; **2018**.
22. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, ve ark. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 2006; **147**(3): 1166-1174.
23. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological Mechanisms of the Onset of Puberty. *Endocrine Reviews* 2001; **22**(1): **111–151**.
24. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, ve ark. A GPR54 Activating Mutation in a Patient with Central Precocious Puberty. *n engl j med* 2008; **358**(7): 709-715.
25. Stenson PDea. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. . *Hum Genet*. 2017; **136**: 665-677.
26. Ortiz-Cabrera NV, Riveiro-Alvarez R, Lopez-Martinez MA, Perez-Segura P, Aragon-Gomez I, Trujillo-Tiebas MJ, ve ark. Clinical Exome Sequencing Reveals MKRN3 Pathogenic Variants in Familial and Nonfamilial Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr* 2017; **87**(2): 88-94.
27. Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, ve ark. Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol* 2016; **174**(1): 1-8.
28. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, ve ark. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**(5): 2276-2280.
29. <http://www.genenames.org/>. HGNC.
30. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, ve ark. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; **12**(6): 996-1006.
31. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**(W1): W174-181.
32. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012; **92**(3): 1235-1316.
33. Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, ve ark. Association study of the polymorphisms in the KISS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. *Eur J Endocrinol* 2007; **157**(1): 113-118.
34. Seminara SB, Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R.,, Acierno JS, Shagoury JK. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *n engl j med* 2003; **349**;17.
35. Pagani S, Calcaterra V, Acquafredda G, Montalbano C, Bozzola E, Ferrara P, ve ark. MKRN3 and KISS1R mutations in precocious and early puberty. *Ital J Pediatr* 2020; **46**(1): 39.

36. Avendano MS, Vazquez MJ, Tena-Sempere M. Disentangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty. *Hum Reprod Update* 2017; **23**(6): 737-763.
37. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005; **146**(9): 3686-3692.
38. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 2002; **277**(22): 19276-19280.
39. Fukami M, Suzuki E, Izumi Y, Torii T, Narumi S, Igarashi M, ve ark. Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein-coupled receptor PROKR2 promotes early puberty. *J Cell Mol Med* 2017; **21**(10): 2623-2626.
40. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, ve ark. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med* 2013; **368**(26): 2467-2475.
41. Valadares LP, Meireles CG, De Toledo IP, Santarem de Oliveira R, Goncalves de Castro LC, Abreu AP, ve ark. MKRN3 Mutations in Central Precocious Puberty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Endocr Soc* 2019; **3**(5): 979-995.
42. Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. *J Mol Endocrinol* 2015; **54**(3): R131-139.
43. Jong MTG, T. A. Ji, Y.; Glenn, C. C.; Saitoh, S.; Driscoll D. J.; Nicholls, R. D. . A Novel Imprinted Gene, Encoding a RING Zinc-Finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet.* 1999; **8**(5): 783-793.
44. Aguirre RS, Eugster EA. Central precocious puberty: From genetics to treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2018; **32**(4): 343-354.
45. Hagen CP, Sorensen K, Mieritz MG, Johannsen TH, Almstrup K, Juul A. Circulating MKRN3 levels decline prior to pubertal onset and through puberty: a longitudinal study of healthy girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; **100**(5): 1920-1926.
46. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes (Basel)* 2017; **8**(6).
47. Howard M, Charalambous M. Molecular basis of imprinting disorders affecting chromosome 14: lessons from murine models. *Reproduction* 2015; **149**(5): R237-249.
48. Cheon CK. Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2016; **21**(3): 126-135.
49. Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, ve ark. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; **99**(6): E1097-1103.
50. Kanber D, Giltay J, Wiczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, ve ark. A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**(5): 582-590.

51. Crino A, Di Giorgio G, Schiaffini R, Fierabracci A, Spera S, Maggioni A, ve ark. Central precocious puberty and growth hormone deficiency in a boy with Prader-Willi syndrome. *Eur J Pediatr* 2008; **167**(12): 1455-1458.
52. Grandone A, Cantelmi G, Cirillo G, Marzuillo P, Luongo C, Miraglia del Giudice E, ve ark. A case of familial central precocious puberty caused by a novel mutation in the makorin RING finger protein 3 gene. *BMC Endocr Disord* 2015; **15**: 60.
53. Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E, Woelfle J. MKRN3 mutations in familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr* 2014; **82**(2): 122-126.
54. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, ve ark. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; **347**(6220): 1260419.
55. Macedo DB, Franca MM, Montenegro LR, Cunha-Silva M, Best DS, Abreu AP, ve ark. Central Precocious Puberty Caused by a Heterozygous Deletion in the MKRN3 Promoter Region. *Neuroendocrinology* 2018; **107**(2): 127-132.
56. Dimitrova-Mladenova MS, Stefanova EM, Glushkova M, Todorova AP, Todorov T, Konstantinova MM, ve ark. Males with Paternally Inherited MKRN3 Mutations May Be Asymptomatic. *J Pediatr* 2016; **179**: 263-265.
57. Christoforidis A, Skordis N, Fanis P, Dimitriadou M, Sevastidou M, Phelan MM, ve ark. A novel MKRN3 nonsense mutation causing familial central precocious puberty. *Endocrine* 2017; **56**(2): 446-449.
58. Villanueva C, Jacquier S, de Roux N. DLK1 is a somato-dendritic protein expressed in hypothalamic arginine-vasopressin and oxytocin neurons. *PLoS One* 2012; **7**(4): e36134.
59. Kim-Hellmuth S, Aguet F, Oliva M, Munoz-Aguirre M, Kasela S, Wucher V, ve ark. Cell type-specific genetic regulation of gene expression across human tissues. *Science* 2020; **369**(6509).
60. Wylie AA, Murphy SK, Orton TC, Jirtle RL. Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res* 2000; **10**(11): 1711-1718.
61. Helman LJT, C. J.; Linehan, W. M.; Nelkin BDB, S. B.; Israel M. A. Molecular markers of neuroendocrine development and evidence of environmental regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; **84**: 2336-2339.
62. Gomes LG, Cunha-Silva M, Crespo RP, Ramos CO, Montenegro LR, Canton A, ve ark. DLK1 Is a Novel Link Between Reproduction and Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; **104**(6): 2112-2120.
63. Temple IK, Shrubbs V, Lever M, Bullman H, Mackay DJ. Isolated imprinting mutation of the DLK1/GTL2 locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. *J Med Genet* 2007; **44**(10): 637-640.
64. de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr* 2007; **166**(7): 637-643.
65. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. Sanger DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977; **74**(12): 5463-5467.
66. Gupta N, Verma VK. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. *Microbial Technology for the Welfare of Society* 2019:313-341.

67. Schouten JPM, C. J. ; Waaijer, R. ; Zwinnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**(12): 57.
68. Gupta NV, V.K. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. *Microbial Technology for the Welfare of Society*: Springer, Singapore; 2019:313-341.
69. Kanzi AM, San JE, Chimukangara B, Wilkinson E, Fish M, Ramsuran V, ve ark. Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. *Front Genet* 2020; **11**: 544162.
70. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, ve ark. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011; **475**(7356): 348-352.
71. Merriman B, Ion Torrent R, Team D, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis* 2012; **33**(23): 3397-3417.
72. Greenbaum L, Pode-Shakked B, Eisenberg-Barzilai S, Dicastro-Keidar M, Bar-Ziv A, Goldstein N, ve ark. Evaluation of Diagnostic Yield in Fetal Whole-Exome Sequencing: A Report on 45 Consecutive Families. *Front Genet* 2019; **10**: 425.
73. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, ve ark. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA* 2014; **312**(18): 1880-1887.
74. Biesecker LG, Biesecker BB. An approach to pediatric exome and genome sequencing. *Curr Opin Pediatr* 2014; **26**(6): 639-645.
75. Bhowmik AD, A. D. Exome Data Analysis for Clinicians: How Why. *Genetic Clinics* 2017; **10**(2): 5-10.
76. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet* 2012; **57**(10): 621-632.
77. Miller CR, Lee K, Pfau RB, Reshmi SC, Corsmeier DJ, Hashimoto S, ve ark. Disease-associated mosaic variation in clinical exome sequencing: a two-year pediatric tertiary care experience. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2020; **6**(3).
78. Gedikbaşı A. *Tanı Konulamayan Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Tüm Ekzom Dizi Analizinin Katkısı* [PhD]. İstanbul: Medical Genetics, İstanbul Üniversitesi; 2020.
79. <http://genome.ucsc.edu/>. <http://genome.ucsc.edu/>.
80. www.ensembl.org/genesnpview. www.ensembl.org/genesnpview.
81. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.
82. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>.
83. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010; **7**(8): 575-576.
84. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* 2013; **Chapter 7**: Unit7 20.
85. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, ve ark. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2019; **35**(11): 1978-1980.

86. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020; **581**(7809): 434-443.
87. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 2015; **31**(16): 2745-2747.
88. Fuller ZL, Berg JJ, Mostafavi H, Sella G, Przeworski M. Measuring intolerance to mutation in human genetics. *Nat Genet* 2019; **51**(5): 772-776.
89. Ziegler A, Colin E, Goudenege D, Bonneau D. A snapshot of some pLI score pitfalls. *Hum Mutat* 2019; **40**(7): 839-841.
90. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; **536**(7616): 285-291.
91. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; **17**(5): 405-424.
92. 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.
93. Skaar DAL, Y.; Bernal, A. J.; Hoyo, C.; Murphy, S. K.; Jistle, R. L. The Human Imprintome: Regulatory Mechanisms, Methods of Ascertainment, and Roles in Disease Susceptibility. *ILAR Journal* 2012; **53**: 341-358.
94. *geneimprint*. <https://www.geneimprint.com/site/genes-by-species.Homo+sapiens.imprinted-All>.
95. Pymol T. <https://pymol.org/2/>.
96. Shaw ND, Seminara SB, Welt CK, Au MG, Plummer L, Hughes VA, et al. Expanding the phenotype and genotype of female GnRH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**(3): E566-576.
97. Bianco SD, Vandepas L, Correa-Medina M, Gereben B, Mukherjee A, Kuohung W, et al. KISS1R intracellular trafficking and degradation: effect of the Arg386Pro disease-associated mutation. *Endocrinology* 2011; **152**(4): 1616-1626.
98. Bo-Abbas Y, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Crowley WF, Jr., Seminara SB. Autosomal recessive idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: genetic analysis excludes mutations in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**(6): 2730-2737.
99. Brioude F, Bouligand J, Francou B, Fagart J, Roussel R, Viengchareun S, et al. Two families with normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism and biallelic mutations in KISS1R (KISS1 receptor): clinical evaluation and molecular characterization of a novel mutation. *PLoS One* 2013; **8**(1): e53896.
100. Luan X, Yu H, Wei X, Zhou Y, Wang W, Li P, et al. GPR54 polymorphisms in Chinese girls with central precocious puberty. *Neuroendocrinology* 2007; **86**(2): 77-83.
101. Zhou C, Niu Y, Xu H, Li Z, Wang T, Yang W, et al. Mutation profiles and clinical characteristics of Chinese males with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 2018; **110**(3): 486-495 e485.
102. Oh YJ, Rhie YJ, Nam HK, Kim HR, Lee KH. Genetic Variations of the KISS1R Gene in Korean Girls with Central Precocious Puberty. *J Korean Med Sci* 2017; **32**(1): 108-114.

103. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, ve ark. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(34): 15140-15144.
104. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, ve ark. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet* 2013; **92**(5): 725-743.
105. Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, Ma J, Mukherjee A, ve ark. Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**(11): 4380-4390.
106. Karaman V, Toksoy G, Karaman B, Kayserili Karabey H, Başaran S, Altunoğlu U, ve ark. Molecular Analysis of Fgfr1-3, Twist1, Msx2, Por, Frem1 and Rab23 Genes in Syndromic and Non-Syndromic Craniosynostosis Cases. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2019; **82**(2).
107. Kansakoski J, Fagerholm R, Laitinen EM, Vaaralahti K, Hackman P, Pitteloud N, ve ark. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr Res* 2014; **75**(5): 641-644.
108. Huijbregts L, Roze C, Bonafe G, Houang M, Le Bouc Y, Carel JC, ve ark. DNA polymorphisms of the KISS1 3' untranslated region interfere with the folding of a G-rich sequence into G-quadruplex. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **351**(2): 239-248.
109. Ko JM, Lee, H. S., Hwang, J. S. KISS1 gene analysis in Korean girls with central precocious. *Endocrine Journal* 2010; **57**(8): 701-709.
110. Perry JR, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, ve ark. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature* 2014; **514**(7520): 92-97.
111. Stecchini MF, Macedo DB, Reis AC, Abreu AP, Moreira AC, Castro M, ve ark. Time Course of Central Precocious Puberty Development Caused by an MKRN3 Gene Mutation: A Prismatic Case. *Horm Res Paediatr* 2016; **86**(2): 126-130.
112. Maione L, Naule L, Kaiser UB. Makorin RING finger protein 3 and central precocious puberty. *Curr Opin Endocr Metab Res* 2020; **14**: 152-159.
113. Montenegro L, Labarta JJ, Piovesan M, Canton APM, Corripio R, Soriano-Guillen L, ve ark. Novel Genetic and Biochemical Findings of DLK1 in Children with Central Precocious Puberty: A Brazilian-Spanish Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; **105**(10).
114. Grandone A, Capristo C, Cirillo G, Sasso M, Umano GR, Mariani M, ve ark. Molecular Screening of MKRN3, DLK1, and KCNK9 Genes in Girls with Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr* 2017; **88**(3-4): 194-200.
115. Abreu AP, Toro CA, Song YB, Navarro VM, Bosch MA, Eren A, ve ark. MKRN3 inhibits the reproductive axis through actions in kisspeptin-expressing neurons. *J Clin Invest* 2020; **130**(8): 4486-4500.
116. Kansakoski J, Raivio T, Juul A, Tammiska J. A missense mutation in MKRN3 in a Danish girl with central precocious puberty and her brother with early puberty. *Pediatr Res* 2015; **78**(6): 709-711.
117. Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 2009; **78**: 399-434.

118. Simsek E, Demiral M, Ceylaner S, Kirel B. Two Frameshift Mutations in MKRN3 in Turkish Patients with Familial Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr* 2017; **87**(6): 405-411.
119. Aycan Z, Savas Erdeve Ş, Çetinkaya S, Kurnaz E, Keskin M, Muratoğlu Şahin N, ve ark. Investigation of MKRN3 Mutation in Patients with Familial Central Precocious Puberty. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2018; **10**(3): 223-229.
120. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, ve ark. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007; **447**(7140): 87-91.
121. Cheung LY, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Le Tissier PR. Pituitary phenotypes of mice lacking the notch signalling ligand delta-like 1 homologue. *J Neuroendocrinol* 2013; **25**(4): 391-401.
122. Wolf B. Successful outcomes of older adolescents. *Genetics in medicine* 2017; **19**(4): 396-402.
123. Schreiber R, Uliyakina I, Kongsuphol P, Warth R, Mirza M, Martins JR, ve ark. Expression and function of epithelial anoctamins. *J Biol Chem* 2010; **285**(10): 7838-7845.
124. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, ve ark. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 2016; **37**(6): 564-569.
125. Bonnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Moller E, Mercader JM, Belgrave D, ve ark. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nat Genet* 2014; **46**(1): 51-55.
126. Everman JL, Sajuthi S, Saef B, Rios C, Stoner AM, Numata M, ve ark. Functional genomics of CDHR3 confirms its role in HRV-C infection and childhood asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2019; **144**(4): 962-971.
127. Schleimer RP, Berdnikovs S. Etiology of epithelial barrier dysfunction in patients with type 2 inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139**(6): 1752-1761.

HAM VERILER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI IZNI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SANTRAL ERKEN PUBERTE OLGULARINDA YENİ NESİL DİZİLEME
İLE MOLEKÜLER PATOLOJİNİN AYDINLATILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 8	% 6	% 3	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	% 1
4	open.library.ubc.ca İnternet Kaynağı	% 1
5	openaccess.maltepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.nature.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.thd.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	"Environmental Epigenomics in Health and Disease", Springer Science and Business Media LLC, 2013 Yayın	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

