TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ İLE SONUÇ ALINAMAYAN GENETİK HASTALIKLARDA m-RNA DİZİLEME YÖNTEMİ İLE MOLEKÜLER ETİYOLOJİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Okan KURTÇU

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Timur TUNCALI
Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ

ANKARA
2025

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ İLE SONUÇ ALINAMAYAN GENETİK HASTALIKLARDA m-RNA DİZİLEME YÖNTEMİ İLE MOLEKÜLER ETİYOLOJİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Okan KURTÇU

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Timur TUNCALI
Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2024-3492 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2025

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum "DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan genetik hastalıklarda m-RNA dizileme yöntemi ile moleküler etiyolojinin araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımca yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından, 14 Aralık 2023 tarihinde, İ11-785-23 numaralı kararla onaylanmıştır. 30 Eylül 2024 tarihinde İ08-620-24 numaralı kararla çalışmanın başlığının "DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan genetik hastalıklarda m-RNA dizileme yöntemi ile moleküler etiyolojinin araştırılması" olarak değiştirilmesine ve gönüllü sayısına ilişkin yapılan değişiklikler incelenerek, uygun bulunmuştur.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Dr. Okan KURTÇU
Tarih:
İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU



Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 07-Nis-2025 11:53 +03
NUMARA: 2637897334
Kelime Sayısı: 23165
Gönderildi: 1

Uzmanlık Tezi Okan Kurtçu tarafından

Benzerlik Endeksi
%11

Kaynağa göre Benzerlik

Internet Sources:	%7
Yayınlar:	%5
Öğrenci Ödevleri:	%6

KABUL ONAY SAYFASI

TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı: Dr. Okan KURTÇU	**Sınav tarihi:**
Anabilim/Bilim Dalı: Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Timur TUNCALI Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ	07 / 04 / 2025

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER		
Tezin Başlığı: DNA Dizi Analizi Yöntemleri ile Sonuç Alınamayan Genetik Hastalıklarda M-RNA Dizileme Yöntemi ile Moleküler Etiyolojinin Araştırılması		
Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☐ 1	☒ 2	☐ 3

III. KARAR
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak ☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine ☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN
GÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Dr. Öğr.Üyesi Şule ALTINER
AÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Genetik hastalıklarda, moleküler tanı için çoğunlukla tek gen dizileme, hedefli paneller, tüm ekzom dizileme gibi yöntemler kullanılır. Ancak, bu yöntemler derin intronik varyantları, yapısal değişiklikleri ve klinik önemi belirsiz varyantların klinik etkilerini belirlemede yetersiz kalabilir. Bu çalışmada, DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan, ancak genetik hastalık tanısı konmuş olgularda m-RNA dizileme yöntemi kullanılarak moleküler etiyolojinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu zorlu süreçte bana her zaman yardımcı olan, deneyim ve tecrübelerini paylaşıp yol gösteren, saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Timur TUNCALI'ya; tezim ve uzmanlık eğitimim süresince destek olup her sorumu cevaplayan, bilgi ve tecrübelerinden çokça faydalandığım eş tez danışmanım Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ'ye; emeklerine müteşekkir olduğum, desteklerini daima hissettiğim Doç. Dr. Nüket YÜRÜR KUTLAY, Doç. Dr. Halil Gürhan KARABULUT, Öğr. Gör. Dr. Arzu Nedime VİCDAN, Dr. Öğr. Üyesi Şule ALTINER, Dr. Öğr. Üyesi Ezgi GÖKPINAR İLİ ve Öğr. Gör. Dr. Sadiye EKİNCİ'ye,

Tezime büyük katkı sunan, her sorumu cevaplayan ve değerli yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Fatma Tuba EMİNOĞLU'na,

Birlikte çalışmayı bir ayrıcalık gördüğüm, destekleri ve yol arkadaşlıklarıyla süreci anlamlı kılan Dr. Elifcan TAŞDELEN, Dr. Yasemin ÜLGER, Dr. İbrahim KAPLAN, Dr. Hande Nur CESUR BALTACI, Dr. Berna ÖZAYDIN, Dr. Mustafa Oğuz ACAR, Dr. Ahmet Karer YURTDAŞ, Dr. Can Berk LEBLEBİCİ, Dr. Sümeyra ÖZBOLAT, Dr. Hüseyin İLBASMIŞ, Dr. İrem Hartuç ÇEVİK, Dr. Muhammed Faruk ÜRKMEZ, Dr. Ekin AYDIN ve Dr. Batuhan ERGİN'e,

Çok şey öğrendiğim ve beraber çalışmaktan keyif duyduğum anabilim dalımızdaki tüm çalışanlara teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) tarafından "Uzmanlık Tez Projesi" kapsamında 24 Nisan 2024 tarihinde "DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan genetik hastalıklarda m-RNA dizileme yöntemi ile moleküler etiyolojinin araştırılması" başlığında TTU-2024-3492 proje numarası ile desteklenmiştir.

Son olarak beni büyük bir sevgi ve özveriyle bu günlere getiren, her zaman destekleyen sevgili annem Hatice KURTÇU ve sevgili babam Oğuz KURTÇU'ya; her daim yanımda olan sevgili abim Onur KURTÇU'ya; sevgisi ve desteğiyle bana her zaman güç veren, hayat arkadaşım, sevgili eşim Şeyma Aybüke ÖZYAR KURTÇU'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Nisan 2025, Ankara

Dr. Okan KURTÇU

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Özgünlük Raporu iii
Kabul Onay Sayfası iv
Önsöz v
İçindekiler vi
Simgeler ve Kısaltmalar ix
Şekiller Dizini xii
Tablolar Dizini xiv

1. ÖZET 1

2. ABSTRACT 3

3. GİRİŞ VE AMAÇ 5

4. GENEL BİLGİLER 7

4.1. Çalışma Kapsamında Değerlendirilen Hastalıklar 7

4.1.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar 7

4.1.1.1. Mukopolisakkaridozlar – Oligosakkaridozlar 8

4.1.1.2. Mitokondriyal Hastalıklar 9

4.1.1.3. Biyotinidaz Eksikliği 12

4.1.1.4. Akçaağaç Şurubu İdrar Hastalığı (MSUD) 13

4.1.1.5. Glikojen Depo Hastalıkları 14

4.1.1.6. Canavan Hastalığı 16

4.1.2. Endokrin Hastalıklar 16

4.1.2.1. Hipofiz Hormon Yetmezlikleri 16

4.1.2.2. Hiperinsülinemik-Hipoglisemi-Hiperamonyemi Sendromu 17

4.2. Kırpılma İşlemi / "Nonsense Mediated m-RNA Decay" (NMD – Anlamsız aracılı mRNA bozulması) Mekanizması 17

4.3. DNA Dizi Analizi Yöntemleri 22

4.4. m-RNA Dizi Analizi ve Güncel Uygulamaları 25

4.5. İdrardan Derive Hücre (UDC) Kültürü 29

5. GEREÇ ve YÖNTEM 31

5.1. Kültür Aşaması 32

5.1.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre Örneğinden Kültür Aşaması 32

5.1.2. UDC Örneğinden Kültür Aşaması 33

5.1.3. Cilt Biyopsi Örneğinden Kültür Aşaması 34

5.2. RNA - DNA İzolasyonu 35
5.3. m-RNA Dizileme Yöntemi 38
5.3.1. Ribozomal RNA'nın Uzaklaştırılması ve Poli-A Zenginleştirilmesi 38
5.3.2. m-RNA Fragmanlarının Hazırlanması 38
5.3.3. cDNA Üretimi 38
5.3.4. Adaptör Ligasyonu ve m-RNA Dizileme 38
5.3.5. Kütüphane Hazırlama ve Kontrol 39
5.3.6. Ham Veri İşleme-Veri Kalite Kontrolü 39
5.3.7. Yarı-Hizalama ve Gen Düzeyinde Nicelleştirme 39
5.3.8. Varyant Analizi 40
5.3.9. Anormal Kırpılma (Splicing) Analizi 40
5.3.10. Anormal Ekspresyon Analizi 41
5.3.11. Anormal Alel-Spesifik Ekspresyon 41
5.4. Doğrulama, DNA Dizisinde Mutasyon Araştırması 41
6. BULGULAR 45
6.1. Olgu 1 49
6.2. Olgu 2 52
6.3. Olgu 3 54
6.4. Olgu 4 55
6.5. Olgu 5 58
6.6. Olgu 6 61
6.7. Olgu 7 62
6.8. Olgu 8 65
6.9. Olgu 9 66
6.10. Olgu 10 67
6.11. Olgu 11 70
6.12. Olgu 12 71
6.13. Olgu 13 73
6.14. Olgu 14 75
6.15. Olgu 15 76
6.16. İdrar Derive Hücrelere ait RNA Ekspresyon Verilerinin Fibroblast ve Tam Kan Örnekleriyle Karşılaştırılması 77
7. TARTIŞMA 78
8. SONUÇ ve ÖNERİLER 84
9. KAYNAKLAR 86

10. EKLER **92**

EK-1: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu 92

EK-2: Hasta Takip Form 96

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
</≤	Küçüktür/Küçük eşittir
>/≥	Büyüktür/Büyük eşittir
≈/~	Yaklaşık
ACMG	*The American College of Medical Genetics and Genomics*
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
ADP	Adenozin difosfat
ASO	Antisense oligonükleotid
ATP	Adenozin trifosfat
BCKD	Dallı zincirli α-ketoasit dehidrogenaz
BPS	*Branch point sequence*, dallanma noktası
BOS	beyin omurilik sıvısı
CNV	*Copy number variation*, kopya sayısı değişikliği
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
EKO	Ekokardiyografi
ESE	*Exonic Splicing Enhancer,* ekzonik kırpılma güçlendiricisi
ESS	*Exonic Splicing Silencers***,** ekzonik kırpılma susturucusu
FBS	*Fetal bovin serum,* fetal sığır serum
FSH	Folikül uyarıcı hormon
g/mg/µg	Gram/Miligram/Mikrogram
GAG	Glikozaminoglikan
GDH	Glikojen depo hastalığı
GDP	Guanozin difosfat
GH	Büyüme hormonu
GTEx	*Genotype-Tissue Expression Portal*
GTP	Guanozin trifosfat
HPA	*Human Protein Atlas*
ISE	*Intronic Splicing Enhancer*, intronik kırpılma güçlendiricisi
ISS	*Intronic Splicing Silencers*, intronik kırpılma susturucusu
IUGR	İntrauterin gelişme geriliği
IVF	İn-vitro fertilizasyon

L/mL/µL Litre/Mililitre/Mikrolitre

LH Lüteinize edici hormon

m-RNA Mesajcı ribonükleik asit

MAE *Monoallelic expression,* monoalelik ifade

MELAS Mitokondriyal Ensefalomiyopati, Laktik Asidoz ve İnme-benzeri Ataklar

MERRF Myoklonik Epilepsi, Ragged-Kırmızı Lifler

$MgCl_2$ Magnezyum klorür

MNGIE Mitokondriyal Nörogastrointestinal Ensefalopati

MPS Mukopolisakkaridoz

MRG Manyetik rezonans görüntüleme

MSUD M*aple syrup urine disease,* akçaağaç şurup idrar hastalığı

mtDNA Mitokondriyal DNA

NAA N-asetil aspartik asit

NARP Nörojenik Kas Güçsüzlüğü, Ataksi ve Retinitis Pigmentosa

nDNA Nükleer DNA

NGS *Next Generation Sequencing***,** yeni nesil dizileme

NMD *Nonsense mediated decay,* anlamsız aracılı mRNA bozulması

º C Santigrat derece, Celsius

OMIM *Online Mendelian Inheritance in Man*

ONT *Oxford nanopore technologies*

PBMC *Peripheral Blood Mononuclear Cells***,** periferik kan mononükleer hücre

PBS *Phosphate Buffered Saline*, fosfat tamponlu salin

PCR *Polymerase Chain Reaction***,** polimeraz zincir reaksiyonu

PGT Preimplantasyon genetik tanı

PHA *Phytohemagglutinin***,** fitohemaglutinin

PPT *Polypyrimidine tract*, polipirimidin yolu

PTC *Premature Termination Codon***,** erken sonlanma kodonu

RNA Ribonükleik asit

RT-PCR *Revers transcriptase polymerase chain reaction,* ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

SBS Sequencing-by-synthesis, sentez yoluyla dizileme

SCA Spinoserebellar ataksi

SGA *Small for gestational age,* gebelik yaşına göre küçük

SNRNP *Small nuclear ribonucleoprotein,* küçük nükleer ribonükleoprotein

SUT Sağlık Uygulama Tebliği

TSH	Tiroid uyarıcı hormon
TMM	*trimmed mean of M values*
TPM	*Transcripts per kilobase million*
UDC	*Urine derive cell,* idrardan derive hücre
uORF	*upstream open reading frame*
USC	*Urine stem cell,* idrardan derive kök hücre
UTR	*untranslated region*, çevrilmemiş bölge
VUS	Klinik önemi belirsiz varyant
WES	Tüm ekzom dizileme
WGS	Tüm genom dizileme

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Ekzonik kırpılma güçlendiricileri (ESE) ve susturucuları (ESS) ile intronik kırpılma güçlendiricileri (ISE) ve susturucularının (ISS) gösterimi 18
Şekil 4.2. Minör - majör intronların gösterimi ve "spliceozom" kompleksi ile etkileşimi 19
Şekil 4.3. Alternatif kırpılma işlemelerinin temsili gösterimi 20
Şekil 4.4. NMD mekanizmasını etkileyen durumlar 21
Şekil 6.1. Olgu 1'e ait aile ağacı 49
Şekil 6.2. Olgu 1'e ait *GNPTAB* geni Sashimi Plot görüntüsü 50
Şekil 6.3. Olgu 1'e ait intronik kalıntıyı gösteren jel ve elektroferogram görüntüsü 50
Şekil 6.4. Olgu 1'de saptanan derin intronik varyantın değerlendirilmesi ve segregasyon sonuçları 51
Şekil 6.5. Olgu 2'ye ait aile ağacı 52
Şekil 6.6. Olgu 2'ye ait *BCKDHA* geni Sashimi Plot görüntüsü 53
Şekil 6.7. Olgu 2'de bulunan RNA değişikliğinin doğrulanması 54
Şekil 6.8. Olgu 3'e ait aile ağacı 55
Şekil 6.9. Olgu 4'e ait aile ağacı 55
Şekil 6.10. Olgu 4'e ait RNA çalışmasının IGV görüntüleri 56
Şekil 6.11. Olgu 4'te yeniden düzenlenmenin kanıtlanması için planlanan PCR çalışması ve primerlerin *IDS* ve *IDSP1* genlerine göre konumları 57
Şekil 6.12. Olgu 4'te yeniden düzenlenmenin kanıtlanması için yapılan PCR çalışmaları 57
Şekil 6.13. Olgu 4'te yeniden düzenlenme sonucu meydana gelmiş *IDS-EOLA1* füzyon transkripti 58
Şekil 6.14. Olgu 5'e ait aile ağacı 59
Şekil 6.15. Olgu 5'e ait Sashimi plot görüntüsü 59
Şekil 6.16. Olgu 5'e ait intronik kalıntıyı gösteren jel ve elektroferogram görüntüsü 60
Şekil 6.17. Olgu 5'te saptanan derin intronik varyantın değerlendirilmesi ve segregasyon sonuçları 61
Şekil 6.18. Olgu 6'ya ait aile ağacı 62
Şekil 6.19. Olgu 7'ye ait aile ağacı 63
Şekil 6.20. Olgu 7'ye ait Sashimi plot görüntüleri 63
Şekil 6.21. Olgu 10'da RNA dizileme ile bulunan değişikliklerin doğrulanması 64
Şekil 6.22. Olgu 8'e ait aile ağacı 66

Şekil 6.23. Olgu 9'a ait aile ağacı 66
Şekil 6.24. Olgu 10'a ait aile ağacı 67
Şekil 6.25. Olgu 10'a ait *SLC52A2* genine ait Sashimi plot görüntüsü 68
Şekil 6.26. Olgu 10'a ait uORF'lerin 1.ekzon ve 2.ekzondaki başlangıç ve stop kodonlarının yerleşimi 68
Şekil 6.27. Olgu 10'a ait *POLG2* genine ait Sashimi plot görüntüsü 69
Şekil 6.28. Olgu 10 *CFH-CFHR3* genlerine ait Sashimi plot görüntüsü 70
Şekil 6.29. Olgu 11'e ait aile ağacı 71
Şekil 6.30. Olgu 12'a ait aile ağacı 72
Şekil 6.31. Olgu 12'ye ait *KCNQ1* geninin ekzon 2-10 bölgesini içeren Sashimi plot görüntüsü 72
Şekil 6.32. Olgu 13'e ait aile ağacı 73
Şekil 6.33. Olgu 13'e ait Sashimi plot görüntüsü 74
Şekil 6.34. Olgu 13'te saptanan derin intronik varyantın değerlendirilmesi ve segregasyon sonuçları 75
Şekil 6.35. Olgu 14'e ait aile ağacı 76
Şekil 6.36. Olgu 15'e ait aile ağacı 77

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Kalıtsal metabolik hastalıkların semptomlara ve patofizyolojik mekanizmaya göre sınıflandırması 8
Tablo 4.2. Mitokondriyal hastalıklardaki kusurlu nükleer genler ve fonksiyonları 9
Tablo 4.3. Çocukluk çağı başlangıçlı mitokondriyal hastalıklar ve klinik bulguları 11
Tablo 4.4. Yetişkin başlangıçlı mitokondriyal hastalıklar ve klinik bulguları 12
Tablo 4.5. Glikojen depo hastalıkları ve klinik bulguları 15
Tablo 5.1. Hücre sayısına göre kullanılması gereken *Buffer RLT* miktarı 35
Tablo 5.2. Çalışmada cDNA ve DNA örnekleri için kullanılan primerler ve özellikleri 42
Tablo 5.3. RT-PCR reaksiyon karışımı 42
Tablo 5.4. RT-PCR reaksiyon koşulları 42
Tablo 5.5. PCR reaksiyon karışımı 43
Tablo 5.6. PCR reaksiyon koşulları 43
Tablo 5.7. ExoSAP reaksiyon koşulları 43
Tablo 5.8. Sekans PCR reaksiyonu karışımı 44
Tablo 5.9. Sekans PCR reaksiyonu koşulları 44
Tablo 6.1. Olgulara ait çalışılan doku, yaş/cinsiyet, klinik bulgu, yapılan genetik testler ve ön tanı bilgileri 46

1. ÖZET

DNA Dizi Analizi Yöntemleri ile Sonuç Alınamayan Genetik Hastalıklarda m-RNA Dizileme Yöntemi ile Moleküler Etiyolojinin Araştırılması

Giriş ve amaç: Genetik hastalıklarda, moleküler tanı için çoğunlukla tek gen dizileme, hedefli paneller, tüm ekzom dizileme gibi yöntemler kullanılır. Ancak, bu yöntemler derin intronik varyantları, yapısal değişiklikleri ve klinik önemi belirsiz varyantların klinik etkilerini belirlemede yetersiz kalabilir. Prenatal tanı veya preimplantasyon genetik tanı (PGT), kalıtsal hastalıklara sahip ailelerin sağlıklı çocuk sahibi olmasını sağlayabilir. Kalıtsal bir hastalığı olan veya kalıtsal bir hastalık için taşıyıcı olduğu bilinen evli çiftlerin; sağlıklı bebek sahibi olması için uygulanan PGT ve yardımcı üreme tekniklerine yönelik geri ödeme kapsamındaki hastalık listesi, 1 Ağustos 2021 tarihinde güncellenen Sağlık Uygulama Tebliği ile genişletilmiş ve bazı metabolik hastalıklar eklenmiştir. Antisense oligonükleotidler, U1-snRNA modülasyonu, kırpılma mutasyonları taşıyan hastalarda araştırma ve geliştirmesi devam etmekte olan tedavi yöntemleridir. Bu tedavi yöntemlerine uygunluğunun belirlenebilmesi için ve prenatal tanının endike olduğu olgularda, mutasyonun moleküler genetik yöntemler ile gösterilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan genetik hastalık tanısının net olduğu olgularda m-RNA dizileme yöntemi ile incelenerek moleküler etiyolojinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya rutin genetik testler ile tanı alamayan 15 olgu dahil edilmiştir. RNA eldesi için periferik kan, periferik kan mononükleer hücreleri, fibroblast ve idrar kullanılmıştır. RNA izolasyonu sonrasında m-RNA dizileme çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda saptanan RNA değişiklikleri doğrulanmış ve değişikliğe neden olan mutasyon belirlenerek, aile içinde segregasyon çalışması uygulanmıştır.

Bulgular: Çalışmaya alınan 8 olguda RNA değişikliği tespit edildi. Bu değişiklikler sonucunda *GNPTAB*, *HLCS, GLB1, FBXL4* genlerinde derin intronik varyantlar, bir olguda *IDS-IDSP1* yeniden düzenlenmesi ve *IDS-EOLA1* füzyon geni, bir olguda *GLB1* geninde heterozigot ekzon delesyonu, *MSUD* tanılı daha önce yapılan dizi analizi incelemelerinde yanlış negatif sonuç verilen bir olguda *BCKDHA* homozigot ekzon delesyonu, mitokondriyal hastalık düşünülen bir olguda 5'UTR bölgesindeki RNA değişikliği gösterilerek bozulmuş uORF

mekanizması, *KCNQ1* geninde ardışık ekzon atlamaları ve *CDKN1C* geninde ifade değişikliği saptanarak hastaların klinik bulgularının genetik olarak açıklanmasına katkıda bulunuldu.

Sonuç: Çalışmada tespit edilen intronik varyantlar ilgili genlerde tanımlanmış ilk derin intronik varyantlardır. Ayrıca çalışmamız idrardan derive hücre kültürü ile RNA dizileme yapılan Türkiye'deki ilk çalışmadır. RNA dizileme, tüm ekzom dizileme ve tüm genom dizileme yöntemlerinin sınırlılıklarını aşabilmesi (derin intronik varyantlar, heterozigot ekzon delesyonları gibi) ile analiz edilmesi zor bölgelerin fonksiyonel olarak incelenmesini sağlaması (5'UTR gibi) nedeniyle moleküler tanısı konamamış genetik hastalıklarda güçlü bir alternatiftir. Hastaların moleküler tanısına katkı vererek, prenatal tanı-preimplantasyon genetik tanıdan ve kırpılmayı modüle eden tedavi olanaklarından faydalanması sağlanır. Ayrıca, hasta kliniğiyle ilişkilendirilemeyen bir varyant bulunması veya ilgili gende herhangi bir varyant bulunmaması durumunda da gen ekspresyon analizleri tanıya katkı sağlayabilir. RNA dizileme, tanı için tek başına veya tüm ekzom dizileme/tüm genom dizileme ile kombine şekilde kullanılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: RNA dizileme, idrar derive hücre, derin intronik varyant, ekspresyon

2. ABSTRACT

Introduction and Aim: Genetic diseases can occur through chromosomal anomalies or mutations in DNA and can be inherited. Methods such as single-gene sequencing, targeted panels, and whole exome sequencing are used for molecular diagnosis. However, these methods may be inadequate in detecting deep intronic variants, structural changes, and determining the clinical effects of variants of uncertain significance. Prenatal diagnosis or preimplantation genetic diagnosis (PGD) can enable families with hereditary diseases to have healthy children. The list of diseases covered by reimbursement for PGD and assisted reproductive techniques applied to enable couples who have or are known to be carriers of a hereditary disease to have a healthy child was expanded with the inclusion of certain metabolic disorders through the updated Healthcare Implementation Communiqué on August 1, 2021. Antisense oligonucleotides and U1-snRNA modulation in patients with splicing mutations are treatment methods still under research and development. For these treatment methods to be applied and in cases where prenatal diagnosis is indicated, the mutation must be demonstrated by molecular genetic methods. In this study, it is aimed to determine the molecular etiology by examining genetic disease cases with no results from DNA sequencing methods through mRNA sequencing.

Materials and Methods: Fifteen cases that could not be diagnosed with routine genetic tests were included in the study. Peripheral blood, peripheral blood mononuclear cells, fibroblasts, and urine were used for RNA extraction.

Results: RNA changes were detected in 8 cases. As a result of these changes, deep intronic variants were identified in the *GNPTAB, HLCS, GLB1*, and *FBXL4* genes. Additionally, *IDS-IDSP1* rearrangement and *IDS-EOLA1* fusion gene were detected in one case, heterozygous deletion in the *GLB1* gene in another, and a homozygous exon deletion in the *BCKDHA* gene in a case previously diagnosed with MSUD that had been falsely reported as negative in previous sequence analysis studies. Furthermore, in a case suspected of mitochondrial disease, RNA changes in the 5'UTR region were shown to disrupt the upstream ORF mechanism. Consecutive exon skipping in the *KCNQ1* gene and expression changes in the *CDKN1C* gene were identified, contributing to the explanation of patients' clinical findings.

Conclusion: The identified variants are the first deep intronic variants defined in the relevant genes. Additionally, our study is the first in Turkey to perform RNA sequencing using urine-derived cell culture. RNA sequencing is a powerful alternative in undiagnosed genetic diseases due to its ability to overcome the limitations of whole exome sequencing and whole genome sequencing methods (such as deep intronic variants and heterozygous exon deletions) and to provide functional analysis of difficult-to-analyze regions (such as the 5'UTR). Furthermore, gene expression analysis can contribute to diagnosis if a variant unrelated to the patient's clinical findings is found or if no variant is found in the relevant gene. RNA sequencing should be used alone or in combination with whole exome sequencing/whole genome sequencing for diagnosis.

Key Words: RNA sequencing, urine-derived cells, deep intronic variant, expression

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Nadir genetik hastalıklar, Avrupa ve diğer gelişmiş ülkelerdeki tanımıyla; 2000'de 1 ya da daha az sıklıkta görülen, çoğunlukla ilerleyici, metabolik, kronik ve bazen de ölümcül olabilen hastalıklardır. Türkiye'de tahmini olarak yaklaşık 5 milyon, Dünya genelinde ise yaklaşık 350 milyon insanı etkileyen, bilinen 10.000'den fazla nadir genetik hastalık vardır. Ülkemizdeki yüksek akraba evliliği oranı, genetik hastalıkların insidansını arttırmaktadır.

Genetik hastalık tanısı; klinik/dismorfolojik muayene, soy ağacı bilgileri, biyokimyasal testler, spesifik enzim düzeyleri, görüntüleme bulguları ve genetik testlerle konulmaktadır. Moleküler genetik tanı için tek gen dizileme, hedefli paneller, tüm ekzom dizileme (WES) gibi DNA dizileme yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler ile hastalığın etiyolojisinden sorumlu olabilecek derin intronik varyantlar, yapısal değişiklikler ve kopya sayısı değişiklikleri (translokasyon, insersiyon-delesyon, inversiyon) tespit edilememektedir. Ayrıca bu yöntemler ile klinik önemi bilinmeyen varyant (VUS) kategorisinde sınıflandırılan mutasyonların klinik etkisi net olarak ortaya konamamaktadır.

Antisense oligonükleotidler (ASO), kırpılma mutasyonlarını taşıyan hastalarda U1-küçük nükleer RNA (U1-snRNA) modülasyonu, kırpılma mutasyonu taşıyan hastalar için araştırma ve geliştirmesi süren tedavi yöntemleridir. Ayrıca genetik hastalık tanı öyküsü olan ailelerde, sonraki kuşaklarda sağlıklı sağlıklı bebek sahibi olabilmek için prenatal tanı veya preimplantasyon genetik tanı (PGT) imkanları mevcuttur. Kalıtsal bir hastalığı olan veya kalıtsal bir hastalık için taşıyıcı olduğu bilinen evli çiftlerin; sağlıklı bebek sahibi olması için uygulanan PGT ve yardımcı üreme tekniklerine yönelik geri ödeme kapsamındaki hastalık listesi, 1 Ağustos 2021 tarihinde güncellenen Sağlık Uygulama Tebliği ile genişletilmiş ve bazı metabolik hastalıklar eklenmiştir. Bu tedavi yöntemlerinin uygulanabilirliğinin değerlendirilebilmesi için ve prenatal tanının endike olduğu olgularda, mutasyonun moleküler genetik yöntemler ile gösterilmesi gerekmektedir. Genetik hastalığı olup moleküler tanı alamayan hastaların doğru ve erken tanı alması, gereksiz tetkik ve tedavilerin önüne geçerek sağlık sistemindeki mali yükü azaltır. Ayrıca, kesin tanı konulan hastalarda uygun izlem ve tedavi planlaması yapılabildiğinden hastane başvuruları ve komplikasyon oranları düşer.

Araştırma kapsamında DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan genetik hastalık tanılı olgular m-RNA dizileme yöntemi ile incelendi. Bu araştırmanın birincil amacı; klinik

muayene, biyokimyasal testler, spesifik enzim düzeyleri ve görüntüleme bulguları ile genetik hastalık tanısı alan ancak genetik testleri normal çıkan hastalarda moleküler etiyolojiyi belirlemektir. Bu nedenle çalışmada rutin genetik testlerde varyant saptanmayan hastalar hedeflenmiştir. İkincil amaç ise, rutin genetik testler ile saptanan fakat etkisi net olarak açıklanamayan varyantların fonksiyonel çalışmalar ile (m-RNA dizileme) etkisini göstermektir.

4. GENEL BİLGİLER

Genetik hastalıklar, kromozomal hastalıklar, monogenik (tek genin etkisine bağlı) veya poligenik (birden fazla genin etkisiyle) hastalıklar, mitokondiryal hastalıklar, tekrar hastalıkları, multifaktöriyel hastalıklar olarak sınıflandırılabilir. Nadir genetik hastalıklar, Avrupa ve diğer gelişmiş ülkelerdeki tanımıyla; 2000'de 1 ya da daha az sıklıkta görülen, çoğu ilerleyici, metabolik, kronik ve bazıları ölümcül olabilen hastalıklardır. Türkiye'de tahmini olarak yaklaşık 5 milyon, Dünya üzerinde ise yaklaşık 350 milyon insanı etkileyen 10.000'den fazla bilinen nadir genetik hastalık vardır.

4.1. Çalışma Kapsamında Değerlendirilen Hastalıklar

4.1.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar

Kalıtsal metabolik hastalıklar, ailesel veya *de_novo* mutasyonlar sonucu ortaya çıkabilen heterojen bir morbidite grubudur. Bu hastalıklar, karbonhidratların, yağ asitlerinin ve proteinlerin sindirilmesinde veya depolanmasında rol oynayan metabolik yolakların bozukluğu ile oluşur. (Tablo 4.1.) Etkilenen biyokimyasal yolağa bağlı olarak özgün klinik ve biyokimyasal bulgular görülür (1). Çok nadir olmasına rağmen, bir grup olarak ele alındığında kalıtsal metabolik hastalıklar 1:2500-4000 sıklığında görülür. İntrauterin dönemden başlayarak erişkin dönem dahil geniş bir zaman aralığı içinde semptom gösterebilir. Birkaç istisna dışında kalıtsal metabolik hastalıkların büyük çoğunluğu otozomal resesif kalıtım gösterir. Ülkemizde yüksek akraba evliliği oranı kalıtsal metabolik hastalıkların insidansını arttırmaktadır.(2)

Tarihte tanımlanan ilk kalıtsal metabolik hastalık olan "alkaptonüri" ve ilişkili biyokimyasal yolağı, 1908 yılında bir annenin çocuğunun idrarının renginin neden siyah renge döndüğünü araştırması için Sir Archibald Garrod'a danışmasıyla ortaya konmuştur(3). Ivar Asbjörn Følling 1934'te entelektüel yetersizliği olan ve alışılmadık kokuya sahip iki çocuğun hastalığını araştırırken, en yaygın kalıtsal metabolik hastalıklardan biri olan fenilketonüri hastalığını tanımlamıştır. Robert Guthrie kendi adını taşıyan bir bakteriyel inhibisyon testi olan tarama testi ile 1960 yılında fenilketonüri taramasını başlatmıştır. Kalıtsal metabolik

hastalıklarda tanısal devrim niteliğinde olan ardışık kütle spektrometresi 20. yüzyılın sonlarında kullanıma girmiştir.

Tablo 4.1. Kalıtsal metabolik hastalıkların semptomlara ve patofizyolojik mekanizmaya göre sınıflandırması

Kalıtsal metabolik hastalıklar	
İntoksikasyon hastalıkları	▪ Aminoasit metabolizma bozuklukları: Organik asidemiler, üre siklus defektleri, aminoasidopatiler (fenilketonüri, tirozinemi vb.) ▪ Karbonhidrat metabolizma bozuklukları: Galaktozemi, fruktozemi vb. ▪ Diğer: Porfiriler, nörotransmitter bozuklukları
Enerji eksikliği hastalıkları	▪ Mitokondri hastalıkları: MELAS, Leigh sendromu vb. ▪ Yağ asidi β-oksidasyon bozuklukları ▪ Diğer: GLUT1 transport eksikliği vb.
Depo hastalıkları	▪ Lizozomal depo hastalıkları: Mukopolisakkaridozlar, Nieman-pick sendromu, Fabry hastalığı vb. ▪ Peroksizomal hastalıklar: X-geçişli adrenolökodistrofi, Zellweger hastalığı vb.

4.1.1.1. Mukopolisakkaridozlar – Oligosakkaridozlar

Hücre dışı matrisin, eklem sıvısının ve bağ dokusunun ana bileşeni olan glikozaminoglikanların (mukopolisakkaritler) parçalanması lizozomlarda gerçekleşir. Mukopolisakkaridoz (MPS), glikozaminoglikanları (GAG) yıkan enzimlerin eksikliği sonucu lizozomlarda GAG birikmesine yol açan bir lizozomal depo hastalığıdır (4). Mukopolisakkaridozlar, 11 farklı enzim eksikliğinin neden olduğu yedi ana hastalık olarak sınıflandırılır: MPS I (Hurler, Hurler–Scheie, Scheie sendromu), MPS II (Hunter sendromu), MPS III (Sanfilippo sendromu), MPS IV (Morquio sendromu), MPS VI (Maroteaux-Lamy sendromu), MPS VII (Sly sendromu) ve MPS IX (Natowicz sendromu, hiyalüronidaz eksikliği). X'e bağlı resesif kalıtım kalıbına sahip olan MPS II dışında tüm MPS'ler otozomal resesif geçişe sahiptir. Prevelansı topluma göre değişmektedir. Türkiye için yapılan epidemiyolojik çalışmalarda Türkiye'de en sık tip 2, tip 3 ve tip 4 MPS'in görüldüğü ifade edilmiştir. Bir enzim eksikliğine bağlı olarak, farklı hücre tiplerinde dermatan sülfat, heparan sülfat, kondroitin sülfat gibi GAG'lar birikir. Biriken GAG'lar çeşitli doku ve organların fonksiyonunu etkiler. MPS'li hastalarda klinik olarak kaba yüz özellikleri, iskelet anormallikleri (dizostosis multipleks), hepatosplenomegali, sık enfeksiyon öyküsü, solunum güçlüğü, kardiyak problemler, entelektüel yetersizlik görülür ve yaşam süresi azalır.

Mukopolisakkaridoz ön tanılı hastaların klinik ve radyolojik tanısı, idrar GAG seviyeleri, fibroblast/lökosit hücrelerinde enzim aktivitesi düzeyi ve radyolojik incelemeler ile konulmaktadır. Ayrıca, hem bu tanıyı doğrulamak hem de hastada tedavi olanaklarının

değerlendirilmesi ve sonraki kuşaklarda prenatal tanı olanağı sağlaması nedeniyle moleküler genetik tanı da gereklidir. MPS hastalarında güncel tedaviler tek başına veya kombine şekilde kullanılabilen enzim replasman tedavisi, kök hücre transplantasyonu ve gen terapisidir. Tedavi yöntemi seçimi, hastalığın tipine ve semptomların şiddetine göre yapılır(4, 5).

4.1.1.2. Mitokondriyal Hastalıklar

Mitokondri, eritrositler hariç, her hücrede bulunan ve oksidatif fosforilasyon, yağ asidi oksidasyonu, krebs döngüsü, üre döngüsü, glukoneogenez ve ketogenez gibi çeşitli hücresel metabolik yollardan sorumlu bir organeldir. Bu biyolojik mekanizmaların dışında, hem ve demir-kükürt kümelerinin biyosentezi, kalsiyum homeostazı ve apoptoz gibi başka önemli hücresel süreçlerde de görev alır. Mitokondriyal hastalıklar ise, mitokondri organelinin fonksiyon kaybına bağlı görülen hastalıklardır(6).

Mitokondriler, her hücrede birden fazla kopya mitokondriyal DNA (mtDNA) içerir. Heteroplazmi, bir hücredeki mtDNA'nın farklı tiplerinin (normal ve mutasyonlu halinin) aynı anda bulunması durumudur. Eşik değeri aşılırsa (%60-80) mutasyonlu mtDNA'nın neden olduğu hastalık belirtileri ortaya çıkabilir. Mitokondriyal hastalıklar hem mtDNA hem de nükleer DNA'daki (nDNA) mutasyonlar sonucu oluşabilir. Mitokondriyal hastalıklar nDNA için otozomal ya da X'e bağlı, mtDNA için ise maternal kalıtım gibi farklı kalıtım modellerine sahip olabilir. (Tablo 4.2.) Yanı sıra, *de_novo* (taze) mutasyonlara bağlı nadir sporadik olgular da bildirilmiştir. Mitokondriyal hastalıklar klinik olarak oldukça heterojendir, her yaşta ortaya çıkabilir ve çok çeşitli klinik semptomlarla kendini gösterebilir. Mitokondriyal hastalıklar herhangi bir organı veya dokuyu tutabilir, aerobik metabolizmaya oldukça bağımlı organları etkileyerek birden fazla sisteme ait bulgular görülebilir. Yaygınlığının 100.000 kişide 5 ila 15 olgu olduğu düşünülmektedir. Genetik kurucu mutasyonların ve akraba evliliklerinin belirli popülasyonlarda bazı mitokondriyal hastalıkları daha yaygın hale getirdiği görülmüştür.

Sağlıklı mitokondri fonksiyonu için 1.500'den fazla protein gereklidir. mtDNA 16,6 kb uzunluğunda, oksidatif fosforilasyon sisteminin 13 yapısal proteini ve intramitokondriyal protein sentezi için gerekli olan 24 RNA'yı kodlayan çift sarmallı DNA molekülüdür. mtDNA dairesel bir yapıya sahiptir ve intron-ekzon yapısından yoksundur. Diğer proteinler ise nDNA tarafından kodlanır(7).

Tablo 4.2. Mitokondriyal hastalıklardaki kusurlu nükleer genler ve fonksiyonları(8)

Mitokondriyal Hastalıklardaki Kusurlu Nükleer Genler ve Fonksiyonları	
Fonksiyon	**Genler**
Fosfolipid metabolizması	*AGK, SERAC1, TAZ*
Toksik bileşiklerin metabolizması	*HIBCH, ECHS1, ETHE1, MPV17*
Disülfid taşıma sistemi	*GFER*
Demir-kükürt protein sistemi	*ISCU, BOLA3, NFU1, IBA57*
tRNA modifikasyonu	*MTO1, GTP3BP, TRMU, PUS1, MTFMT, TRIT1, TRNT1, TRMT5*
Aminoasil-tRNA sentetazları	*AARS2, DARS2, EARS2, RARS2, YARS2, FARS2, HARS2, LARS2, VARS2, TARS2, IARS2, CARS2, PARS2, NARS2, KARS, GARS, SARS2, MARS2*
Uzama faktörleri	*TUFM, TSFM, GFM1*
Mitokondriyal ribozomal proteinler	*MRPS16, MRPS22, MRPL3, MRP12, MRPL44*
m-RNA işlenmesi	*LRPPRC, TACO1, ELAC2, PNPT1, HSD17B10, MTPAP, PTCD1*
Deoksinükleotit trifosfat sentezi	*DGUOK, TK2, TYMP, MGME1, SUCLG1, SUCLA2, RNASEH1, C10orf2, POLG, POLG2, DNA2, RRM2B*
Tiamin ve fosfat taşıyan çözücü proteinler	*SLC19A3, SLC25A3, SLC25A19*
Solunum zinciri alt birimleri	**Kompleks I:** *NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUFA1, NDUFA2, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFAF2, NDUFAF6, NDUFB11*
	Kompleks II: *SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF1*
	Kompleks III: *UQCRB, BCS1L, UQCRQ, UQCRC2, CYC1, TTC19, LYRM7, UQCC2, UQCC3*
	Kompleks IV: *COA5, SURF1, COX10, COX14, COX15, COX20, COX6B1, FASTKD2, SCO1, SCO2, LRPPRC, TACO1, PET100*
	Kompleks V: *ATPAF2, TMEM70, ATP5E, ATP5A1*
Koenzim Q10 eksikliği	*PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ4, COQ6, COQ8A, COQ8B, COQ9*
Protein kalitesi kontrolü ve yıkımı	*FBXL4, AFG3L2, SPG7*

Mitokondriyal hastalıklarda semptomların başlangıcının, hayatın ilk üç yılında birincil zirveye ulaştığı ve ardından ergenlik sonlarına doğru başlayarak yaşamın dördüncü dekatında erişkin başlangıçlı hastalıklar olarak ikinci bir zirve gösterdiği bilinmektedir. Bununla birlikte, mitokondriyal hastalıklar daha geç yaşlarda, özellikle kronik ilerleyici eksternal oftalmopleji gibi durumlarla da kendini gösterebilir. Mitokondriyal hastalıkların klinik tanısı, neredeyse her organ sistemini etkileyebildiği için, geniş bir fenotipik yelpazeye sahip olması nedeniyle oldukça zordur. Tek sistem tutulumu, sınırlı sayıda olguda gözlenir. Ancak çoğu hastada, birden fazla sistemin etkilendiği çoklu organ tutulumu ön plandadır.

Mitokondriyal hastalıkların klinik bulguları oldukça heterojen olduğu için tüm mitokondriyal hastalıkları kapsayan bir tanı algoritması geliştirmek oldukça zordur. Tanı algoritması, hastanın yaşı/semptomların başlangıç yaşı ve ortak genetik kurucu mutasyonların

varlığından oldukça etkilenir. (Tablo 4.3. – Tablo 4.4.) Hastanın klinik öyküsü ve fizik muayenesi yapılır. Kalıtım şeklinin değerlendirilmesi, plazmada veya beyin omurilik sıvısında (BOS) laktat ve/veya pirüvat seviyelerinin ölçülmesi, plazma açilkarnitin, idrar organik asit ve serumdaki FGF21 ve/veya GDF15 düzeylerinin belirlenip değerlendirilmesi gerekir(9, 10). Ayrıca nörogörüntüleme, nörofizyoloji ve kardiyovasküler fonksiyonlar değerlendirilir. Tüm bu süreçlerden sonra oluşacak ön tanıya yönelik spesifik genetik test yapılır. Eğer herhangi bir ön tanı oluşmadıysa klinik ilişkili doku (kas vb.) biyopsisi, mitokondriyal genom analizi, WES, tüm genom dizileme (WGS) testleri ile olgunun tanısı kesinleştirilir(6).

Tablo 4.3. Çocukluk çağı başlangıçlı mitokondriyal hastalıklar ve klinik bulguları(8)

Çocukluk Çağı Başlangıçlı Mitokondriyal Hastalıklar	
Sendrom	**Klinik bulgular**
Leigh sendromu	nDNA ve mtDNA'da >75 gen ilişkili Akut nörogelişimsel gerileme, hipotoni, distoni, hipopne, disfaji, epilepsi, gelişme geriliği, ensefalopati, bazal ganglion ve beyin sapı lezyonları(11)
Alpers–Huttenlocher sendromu	nDNA'da *POLG* geni ile ilişkili Tedaviye dirençli epilepsi, psikomotor gerileme ve karaciğer hastalığı; MCHS ve MEMSA'nın klinik özelliklerini de içerebilir
Çocukluk çağı miyoserebrohepatopati spektrumu	Nöropati, ataksi, hipotoni, miyoklonus (spontan kas kasılmaları), koreoatetoz (istem dışı hareketler), Parkinsonizm ve renal tübülopati
Ataksi nöropati spektrumu	Sensöriyel aksonal nöropati ve serebellar ataksi
Myoklonik epilepsi miyopati sensoryel ataksi	Epilepsi, nöbetler, dizartri, demans, spastisite ve miyopati
Sengers sendromu	nDNA'da *AGK* geni mutasyonları ile ilişkili Konjenital katarakt, hipertrofik kardiyomiyopati, iskelet miyopatisi, egzersiz intoleransı ve laktik asidoz
MEGDEL sendromu	nDNA'da *SERAC1* geni mutasyonları ile ilişkili Sensörinöral işitme kaybı (SNİK), ensefalopati, gelişme geriliği, hipotoni, psikomotor gecikme, distoni, spastisite, hipoglisemi, hepatopati ve laktik asidoz
Pearson sendromu	Büyük mtDNA delesyonları veya yeniden düzenlenmeler sorumlu Çocuklukta sideroblastik anemi, ekzokrin ve/veya endokrin pankreas disfonksiyonu, pansitopeni ve renal tübülopati
Konjenital laktik asidoz	nDNA, *de_novo* mtDNA nokta mutasyonları veya kalıtsal mtDNA nokta mutasyonları Çocukluk çağı başlangıçlı genellikle ölümcül, progresif nöromüsküler zayıflık, kanda asidoz, idrarda ve/veya BOS'ta laktat birikimi

Tablo 4.4. Yetişkin başlangıçlı mitokondriyal hastalıklar ve klinik bulguları(8)

Yetişkin Başlangıçlı Mitokondriyal Hastalıklar	
Leber kalıtsal optik nöropati	mtDNA mutasyonları: m.11778G>A (*MT-ND4*), m.14484T>C (*MT-ND6*) ve m.3460G>A (*MT-ND1*) Subakut, ağrısız, bilateral görme kaybı Ayrıca distoni, kardiyak preeksitasyon sendromları ve multipl skleroz benzeri semptomlar (Harding sendromu).
Kearns–Sayre sendromu	Büyük ölçekli mtDNA delesyonu (genellikle sporadik) Progresif eksternal oftalmopleji, pigmente retinopati, BOS protein düzeyi >1 g/L, serebellar ataksi, kardiyak ileti anormallikleri, miyopati, diyabet, işitme kaybı, bulbar güçsüzlük ve demans
MELAS sendromu (Mitokondriyal Ensefalomiyopati, Laktik Asidoz ve İnme-benzeri Ataklar)	mtDNA mutasyonları: m.3243A>G (*MT-TL1)* İnme benzeri ataklar, işitme kaybı, diyabet, pigmente retinopati, kardiyomiyopati, serebellar ataksi, nöbetler, ensefalopati, laktik asidoz ve mitokondriyal miyopati
MERRF sendromu (Myoklonik Epilepsi, Ragged-Kırmızı Lifler ile)	mtDNA mutasyonları, örneğin m.8344A>G Progresif myoklonik epilepsi, ataksi, güçsüzlük, pigmente retinopati, SNİK , laktik asidoz, lipomlar, spastisite ve kardiyak ileti bozuklukları
NARP sendromu (Nörojenik Kas Güçsüzlüğü, Ataksi ve Retinitis Pigmentosa)	mtDNA mutasyonları, örneğin m.8993T>G – m.8993T>C (*MT-ATP6)* Çocukluk çağı başlangıçlı, sensörimotor nöropati, ataksi, pigmente retinopati, nöbetler, öğrenme güçlüğü, demans, miyopati, kısa boy ve kardiyak ileti bozuklukları
MNGIE (Mitokondriyal Nörogastrointestinal Ensefalopati)	*TYMP, POLG1, POLG2* genleri ilişkili Gastrointestinal dismotilite, kas zayıflığı ve atrofi, nöropati, retinopati, işitme kaybı, lökensefalopati ve TYMP aktivitesinde azalma

4.1.1.3. Biyotinidaz Eksikliği

Biyotinidaz eksikliği, *BTD* geninin kodladığı biyotinidaz enzim aktivitesinin kısmi azlığı veya yokluğu ile gelişen otozomal resesif bir hastalıktır. Biyotinidaz, biyotin vitamininin geri dönüşümünden sorumlu enzimdir, biyositin ve biyotinil-peptitleri parçalayarak bir hidrolaz gibi davranır ve böylece biyotini yeniden kullanım için serbest bırakır. Klinik bulguları değişkendir, eğer tedavi edilmezse bebeklerde hipotoni, emme güçlüğü, ileri dönemde ensefalopati, hipertoni, nöbetler, infantil spazm, spastik paraparezi, ataksi, gelişme geriliği gibi nörolojik bulgular ile egzamatöz dermatit, alopesi gibi cilt bulguları görülebilir(12).

Biyotinidaz eksikliğinin Türkiye'deki insidansı 1:12000'dir. Ülkemizde, "Ulusal Yenidoğan Tarama Programı" ile 2008 yılından beri yenidoğanlar taranmaktadır. Kesin tanı biyotinidaz enzim aktivitesi veya *BTD* için yapılan genetik test ile konulmaktadır. Çocuklarda günlük oral biyotin uygulaması erken başlandığında bulguların gerilemesini sağlar ve semptomların gelişmesini önleyebilir. Biyotinidaz aktivitesi %10'un altında olanlar belirgin biyotinidaz eksikliği tanısı alırken %10-30 arasında olanlara kısmi biyotinidaz eksikliği tanısı konulmaktadır. Heterozigot mutasyon taşıyan hastalar, genellikle etkilenen bireyler ile normal bireylerin serum enzim aktiviteleri arasında ara bir değere sahiptir.

4.1.1.4. Akçaağaç Şurubu İdrar Hastalığı (MSUD)

Akçağaç şurubu idrar hastalığı (MSUD) dallı zincirli amino asit metabolizmasının bozulduğu, nadir görülen otozomal resesif bir genetik hastalıktır. Dallı zincirli amino asitler olan lösin, izolösin ve valinin metabolizmasından sorumlu olan dallı zincirli α-ketoasit dehidrogenaz (BCKD) kompleksindeki enzimatik eksiklik nedeniyle ortaya çıkar. BCKD kompleksi dört ana alt birimden oluşur: E1α, E1β, E2 ve E3. Dört temel genetik alt tipi tanımlanmıştır:

Tip 1α: *BCKDHA* genindeki mutasyonlar nedeniyle oluşur. Bu gen, E1α alt birimini kodlar.

Tip 1β: *BCKDHB* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Bu gen, E1β alt birimini kodlar.

Tip II: *DBT* genindeki mutasyonlarla ilişkilidir ve E2 alt birimini kodlar.

Tip III: *DLD* genindeki mutasyonlarla ilişkilidir ve E3 alt birimini kodlar.

Mitokondride yer alan ve BCKD kompleksinin fosforilasyonunu düzenleyen bir PPM1K varyantı ise MSUD'un hafif seyirli kliniğine (MIM: 615135) neden olur.

Klasik ve E3 eksikliği olan MSUD karakteristik olarak yenidoğan döneminde bulgu verirken, orta, aralıklı ve tiamin yanıtlı formlarında klinik bulgular hayatın herhangi bir döneminde görülebilir ve hastalık veya stres dönemlerinde ortaya çıkabilir. Klasik yenidoğan tipinde hastalarda <%2 BCKD enzimatik aktivitesi bulunur ve doğumdan sonra serumda ve yaşamın ilk haftalarında idrarda akçaağaç şurup kokusu görülür. MSUD'un ara formunda %30'a kadar BCKD kalıntı aktivitesi bulunur. Bu bireyler yenidoğan döneminde sağlıklı görünebilir, ancak serumda akçaağaç şurubu kokusu mevcut olabilir. Yaşamın ilk yıllarında klinik bulgular ortaya çıkar. Aralıklı MSUD'lu bireyler tamamen asemptomatiktir, kısıtlanmamış bir diyetle bile normal büyüme ve nörolojik gelişime sahiptir. Tiamin yanıtlı MSUD, BCKD kompleksinin E2 alt birimini kodlayan *DBT* genindeki mutasyonlarla ilişkili, oldukça nadir bir fenotiptir . Etkilenen hastalar, ara forma benzer klinik bulgular gösterir (13).

MSUD'un klinik bulguları, yenidoğan döneminde beslenme güçlüğü, letarji, hipotoni/hipertoni ve nöbetler gibi semptomlardır; tedavi edilmezse metabolik krizler ve kalıcı nörolojik hasar gelişebilir. Radyolojik bulgularında, MR'da beyin sapı, talamus ve

serebellumda T2 hiperintensitesi ve akut fazda sitotoksik ödem izlenebilir. Kronik dönemde, miyelin kaybı ve beyin atrofisi görülebilir, bu da nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilidir. MSUD'un klinik tanısı, yenidoğan döneminde karakteristik akçaağaç şurubu kokusu, beslenme güçlüğü ve nörolojik belirtilerle desteklenir(14). Laboratuvar tanısında, plazmada yüksek dallı zincirli aminoasitler ve metabolitlerinin tespiti ile tandem kütle spektrometrisi önemli rol oynar. Genetik tanı için yaklaşık %90 hastada *BCKDHA, BCKDHB ve DBT* genlerindeki mutasyonlar DNA dizi analizi ile tespit edilirken patofizyolojide hastaların %10'unda gözlenen büyük delesyon ve duplikasyonların saptanmasında multipleks ligasyona bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) kullanılır.

4.1.1.5. Glikojen Depo Hastalıkları

Glikojen depo hastalıkları (GDH), glikojenin sentezi veya yıkımı sırasında ortaya çıkan genetik kusurlar sonucu gelişen, nadir görülen monogenik hastalıklardır.(Tablo 4.5.) Bu hastalıklar, hepatik ve kas sistemini etkileyen formlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Hastaların semptomları, hastalığın alt tipine ve etkilediği organlara bağlı olarak değişir:

- Hepatik GDH: Hepatomegali, hipoglisemi, büyüme geriliği ve asidoz gibi belirtilerle karakterizedir.

- Kas GDH: Egzersiz intoleransı, kas güçsüzlüğü, rabdomiyoliz ve kardiyomiyopati ile kendini gösterebilir. Pompe hastalığı (GSD II) infantil formunda kardiyomiyopati ve solunum yetmezliğiyle ölümcül seyreder.

Ultrasonografi ile karaciğer büyüklüğü ve yağlanması değerlendirilebilir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), kas glikojen birikimini ve ilgili yapısal değişiklikleri tespit etmek için kullanılabilir. Tanıda klinik belirtiler, biyokimyasal analizler ve genetik testler birlikte değerlendirilir. Biyokimyasal testler ile hipoglisemi, hipertrigliseridemi, laktik asidoz ve karaciğer enzimlerinde artış tespit edilebilir. Enzim aktivite testleri ile özellikle kas ve karaciğer biyopsileri ile ilgili enzim aktivitesi değerlendirilir(15).

GDH'ye neden olan genetik mutasyonlar, genel olarak DNA dizi analizi yöntemleri ile tespit edilebilir. Ancak delesyon-duplikasyonların ve RNA işlenmesine etkisi olabilecek intronik mutasyonların tespiti için öncelikle RNA çalışması olmak üzere ileri incelemelerin yapılması gerekmektedir(16).

Tablo 4.5. Glikojen depo hastalıkları ve klinik bulguları

Hastalık	Gen / Enzim	Klinik Özellikler
GDH 0a	*GYS2*/Hepatik glikojen sentaz	Açlık sırasında ketotik hipoglisemi, postprandial hiperglisemi, yüksek laktat seviyesi, kısa boy ve düşük kemik yoğunluğu görülür.
GDH 0b	*GYS1* / Kas glikojen sentaz	Egzersiz intoleransı, hipertrofik kardiyomiyopati, ani ölüm riski görülür.
GDH I (Von Gierke)	*G6PC1* – G6Paz *SLC37A4* – G6PT	Hipoglisemi, laktik asidoz, hipertrigliseridemi, hiperürisemi, hepatomegali, hepatoselüler adenom, nefromegali ve renal tübüler hastalık, osteoporoz görülür. GDH Ib'de ise nötropeni, nötrofil disfonksiyonu ve inflamatuvar bağırsak hastalığı görülür.(17)
GDH II (Pompe)	*GAA* / Asit alfa-glukozidaz	Çocukluk başlangıçlı form tedavi edilmediğinde ölümcüldür. Hipertrofik kardiyomiyopati, hipotoni, motor gecikme görülürken, geç başlangıçlı formda ise kas güçsüzlüğü ve çoklu organ etkilenimi görülür.
GDH III (Cori/Forbes)	*AGL* / Glikojen dallanma enzimi	Hipoglisemi, hiperlipidemi, AST/ALT yüksekliği, periportal fibrozis ve siroz görülür.
GDH IV (Andersen)	*GBE1* / Glikojen dallanma enzimi	Karaciğer, kalp ve nörolojik özellikler açısından farklı derecelerde etkilenim gösterir. Klasik (ilerleyici) hepatik alt tip, hepatosplenomegali, karaciğer fonksiyon bozukluğu, siroz, kardiyomiyopati, hipotoni, büyüme geriliği ve karaciğer nakli olmadığı takdirde genellikle 3 ila 5 yaşlarında ölüm ile karakterizedir. Diğer bir alt tip olan "poliglukozan cisim hastalığı-yetişkin formu (APBD)" yetişkin yaş başlangıçlı nörodejeneratif bir hastalıktır ve yürüyüş zorluğu, nörojenik mesane, otonomik disfonksiyon, duyu kaybı ve daha nadir olarak değişken bilişsel zorluklarla karakterizedir.
GDH V (McArdle)	*PYGM* / Miyofosforilaz	Miyalji, yorgunluk, taşikardi, kramp, rabdomiyoliz, kreatin kinaz (CK) yüksekliği görülür.
GDH VI (Hers)	*PYGL* / Karaciğer glikojen fosforilaz	Hepatomegali, büyüme geriliği, hipoglisemi, ketoz, karaciğer fibrozisi ve siroz görülür.
GDH VII (Tarui)	*PFKM* / Kas fosfofruktokinaz	Egzersiz intoleransı, miyoglobinüri, hemolitik anemi, hiperürisemi görülür.
GDH IX (Hepatik ve Kas)	*PHKA2 (GDH IX α2), PHKB (GDH IX β), PHKG2 (GDH IX γ2)* Fosforilaz kinaz (karaciğer/kas/testis izoformları)	α2: X'e bağlı kalıtılır. Büyüme geriliği, ketotik hipoglisemi ve/veya hepatomegali görülür. Transaminazlarda artış, hiperlipidemi, karaciğer fibrozisi, siroz diğer bulgulardır. Yetişkinler genellikle asemptomatiktir. B: Nadir görülür. Genellikle hepatomegali nedeniyle tespit edilir. Diğer belirtiler arasında ketotik hipoglisemi, yüksek trigliserid düzeyleri vardır. γ 2: Klinik diğer alt tiplerinden şiddetlidir. Belirtiler arasında hipoglisemi, karaciğer fibrozisi ve siroz riski (siroz yaşamın ilk yıllarında gelişebilir) ve karaciğer adenomları bulunur.
GDH X	*PGAM2* / Kas fosfogliserat mutaz	Egzersiz intoleransı, kramp, miyalji, rabdomiyoliz görülür.
GDH XI	*LDHA* / Laktat dehidrogenaz A	Egzersiz intoleransı, kas krampları, rabdomiyoliz, miyoglobinüri, deri lezyonları ile karakterizedir. Miyoglobinüri esnasında serum CK (kreatin kinaz) seviyeleri yükselebilir.
Fanconi-Bickel	*SLC2A2* / GLUT2	Glikoz ve galaktoz intoleransı, hipoglisemi, hepatomegali, kısa boy, böbrek tübüler disfonksiyonu, glikozüri görülür.
GDH XII	*ALDOA* / Fruktoz-1,6-bifosfat aldolaz	Hemolitik anemi, miyopati, rabdomiyoliz, entelektüel yetersizlik, dismorfik yüz bulguları görülür.
GDH XIII	*ENO3* / β-Enolaz	Egzersiz intoleransı, miyalji, rabdomiyoliz, kas MR'ında yağ infiltrasyonu görülür.
GDH XIV	*PGM1* / Fosfoglukomutaz 1	Primer miyopatik ve multisistemik olarak 2 ana fenotipi vardır. Multisistemik fenotip, konjenital malformasyonlar, kas ve kalp tutulumu, karaciğer özellikleri, hematolojik anormallikler, hipoglisemi, büyüme geriliği ve dilate kardiyomiyopati gibi değişken bulgular görülür.
GDH XV	*GYG1* / Glikojenin 1	Kas güçsüzlüğü, aritmi, kardiyomiyopati/iskelet miyopatisi görülür.
PGK Eksikliği	*PGK1* / Fosfogliserat kinaz	X'e bağlı kalıtım görülür. Non-sferositik hemolitik anemi, rabdomiyoliz ile miyopati ve entelektüel yetersizlik dahil olmak üzere nörolojik özellikler (anemi, miyopati ve nörolojik özellikler farklı kombinasyonlarda ortaya çıkabilir) ile karakterizedir. Bazı hastalarda levo-dopaya yanıt veren parkinsonizm bildirilmiştir. Retinitis pigmentosa görülebilir. PGK eksikliği, periferik sinir sistemi hastalığına ve Charcot–Marie–Tooth hastalığını andıran bir fenotipe neden olabilir.

4.1.1.6. Canavan Hastalığı

Canavan hastalığı, erken çocukluk döneminde başlayan, nadir ve yıkıcı otozomal resesif kalıtılan nörometabolik bir hastalıktır. Aspartoasilaz enziminin eksikliği ile ortaya çıkan bu hastalıkta, miyelin üretimindeki bozukluklara ve beyinde N-asetilaspartik asit (NAA) birikimine yol açarak, NAA'nın toksik etkilerine neden olur. NAA birikimi sonucunda yetersiz miyelinleşme ve beyaz cevherde süngerimsi dejenerasyona oluşur. Hastalık belirtileri genellikle yaşamın ilk 6 ayında ortaya çıkar. Makrosefali (4-18 ay arası daha belirgin), hipotoni ve psikomotor gerilik, erken dönem bulgular arasında yer alır. Gelişim basamaklarını kazanım sınırlıdır; çoğu hasta baş kontrolü veya yuvarlanma gibi temel motor becerileri dahi kazanamaz. Nöbetler, ilk yıl nadiren görülse de hastalığın ilerleyen evrelerinde sıklaşır. Diğer belirtiler arasında hipotoni, hipertoni, görme bozuklukları ve yutma zorlukları bulunur. İşitme genellikle normal olmakla birlikte, görme yollarındaki beyaz cevher etkilenmesi nedeniyle kortikal körlük nedeniyle görme problemleri yaygındır. Optik atrofi de Canavan hastalarında görme kaybının bir diğer nedenidir. Nistagmus bulgusu genellikle bebekliğin erken dönemlerinde gelişir. Hastalığın tanısında en önemli biyokimyasal bulgu, idrar, kan veya beyin manyetik rezonans spektroskopisinde (MRS) yükselmiş NAA düzeylerinin saptanmasıdır(18). Genetik olarak ise, çoğu vakada DNA dizi analizi yöntemleri ile tanı konulurken, diğer olgularda delesyon ve duplikasyon analizi için MLPA yöntemi ile test yapılması önerilmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmada moleküler genetik tanı konulamayan Canavan hastalarında yapılan uzun okumalı genom ve RNA dizileme analizleri, intron 4'e yerleşmiş ve RNA işlenmesini etkileyen SVA-E retrotranspozonun varlığını ortaya koyarak, ileri genetik incelemelerin önemini vurgulamaktadır(19).

4.1.2. Endokrin Hastalıklar

4.1.2.1. Hipofiz Hormon Yetmezlikleri

Hipofiz yetmezliği, klinik olarak tek hormon eksikliği ya da kombine hormon eksiklikleri şeklinde ortaya çıkabilir. Kombine hormon eksikliği, genellikle ACTH, GH, TSH, FSH ve LH gibi adenohipofiz hormonlarını etkiler. Neonatal dönemde hipoglisemi, kolestatik sarılık, büyüme geriliği ve hipotermi gibi bulgular, GH ve ACTH eksikliklerini düşündürür. Daha ileri yaşlarda büyüme geriliği, pubertal gecikme, hipotansiyon ve cilt solukluğu sıkça gözlenir.

Makrosefali, nistagmus, optik sinir hipoplazisi gibi orta hat defektleri, septo-optik displazi gibi bulgularla ilişkilendirilebilir. Ek olarak, hastalarda hipogonadotropik hipogonadizm nedeniyle pubertal gecikme ve infertilite görülebilir. Hipofiz bezinin embriyolojik gelişiminde etkili olan genlerdeki mutasyonlar, hipofiz hormonlarının eksikliğiyle sonuçlanan bozukluklara neden olabilir. Bu genetik değişiklikler, hipofiz bezinin gelişimsel süreçlerinin farklı aşamalarını etkileyerek hastalığın patogenezinde belirleyici olabilir.

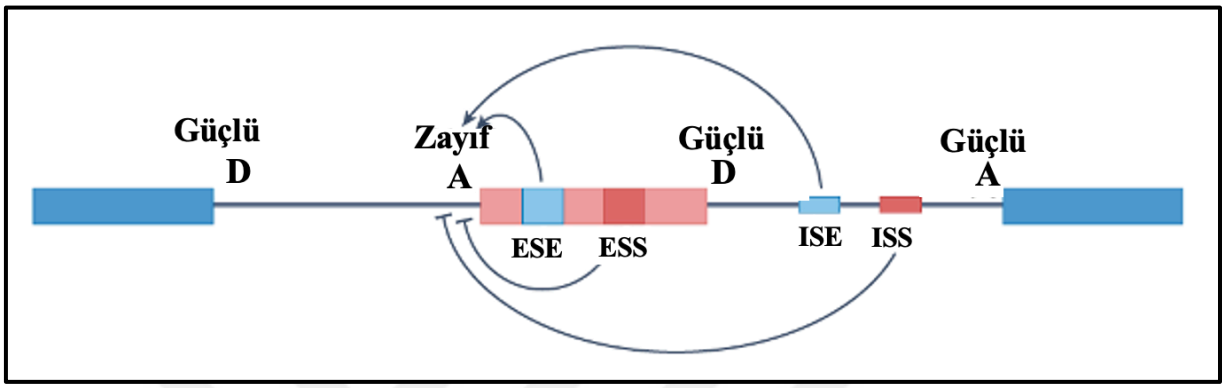
4.1.2.2. Hiperinsülinemik-Hipoglisemi-Hiperamonyemi Sendromu

İlk kez 1956 yılında Cochrane tarafından bildirilen protein-lösin duyarlı hipoglisemi nedeni olup, konjenital hiperinsülinizmin en sık ikinci nedenidir. Mitokondriyal glutamat dehidrogenaz enzimini kodlayan *GLUD1* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan patojenik fenotiplerdir. Klinik olarak hafif hiperamonyemi ile tekrarlayan semptomatik hipoglisemi atakları gözlenir. Hastalar genellikle normal doğum ağırlıklarına sahiptir, genellikle yaşamın ilk 2 yılında ortaya çıkar. Glutamat dehidrogenaz, glutamatın alfa-ketoglutarat (α-KG) ve amonyağa oksidatif deaminasyonunu sağlar. Pankreas beta hücrelerinde, alfa ketoglutarat sitrik asit döngüsüne girer ve hücre içi adenozin trifosfat/ adenozin difosfat (ATP/ADP) oranında artışa neden olur. ATP/ADP oranındaki artma, ATP'ye duyarlı potasyum (K-ATP) kanalını inhibe ederek, membranın depolarizasyonuna, kalsiyum akışına ve insülin salınımına neden olur. Hastalıkta Glutamat dehidrogenazın GTP inhibisyonuna olan duyarlılığının ortadan kalkması pankreas beta hücreleri tarafından aşırı insülin salgılanmasına ve karaciğer ve böbrekte amonyak metabolizmasının bozulmasıyla hastalık bulgularını ortaya çıkartır(20).

4.2. Kırpılma İşlemi / "Nonsense Mediated m-RNA Decay" (NMD – Anlamsız aracılı mRNA bozulması) Mekanizması

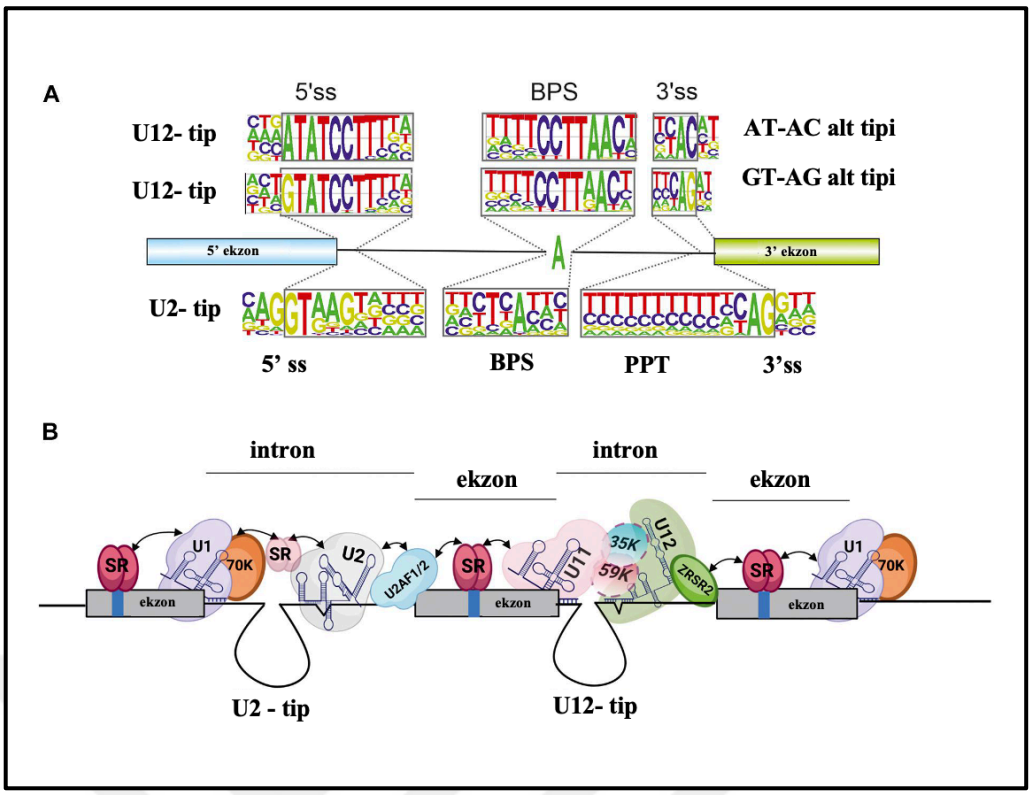
Ökaryotik organizmalarda RNA polimeraz II tarafından sentezlenen pre-m-RNA'ların kırpılma işlemi, intronlar boyunca konumlanmış küçük nükleer ribonükleoproteinler (snRNP'ler) ve çeşitli yardımcı proteinlerden oluşan "spliceozom" kompleksi tarafından gerçekleştirilir. "Spliceozom" kompleksi, her intronun 5' ve 3' uçlarındaki dizileri tanıyarak bu bölgelere bağlanır ve intronların çıkarılması ve ekzonların birleştirilmesini katalize eder(21). Kırpılma yerlerinin seçimi yalnızca *cis* diziler ile belirlenmez, ekzon veya intron içerisinde bulunan, belirli hedef diziler ve onlara bağlanan trans faktörler de bu seçimde önemli rol oynar.

Bu düzenleyici elementler, ekzonik kırpılma güçlendiricileri (ESE) ve susturucuları (ESS) ile intronik kırpılma güçlendiricileri (ISE) ve susturucularını (ISS) kapsar. (Şekil 4.1.) Serin/arginin açısından zengin (SR) proteinlerin kırpılma güçlendirici dizilere bağlanması, kırpılma bölgelerinin kullanımını sağlayarak ekzonun dahil edilme olasılığını artırabileceği, Diğer yandan, heterojen nükleer ribonükleoprotein (hnRNP) ailesine ait üyelerin kırpılma susturucu elementlere bağlanması ekzon atlamayı destekleyebileceği yönünde kanıtlar vardır.



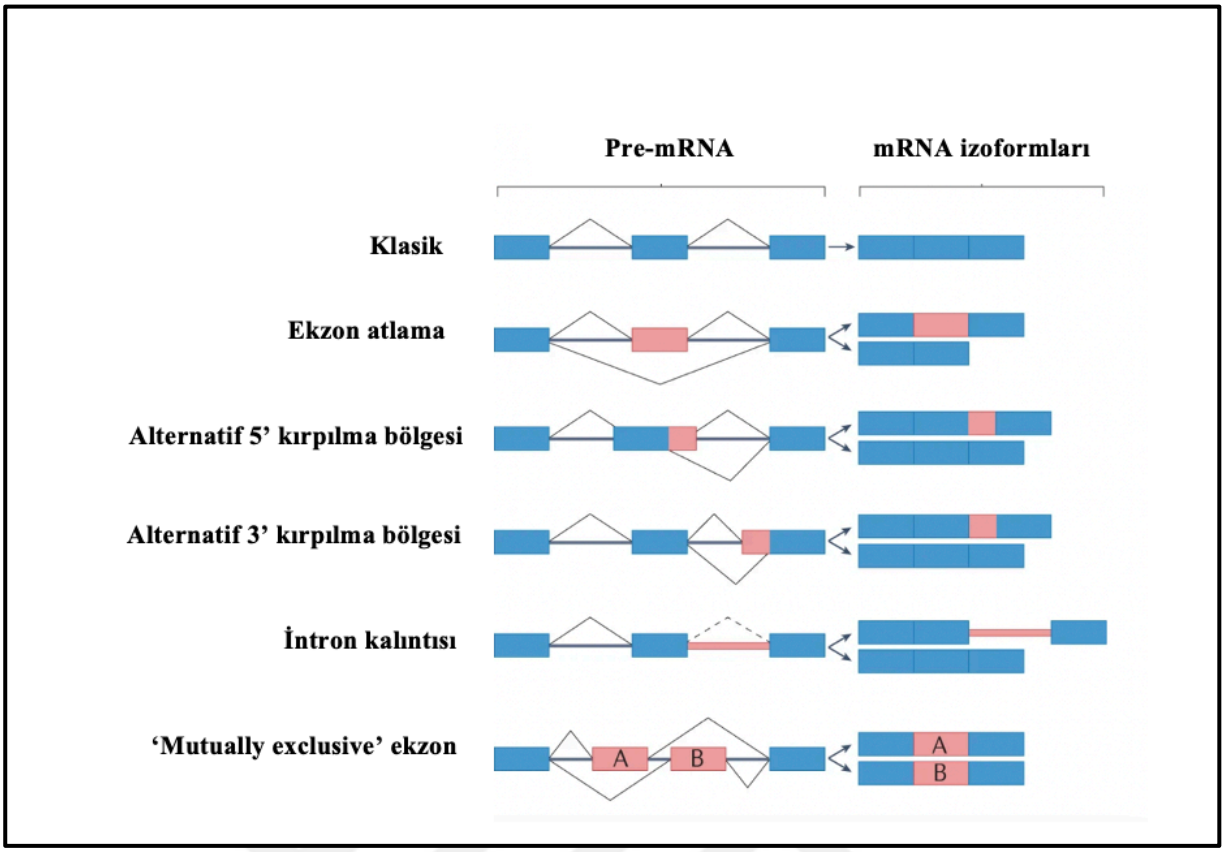
Şekil 4.1. Ekzonik kırpılma güçlendiricileri (ESE) ve susturucuları (ESS) ile intronik kırpılma güçlendiricileri (ISE) ve susturucularının (ISS) gösterimi (D: *Donor site*, A: *Acceptor site*, Oklar güçlendiricilerin ve susturucuların etki ettiği bölgeleri işaret etmektedir.) *(Marasco ve Kornblihtt'in çalışmasından uyarlanmıştır.)(21)*

Organizmaların çoğu ancak iki "spliceozom" kompleksine sahiptir. İntronların yaklaşık %99,5'ini çıkaran "kompleks majör" veya "U2-bağımlı spliceozom" olarak isimlendirilirken, intronların yaklaşık %0,5'ini çıkaran kompleks ise "minör" veya "U12-bağımlı spliceozom" olarak tanımlanır. Bağlandıkları intron tipleri de benzer şekilde majör veya U2-tipi intronlar ile minör veya U12-tipi intronlar olarak isimlendirilir. U12-tipi intronların sayısı türlere göre farklılık gösterebilir. İnsanlarda yaklaşık 700 gen U12-tipi intronlar içerirken, drosophila'da yalnızca 19 tane bulunur. Minör intron içeren genler genel olarak, gen başına bir U12 tipi intron ve onu çevreleyen birden fazla U2 tipi intron içerir. (Şekil 4.2.)



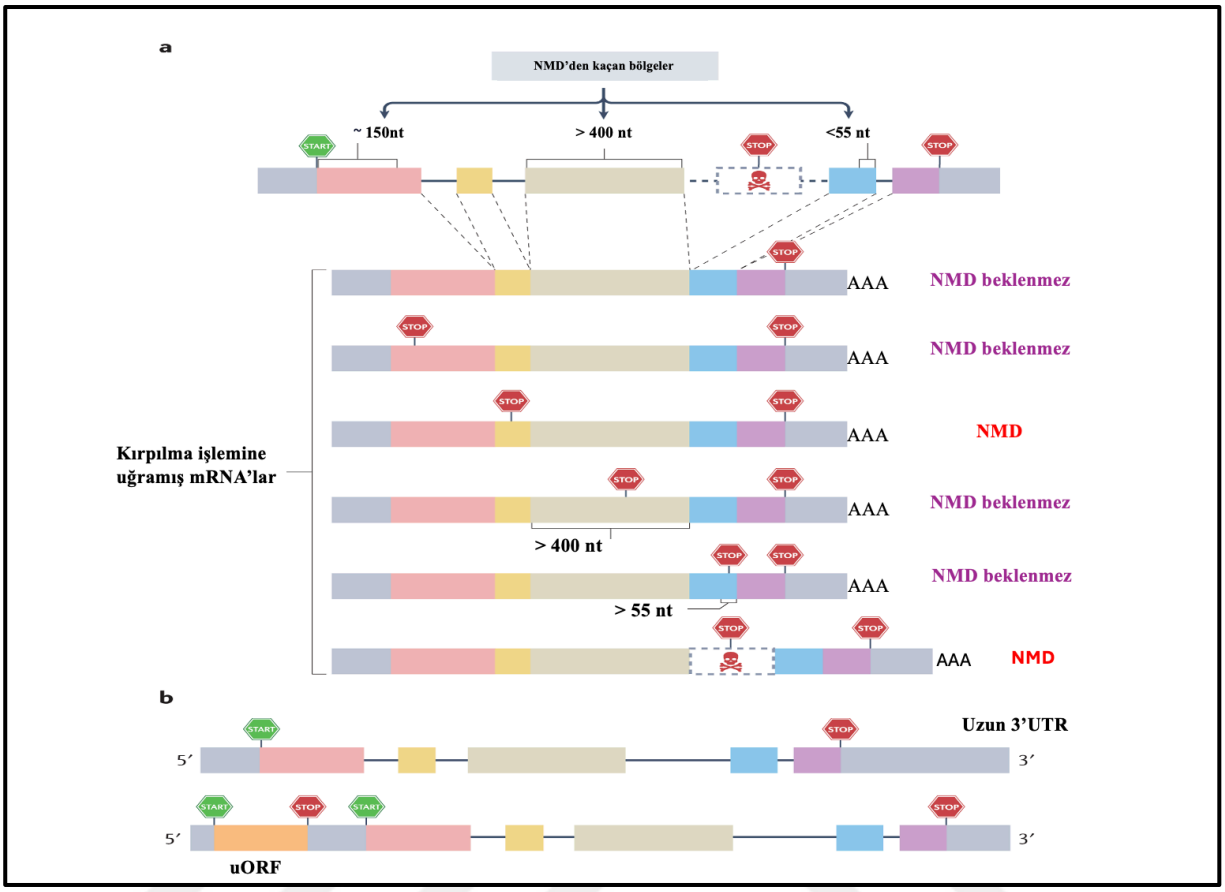
Şekil 4.2. Minör - majör intronların gösterimi ve "spliceozom" kompleksi ile etkileşimi A- Minör ve majör intronların kırpılma yeri dizileri B- Minor ve majör intronlarda gerçekleşen intron-ekzon tanıma ve protein etkileşimleri (5'ss : 5' kırpılma bölgesi, BPS: dallanma noktası (branchpoint site) PPT: polipirimidin yolu, 3'ss: 3' kırpılma bölgesi) *(Akinyi ve arkadaşının çalışmasından uyarlanmıştır.) (22)*

U12 tipi ve U2 tipi intronlar arasındaki en belirgin fark, intron tanıma dizilerinin korunma derecesidir; bu diziler arasında 5' kırpılma bölgesi (5'ss), 3' kırpılma bölgesi (3'ss) ve dallanma noktası dizisi (BPS) yer almaktadır. Ayrıca, U2 tipi intronlarda 3'ss'nin yukarısında belirgin bir polipirimidin dizisi (PPT) bulunurken, U2 tipi intronların kırpılma bölgeleri nispeten daha az korunmuştur. Bu durum, alternatif kırpılma süreçlerine olanak tanıyan daha esnek kırpılma yeri seçimlerini sağlar. Bu farklılıklara rağmen, her iki intron tipi arasında genel kırpılma mekanizması benzer özellikler taşır. 5'ss ve BPS dizileri, öncelikle majör "spliceozom" kompleksinde U1 ve U2 snRNP'leri ya da minör "spliceozom" kompleksinde U11/U12 di-snRNP kompleksi tarafından tanınır. Ayrıca, U2 tipi intronlarda bulunan PPT ve 3'ss, U2AF1/U2AF2 protein heterodimeri aracılığıyla tanınırken; U12 tipi intronlardaki 3'ss, ZRSR2 proteini tarafından saptanır. Bu ilk tanıma adımının ardından, majör "spliceozom" için U4/U6.U5 tri-snRNP veya minör "spliceozom" için U4atac/U6atac.U5 tri-snRNP komplekslerinin katılımı, fonksiyonel yapıların oluşmasını ve sonuç olarak intron eksizyonunu başlatır(22).



Şekil 4.3. Alternatif kırpılma işlemelerinin temsili gösterimi (kutucuklar ekzonları, kutucukların arasındaki çizgiler intronları, üçgenler ise kırpılma olayını göstermektedir.)*(Marasco ve Kornblihtt'in çalışmasından uyarlanmıştır.) (21)*

Protein kodlayan bir genin ifadesi, karşılık gelen m-RNA'sının sentezi, işlenmesi, translasyonu ve yıkılmasının hassas bir dengesiyle düzenlenir. (Şekil 4.3.) Ayrıca, işlevsel bir proteini kodlayabilmesi için olgun m-RNA'ların yeterli kaliteye sahip olması gereklidir. Bu gereksinimi karşılamak üzere ökaryotik hücreler, m-RNA kalitesini denetleyen gözetim mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalardan biri, translasyon sonlandırma kodonlarına sahip m-RNA'ları tanıyıp ortadan kaldıran translasyona bağlı "nonsense mediated m-RNA decay" (NMD) yoludur. NMD'nin biyolojik süreçlerde nasıl işlev gördüğü tam olarak anlaşılmamış olsa da kurtarma deneyleri aracılığıyla belirli NMD hedef m-RNA'larının erken embriyonik gelişim, nöral farklılaşma ve endoplazmik retikulum stres yanıtı gibi süreçlerde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Kabaca m-RNA, son ekzon-ekzon bağlantısından 50-55 nükleotidden daha uzak 5' yönünde yer alan bir erken sonlandırma kodonuna (PTC) veya uzun bir 3' çevrilmemiş bölgeye (UTR) sahip ise NMD için hedeftir. (Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. NMD mekanizmasını etkileyen durumlar: NMD mekanizmasını aktive edebilecek ekzon ve UTR'lerdeki mutasyonların şematik gösterimi A- sıklıkla görülen PTC bağımlı NMD mekanizmaları B- Uzun 3' UTR ve uORF'ların neden olduğu NMD mekanizmaları (UTR : *untranslated region*, çevrilmemiş bölge , uORF: *upstream open reading frame,* nt: nükleotid, AAA: poli(A) kuyruğu) *(Tan ve arkadaşlarının çalışmasından uyarlanmıştır.)* (23)

Bir ekzon-ekzon bağlantısının yukarısındaki çoğu konumda PTC üreten mutasyonlar NMD'yi tetikler. Ancak bu kuralın istisnaları vardır. (Şekil 4.4.)

1. Başlangıç kodonunun ~150 nükleotidi (nt) içinde ise,

2. Büyük bir ekzonun ortasında ise (ekzon 400 nt'den fazla ise),

3. Son ekzon-ekzon bağlantısından 55 nt'den daha yakın olan PTC'ler tipik olarak NMD'yi tetiklemez; bu kısımlar "NMD kaçış bölgeleri" olarak isimlendirilir.

Bazı genlerin normal sonlandırma kodonları son ekzon-ekzon bağlantısından 55 nt'den fazla yukarıda yer alır ve NMD'nin aktif olması beklenir. Böylece, bu genlerin m-RNA'ları, NMD tarafından yıkılarak ekspresyon düzeyleri ayarlanır. Ayrıca uzun 3' UTR bölgeleri ve başlangıç kodonunun 5' bölgesinde bulunan *upstream open reading frame* (uORF) bölgeleri NMD'yi indükleyebilir. Ancak NMD'yi aktive eden belirli 3' UTR uzunluğu olmadığı için bu durumlarda NMD'in aktivasyonu deneysel olarak test edilmelidir.

4.3. DNA Dizi Analizi Yöntemleri

Kalıtsal hastalıkların tanısında, 1950'li yıllardan itibaren kullanılmaya başlanan kromozom analizi, 1970'lerde geliştirilen Sanger dizilemesi ile spesifik genlerin dizilenmesi, 2000'li yıllarda yaygınlaşan multipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) ve mikrodizin yöntemleri ile kopya sayısı varyantlarının (CNV) analizi, ve son olarak test kapasitesini ve tanısal erişilebilirliği önemli ölçüde artıran yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri kullanılmaktadır (24).

Günümüzde dizileme teknolojileri oldukça gelişmiş bir seviyeye ulaşmış olsa da, tarihsel olarak bakıldığında protein ve RNA dizilimlerinin, DNA diziliminden önce gerçekleştirilmiş olması dikkat çekicidir. Sanger, 1950'lerde insülinin iki zincirini parçalayarak her bir parçayı analiz etti ve bu parçaları birleştirerek ilk protein dizilimini ortaya koydu. Bu buluş, proteinlerin amino asit dizilerinden oluştuğunu gösterdi. RNA dizilemesi ise 1960'larda benzer bir yaklaşımla gerçekleştirildi. RNA molekülleri RNAazlar ile parçalara ayrıldı, bu parçalar kromatografi ve elektroforez yöntemleriyle ayrıştırıldı, ardından ekzonükleazlar yardımıyla analiz edildi. İlk RNA dizisi, alanin tRNA'sı, 140 kg mayadan elde edilen 1 gram saf materyalin kullanıldığı ve beş araştırmacının üç yıl süren çalışması sonucunda 76 nükleotid olarak belirlendi(25).

DNA dizileme teknolojileri, biyolojideki büyük gelişmelerin temellerini oluşturan kritik basamaklardan biridir ve bu teknolojiler, DNA'nın nükleotid dizisini belirleyerek, genetik bilgiyi doğrudan analiz etme olanağı sağlar. Ancak DNA dizi analizi, başlangıçta oldukça zahmetli bir süreçti. Wu, primer uzatma yöntemiyle 1968'de sadece 12 baz, 1973'te ise Gilbert ve Maxam 24 bazlık bir DNA dizisini belirlemeyi başardı. Sanger ve Coulson'un zincir sonlandırma yöntemi ile ve Maxam ve Gilbert'in kimyasal kesme yöntemi, 1976 yılında DNA dizi analizinde atılım yaparak ve yüzlerce bazın dizilmesini mümkün hale getirdi. Sanger

yöntemi, DNA polimerazın az miktarda zincir sonlandırıcı nükleotid içeren dört ayrı reaksiyonda çalıştırılmasına dayanıyordu. Maxam-Gilbert yöntemi ise DNA moleküllerini kimyasallar kullanarak bazlara özgü kısmi kesiklere ayırıyordu (26). Her iki yöntemde de DNA parçalarının poliakrilamid jel elektroforezi ile tek baz hassasiyetinde ayrılması sağlandı. Radyoaktif işaretli modifiye nükleotidlerin Röntgen filmi ile elde edilen görüntüleri sayesinde dizilim kolayca okunabilir hale geldi. Bu teknikler kısa sürede benimsenerek rastgele klonların dizilenmesi ve örtüşen bölgeler üzerinden dizilerin birleştirilmesi gibi yeni yöntemler denendi. M13-faj klonlama vektörünün geliştirilmesi ve floresan tabanlı otomatik dizileme makinelerinin üretilmesi süreçleri daha da hızlandırdı. Geliştirilen makineler ile 1987'de günde yaklaşık 1.000 baz dizileyebiliyordu. Sanger dizileme yöntemi, ilk kez 1977 yılında Frederick Sanger tarafından geliştirilen ve genetik araştırmalarda standart bir teknik olarak kullanılan bir yöntemdir. Dideoksi nükleotidler kullanılarak DNA sentezi belirli bir basamakta sonlandırılır ve dizileme yapılacak olan DNA fragmanından, farklı uzunluklarda ürünler üretilir. Bu ürünler daha sonra jel elektroforezi ile ayrılır ve her bir ürünün sonlandığı nükleotid belirlenir.

İnsan Genom Projesi için kullanılan "hiyerarşik shotgun" stratejisinde, insan genomunun büyük parçaları bakteri yapay kromozomlarına (BAC) klonlandı. Her bir BAC'tan DNA izole edilip parçalandı, boyutlarına göre seçildi ve alt klonlar oluşturuldu. Dizileme sürecinin her adımının verimliliği önemli ölçüde artırıldı. Teknolojinin gelişmesiyle 2001 yılında günde 10 milyon baz dizilenebiliyordu. Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri, Sanger dizilemesinden farklı olarak aynı anda milyonlarca DNA fragmanının paralel olarak analiz edilmesine olanak tanır. Bu teknoloji, DNA kütüphanelerinin yüksek yoğunlukta dizileme yüzeylerine (örneğin cam slaytlar veya flow hücreler) immobilize edilmesi ve bu yüzeyler üzerinde amplifikasyonla kümeler oluşturulması prensibine dayanır. Dizileme yüzeyleri, genellikle özel olarak kaplanmış, kimyasal bağlanmayı kolaylaştıran yüzey kimyasına sahip platformlardır. Bu yüzeylerde, her bir DNA molekülü sabit bir konuma bağlanarak, aynı reaktif hacmi içinde yer alan milyonlarca farklı fragmanın eş zamanlı olarak dizilenmesine olanak sağlar. Bu yapı, optik okuma sistemleri ve sinyal ayrımı açısından yüksek hassasiyet ve konumsal ayrım gerektirdiğinden, sürecin teknik olarak oldukça karmaşık ve hassas kalibrasyonlar gerektiren bir düzende işlemesini zorunlu kılar. NGS'nin temel özelliklerinden biri, DNA şablonlarının in vitro amplifikasyon yöntemleriyle çoğaltılmasıdır. Dizileme işlemi, floresan işaretli nükleotitlerin eklenmesi ve bu süreçte oluşan biyokimyasal reaksiyonların görüntülenmesi yoluyla gerçekleştirilir. Bu yaklaşıma genelde "sequencing-by-synthesis" (SBS) adı verilir(27, 28).

NGS'de kullanılan yöntemler arasında köprü amplifikasyonu, emülsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve dairesel amplifikasyon gibi farklı teknikler bulunur. Köprü amplifikasyonu, DNA şablonlarının dizileme yüzeylerine (örneğin cam slaytlar veya flow hücreler) immobilize edilmiş primerlerle çoğaltılmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemde her DNA şablonu bir küme oluşturur ve kümeler yüzeyde yoğun şekilde dizilir. Emülsiyon PCR yönteminde, DNA şablonları yağ-su emülsiyonlarında izole edilir ve küçük damlacıklar içinde çoğaltılır. Dairesel amplifikasyonda ise DNA şablonları sürekli dairesel replikasyon yoluyla çoğaltılarak "nanoball" adı verilen yapılar oluşturur(26).

SBS yönteminde ise üç ana strateji öne çıkar. İlk strateji olan pyrosequencing, DNA polimerazın nükleotit eklemesi sırasında ortaya çıkan pirofosfatın ışık üreten bir reaksiyonu tetiklemesiyle çalışır. İkinci strateji, nükleotit eklenmesi sırasında oluşan protonların iyon sensörleriyle tespit edilmesine dayanan iyon tabanlı dizilemedir. Üçüncü strateji, floresan işaretli nükleotitlerin DNA şablonuna eklenmesiyle gerçekleştirilir. Her bir döngüde sadece bir nükleotit eklenmesini sağlayan "reversible nükleotitler" bu yöntemin temelini oluşturur (29).

NGS teknolojisinin önemli avantajları bulunur. Bu teknoloji, yüksek hız ve düşük maliyetle aynı anda milyonlarca DNA molekülünü dizileyebilir. Küçük miktardaki örneklerle çalışabilir ve transkriptom analizi, epigenetik analizler ve geniş genetik analizler için uygundur. Ancak kısa okuma uzunlukları, özellikle, genomik tekrar bölgeleri ve amplifikasyon kaynaklı hatalar, GC yanlılığı ve birleştirmede sorunlara neden olabilir. Bunun yanında, büyük miktarda veri üreten bu teknoloji, güçlü biyoinformatik altyapı gerektirir.

Amplifikasyon gerektiren NGS yöntemlerine alternatif olarak, gerçek zamanlı tek molekül dizileme teknolojileri geliştirildi. Üçüncü nesil dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle, Pacific Biosciences (PacBio), bir polimerazın gerçek zamanlı olarak izlenmesiyle uzun okuma uzunlukları sunarken, nanopor dizileme (ONT) ise DNA'nın nanoporlar üzerinden geçerken ürettiği iyonik sinyalleri analiz ederek dizilim sağladı. Nanopor teknolojisi, taşınabilir cihazlar sunarak büyük bir yenilik sağladı (25). NGS'nin en büyük kısıtlılıklarından birisi genomdaki tekrar bölgelerinin dizilenmesidir. Kütüphane hazırlığında PCR amplifikasyonu nedeniyle, polimeraz tarafından nükleotid eklenmesinde hatalara ve guanin-sitozin açısından zengin bölgelerin ve tekrar bölgelerinin amplifikasyonunda zorluklara yol açabilir. Bu nedenlerden dolayı, 3. nesil dizileme yönteminin tekrar hastalıklarındaki işlevselliği denenmiştir. McFarland ve arkadaşları, nörodejeneratif bir hastalık olan spinoserebellar ataksi tip 10'a (SCA10) neden olan *ATXN10* geninin intron 9'unda yer alan "ATTCT" tekrar dizilerini

incelemek için PacBio'yu kullandılar. Üç SCA10 olgusunda, 2,5 ile 4,4 kb uzunluğunda tekrar bölgelerini tespit ederek üç olgudaki tandem tekrar sayısını belirlediler(30). Hastalığa sebep olan mutasyonların tanımlanmasındaki başarıların yanında, 3. nesil dizileme teknolojisi kullanılarak yapılan WGS analizleri hizalama hatalarını çözmek için de kullanılmıştır. Hem PacBio hem de ONT teknolojilerini kullanan Telomer-Telomere Konsorsiyumu ile, tüm sentromerik bölgeleri içeren ve GRCh38'den daha fazla doğrulukla sonuçlanan T2T-CHM13'ü içeren eksiksiz bir referans genom elde edildi(31).

4.4. m-RNA Dizi Analizi ve Güncel Uygulamaları

RNA dizileme, transkripsiyon sürecinde meydana gelen genetik dizileri karakterize eder ve niceliksel olarak belirler. Bu sayede, gen ifade düzeyleri, transkript-izoform çeşitleri ve hastalık fenotiplerinin altında yatan patolojik kırpılma olaylarının anlaşılmasana olanak sağlayarak, DNA dizilemesine göre farklı bakış açısı sağlar. Gen ifadelerinin düzenlemesinde yer alan diğer RNA molekülleri için de uygulanmasına rağmen, yapılsa da periferik kan veya doku örneklerinden izole edilen toplam RNA'ya bir poliA zenginleştirme işlemi uygulanarak elde edilen m-RNA'nın dizilenmesi, RNA dizilemenin en yaygın uygulamasıdır (32). Günümüzde yeni nesil dizileme teknolojileriyle geliştirilen RNA dizileme yöntemleri yaygınlaşmıştır. PoliA zenginleştirme ve ribozomal RNA tükenmesinin rutin kullanımı, tam uzunluktaki m-RNA'ların yakalanmasını ve RNA dizileme kütüphanelerine baskın olan RNA'ların ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar. Örneğin, periferik kan örneğiyle yapılan RNA dizileme çalışmasında, bir dizileme kütüphanesine hakim olabilen büyük miktarda ribozomal RNA ve globin RNA'sı uzaklaştırılır. Bu işlem, hastalığa neden olan düşük miktarda ve potansiyel olarak daha fazla dokuya kısıtlı transkriptlerin gözden kaçmamasını sağlar(33). RNA dizileme ile elde edilen transkriptom profili, hastalık progresyonu, hastalık alt tipleri ve tedaviye yanıtı gösteren RNA biyobelirteçlerini tanımlama imkanı verir. RNA biyobelirteçleri, çeşitli genetik hastalıklar için yeni ilaçların veya tedavilerin kullanılmasına yardımcı olabilir. G511D mutasyonu taşıyan kistik fibrozisli hastalarda ivacaftor tedavisinin transkriptom profilini incelemek için RNA dizileme çalışması yapılmış. Periferik kan mononükleer hücrelerde (PBMC) ivacaftor tedavisi ile ilişkili 239 genin işlevleri incelenerek tedavi sonrasında hücre farklılaşması, mikrobiyal enfeksiyon, inflamasyon, Toll benzeri reseptör sinyalleri ve metabolizmayı etkileyerek hastalık semptomlarının azaldığı belirlenmiştir (34).

Rutin genetik tanı yöntemleri ile tanı alamayan nadir genetik hastalıkların tanısı için RNA dizileme çalışmalarının 2017 yılında ilk kez Cummings tarafından yapıldığı görülmektedir. Kas bozukluğu olan 50 hastadan elde edilen kas biyopsileriyle gerçekleştirilen RNA dizileme yapıldığında tanı başarısının %35 oranında olduğu görülmektedir (35). Frésard ve arkadaşları tarafından (36) 16 hasta grubundan oluşan bir seride 94 hasta alınan periferik kan örneklerinden RNA dizileme yapılarak tanısal potansiyel araştırıldığı görülmektedir. OMIM nadir hastalık genlerinin %70,6'sının kanda ifade edildiğini ve bu oranın nörolojik, kas-iskelet, hematolojik ve oftalmolojik hastalıklar gibi OMIM hastalık alt kategorilerinde benzer olduğunu belirtilmiştir ve tüm kohortta olguların %7,5'i için tanı başarısı elde etmişlerdir. Periferik kan, nadir hastalık tanısında RNA dizileme çalışmalarında en çok kullanılan doku olmasına rağmen OMIM hastalık kategorilerindeki genlerin yalnızca %60-80'ini kapsar. Çalışmalar GTEx verilerini kullanarak, klinik olarak erişilebilir diğer dokulara (tam kan, Epstein-Barr virüsüyle kültüre edilmiş B-lenfositler, iskelet kası ve deriden türetilen fibroblastlar) genişletildiğinde, OMIM hastalık genlerinin %90'ından fazlasının en az bir klinik olarak erişilebilir dokuda ifade edildiği gösterilmiştir (37).

Yaygın olarak fibroblastlardan elde edilebilen pluripotent kök hücreler (iPSC), ulaşılabilir herhangi bir dokudan RNA eldesi yapılamayan olguların RNA dizilemesi ile incelenmesine olanak sağlar. Literatürde Bonder ve arkadaşları tarafından, genel olarak serebellumda ifade edilen ve diğer dokulardaki ifadesinin yok/minimal olduğu bilinen *CACNA1A* geninin ekpresyon düzeyinin değerlendirilmesi için kullanıldığı görülmektedir (38).

RNA dizi analizi yöntemi, anormal seviyelerde eksprese edilen genler, anormal şekilde kırpılmış genler ve mono-alelik olarak eksprese edilen nadir varyantlar olarak tanımlanan anormal transkript olaylarının tanımlanmasına izin verir. Bu tür olayların saptanması, transkripti potansiyel olarak etkileyen VUS'un doğrulanmasına ve WES yöntemi ile kapsanmayan patojenik varyantların keşfedilmesine olanak tanır. Yapılan çalışmalarda RNA dizileme yönteminin Mendeliyen hastalık ön tanısı olan bireylerde tanı yüzdesini artırdığı görülmüştür. Genetik etiyolojisi aydınlatılamayan mukopolisakkaridoz tip 2 hastalarında yapılan bir m-RNA dizileme çalışmasında, *IDS* geninin diferansiyel ekspresyonu, kırpılması ve füzyon gen oluşumu değerlendirilerek kapsamlı bir biyoinformatik analiz sürecinden sonra, rutin tanı yöntemleri ile tanımlanamayacak *IDS-EOLA1* transkriptleri tanımlanabilmiştir(39). Ayrıca m-RNA dizileme yöntemi DNA dizileme teknolojileri ile saptanan ancak klinik önemi net olarak açıklanamayan varyantların etkisini göstermede de etkilidir. Bir Nieman-Pick tip C hastasında, polimorfizm olarak nitelendirilen *NPC1*: p.V562V varyantı, RNA dizileme yöntemi

ile incelendiğinde ekzon atlanmasına neden olarak erken durdurma kodonuna yol açtığı gözlenmiştir(40).

Güncel tedaviler haricinde moleküler genetik etiyolojisi gösterilmiş hastalarda kullanılabilecek tedavi yöntemleri denenmektedir. Antisense oligonükleotidler (ASO), m-RNA kırpılma işleminden sorumlu U1-snRNA modülasyonuyla mukopolisakkaridozlarda terapötik amaçla kullanılması açısından araştırılmaktadır. ASO'lar m-RNA dizisi için tamamlayıcı olarak tasarlanan 8-50 nükleik asit uzunluğunda kısa, sentetik, tek sarmallı oligonükleotitlerdir. ASO'lar, pre-m-RNA'nın ribonükleaz H aracılı bozunması, doğrudan inhibisyon ve pre-m-RNA'da kırpılma bölgesine bağlanması yoluyla ekzon modülasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla m-RNA ekspresyonunu değiştirme yeteneğine sahiptir. Lizozomal depo hastalıkları için ASO tedavileri, esas olarak mutasyon taşıyan transkriptlerin normal kırpılma işlemine uğraması için uygulanır. *IDS* geninde c.1122C>T varyantının ekzon 8 atlanmasına neden olduğu mukopolisakkaridoz tip 2 tanılı bir hastada antisense oligonükleotidlerin bu etkisinin bir çalışmada denendiği görülmektedir (41).

Pre-m-RNA'da kırpılma işlemi 5 snRNA ve 200 farklı proteinden oluşan "spliceozom" kompleksi ile yapılır. "Spliceozom" kompleksinin bir üyesi olan U1-snRNA 5' ss'ye (splice site) kısmen tamamlayıcı bir dizi içerir ve 5' ss motifinin tanınması için gereklidir. U1-snRNA, 164 nükleotid uzunluğunda U1-snRNA'sından ve çeşitli proteinlerden oluşur. Mutasyona uğramış 5' ss'lerin tanınmasını iyileştirmek için değiştirilmiş U1-snRNA'ların uygulanması, normal kırpılma sürecini kurtarmak için yeni bir tedavi hedefidir. *HGSNAT* genindeki mutasyonlar sonucu oluşan mukopolisakkaridoz tip 3C (Sanflippo sendromu tip C) hastalarında yapılan bir çalışmada, *HGSNAT* genindeki c.234+1G>A, c.633+1G>A, c.1542+4dupA ve c.372-2A>G mutasyonları için modifiye edilmiş U1-snRNA'ların tasarlanmış olduğu ve c.234+1G>A mutasyonu için modifiye U1-snRNA'ların kırpılma işlemini kısmi düzelttiği (yaklaşık %50) bildirilmektedir(42).

Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2023 yılında yayınladığı rapora göre, Türkiye'de akraba evliliği oranı %3,2 iken, bu oran Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde %20'ye kadar çıkmaktadır. Avrupa ülkelerinde akraba evliliği oranları genel olarak düşüktür ve çoğu ülkede %1'in altındadır. Akraba evlilikleri, otozomal resesif hastalıklar açısından önemli bir risk faktörüdür ve bu evliliklerin yapıldığı ailelerde, otozomal resesif hastalıklara bağlı tekrarlayan kardeş ölümlerinin yanı sıra, sağ kalan kardeşlerde de benzer hastalıkların görülme riski artmaktadır. Kalıtsal bir hastalığı olan veya kalıtsal bir hastalık için taşıyıcı olduğu bilinen

evli çiftlerin; sağlıklı bebek sahibi olması için uygulanan PGT ve yardımcı üreme tekniklerine yönelik geri ödeme kapsamındaki hastalık listesi, 1 Ağustos 2021 tarihinde güncellenen Sağlık Uygulama Tebliği ile genişletilmiş ve bazı metabolik hastalıklar eklenmiştir. Preimplantasyon genetik tanı (PGT) ile invitro fertilizasyon (IVF) yapılacak kalıtsal hastalıklar listesinde, E71, E72.2, E75 E76.0, E76.1, E76.2 ve E76.3 kodlarıyla kalıtsal metabolik hastalıklar yer almaktadır. Ancak PGT ile IVF yapılacak olan çiftlerde taşınan mutasyonun bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle daha önce genetik hastalık nedeniyle ölen çocukları olan veya risk altında olduğu için taranması gereken bireylerin öncelikle moleküler genetik tanısının olması gerekmektedir.

Genetik hastalıklarda tanı, semptomların ve radyolojik bulguların değerlendirilmesi ile klinik, kan/idrarda metabolit ölçümü ve fibroblastlarda, lökösitlerde enzim düzeyi tayini ile biyokimyasal, moleküler genetik testler ile de genetik olarak konulmaktadır. Genetik tanı hastalığın prognozunun tayini, tedavi olanaklarının değerlendirilebilmesi, prenatal tanı imkanlarının kullanılabilmesi için gereklidir. Gösterilen moleküler genetik etiyolojilerinden missense/nonsense mutasyonlar, kırpılmayı etkileyen mutasyonlar, küçük/büyük insersiyon-delesyonlar, kompleks yeniden düzenlenmeler sorumludur. Genetik tanı için hastaların periferik kan örneklerinden DNA elde edilerek, tek gen dizileme, hedefli paneller veya WES yöntemleri uygulanmaktadır. Bu yöntemler ile ilgili genin ekzonları, ekzon-intron bileşkeleri incelenmektedir. Ancak hastalıklar, ilgili genlerdeki çok çeşitli genetik mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır. Nokta mutasyonlarının yanı sıra, rutin genetik analizler ile saptanamayan derin intronik varyantlar, kopya sayısı değişiklikleri/yapısal değişiklikler de (küçük/büyük insersiyon-delesyon, yeniden düzenlenmeler) genetik hastalıklara neden olmaktadır. Rutin yapılan DNA dizileme yöntemleri ile missense olup kırpılmayı etkileyebilecek ya da ekzon-intron bileşkesinde yer almayıp kırpılmayı etkileyecek mutasyonlar, büyük insersiyon-delesyon, kompleks yeniden düzenlenmeler tespit edilememektedir. Bu değişiklerin tespiti için alternatif tanı yöntemleri geliştirilmeye çalışılmakta ve denenmektedir.

Mendeliyen kalıtılan hastalıklara doğru ve zamanında tanı koymak hastalık yönetimini iyileştirebilir, prognostik bilgi ve tedavi seçenekleri açısından yarar sağlar. Yeni nesil dizileme, mendeliyen kalıtımlı hastalıkların tanısında önemli bir yer tutmaktadır. WES analizi ile olguların %35-50'sine tanı koymak mümkündür ancak geri kalan hastaların çoğu bu test ile genetik tanı alamaz. WGS yöntemiyle tüm genomik varyantlar ilke olarak saptanmasına rağmen, klinik uygulamada WES yöntemine benzer tanı oranları bildirilmektedir(43). Bu yöntemler ile, genetik tanı koymadaki ana zorluklar varyant önceliklendirme ve yorumlama

aşamalarıdır. Rutin genetik tanıda kullanılan DNA dizileme yöntemleri (tek gen dizileme, hedefli panel, WES/WGS) ile ekzonlar ve ekzon-intron bileşkeleri incelenerek bu bölgelerde yer alan varyantların saptanması mümkün olur. Bununla birlikte, patojenik varyantların %30'a kadarının kodlama yapmayan bölgelerde olduğu öne sürülmüştür. Kodlama yapmayan bölgelerde yer alan patojenik varyantların tanımlanması, yalnızca ekzon dizilemesi ile mümkün olmadığından, WGS bu varyantların saptanmasında önemli bir araçtır. Bu bölgelerdeki varyantların fonksiyonel etkilerinin anlaşılabilmesi için RNA dizilemesi ile gen ekspresyonu ve kırpılma analizi yapılması büyük önem taşımaktadır.

4.5. İdrardan Derive Hücre (UDC) Kültürü

Moleküler genetik tanı için RNA çalışmasında incelenmesi gereken genler RNA'nın izole edildiği hücrelerde yeterince yüksek seviyelerde ifade edilirse RNA dizilemesi başarılı olabilir. Bunun için uygun hücre tipini seçmek önemlidir. Genellikle periferik kan örneği ile çalışma yapılsa da gen ifade düzeyi periferik yeterli olmayan hastalıklar için cilt biyopsisi sonrasında yapılan fibroblast kültürü ile RNA çalışmaları daha sıklıkla yapılmaktadır. Ancak cilt biyopsisinin invaziv olması nedeniyle, RNA çalışması için örnek elde edilebilecek alternatif dokular gereklidir.

Embriyonik kök hücreleri, erişkin kök hücreleri ve iPSC'ler, doku homeostazını koruma, rejenerasyonu destekleme ve hasarlı dokuların onarımı ile iyileşme süreçlerine katkı sağlama potansiyelleri nedeniyle giderek artan bir şekilde bilimsel araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. İdrar kökenli kök hücreleri (USC) ilk kez Zhang ve arkadaşları(44) tarafından 2008 yılında tanımlanmış olup, otolog kullanımlarıyla kök hücre çalışmalarında önemli bir yenilik olarak görülmektedir. USC'ler, hücresel bağışıklık sistemi, oksidatif stres, revaskülarizasyon, apoptoz ve otofaji gibi süreçlerde düzenleyici roller oynayabilir. USC'lerin klinik uygulamalardaki potansiyeli, doku rejenerasyonu ve çeşitli hastalıkların tedavisinde geniş bir pencerede incelenmiştir. Özellikle, bu hücrelerin çok yönlü farklılaşma yetenekleri, onları doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında cazip kılmaktadır. Ayrıca, USC'lerin salgıladığı biyoaktif maddeler, hasarlı dokuların onarımını destekleyebilir ve inflamatuar yanıtları modüle edebilir. Ayrıca, USC'ler tarafından salgılanan biyoaktif maddeler, hücresel mikroçevrede inflamasyonu azaltarak iyileşme süreçlerini hızlandırabilir. Özellikle, kardiyovasküler hastalıklar, osteoartrit ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik rahatsızlıklarda başarılı sonuçlar gösterilmiştir (45).

İdrar örneklerinden, idrardan derive hücrelerin toplanması ve izole edilmesi kolay, hızlı, tekrarlanabilir ve optimize edilmiş bir yöntemdir. Protokol genel olarak, idrarın toplanmasının (yaklaşık 150 ml-fazla idrar miktarı daha yüksek verim sağlar) ardından santrifüjlemeyi ve fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkamayı içerir. Hücreler daha sonra jelatin kaplı 24 kuyulu plakalarda uygun besiyeri ile kültür işlemi uygulanır. UDC'ler CD14, CD34, CD45, CD31, CD184 gibi hematopoietik yüzey belirteçlerin yokluğunda CD166, CD105, CD13, CD54, CD73, CD90, CD29 ve CD49a gibi mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerinin ifadelerini gösterir. Literatürde sunulan çalışmalarda, UDC'lerin transkriptom profili, insan RNA dizileme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan iki doku türü olan beyaz kan hücreleri ve fibroblastların profili ile karşılaştırıldığı görülmektedir. Bir çalışmada 40 katılımcının UDC verileri GTEx veri bankasındaki tam kan ve kültüre edilmiş fibroblastlardan elde edilen kontrol örneklerinin gen ekspresyon profilleri ile kıyaslandığında UDC ve fibroblastların ekpresyon profillerinin tam kana göre birbirine daha yakın olduğu tespit edildiği görülmektedir (46).

Son yıllarda literatürde, RNA dizileme çalışmalarında, cilt biyopsisine alternatif olarak kolay sağlanabilen, idrar örneklerinden elde edilen UDC kullanımı ile başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir(47, 48). Bu sonuçlar, idrardan derive hücrelerin özellikle metabolik hastalıkların tanısı için yapılan RNA çalışmalarında kullanılan cilt biyopsisi/fibroblast kültürü yerine idrar örneklerinin kullanabileceğini ve uygun doku elde edilemeyecek olgularda alternatif bir yöntem olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2012 – Ocak 2024 arasında Anabilim dalımızda ve Çocuk Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'nda değerlendirilen son derece nadir, moleküler tanısı olmayan ve izlemi devam eden 15 hasta onamları alınarak çalışmaya dahil edildi. Çalışma kapsamında değerlendirildi. . Bu araştırma tanımlayıcı çalışma olarak planlanmıştır. Dahil edilme ve hariç tutulma kriterleri aşağıda sıralanmaktadır.

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilme Ölçütleri:

1. Biyokimyasal yöntemler, klinik ve görüntüleme bulguları ile genetik hastalık tanısı almak

2. Rutin genetik testleri (tek gen / panel / tüm ekzom dizilimi) ile tanı konulamaması ve aşağıdaki durumlardan birini taşıması

a) Genetik test sonucunda klinik ile ilişkili hiçbir varyant saptanmaması

b) Genetik test sonucunda klinik ile ilişkili 1 patojenik/olası patojenik varyant saptanması (otozomal resesif hastalıklar için)

c) Genetik test sonucunda VUS varyantlar saptanması

3. Ekzon delesyonu MLPA vb. yöntemlerle kanıtlanmış olan olgular

4. Onam vermiş olmak

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilmeme Ölçütleri:

1. Biyokimyasal yöntemler, klinik ve görüntüleme bulguları genetik hastalık tanısı konulamaması

2. Rutin genetik testler ile homozigot veya bileşik heterozigot varyantların (DNA dizi analizi ile tespit edilebilen) gösterilmesi

Hastalıklardan sorumlu genlerin doku ekspresyon düzeyleri, *Genotype Tissue Expression Portal* (GTEx) ve *Human Protein Atlas* (HPA) veritabalarında incelenerek hangi dokudan

materyal alınacağına karar verildi. Kan / idrar örneği gibi daha kolay materyal sağlanabilecek durumlar dışında (doku ekpresyon düzeyi kan ve idrarda yeterli olmayan genler için) cilt biyopsi işlemi uygulandı.

Kan ve idrar örneği alma işlemi polikliniklerde yapılan günlük uygulama kapsamındaki gibi gerçekleştirildi; Yaklaşık 5 ml periferik kan örneği, 150-200 ml idrar örneği alındı. Kan veya idrar örneği ile çalışılması uygun olmayan hasta gruplarında ise cilt biyopsi örneği alındı. Bu işlem uygun koşullarda "deri ve zührevi hastalıklar" veya "çocuk cerrahisi" polikliniklerinde gerçekleştirildi. Biyopsi alınacak deri bölgesi lokal anestezik madde ile uyuşturulduktan sonra, silindir biçiminde bir kesiciden ibaret olan biyopsi aleti bu alanın üzerine konuldu, hafifçe bastırıldıktan sonra çevrildi. Dairesel olarak kesilmiş olan 0,5x0,5 cm büyüklüğünde deri parçası bistüri adı verilen cerrahi bıçak ile yerinden ayrıldı. Kanamayı durdurmak için bölgeye tampon ile 3-5 dakika baskı yapıldı, kanama kontrolü sağlandıktan sonra, deri parçasının alındığı alan ortalama 2-3 adet cerrahi dikiş ile kapatıldı. Son olarak biyopsi alınan bölge steril bir şekilde gazlı bez ve flaster ile kapatıldı.

Yöntem Basamakları

- Kültür aşaması
- RNA izolasyonu
- m-RNA dizileme yöntemi
- Doğrulama, DNA Dizisinde Mutasyon Araştırması

5.1. Kültür Aşaması

5.1.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre Örneğinden Kültür Aşaması

1. Hastalardan elde edilen 5 mL periferik kan örneği, eşit miktarda (1:1) PBS ile dilüe seyretildi.

2. 15 mL'lik Falcon tüpüne 5 mL lenfosit seperasyon medyumu eklendi.

3. Kan-PBS karışımı, medyumun üzerine dikkatlice, karıştırmamaya özen gösterilerek eklendi.

4. Kan-PBS ve lenfosit seperasyon medyumu karışımı, 500 g'de 45 dakika santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonrası oluşan 'buffy coat' tabakası dikkatlice toplandı.

6. Buffy coat iki kez eşit hacimde PBS ile yıkandı.

7. Elde edilen hücre peleti, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1,5 PHA içeren RPMI 1640 ortamına eklendi.

8. Hücreler, T-25 flaskında 37°C'de ve %5 CO_2 ortamında 72 saat inkübe edildi.

9. Gerekli görülürse, hücreler 24 veya 48 saat sonra taze besiyeri içeren daha büyük bir flaska aktarıldı.

10. İnkübasyonun 72. saatinde besiyeri değiştirildi ve sonrasında besiyeri takibi yapıldı.

11. Kültürün başlangıcından 6 gün sonra, NMD mekanizmasını inhibe etmek amacıyla kültüre 100 µg/mL siklohekzimid eklendi.

12. Hücreler, 37°C'de ve %5 CO_2 ortamında 6 saat inkübe edildi.

13. 6 saatlik siklohekzimid inkübasyonunun ardından, RNA izolasyonu aşamasına geçildi.

5.1.2. UDC Örneğinden Kültür Aşaması

1. İdrar toplama kapı ile 150-200 ml idrar elde edildi.

2. 50 ml'lik falkon tüplere elde edilen idrar örnekleri aktarıldı.

3. 400 g'de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi.

4. Süpernatant 1 ml kalıncaya kadar dikkatlice boşaltıldı.

5. Pelet ve 1 ml süpernatant resüspanse edildi ve 10 ml yıkama solüsyonu eklendi. (yıkama solüsyonu = PBS+ penisilin+ amfoteresin B + streptomisin)

6. 200 g'de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi.

7. Süpernatant 0,2 ml kalıncaya kadar dikkatlice boşaltıldı.

8. Pelet ve süpernatant yeniden homojenize edildi, 12 kuyucuklu plate kullanarak ekim işlemi yapıldı ve 1 ml besiyeri ilave edilerek 37^0C'lik etüvde takip edildi.

9. 24.– 48.– 72. saatte 1 ml besiyeri ilave edildi ve kolonizasyon değerlendirildi.

10. 96. saatteki değerlendirmede besiyeri, taze besiyeri ile değiştirildi. (1 ml kalıncaya kadar eski besiyeri boşaltıldı ve 1 ml taze besiyeri ilave edildi.)

11. Takip edilen günlerde flasktaki besiyerinin %50 oranında yenilenerek, hücre büyümesi takip edildi.

12. Flask tabanının %80'i hücre ile kaplandığı zaman yeterli büyüme elde edilmiş olduğundan NMD mekanizmasını inhibe etmek amacıyla 100 µg/mL siklohekzimid eklenmesi aşamasına geçilir. 37 °C'de ve %5 CO_2'de 6 saatlik inkübasyonun ardından RNA izolasyonu aşamasına gerçekleştirilir.

5.1.3. Cilt Biyopsi Örneğinden Kültür Aşaması

1. Örnekler bir petri kutusuna aktarıldı. Kanlı kısımlar temizlenerek HAM's besiyeri ile yıkama yapıldı. Mümkün olan en temiz örnek elde edilmeye çalışıldı.

2. Kültürü yapılacak örnek bir petri içine alınıp, bistüri yardımı fiziksel parçalama uygulandı. Doğranarak küçük parçalara ayrılmış örneğe 2,5 ml tripsin eklendi. 15-20 dakika 37 °C de etüvde bekletildi.

3. Süre sonunda etüvden alınan örnek falkon tüpüne aktarıldı ve santrifüj edildi. (1750 rpm, 8 dakika) Santrifüj sonrası süpernatant tamamen atıldı, üzerine 8 ml HAM's besiyeri eklenerek tripsinden temizlemek için tekrar santrifüj edildi. Santrifüjden alındıktan sonra pelet miktarına uygun oranda üzerinde süpernatanttan bir miktar bırakılıp geri kalan atıldı. (Yaklaşık 1ml)

4. Tüp içerisindeki örnekten yeterli miktarda numune alınıp flaskın alt yüzeyine, flaskı çizmeden dikkatlice yerleştirildi. Ekim yapılan flask içine kullanılacak olan besiyerinden 5-6

damla içine bırakılarak 24 saat süresince etüvde bekletildi. 24 saatin sonunda doku örneklerinin flaskın yüzeyine yapışıp yapışmadığı kontrol edilerek besiyerleri 5 ml'ye tamamlandı.

5. Bir hafta boyunca etüvde tutulduktan sonra ilk kontrolleri yapıldı. Koloniler yeterli büyüklükte ve sayıda ise doku parçaları yıkanarak flasktan uzaklaştırıldı.

6. Hücreler flaskın %80'i kaplayana kadar gün aşırı besleme ve kontrol işlemi yapıldı.

7. NMD mekanizmasını inhibe etmek için 100 µg/mL siklohekzimid eklendi, 37 °C'de ve %5 CO_2'de 6 saatlik inkübasyonun ardından RNA izolasyonu aşamasına geçildi.

5.2. RNA - DNA İzolasyonu

RNA izolasyonu 1. Yöntem

Hücre kültürü örneklerinden RNA eldesi için *"RNeasy Plus Mini Kit"* kullanıldı. İzolasyona başlamadan önce izolasyonda kullanılacak *Buffer RPE* çalışma solüsyonu hazırlanırken 1 volüm tampon için 4 volüm %96'lık etanol eklendi. 1 ml *Buffer RLT'ye*, 10 µl β-merkaptoetanol eklenerek çalışma tamponu hazırlandı.

Uygulama yönergesine göre aşağıdaki sırayla işlemler yapıldı:

1. Bir santrifüj tüpünde 300 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj ederek uygun sayıda hücre toplandı. Aspirasyon yoluyla tüm süpernatant dikkatli bir şekilde çekildi. Uygun miktarda *Buffer* RLT eklendi. Karıştırmak için vortekslendi. Hücre sayısına göre kullanılması gereken *Buffer RLT* miktarı Tablo 5.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 5.1. Hücre sayısına göre kullanılması gereken *Buffer RLT* miktarı

Hücre Sayısı	***Buffer RLT* miktarı**
$<5x10^6$	350 µl
$5x10^6 – 10^7$	600 µl

2. Homojenleştirilmiş ürünü, 2 ml'lik bir toplama tüpüne alındıktan sonra ve bir gDNA eliminator döndürme kolonuna aktarıldı. ≥8000 x g'de (≥10.000 rpm) 30 saniye boyunca santrifüjlendi.

3. Tüp içine hacme göre 350 µl veya 600 µl %70'lik etanol eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı.

4. 700 µl'ye kadar numuneyi, 2 ml'lik bir toplama tüpüne alınarak, yerleştirilen kolona aktarıldı. 15 saniye boyunca ≥8000 x g'de (≥10.000 rpm) santrifüjlendi. Alta geçen kısım atıldı.

5. 700 µl *Buffer RW1* eklendi. ≥8000 x g'de (≥10.000 rpm) 15 saniye boyunca santrifüjlendi. Alta geçen kısım atıldı.

6. 500 µl *Buffer RPE* eklendi. ≥8000 x g'de (≥10.000 rpm) 15 saniye boyunca santrifüjlendi. Alta geçen kısım atıldı.

7. 500 µl *Buffer RPE* eklendi. ≥8000 x g'de (≥10.000 rpm) 2 dakika boyunca santrifüjlendi. Alta geçen kısım atıldı.

8. 1,5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilirdi. 30–50 µl RNaz içermeyen su eklendi. ≥8000 x g'de (≥10.000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüjlendi.

9. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirildi ve 260/280'in 1.8-2 aralığında olduğu belirlendi. RNA örnekleri -80 ˚C'de saklandı.

RNA izolasyonu 2.Yöntem

Periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu için "*Geneall Hybrid-R Blood RNA"* kiti kullanılmıştır. İzolasyona başlamadan önce izolasyonda kullanılacak tampon çözeltiler hazırlanmıştır. *RB1 Buffer'a* 55 ml %100 etanol eklenerek çalışma solüsyonu elde edilmiştir. *RBW Buffer'a* 17 ml %96-100 etanol eklenmiştir. *RNW Buffer'a* 24 ml %100 etanol ilave edilmiştir.

Uygulama yönergesine göre sırayla aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. Falkon tüpü (15 ml'lik) içine 1 ml periferik kan örneği eklenmiştir. İçerisine 3 ml *Buffer RL* eklenmiştir.

2. Vortekslenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 700 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

3. Süpernatan kısmı alındıktan sonra 1 ml *Buffer RL* eklenmiştir. 1,5 mililitrelik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. 4000 rpm hızda iki dakika santrifüj edilmiştir.

4. Süpernatan kısmı alındıktan sonra Tüplerin üzerine 250 µl PBS eklenmiştir.

5. 750 µl *RiboEx* eklenmiştir. Oda sıcaklığında iki dakika inkübe bekletilmiştir.

6. 200 µl kloroform eklenmiştir. Vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra üç dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir, sonra 15000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

7. *GeneAll EzPure* filtrelere eklenmiştir. 10000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

8. 900 µl Buffer *RB1* eklenmiştir. Karışımın 700 µl'si *GeneAll Column type W* filtrelere eklenmiştir. 10000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

9. 500 µl *Buffer RBW* eklenmiştir. 10.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

10. 500 µl *Buffer RNW* eklenmiştir. 10.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

11. 42 µl distile su ile elüe edildikten sonra 10000 x g'de bir dakika santrifüj edilmiştir.

12. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirildi ve 260/280'in 1.8-2 aralığında olduğu belirlendi. RNA örnekleri -80 ˚C'de saklandı.

DNA izolasyonu

Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu için "*Geneall Exgene™ Blood SV"* kiti kullanılmıştır.

Uygulama yönergesine göre aşağıdaki sırayla işlemler yapıldı:

1. 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne 20 µl Proteinaz K eklendi.
2. Santrifüj tüpüne 200 µl örnek eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
3. 200 µl *Buffer JBL* eklendi ve iyice karıştırıldı. 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. 200 µl soğuk %100 etanol eklendi, 30 saniye vortex ile karıştırıldı.
5. Çözelti mini kolona aktarıldı, 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Aşağı geçen sıvı atıldı.
6. Kolona 500 µl *Buffer JBW* ekle, 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Aşağı geçen sıvı atıldı.
7. Kolona 700 µl *Buffer NW* ekle, 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Aşağı geçen sıvı atıldı.
8. Kalıntı buffer ulaştırılması için kolonu yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.

9. 42 µl distile su eklendi ve maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.
10. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirildi ve 260/280'in 1.8-2 aralığında olduğu belirlendi. DNA örnekleri -80 ˚C'de saklandı.

5.3. m-RNA Dizileme Yöntemi

5.3.1. Ribozomal RNA'nın Uzaklaştırılması ve Poli-A Zenginleştirilmesi

Total RNA örneklerinden ribozomal RNA'ları uzaklaştırmak amacıyla poli-A zenginleştirilmesi uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen m-RNA'ların kalitesi ve miktarı belirlenmiştir. RNA miktarı ve kalitesine göre kütüphane hazırlanmıştır.

5.3.2. m-RNA Fragmanlarının Hazırlanması

Yeni nesil dizileme işlemi için m-RNA örneklerinin uygun büyüklükte fragmanlara ayrılması gerekir. Daha sonra, uygun büyüklükte olmayan m-RNA fragmanları, saflaştırma (pürifikasyon) yapılarak uzaklaştırılmıştır.

5.3.3. cDNA Üretimi

İlk aşamada, heksamerlerle hazırlanmış RNA fragmanlarının ters transkripsiyonu (revers transkriptaz) yapılarak ilk iplik cDNA sentezlenmiştir. İkinci iplik cDNA sentezi aşamasında, RNA şablonu çıkarılmış ve çift sarmallı, küt uçlu cDNA fragmanları oluşturulmuştur. Bu aşamada, amplifikasyon sırasında iplik özgüllüğünü sağlamak amacıyla deoksitimidin trifosfat yerine deoksiüridin trifosfat kullanılmıştır.

5.3.4. Adaptör Ligasyonu ve m-RNA Dizileme

Adaptör ligasyonu sırasında, birbirine bağlanmalarını önlemek için küt uçlu fragmanların 3' uçlarına bir adenin (A) nükleotidi eklenmiştir. Adaptörlerin 3' ucundaki karşılık gelen timin

(T) nükleotidi, adaptörlerin fragmanlara bağlanması için tamamlayıcı bir çıkıntı sağlamıştır. Çift sarmallı cDNA fragmanlarının uçlarına pre-indeksleme adaptörleri bağlanmış ve fragmanlar ikili indekslemeye hazır hale getirilmiştir. Daha sonra yapılan PCR amplifikasyonu ile indeks adaptör dizileri eklenmiştir.

5.3.5. Kütüphane Hazırlama ve Kontrol

Adaptörlerle bağlanan DNA parçaları seçici olarak amplifiye edilerek küme üretimi için indeksler ve primer dizileri eklenmiştir. Ortaya çıkan ürün, her iki ucunda adaptör bulunan çift indeksli bir kütüphane oluşturulmuştur. Kütüphanenin konsantrasyonu ve kalitesi kontrol edilmiştir.

5.3.6. Ham Veri İşleme-Veri Kalite Kontrolü

Yeni nesil dizileme sonuçlarında elde edilen ham veriler oldukça fazladır. Bu veriler içerisinde özgün olmayan diziler, duplikasyon bölgeleri ve homopolimer dizileri bulunmaktadır. Doğru analiz yapabilmek için bu istenmeyen dizilerin ham veriden uzaklaştırılması gerekmektedir. Ham .fastq verisinin kalite kontrolü FastQC aracı (sürüm 0.11.7) ile gerçekleştirildi. Sekanslanan örnek için Q20 değerleri (%99 doğrulukla çağrılan bazların yüzdesi), Q30 değerleri (%99,9 doğrulukla çağrılan bazların yüzdesi) ve % GC içeriği hesaplandı. Trimmomatic aracı (sürüm 0.39) kullanılarak Phred kalite skoru 20'den düşük olan okumalar kırpıldı ve 20 bazdan kısa olan okumalar filtrelendi. Kalite kırpma işleminden sonra Q20, Q30 değerleri ve % GC içerikleri yeniden hesaplandı.

5.3.7. Yarı-Hizalama ve Gen Düzeyinde Nicelleştirme

Gen düzeyinde ifade değerleri Kallisto (sürüm 0.46.1) ve tximport R paketi (sürüm 1.22.0) ile elde edildi. İlk olarak, Homo sapiens için referans transkriptom ve GTF dosyaları GENCODE veritabanından (v38 sürümü) indirildi ve Kallisto ile referans transkriptom indeksi oluşturuldu. Devamında Kallisto, kırpılmış .fastq dosyasındaki okumaları yarı-hizalama yöntemiyle tüm insan transkript sekanslarına karşı eşleştirerek transkript düzeyinde ham sayımlar hesapladı. Bu transkript düzeyindeki sayımlar, tximport paketi kullanılarak gen

düzeyine dönüştürüldü. Kırpılmış .fastq dosyasındaki okumaların referans transkriptoma yarı-hizalanma yüzdesi hesaplandı.

5.3.8. Varyant Analizi

Temizlenmiş okumalar, "STAR" hizalama aracı (v2.7.10a) kullanılarak hg38 referans genomuna hizalandı(49). İki geçişli hizalama modu kullanılarak, yeni ekzon-intron birleşim bölgeleri tespit edildi ve bu bilgiler şekillendirme analizi için kullanıldı. Referans genom, aynı araç kullanılarak indekslendi. Varyant çağrımı için okuma ön işleme ve varyant belirleme adımları "Genome Analysis Toolkit" (GATK) (v4.1.8) kullanılarak gerçekleştirildi (50). Çoğaltılmış okumalar "MarkDuplicate" aracı ile işaretlendi. "CIGAR" dizisinde "N" içeren okumalar "SplitNCigarReads" aracıyla ayrıldı. Varyantlar, "HaplotypeCaller" ile tespit edilerek GATK'nin "hard filter" kriterlerine göre etiketlendi. Varyant anotasyonu, "EnsemblVEP" aracı (v104) kullanılarak gerçekleştirildi. Hastalık ilişkili genler, "Human Phenotype Ontology" (HPO), "Orphanet" ve "Online Mendelian Inheritance in Man" (OMIM) (OMIM, 2023) veritabanları kullanılarak belirlendi (51-53). Klinik önem taşıyan varyantlar, "ClinVar" ve ACMG 2015 kriterlerine göre işaretlendi. Tespit edilen varyantlar, *Genomics&More* platformu üzerinden erişilebilir hale getirildi.

5.3.9. Anormal Kırpılma (Splicing) Analizi

İlgili genlerdeki anormal kırpılma olayları (intron tutulumları, ekzon atlamaları) tespit edildi. Üç farklı makine öğrenmesi algoritması kullanan araç ile analiz yapıldı: FRASER (54) ve DASPER (55) için kontrol RNA-seq örnekleri gerekliydi. *"The Genotype Tissue Expression Portal"* (GTEx) (v8 sürümü) projesine ait 209 kan örneği, 222 kültürlenmiş fibroblast ve 68 böbrek korteks örneği kontrol grubu olarak kullanıldı(52). Üçüncü araç (56) varyant kaynaklı kırpılma değişikliklerini tespit etti. Anormal kırpılma olayına neden olan varyantlar, varyant bölgesinin ±500 bp içindeki ekzon-intron birleşim noktaları içinde bulunuyorsa tanımlandı. Anormal kırpılma analizi için Integrated Genomics Viewer (IGV) ve IGV-Sashimi Plot kullanıldı. IGV .bam dosyalarını, hastalara ait okumaları görselleştirirken, Sashimi Plot ise RNA dizi analizlerinin nicel ekspresyon sonuçlarının görsel olarak karşılaştırılmasını ve RNA fragmanlarının içerdiği, devamlılık gösterdiği ekzonların analizinin yapılmasına olanak sağlayarak, hastalardaki anormal kırpılmaların belirlenmesini sağlar.

5.3.10. Anormal Ekspresyon Analizi

Ekspresyon anormallikleri, GTEx kontrol grubu ile kıyaslanarak tespit edildi. TMM normalizasyon yöntemi EdgeR kullanılarak ham okuma sayıları normalize edildi(57). Bir gen veya transkript, ekspresyon seviyesi GTEx kontrol grubundaki bireylerin %95'inden daha yüksek veya daha düşükse, dışlanmış ekspresyon (outlier) olarak sınıflandırıldı.

5.3.11. Anormal Alel-Spesifik Ekspresyon

Alel-spesifik ekspresyon analizi için GTEx kontrol grubu kullanıldı. GATK "ASEReadCounter" ile RNA-Seq ve genomik veri kullanılarak heterozigot biallelik SNP'lerde her bir alelin okuma sayısı hesaplandı. Varyantlar, "EnsemblVEP" aracıyla tanımlandı. Bir gen, hastanın alel dengesi %95'lik GTEx kontrol grubuna göre anormal ise alel-spesifik olarak eksprese kabul edildi.

5.4. Doğrulama, DNA Dizisinde Mutasyon Araştırması

Olgularda saptanan RNA değişikliklerini kapsayan bölgeler için ekzon-ekzon bileşkelerini içeren dizilerle primer çiftleri tasarlandı. (Tablo 5.2.*) *HiScript II One Step RT-PCR Kit* ile uygun reaktif miktarları ve uygun koşullarda kontrol örneği ile birlikte revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yapıldı. (Tablo 5.3 - Tablo 5.4.) Uygun amplikonların elde edilip edilmediğini test etmek için RT-PCR ürünleri %1.5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Agaroz jele, 7 µl RT-PCR ürünü 2 µl yükleme tamponu kullanılarak yüklendi. Ürünler, 100 volt (V)'da 60 dakika yürütüldü. Jel, *Kodak Gel 200* cihazında görüntülenerek, *Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York)* kullanılarak analiz edildi. Elde edilen ürünlerin boyları, *GeneRuler 50 bp DNA Ladder* kullanılarak kontrol edildi.

Tablo 5.2. Çalışmada cDNA ve DNA örnekleri için kullanılan primerler ve özellikleri

	Primer ismi	**Dizi (5' – 3')**	**Ürün boyu (bp)**	***Tavlama sıcaklığı***
Olgu 1	*GNPTAB*-E17F	ACTGACAAAATCCACAAAGCAT	323	*54*
	GNPTAB-E20R	CGATAAGCCCTCCATTCCTG		
	GNPTAB-I17F	CGTACCAACGTTTCTCATGTGG	905	*55*
	GNPTAB-I17R	AGTGAGGTAAAACTAAAGACCTCCA		
Olgu 5	*HLCS*-E7F	AAAGGACGGGGAGGGAATGT	516	*57*
	HLCS-E11R	GCCCAGATGGACTTGCTGAC		
	HLCS-I8F	CTGTGGCGAATGTTTTGGGG	293	*56*
	HLCS-I8R	AGACGCCGACTCATGTTCAG		
Olgu 7	*GLB1-E9F*	ATTGGAATGGGGCCAACTCA	215	*54*
	GLB1-E12R	TGCTCCCACTGTCTTTAACTTTT		
	GLB1-E13F	CAGGGAGTCCTTGAGCGAAA	563	*55*
	GLB1-E16R	ACGAACGTCACAGCACATAGT		
	GLB1-I10F	AGCCCACCAGCTACGACTAT	863	*55*
	GLB1-I10R	AGTCTGTGAGGTAAGTACGGC		
	GLB1-I14F	CCAAGCTCACTGAAGGCACT	2650 (yaban tip)	*55*
	GLB1-I15R	GTCTTCAAACGACAAGGCGG		
Olgu 10	*POLG2*-E3F	GGTTTACTCCTCCGAGAACTTCAA	367	*56*
	POLG2-E5R	CTTGTAAAGGAGTTCTCTGTCAGC		
	SLC52A2-E1F	TGGTGGTGGCGTTGACT	595	*54*
	SLC52A2-E3R	CCAGTGCTAAGAAGGCCACA		
Olgu 13	*FBXL4*-E5F	GCAGTTGTGCTACATGGTGTG	621	*56*
	FBXL4-E7R	AAGGCTGCATAACTTGGCAATG		
	FBXL4-I6F	CCCATATACAGTTAAGCAGGAAGT	563	*54*
	FBXL4-I6R	TTTCATCTCAACTGTGCCACT		

**Olgu 2 ve olgu 4 için literatürdeki çalışmalarda kullanılan primerler ile PCR yapıldı(58, 59).*

Tablo 5.3. RT-PCR reaksiyon karışımı

Reaktif	**1x Reaksiyon Hacmi (µl)**
One step mix	10
One step enzyme mix	1
Forward primer (10 µM)	0.8
Reverse primer (10 µM)	0.8
RNA	1
Su	6.4

Tablo 5.4. RT-PCR reaksiyon koşulları

Basamak	**Sıcaklık**	**Süre**
cDNA sentezi	50°C	30 dakika
İlk denatürasyon	94°C	3 dakika
3 basamaklı döngü (30-35 döngü)		
1. Denatürasyon	94°C	30 saniye
2. Annealing	Primer Tm – 4-5 °C	30 saniye
3. Uzama	72°C	45 saniye
Son uzama	72°C	5 dakika

RT-PCR ürünlerini m-RNA dizileme ile karşılaştırıp doğruladıktan sonra, RNA değişikliğine neden olabilecek DNA mutasyonunu saptamak ve aile bireyleri için segregasyon yapabilmek amacıyla RNA değişikliğini de kapsayacak şekilde değişikliğin 5'ucuna yaklaşık 200 baz, 3'ucuna yaklaşık 200 baz uzaklıkta olacak şekilde primer tasarlandı. Primer dizileri

ve özellikleri Tablo 5.2.'de belirtildi. *HotStarTaq Plus DNA Polymerase ile* olgulara ait DNA örnekleri kullanılarak uygun reaktif miktarları ile uygun koşullarda PCR yapıldı. (Tablo 5.5 – Tablo 5.6.)

Tablo 5.5. PCR reaksiyon karışımı

Reaktif	1x Reaksiyon Hacmi (µl)
PCR buffer	5
Q solution	10
25 mM $MgCl_2$	2
dNTP	2
Forward primer (10 µM)	2
Reverse primer (10 µM)	2
DNA	2
Taq polimeraz	0.5
Su	25

Tablo 5.6. PCR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95°C	5 dakika
3 basamaklı döngü (30-35 döngü)		
1. Denatürasyon	94°C	30 saniye
2. Annealing	Primer Tm – 4-5 °C	30 saniye
3. Uzama	72°C	45 saniye (60 saniye/kb)
Son uzama	72°C	10 dakika

Uygun amplikonların elde edilip edilmediğini test etmek için PCR ürünleri %1,5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Agaroz jele, 10 µl PCR ürünü 2 µl yükleme tamponu kullanılarak yüklendi. Ürünler, 100 volt (V)'da 60 dakika yürütüldü. Jel, *Kodak Gel 200* cihazında görüntülenerek, *Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York)* kullanılarak analiz edildi. Elde edilen ürünlerin boyları, *GeneRuler 50 bp DNA Ladder* kullanılarak kontrol edildi.

Elde edilen ürünlerin Sanger dizilemesi öncesinde, enzimatik pürifikasyon için 5 µl PCR ürünü için 2 µl *ExoSAP* enzimi ile uygun koşullarda reaksiyon yapıldı. (Tablo 5.7.)

Tablo 5.7. ExoSAP reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre
Enzim aktivasyonu	37 °C	15 dakika
Enzim inaktivasyonu	85 °C	15 dakika

Sekans PCR reaksiyonları için "*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, USA)* kullanılmıştır. Reaksiyon için kullanılan reaktifler ve miktarları Tablo 5.8 ve Tablo 5.9'da belirtilmiştir.

Tablo 5.8. Sekans PCR reaksiyonu karışımı

Reaktif	**1x Reaksiyon Hacmi (µl)**
Buffer	2
Dye	1
Primer (Forward veya reverse)	1
PCR ürünü	1
Su	5

Tablo 5.9. Sekans PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	**Sıcaklık**	**Süre**
İlk denatürasyon	95℃	1 dakika
3 basamaklı döngü (28 döngü)		
1. Denatürasyon	95℃	10 saniye
2. Annealing	50℃	5 saniye
3. Uzama	60℃	4 dakika

Elde edilen sekans PCR ürünleri Sephadex pürifikasyonu sonrasında *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer* cihazı ile dizilendi. Elektroferogram görüntüleri *Unipro UGENE 49.1* programı ile analiz edildi. Analiz sırasında OMIM, Pubmed, ClinVar veritabanlarından yararlanıldı.

6. BULGULAR

Çalışmaya, Ocak 2012 – Ocak 2024 arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı'nda ve Çocuk Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı'nda değerlendirilen ve kabul kriterlerini karşılayan 15 olgu onamları doğrultusunda dahil edildi.

Hasta grubuna ait bilgiler ve sonuçları Tablo 6.1.'de verildi.

Tablo 6.1. Olgulara ait çalışılan doku, yaş/cinsiyet, klinik bulgu, yapılan genetik testler ve ön tanı bilgileri

Hasta	Çalışılan Doku	Hasta yaşı ve cinsiyeti	Klinik bulgular	Daha önce yapılan genetik testler	Klinik ön tanı / tanı	RNA dizileme sonucu
Olgu 1	PBMC	4 yaş, Erkek	• Dismorfik bulgular • Yüksek plazma "heksozaminidaz A,total heksozaminidaz, alfa-N-asetilglukozaminidaz" enzim düzeyleri	Lizozomal depo hastalıkları paneli (37 gen)	Mukolipidozis tip 2 (I-cell hastalığı- MIM: 252500)	*GNPTAB* geninde 147 bp intronik kalıntı *GNPTAB*(NM_024312.5): c.3434+641G>T(p.K1146Ifs37) homozigot (Olası patojenik)
Olgu 2	PBMC	10 yaş, Erkek	• Postnatal 3.gününde emmeme, kusma, letarji şikayeti sonrası yapılan kan aminoasit incelemesinde yüksek lösin düzeyi • Dil-bilişsel alanda gerilik • EKO: interatriyal açıklık, periferik pulmoner stenoz, eser mitral yetmezlik • Kraniyal MRG = MSUD sekelleri • Strabismus nedeniyle göz bölümünde takipli	*"BCKDHA*, *BCKDHB, DBT, PPM1K*" genleri için DNA dizi analizi normal	Akçaağaç şurup idrar hastalığı (MSUD-MIM: 248600)	*BCKDHA* homozigot ekzon 4 atlanması *BCKDHA*(NM_000709.3): c.375+648_484+520del p.Gly126ValfsTer3 – homozigot (Olası patojenik)
Olgu 3	PBMC	2 yaş, Erkek	• Topuk kanı taramasında biyotinidaz eksikliği • Tekrarlayan ölçümlerde düşük biyotinidaz aktivitesi. (1.81 U/L – 1.79 U/L – 1.91 U/L – 1.96 U/L)	*BTD* (NM_001370658.): c.1309G>C (p.V437L)-heterozigot	Biyotinidaz eksikliği (MIM: 253260)	RNA dizisinde değişiklik saptanmadı. *BTD* geninde kontrollere göre - 4.42477 kat ifade değişimi
Olgu 4	PBMC	13 yaş, Erkek	• 4 yaşına kadar normal gelişim • 4 yaşında konuşmada gerileme şikayeti • Kaba yüz görünümü, makroglossi, ağır mental retarde, pes cavus, el ve ayaklarda kabalaşma • Kraniyal MRG = Serebral-serebellar atrofi ve ağır ventriküler dilatasyon, beyaz cevher volümünde azalma • EKO = Hafif sol ventrikül hipertrofisi, mitral yetmezlik • İşitme testi: %25 SNİK • İdurnat 2 sülfataz düzeyi = <0,1 nmol/mg.saat (lökosit içi referans ölçüm =>7.5)	*IDS* dizi analizi normal	Mukopolisakkaridoz tip 2 (Hunter sendromu – MIM: 309900)	*IDS* geninde ekzon 7 – 8 atlanması *IDS* geni 7.intron ile *IDSP1* 3.intron arasında hemizigot inversiyon (Olası patojenik)

(EKO: ekokardiyografi, MRG: manyetik rezonans görüntüleme)

Tablo 6.1. Olgulara ait çalışılan doku, yaş/cinsiyet, klinik bulgu, yapılan genetik testler ve ön tanı bilgileri (devam)

Olgu 5	PBMC	3 yaş, Erkek	• 2 yaşında solunum güçlüğü ve metabolik asidoz • İdrar organik asit analizinde laktat, 2-hidroksibütirat, 3-hidroksipropiyonat, pirüvat, 3-hidroksibütirat, 3-hidroksiizovalerat düzeylerinde artış ve normal biyotinidaz enzim aktivitesi	*HLCS* dizi analizi: Normal Tüm ekzom dizileme analizi: Normal	Holokarboksilaz sentetaz eksikliği (MIM: 609018)	*HLCS* geninde 118 bp intronik kalıntı *HLCS*(NM_001352514.2): c.2237-669T>G (p.G746VfsTer21) – homozigot (Olası patojenik)
Olgu 6	PBMC	16 yaş, Kadın	• 1,5 yaşında periorbital ödem / proteinüri • Steroid tedavisine yanıtsız nefrotik sendrom • Renal biyopsi: Fokal segmental glomerüloskleroz • 14 yaşında bilateral hafif SNİK	*COQ6*(NM_182476.3): c.1383del - homozigot (Nefropati panelinde)	Koenzim Q10 eksikliği (MIM: 614650)	Yapılan analizlerde ekspresyon ve dizi değişikliği saptanmadı.
Olgu 7	PBMC	17 yaş, Kadın	• 3 yaşına kadar normal gelişim • 3 yaşında parmak ucunda yürüme, denge bozukluğu şikayeti • Beta-galaktosidaz enzim aktivitesi 0,12 nnmol/mg.saat	Karyotip, SNP-array, tüm ekzom dizileme analizi: Normal	GM-1 Gangliosidosis (MIM:230600)	*GLB1* geninde 156 bp'lık intronik kalıntı ve heterozigot ekzon 15 atlanması *GLB1(NM_000404.4)*: c.1068+441C>G – heterozigot (VUS) ve *GLB1*(NM_000404.4) :c.1479+846_1734+248delinsG – heterozigot (Olası patojenik)
Olgu 8	PBMC	1 yaş, Kadın	• Prenatal dönemde intrauterin gelişme geriliği (IUGR) ve 2150 gram doğum öyküsü • Postnatal 2.günde hipoglisemi • Kraniyal MRG: Anterior hipofiz hipoplazisi, ektopik nörohipofiz, infundibulum yokluğu ve ince corpus kallosum	Tüm ekzom dizileme analizinde *RNPC3* : (NM_017619.4): c.1420C>A - heterozigot	Pituiter hormon eksikliği tip 7 (MIM: 618160) Orta hat gelişim anomalileri-holoprozensefali	Yapılan analizlerde ekspresyon ve dizi değişikliği saptanmadı.
Olgu 9	İdrar	18 yaş, Kadın	• 25 haftalık, 950 gram doğum öyküsü • Karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk, karında şişlik • Karaciğer biyopsisi: glikojen depo hastalığı ile uyumlu görünüm, glikojen fosforilaz A ve A+B düzeylerinde düşüklük, fosforilaz kinaz enzim düzeyi normal	*PYGL* dizi analizi: Normal	Glikojen depo hastalığı tip 6 (MIM:232700)	Yapılan analizlerde ekspresyon ve dizi değişikliği saptanmadı.
Olgu 10	Cilt-Fibroblast	19 yaş, Erkek	• Hipertrofik kardiyomiyopati • Kan laktik asit ve kreatin kinaz düzeylerinde artış • Üst ekstremitede parestezi şikayeti ve alt ekstremitede güçsüzlük öyküsü	SNP-array ve tüm ekzom dizileme analizi: Normal	Mitokondriyal hastalık?	*SLC52A2* geninde ekzon 2'de 4 bp ve 7 bp'lik ekzon atlanması

(EKO: ekokardiyografi, MRG: manyetik rezonans görüntüleme)

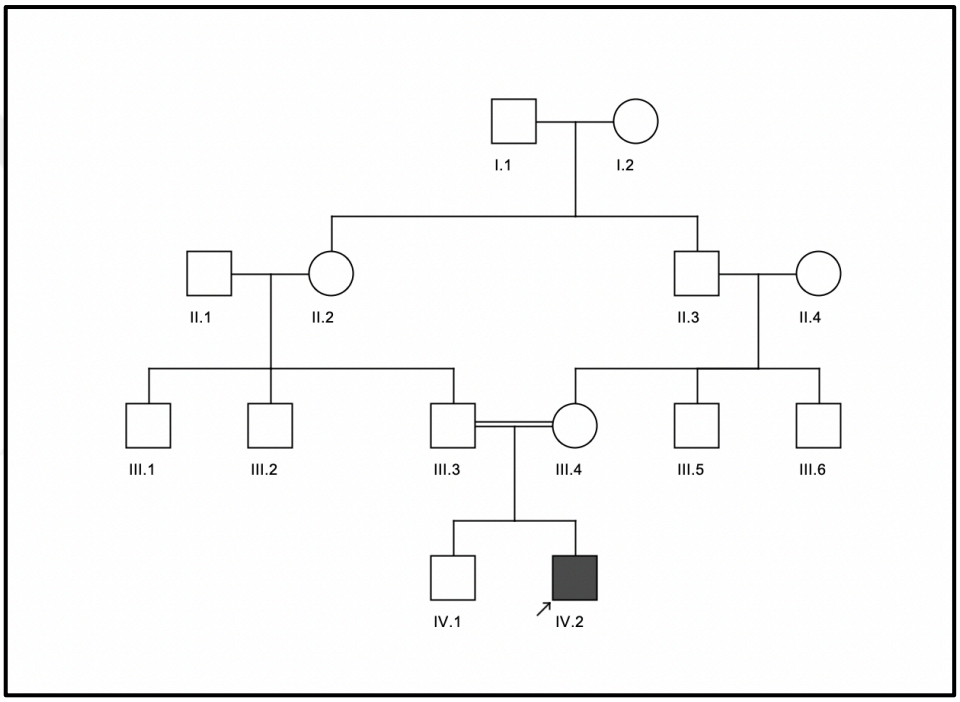
Tablo 6.1. Olgulara ait çalışılan doku, yaş/cinsiyet, klinik bulgu, yapılan genetik testler ve ön tanı bilgileri (devam)

Olgu 11	Periferik kan	14 yaş, Kadın	• İdrar renginde koyulaşma • Kanda homogentisik asit düzeyinde artış • El ve ayak bileğinde ağrı	*HGD* dizi analizi: Normal Tüm ekzom dizileme analizi: Normal	Alkaptonüri (MIM: 203500)	İlk çalışma başarısız
Olgu 12	Periferik kan	3 yaş, Erkek	• Hiperinsülinemik-hipoglisemi-hiperamonyemi	Tüm ekzom dizileme analizi: Normal	Ailesel hiperinsülinemik hipoglisemi tip 6 (hiperinsülinizm-hiperamonyemi sendromu/ MIM: 606762)	*KCNQ1* geninde ekzon 3-8 atlanması ve *CDKN1C* geninde ekspresyon artışı
Olgu 13	Cilt-Fibroblast	12 yaş, Erkek	• Bilişsel ve motor gerilik • Dismorfik bulgular • Katarakt • Nötropeni – Hipogammaglobinemi • Pes planus	SNP-array ve tüm ekzom dizileme analizi: Normal	Mitokondriyal hastalık?	*FBXL4* geni intron 6'da 34 bp'lik intron kalıntısı *FBXL4*(NM_001278716.2):c.1104-2646A>G (pF369Qfs*23) – homozigot (Olası patojenik)
Olgu 14	Cilt-Fibroblast	8 yaş, Kadın	• 5 aylıkken başını tutamama, göz takibi kaybı şikayeti • Görme: Normal, İşitme: Normal • Kraniyal MRG: Lökodistrofi bulguları • MR Streskopi: artmış NAA / Cho (3.77) ve NAA/Cr (2.99) oranları • N-asetil aspartik asit: 23.45	SNP-array ve tüm ekzom dizileme analizi: Normal	Canavan hastalığı (MIM: 271900)	İlk çalışma başarısız
Olgu 15	Periferik kan	13 yaş, Kadın	• Gelişim geriliği • Dismorfik bulgular (kaba yüz, kalın kaş, sinorfiz, hirşuitizm, geniş filtrum, ince üst dudak, sağ el 5.parmakta kısalık) • Atriyal septal defekt (ASD) • Boy, ağırlık ve baş çevresi: <3p (< -2 SDS)	SNP-array ve tüm ekzom dizileme analizi: Normal	Mukopolisakkaridoz?, Coffin Siris sendromu?	Yapılan analizlerde ekspresyon ve dizi değişikliği saptanmadı.

(EKO: ekokardiyografi, MRG: manyetik rezonans görüntüleme)

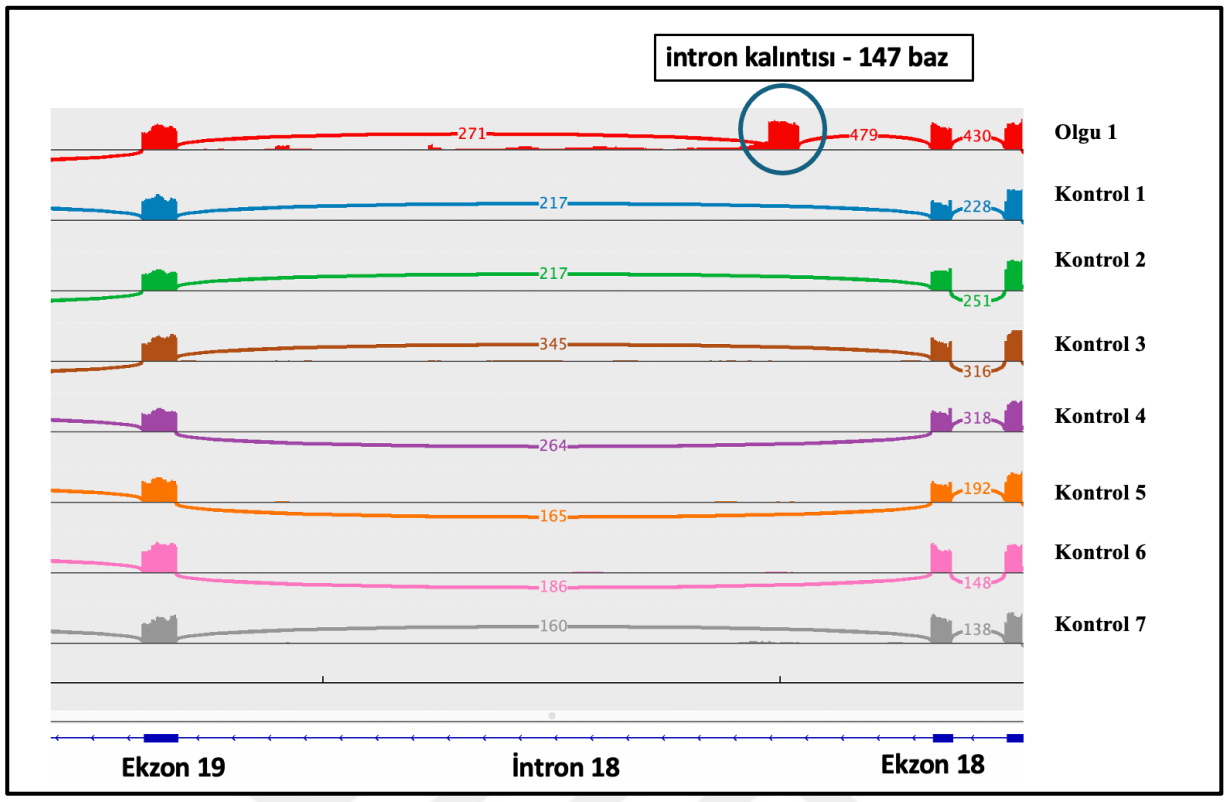
6.1. Olgu 1

Prenatal dönemde anlamlı bir öyküsü olmayan 6 aylıkken geçirdiği pnönomi sonrasında dismorfik bulguları nedeniyle araştırılan 4 yaş erkek hastanın mukopolisakkaridoz ile ilişkili enzim düzeyi taramasında "plazma heksozaminidaz A, heksozaminidaz total, alfa-N-asetilglukozaminidaz" enzim düzeyleri yüksek saptandığı öğrenildi. (Şekil 6.1.) Mukopolipidoz tip 2/3 (MIM: 252500 – 252600) ile uyumlu bulunan hastaya yapılan 37 genlik lizozomal depo hastalıkları panelinde klinik ile ilişkili patojenik / olası patojenik mutasyon tespit edilmediği belirtildi.

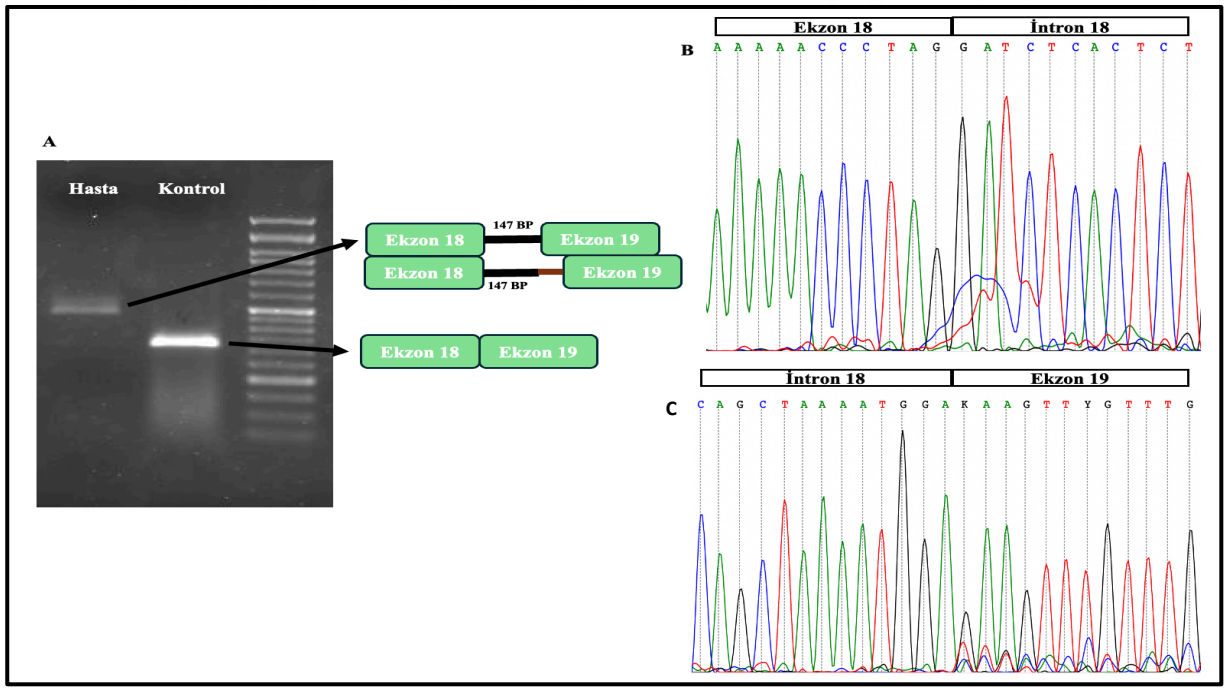


Şekil 6.1. Olgu 1'e ait aile ağacı

Hastaya tüm bulgular sonucunda m-RNA dizileme analizi yapıldı. *GNPTAB* geninde ekzon 18 ve ekzon 19 arasında, ekzon 18'den çıkan bütün RNA fragmanlarında (479 adet) 147 baz uzunluğunda intron 18'e ait intronik kalıntı saptandı. (Şekil 6.2)

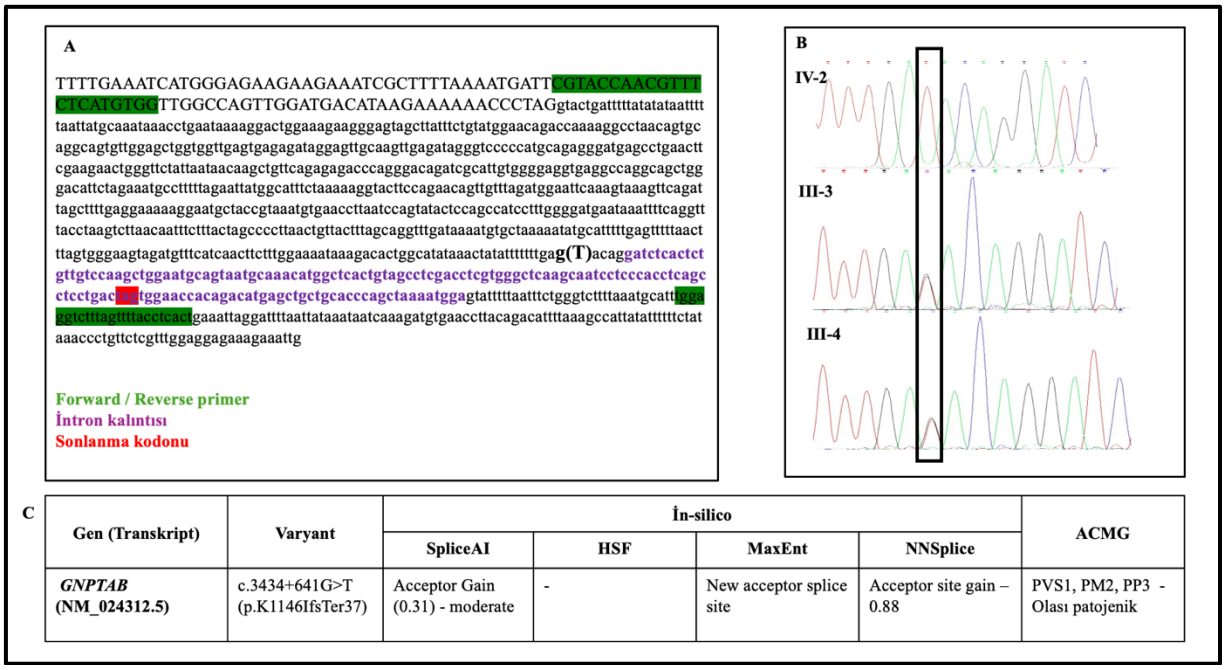


Şekil 6.2. Olgu 1'e ait *GNPTAB* geni Sashimi Plot görüntüsü (147 bazlık intron kalıntısı daire içerisinde gösterilmiştir.)



Şekil 6.3. Olgu 1'e ait intronik kalıntıyı gösteren jel ve elektroferogram görüntüsü A- Olgu 1'e ait RNA örneğinden ekzon 18 ve ekzon 19'u içeren RT-PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüsü B-Hastaya ait PCR ürünün 5' elektroferogram görüntüsü C- Hastaya ait PCR ürünün 3' elektroferogram görüntüsü

Saptanan değişiklik hastaya ait RNA örneğiyle yapılan RT-PCR analizi ve Sanger dizileme ile doğrulandı. (Şekil 6.3.) Sanger dizi analizinde 3' ucundaki görüntü paterni intron 18'e ait diğer alternatif kırpılma ürünleri olduğu düşünüldü. (Şekil 6.3.-C) Hastaya ait DNA örneği kullanılarak intron kalıntısının 200'er baz 5' ve 3' bölgeleri dizilendi. Analiz sonucunda *GNPTAB*(NM_024312.5): c.3434+641G>T(p.K1146Ifs37) mutasyonu homozigot olarak saptandı. Anne ve babaya yönelik segregasyon analizinde aynı mutasyon her ikisinde de heterozigot olarak tespit edildi. (Şekil 6.4. B)



C

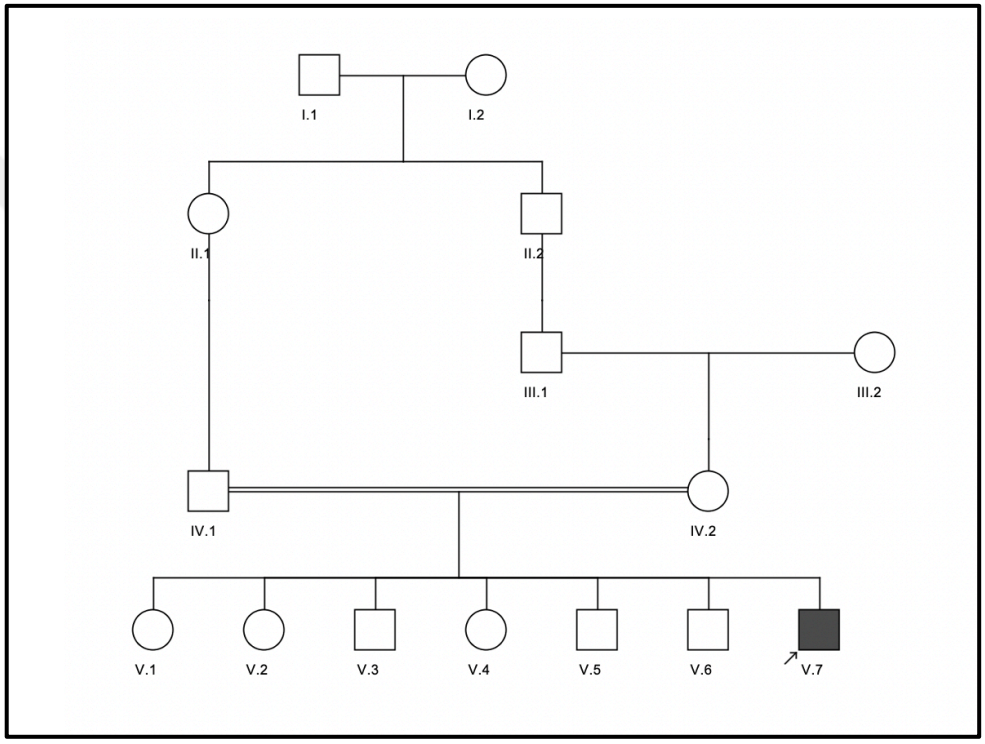
Gen (Transkript)	Varyant	İn-silico				ACMG
		SpliceAI	HSF	MaxEnt	NNSplice	
GNPTAB **(NM_024312.5)**	c.3434+641G>T (p.K1146IfsTer37)	Acceptor Gain (0.31) - moderate	-	New acceptor splice site	Acceptor site gain – 0.88	PVS1, PM2, PP3 - Olası patojenik

Şekil 6.4. Olgu 1'de saptanan derin intronik varyantın değerlendirilmesi ve segregasyon sonuçları A- İntron kalıntısını içeren bölgeyi dizilemek için kullanılan primer çifti, intron kalıntısı ve sonlanma kodonu B- Olgu 1'e (IV-2), babasına (III-3) ve annesine (III-4) yapılan elektroferogram görüntüleri C- Saptanan mutasyonun yorumlanmasına ait skorlama bilgileri

Yaptığımız m-RNA dizileme analizi sonucunda mutasyonun erken sonlanma kodonuna yol açtığı belirlenmiştir. (PVS1). Mutasyona popülasyon veri tabanlarında (GnomAD: 0) rastlanmamıştır (PM2). Varyantın proteine etkisi in-siliko programları tarafından zararlı olarak tahmin edilmiştir (PP3). Mevcut bilgiler ile, tespit edilen bu novel mutasyon "ACMG 2015" rehberine göre olası patojenik olarak değerlendirilmiştir.

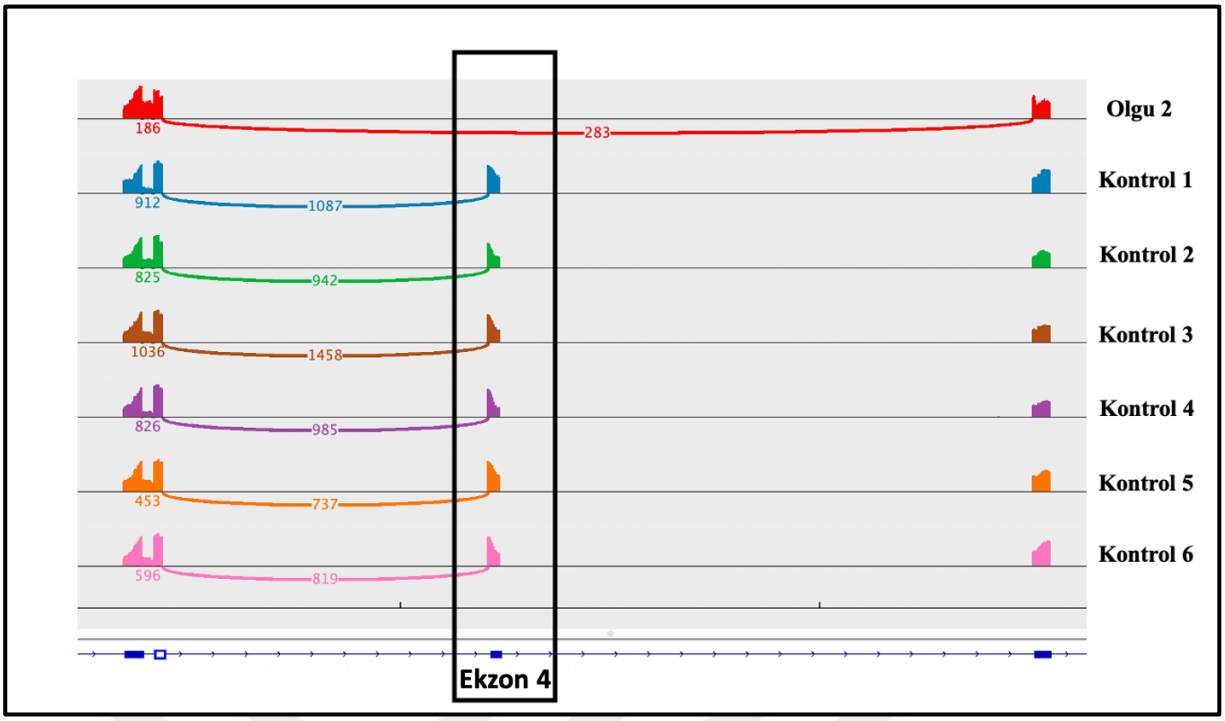
6.2. Olgu 2

Prenatal dönemde anlamlı bir öyküsü olmayan 10 yaş erkek hasta postnatal 3.gününde emmeme, kusma, letarji şikayeti sonrası yapılan kan aminoasit incelemesinde lösinin 7254 µmol/l ölçülerek artışı saptandığı öğrenildi. (Şekil 6.5.) Bu sonuç ile "akçaağaç şurup idrar hastalığı (MSUD)" tanısı alan hasta moleküler genetik etiyolojinin araştırılması için "*BCKDHA*, *BCKDHB, DBT, PPM1K*" genlerine yönelik yapılan DNA dizi analizi normal olarak sonuçlandığı öğrenildi.



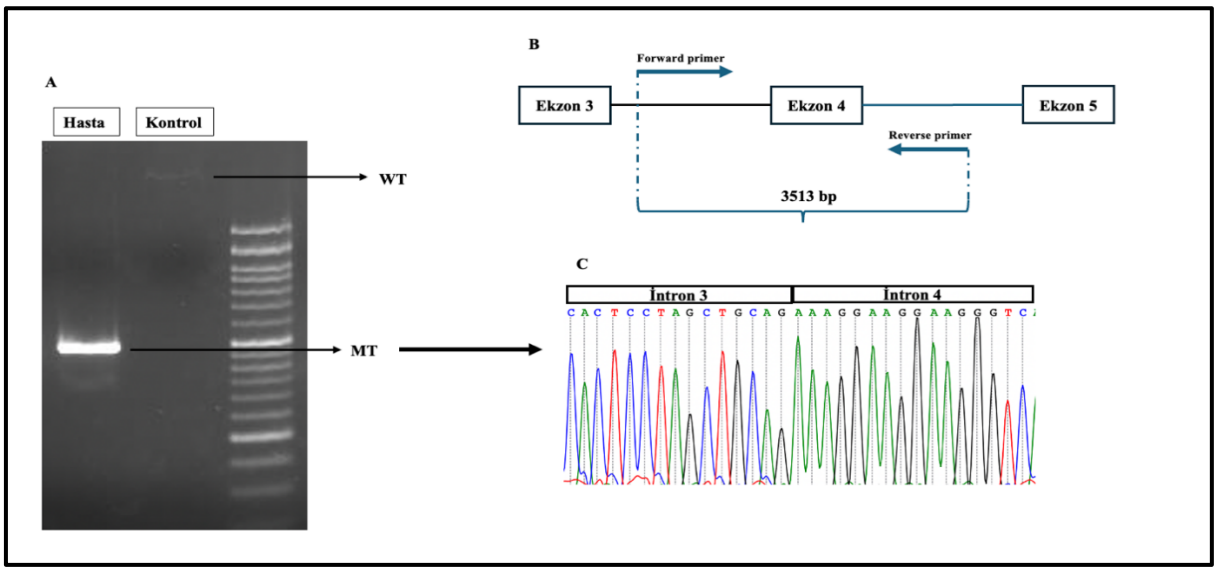
Şekil 6.5. Olgu 2'ye ait aile ağacı

Hasta m-RNA dizileme analizine alındı. Analiz sonucunda *BCKDHA* geninde ekzon 4'ün tüm fragmanlarda atlandığı saptandı. (Şekil 6.6.)



Şekil 6.6. Olgu 2'ye ait *BCKDHA* geni Sashimi Plot görüntüsü (Olgu 4'te homozigot ekzon 4 atlanması dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir.)

Olguda tespit edilen ekzon atlamasının değerlendirilmesi için, bu bölgeye spesifik primerler ile hastaya ait DNA materyalinden ekzon 4'ü çevreleyen ± 20 bazlık bölgeyi incelemek amacıyla PCR planlandı. Ancak PCR yönteminin başarısız olması üzerine delesyon ihtimali düşünüldü. Yapılan literatür taramasında homozigot ekzon 4 delesyonu bildirilen yayındaki primer çifti kullanılarak delesyon analizi uygulandı (58). PCR reaksiyonu sonucu elde edilen 492 bp'lik ürün dizilendi. Dizileme sonucunda intron 3'e ait dizinin devamında intron 4'e ait dizinin görülmesiyle 3021 bp'lik delesyonu sonucu oluşan homozigot ekzon 4 delesyonu desteklendi. (Şekil 6.7.) *(Baba (IV-1) ve annenin (IV-2) materyaline ulaşılamadığı için segregasyon çalışması yapılamamıştır.)*

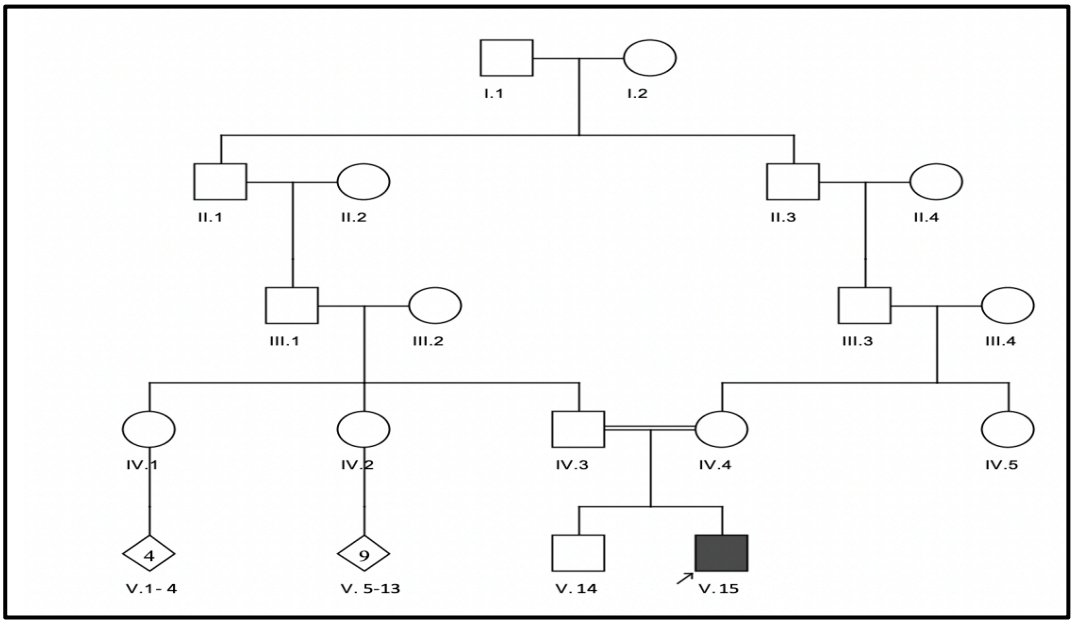


Şekil 6.7. Olgu 2'de bulunan RNA değişikliğinin doğrulanması A- Homozigot ekzon delesyonunu gösteren 492 bp'lik ve kontrolde 3513 bp'lik PCR ürünlerine ait jel görüntüsü B-Kırık noktasının tespiti için yapılan PCR tasarımı C- Delesyona ait kırık noktalarının dizi görüntüsü

Bu analizler sonucunda olguda saptanan *BCKDHA*(NM_000709.3): c.375+648_484+520del mutasyonu p.Gly126ValfsTer3 değişimine neden olarak erken sonlanma kodonu oluşturur. (PVS1) Mutasyona popülasyon veri tabanlarında (GnomAD: 0) rastlanmamıştır (PM2). Mevcut bilgiler ile, tespit edilen bu mutasyon "ACMG 2015" rehberine göre olası patojenik olarak değerlendirilmiştir.

6.3. Olgu 3

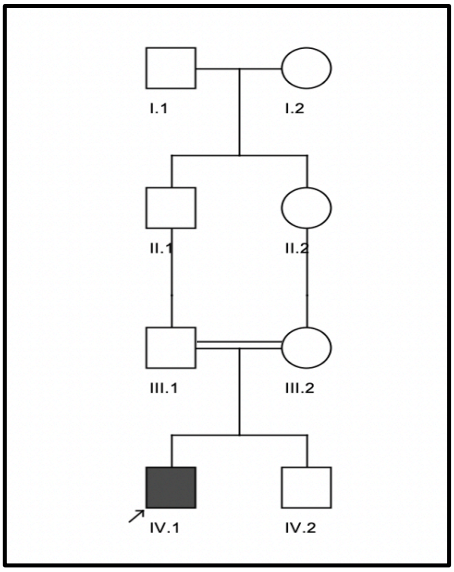
Prenatal dönemde anlamlı bir öyküsü olmayan topuk kanı taramasında biyotinidaz eksikliği saptanan 2 yaş erkek hastanın tekrarlayan ölçümlerde de biyotinidaz aktivitesi düşük (1.81 U/L – 1.79 U/L – 1.91 U/L – 1.96 U/L) saptandığı öğrenildi. Yapılan *BTD* geni dizi analizi sonucunda "olası patojenik" NM_001370658.1: c.1309G>C (p.V437L) mutasyonu heterozigot olarak saptandı. DNA dizi analizi ile saptanamayacak diğer mutasyonları tespit edebilmek ve *BTD* geninin ekspresyonunu incelemek için m-RNA dizileme çalışması yapıldı. Çalışma sonucunda klinik ile ilişkili olabilecek RNA değişikliği saptanmadı ancak yapılan ekspresyon analizinde - 4.42477 kat değişim saptanarak, kontrol örneklerine göre ekspresyonun azaldığı tespit edildi. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 6.8. Olgu 3'e ait aile ağacı

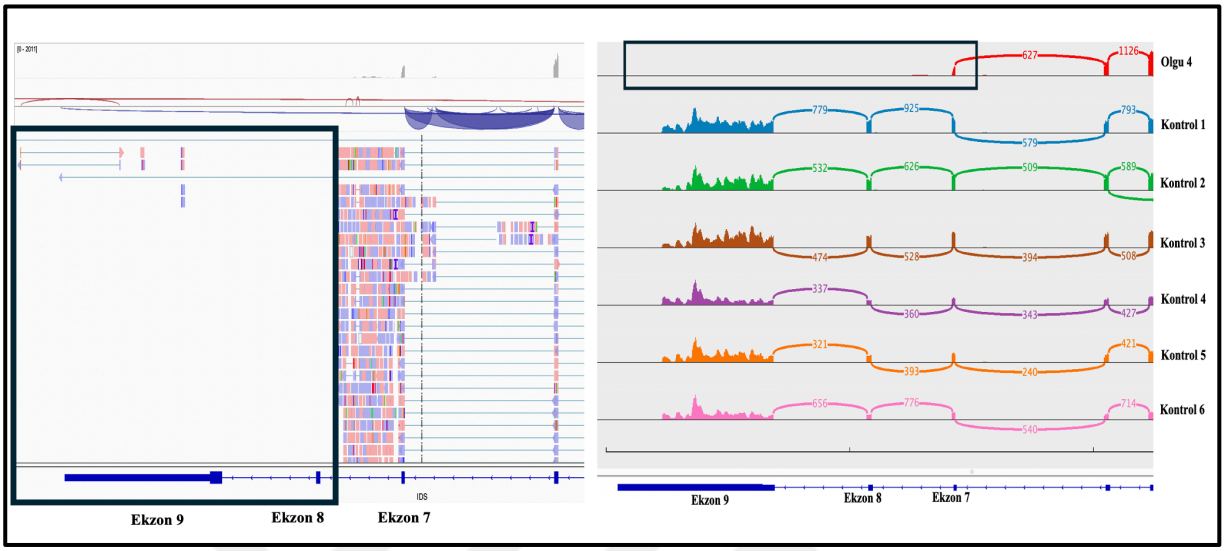
6.4. Olgu 4

Prenatal dönemde anlamlı bir öyküsü olmayan 13 yaşındaki erkek hasta, 4 yaşında iken konuşmada gerileme, dismorfik bulguları ve işitme kaybı nedeniyle araştırılmıştır. Mukopolisakkaridoz enzim düzeyleri taramasında "iduronat 2-sülfataz" enzim düzeyinin <0.1 nnmol/mg.saat (lökosit içi ölçüm referansı> 7,5 nnmol/mg.saat) olarak ölçülmesi üzerine hastaya "Mukopolisakkaridoz tip 2" ile (MIM: 309900) tanısı konmuş ancak, *IDS* geni dizi analizi sonucu normal olarak saptanmıştır. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 6.9. Olgu 4'e ait aile ağacı

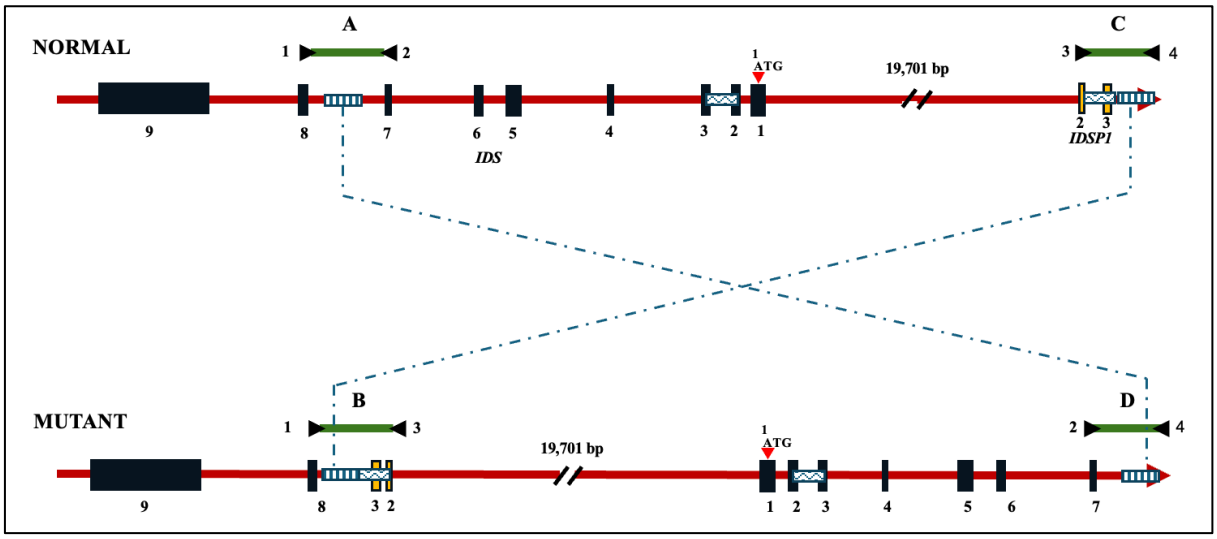
Hastaya bu sonuçlarıyla m-RNA dizileme analizine alınmıştır. Analiz sonucunda *IDS* genine ait transkriptlerin ekzon 8 ve ekzon 9'u içermediğinin saptanması üzerine *IDS* geni (X kromozomunda yer alması ve hastanın erkek olması nedeniyle) tüm ekzom analizi ham verisinden delesyon analizi yapılmış ancak delesyon saptanmamıştır. (Şekil 6.10.)



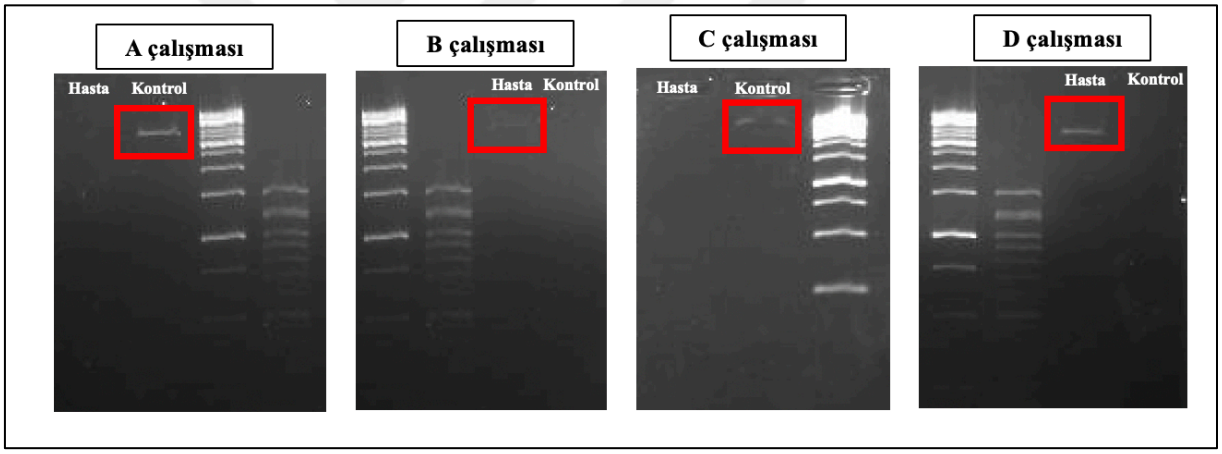
Şekil 6.10. Olgu 4'e ait RNA çalışmasının IGV ve Sashimi plot görüntüleri Sol - Olgu 4'e ait *IDS* geninin IGV görüntüsü Sağ - Olgu 4'e ait *IDS* geninin Sashimi plot görüntüsü (ekzon 8 ve ekzon 9 atlanması dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir.)

Literatürde mukopolisakkaridoz tip 2 hastalığının yaklaşık %10'unun *IDS* geninin, psödogeni olan *IDSP1* geni ile yaptığı yeniden düzenlenmeler sonucu meydana geldiği ile ilgili yayınlar mevcuttur (60, 61).

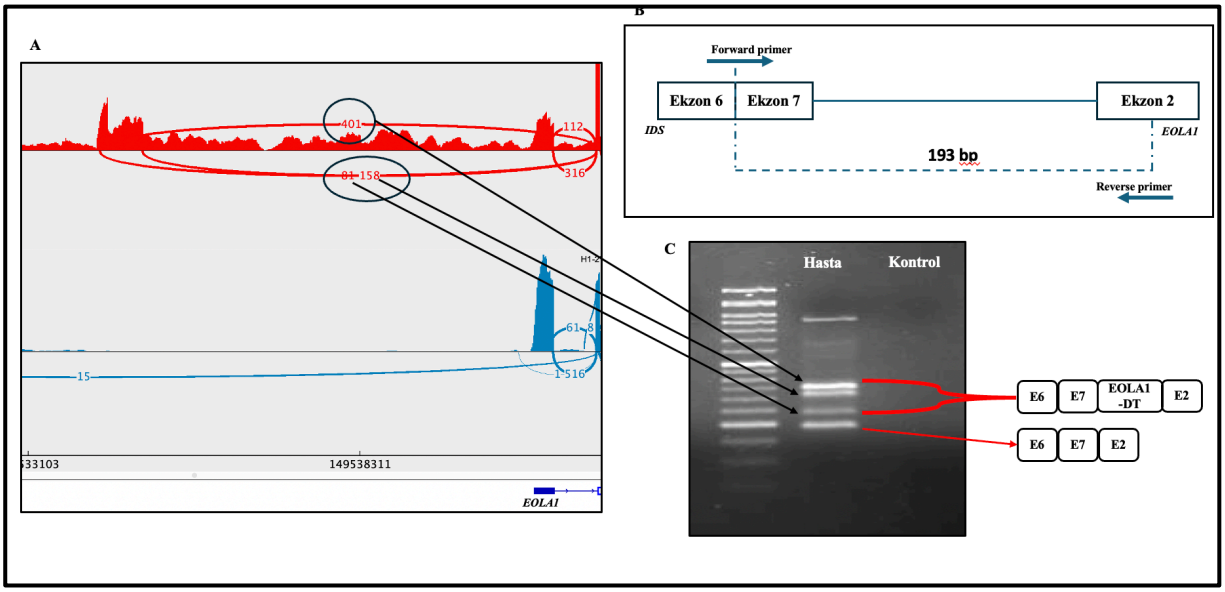
Ekzon 8 ve ekzon 9 delesyon ihtimali dışlandığından, *IDS* geninin yeniden düzenlemelerini kanıtlamak için literatürde daha önce tarif edilen primerler ile PCR çalışması uygulandı (59). Bu çalışma ile 4 ayrı primer ve hasta-kontrol örneği kullanılarak 4 ayrı PCR çalışması yapıldı veyeniden düzenleme gösterildi. (Şekil 6.11. – Şekil 6.12.)



Şekil 6.11. Olgu 4'te yeniden düzenlenmenin kanıtlanması için planlanan PCR çalışması ve primerlerin *IDS* ve *IDSP1* genlerine göre konumları (A, B, C, D ile PCR çalışmaları, 1,2,3,4 ile de primerler temsil edilmiştir.) (59)



Şekil 6.12. Olgu 4'te yeniden düzenlenmenin kanıtlanması için yapılan PCR çalışmaları (A ve C çalışması normal DNA dizilimindeki gene göre tasarlanmıştır. Bu nedenle hastada ürün alınamamıştır. B ve D çalışmaları ile inversiyon senaryosu için tasarlandığı için hastada ürün görülür iken kontrolde ürün alınamamıştır. A çalışması IDS geni 7.ekzon – 8.ekzon , B çalışması: IDSP1 geni 2.ekzon – IDS geni 8.ekzon, C çalışması IDSP1 geni 2.ekzon – 3.intron, D çalışması IDS geni 7.ekzon – IDSP1 geni 3.intron bölgelerini çoğaltır.)



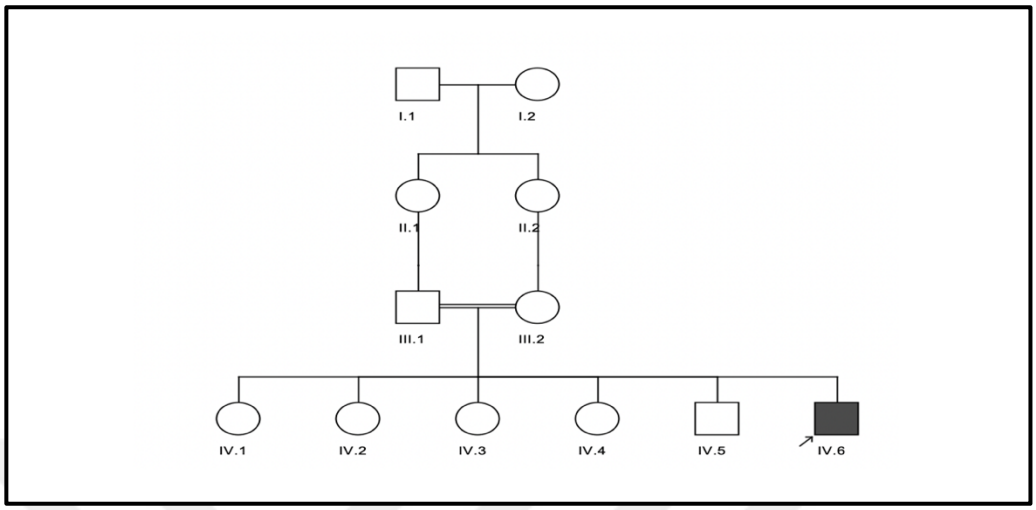
Şekil 6.13. Olgu 4'te yeniden düzenlenme sonucu meydana gelmiş IDS-EOLA1 füzyon transkripti A- RNA değişiklerini gösteren Sashimi plot görüntüsü (EOLA1 geninin 2.ekzonu ile devam eden farklı uzunlukta ve farklı miktardaki RNA fragmanları daire içine alınmıştır.) B- RNA değişikliğini kanıtlamak için yapılan RT-PCR'da kullanılan primerlerinin konumu C- RT-PCR'a ait jel görüntüsü (siyah oklar : Sashimi plotta saptanan RNA fragmanlarının jel görüntüsü ile eşleştirilmesi, kırmızı oklar, jel görüntüsünde saptanan ürünlerin içerdiği ekzonların şematik gösterimi)

Olguya ait RNA verileri detaylı olarak IGV'de incelendiğinde *EOLA1* geninin 2. ekzonu ile transkripsiyona uğrayan diziler tespit edildi. (Şekil 6.13. A) Bu durumu kanıtlamak için olgunun RNA örneği kullanılarak *IDS* geninin ekzon 6 ve ekzon 7'sini kapsayan forward primer ve *EOLA1* geninin ekzon 2'sinde yer alan reverse primer ile RT-PCR yapıldı. Jel analizinde yaklaşık 200 bp uzunluğunda beklenen ürünün dışında farklı boylarda ürünler görüldü. Bu sonuç ile, RT-PCR sonucunda *IDS-EOLA1* füzyon transkripti doğrulandı. (Şekil 6.13. B-C)

6.5. Olgu 5

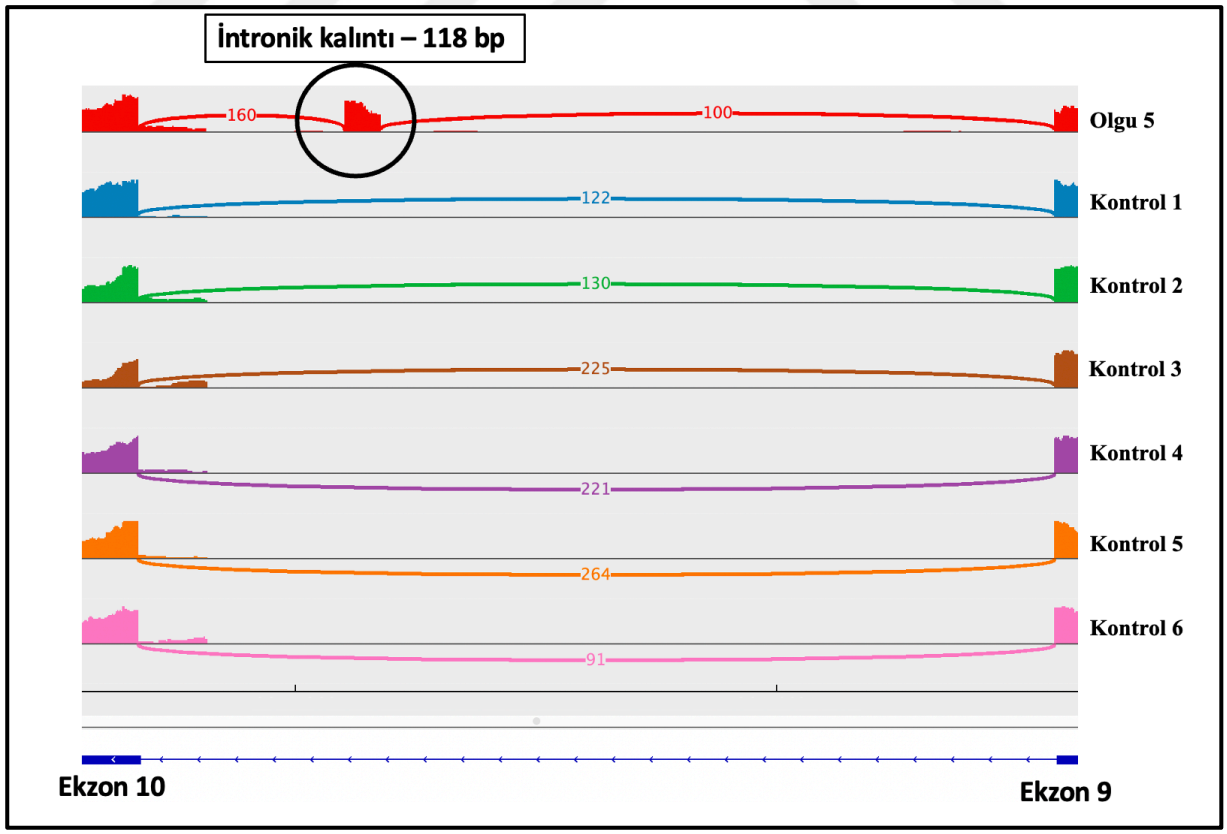
Prenatal dönemde anlamlı bir öyküsü olmayan 3 yaşındaki erkek hastanın, 2 yaşında iken solunum güçlüğü ve metabolik asidoz şikayetleri araştırılırken idrar organik asit analizinde laktat, 2-hidroksibütirat, 3-hidroksipropiyonat, pirüvat, 3-hidroksibütirat, 3-hidroksiizovalerat düzeylerinde artış saptanması ve biyotinidaz enzim aktivitesinin normal bulunması nedeniyle "Holokarboksilaz sentetaz eksikliği (MIM:253270)" ön tanısı alarak *HLCS* geni dizi analizi

planlandığı öğrenildi Ancak, *HLCS* geni dizi analizi sonucunda klinik ile ilişkili olabilecek patojenik / olası patojenik değişiklik saptanmadı. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.14.'de gösterilmiştir.



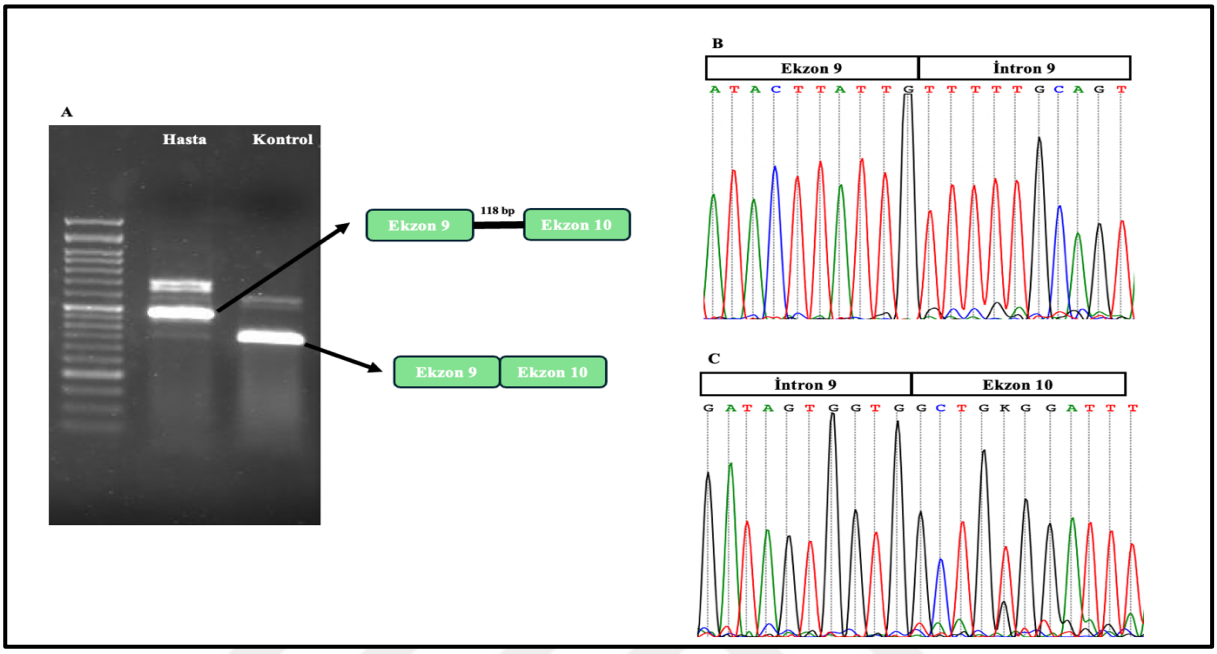
Şekil 6.14. Olgu 5'e ait aile ağacı

Hastaya tüm bulgular sonucunda m-RNA dizileme analizi yapıldı. *HLCS* geninde ekzon 9 ve ekzon 10 arasında 118 baz uzunluğunda intron 9'a ait intronik kalıntı saptandı. (Şekil 6.15)



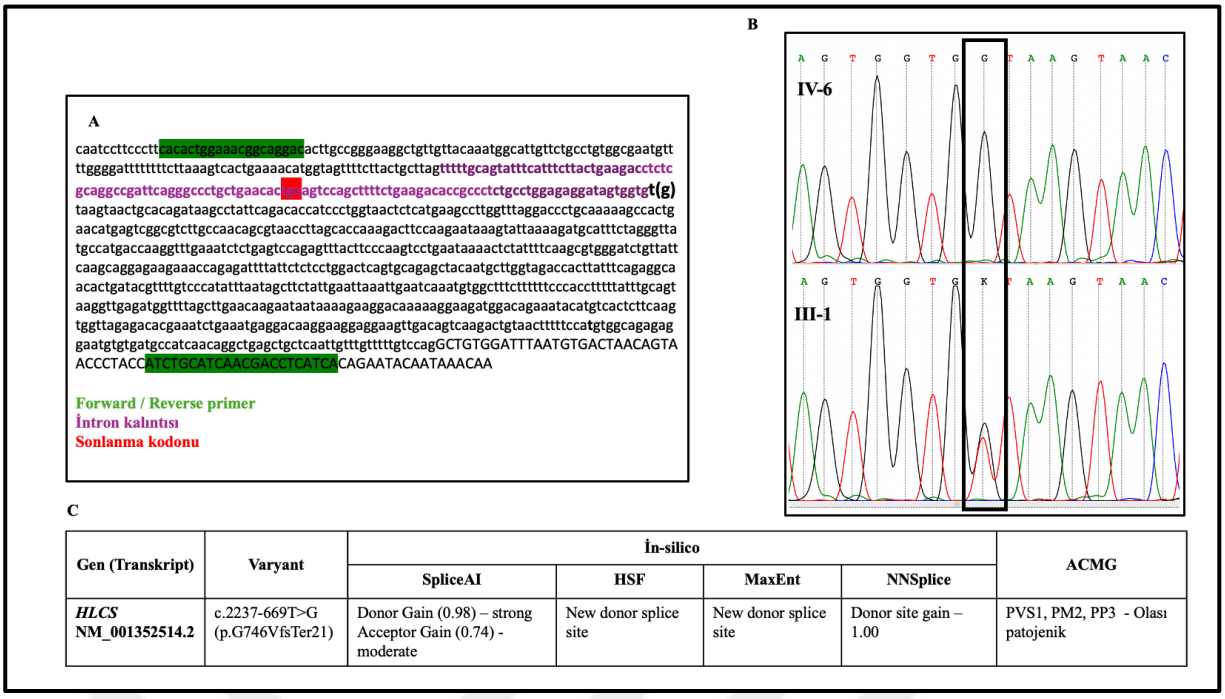
Şekil 6.15. Olgu 5'e ait Sashimi plot görüntüsü (118 bazlık intron kalıntısı daire içerisinde gösterilmiştir.)

Saptanan değişiklik hastaya ait RNA örneğiyle yapılan RT-PCR analizi ve Sanger dizileme ile doğrulandı. (Şekil 6.16.) Sanger dizi analizinde 3' ucundaki görüntü paterni ve jeldeki ana bant dışındaki diğer bantlar intron 9'a ait diğer alternatif kırpılma ürünleri olduğu düşünüldü. (Şekil 6.16. A-C)



Şekil 6.16. Olgu 5'e ait intronik kalıntıyı gösteren jel ve elektroferogram görüntüsü A -Olgu 5'e ait RNA örneğinden ekzon 9 ve ekzon 10'u içeren RT-PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin jel görüntüsü B -Hastaya ait PCR ürününün 5' elektroferogram görüntüsü C -Hastaya ait PCR ürünün 3' elektroferogram görüntüsü

Hastaya ait DNA örneği kullanılarak intron kalıntısının 200'er baz 5' ve 3' bölgeleri dizilendi. Analiz sonucunda *HLCS* (NM_001352514.2):c.2237-669T>G (p.G746VfsTer21) mutasyonu homozigot olarak saptandı. Babada yapılan segregasyon analizinde aynı mutasyon heterozigot olarak tespit edildi. (Şekil 6.17.B) *(Annenin (III-2) materyaline ulaşılamadığı için segregasyon çalışması sadece baba ile yapılmıştır.)*



Gen (Transkript)	Varyant	İn-silico				ACMG
		SpliceAI	HSF	MaxEnt	NNSplice	
HLCS **NM_001352514.2**	c.2237-669T>G (p.G746VfsTer21)	Donor Gain (0.98) – strong Acceptor Gain (0.74) - moderate	New donor splice site	New donor splice site	Donor site gain – 1.00	PVS1, PM2, PP3 - Olası patojenik

Şekil 6.17. Olgu 5'te saptanan derin intronik varyantın değerlendirilmesi ve segregasyon sonuçları A- İntron kalıntısını içeren bölgeyi dizilemek için kullanılan primer çifti, intron kalıntısı ve sonlanma kodonu B- Olgu 5'e (IV-6) ve babasına (III-1) ait elektroferogram görüntüleri C- Saptanan mutasyona ait bilgiler

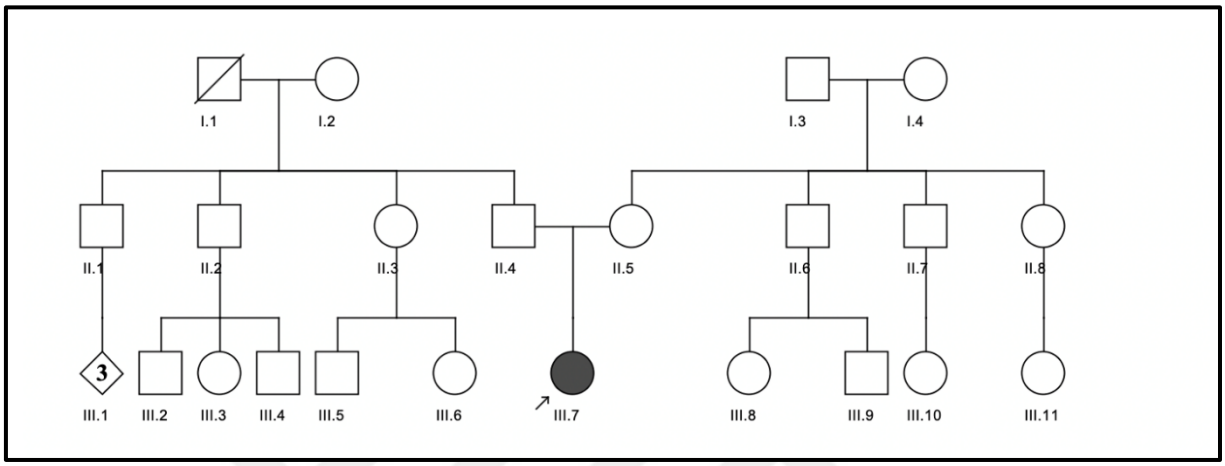
Yapılan m-RNA dizileme analizi sonucunda mutasyonun erken sonlanma kodonuna yol açtığı belirlenmiştir. (PVS1). Mutasyona popülasyon veri tabanlarında (GnomAD: 0) rastlanmamıştır (PM2). Varyantın proteine etkisi in-siliko programları tarafından zararlı olarak tahmin edilmiştir (PP3). Mevcut bilgiler ile, tespit edilen bu mutasyon "ACMG 2015" rehberine göre olası patojenik olarak değerlendirilmiştir.

6.6. Olgu 6

Prenatal dönemde anlamlı bir öyküsü olmayan 16 yaşındaki kadın hastanın, 1,5 yaşındayken periorbital ödem / proteinüri şikayetleri ile doktora başvurduğunda nefrotik sendrom tanısı aldığı öğrenildi. Steroid tedavisine yanıtsız olması üzerine yapılan renal biyopsi işlemi "fokal segmental glomerüloskleroz" olarak raporlandıktan sonra, 2013 yılında babasından renal transplantasyon yapıldığı belirtildi. 14 yaşında ise SNİK tanısı aldığı öğrenildi. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.18.'de gösterilmiştir. Bu bulguları nedeniyle yapılan nefropati genetik panel incelemesinde *COQ6* (NM_182476.3): c.1383del mutasyonunun

homozigot olarak raporlandığı görüldü. Maya hücrelerinde yapılan çalışmalarda bu varyantın rezidüel enzim aktivitesi gösterdiği ve hipomorfik olarak değerlendirildiği bildirilmiştir (62).

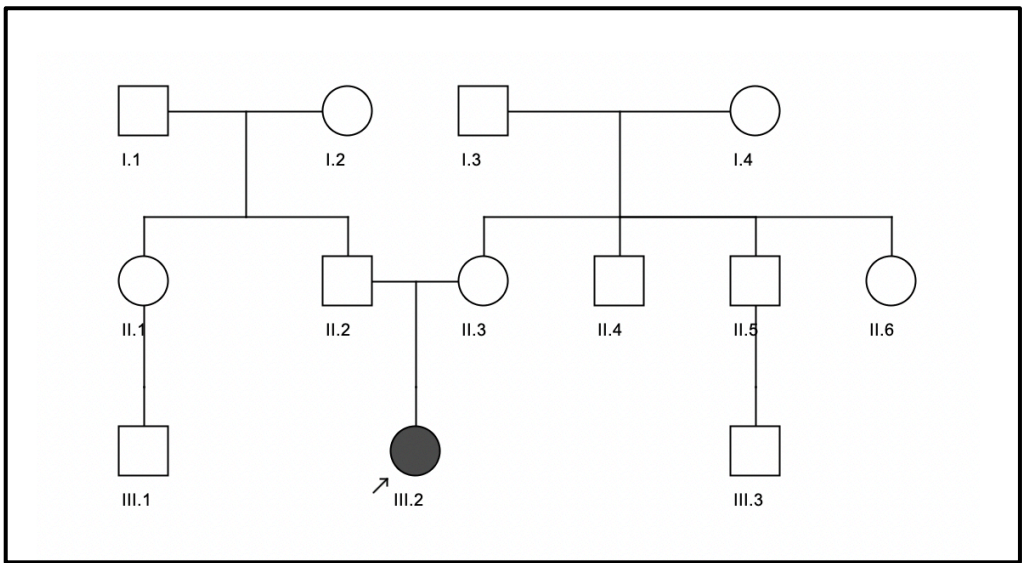
DNA dizi analizi ile saptanamayacak diğer mutasyonları tespit edebilmek ve *COQ6* geninin ekspresyonunu incelemek amacıylam-RNA dizileme çalışması yapıldı. Ancak yapılan çalışma sonucunda klinik ile ilişkili olabilecek RNA değişikliği saptanmadı.



Şekil 6.18. Olgu 6'ya ait aile ağacı

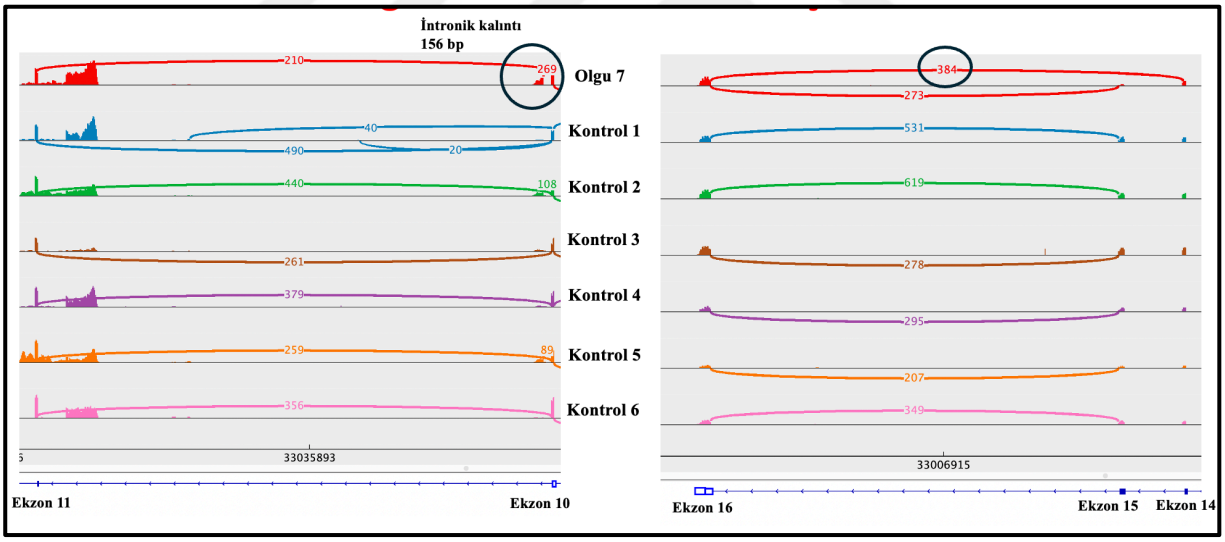
6.7. Olgu 7

Prenatal dönemde anlamlı bir öyküsü olmayan ve 3 yaşına kadar normal gelişim gösteren 17 yaşındaki kadın hastanın, 3 yaşında parmak ucunda yürüme, denge bozukluğu şikayetlerinin başladığı ve yapılan tetkiklerinde beta-galaktosidaz enzim aktivitesinin 0,12 nnmol/mg.saat (referans normal: 0,5 – 3,1) olarak saptandığı öğrenildi. GM-1 Gangliosidosis (MIM:230600) ön tanısıyla izlenen hastadan *GLB1* geni dizi analizi çalışılmış ancak normal olarak sonuçlanmıştır. SNP-array ve tüm ekzom dizileme analizlerinde klinik ile ilişkili olabilecek bir değişiklik saptanmamıştır. Olgu ait aile ağacı Şekil 6.19.'da gösterilmiştir.

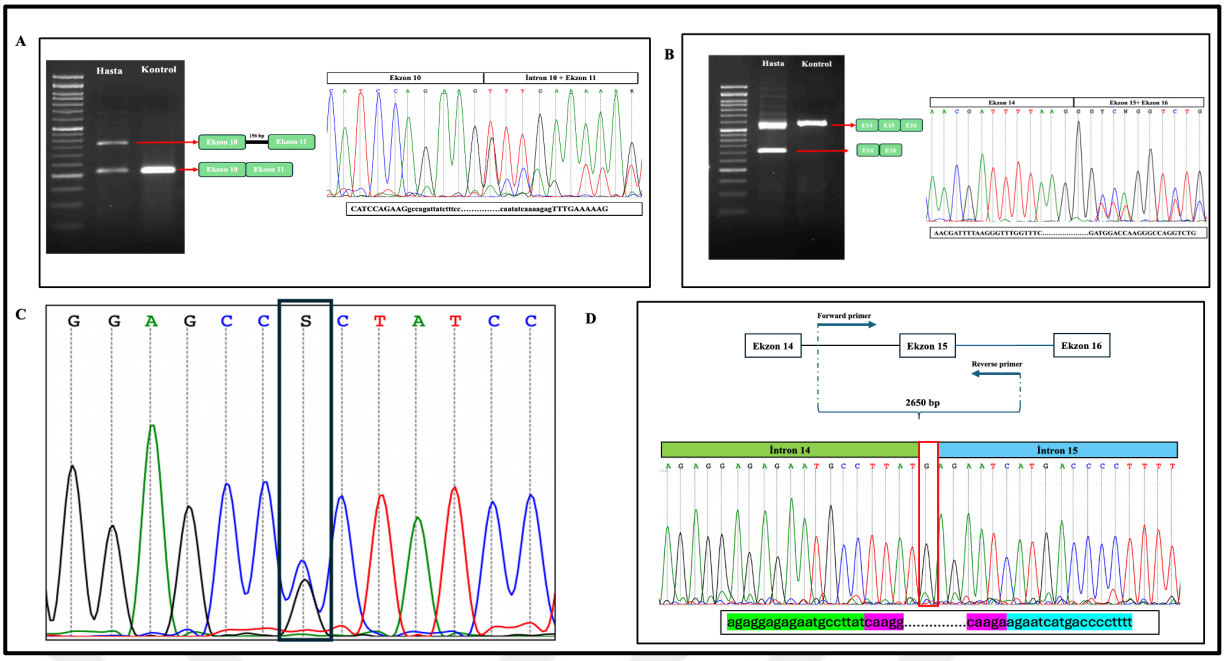


Şekil 6.19. Olgu 7'ye ait aile ağacı

Hastaya tüm bulgular sonucunda m-RNA dizileme analizi yapıldı. *GLB1* geninde ekzon 10 ve ekzon 11 arasında 156 baz uzunluğunda intron 10'a ait intronik kalıntı ve ekzon 15 atlaması tespit edildi. (Şekil 6.20.)



Şekil 6.20. Olgu 7'ye ait Sashimi plot görüntüleri A- İntron 10'da tespit edilen intronik kalıntıyı gösteren Sashimi plot görüntüsü B- Ekzon 15 atlamasını gösteren Sashimi plot görüntüsü (A'da ve B'de RNA değişikliklerinin fragmanlarının yaklaşık yarısında tespit edilmesi heterozigot değişiklik olarak yorumlanabilir.)



Şekil 6.21. Olgu 7'de RNA dizileme ile bulunan değişikliklerin doğrulanması A- İntron 10'da tespit edilen intronik kalıntının doğrulanması için yapılan RT-PCR ve mutant alel ürününün elektroferogram görüntüsü B- Ekzon 15 atlanmasının doğrulanması için yapılan RT-PCR ve mutant alel ürününün elektroferogram görüntüsü C- Olguda DNA materyali yapılan çalışma ile elde edilen, intron 10'da tespit edilen intronik mutasyonun elektroferogram görüntüsü D- Olguda DNA materyali yapılan çalışma ile elde edilen, ekzon 15'te kırık noktalarının tespiti için tasarlanan PCR ve elektroferogram görüntüsü

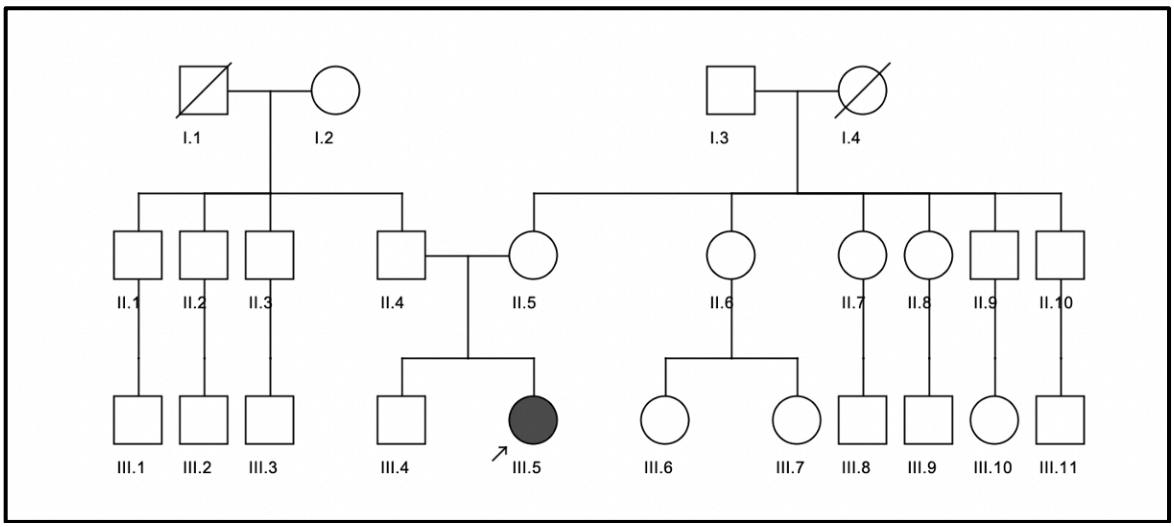
Tespit edilen RNA değişikleri, RT-PCR ve mutant alelin ürünü dizilenerek doğrulandı. (Şekil 6.21. A-B) Ekzon 15 atlanmasının nedenini tespit etmek için, WES ham verisi tekrar incelendiğinde ekzon 15 atlamasına neden olabilecek mutasyon tespit edilmedi. Heterozigot ekzon 15 delesyonunun kanıtlanması ve kırık noktalarının tespiti amacıyla intron 14 ve intron 15'de yer alan primer çifti ile PCR yapıldı. Jel elektroforezi ile analiz sırasında beklenen 2650 bp uzunluğundaki ürün dışında yaklaşık 600 bp uzunluğunda ek bir PCR ürünü daha tespit edildi ve dizilendi. Dizileme analizi sonucunda intron 14'e ait dizinin devamında intron 15'e ait dizi ve iki bölgenin arasında 1 baz "guanin" insersiyonu tespit edildi. (Şekil 6.21. D) 2055 bp uzunluğunda delesyona uğrayan bölge *Repeatmasker* ile analiz edildiğinde 5' kırık noktasının LINE tekrar ailesinden "L2c" tekrar bölgesinde yer aldığı ve yapılan analizde saptanan GLB1(NM_000404.4): c.1479+846_1734+248delinsG mutasyonu p.Ser497TrpfsTer99 değişimine neden olarak erken sonlanma kodonu oluşturduğu belirlendi. (PVS1) Mutasyona popülasyon veri tabanlarında (GnomAD: 0) rastlanmamıştır (PM2). Mevcut

bilgiler ile, tespit edilen bu mutasyon "ACMG 2015" rehberine göre olası patojenik olarak değerlendirilmiştir.

Hastaya ait DNA örneği kullanılarak intron kalıntısının 200'er baz 5' ve 3' bölgeleri dizilendi. Analiz sonucunda *GLB1*(NM_000404.4):c.1068+441C>G mutasyonu heterozigot olarak saptandı. İn-siliko olarak kırpılma etkisini tahmin edebilmek için kullanılan *SpliceAI*, *HSF, MaxEntScan*, *NNSplice* araçları ile mutasyonun etkisi "iyi huylu" olarak belirledi. Kırpılma olayında görevli proteinlerin bağlanma motifleri analiz edildi. *SpliceAID* aracı ile yapılan analizde mutasyon sonucunda, "SF2/ASF" proteini için yeni bağlanma motifi oluştuğu, "hnRNP" proteini için ise mevcut bağlanma motifinin kaybolduğu saptandı. Mutasyona popülasyon veri tabanlarında (GnomAD: 0) rastlanmamıştır (PM2). Mevcut bilgiler ile, tespit edilen bu mutasyon "ACMG 2015" rehberine göre "klinik önemi belirsiz" olarak değerlendirilmiştir. *(Babanın (II-2) ve annenin (II-3) materyaline ulaşılamadığı için segregasyon çalışması yapılamamıştır.)*

6.8. Olgu 8

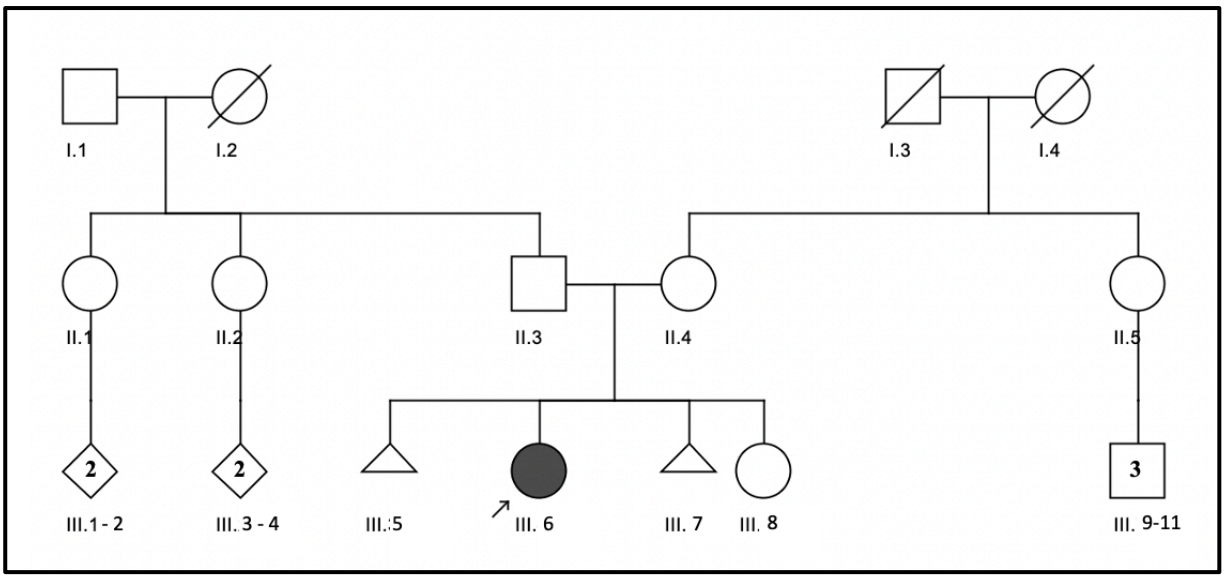
Prenatal dönemde IUGR öyküsü ile takip edilen 1 yaşında kadın hastanın, term dönemde 2150 gram olarak doğduktan sonra postnatal hipoglisemi ve gebelik yaşına göre küçük (SGA) olma öyküsü nedeniyle 1 ay yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) takip edildiği öğrenildi. Beyin MRG'sinde anterior hipofiz hipoplazisi, ektopik nörohipofiz, infundibulum yokluğu ve ince corpus kallosum saptandığı öğrenildi. Olguya ait aile ağacı şekil 6.22.'de belirtilmektedir. Hipofiz yetmezliği ön tanısı ile yapılan tüm ekzom dizileme analizinde *RNPC3* geninde (NM_017619.4): c.1420C>A mutasyonu heterozigot olarak saptandı. DNA dizi analizi ile saptanamayacak diğer mutasyonları tespit edebilmek ve *RNPC3* geninin ekspresyonunu incelemek için m-RNA dizileme çalışması yapıldı. Ancak yapılan çalışma sonucunda klinik ile ilişkili olabilecek RNA değişikliği saptanmadı. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.22.'de belirtilmiştir.



Şekil 6.22. Olgu 8'e ait aile ağacı

6.9. Olgu 9

18 yaşındaki kadın hastanın, 25 haftalıkken 950 gram olarak doğduğu, doğum sonrası sepsis ve prematürite bulgularıyla yoğun bakımda izlendiği öğrenildi. Hastanın karında şişlik yakınmasıve karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk saptanması üzerine karaciğer biyopsisi yapıldığı ve biyopsi sonucunun glikojen depo hastalığı ile uyumlu göründüğü bildirildi. Glikojen fosforilaz A ve A+B düzeylerinde düşüklük saptanırken, fosforilaz kinaz enzim düzeyinin normal aralıkta olduğu öğrenildi. Hastaya bu bulgular ile "glikojen depo hastalığı tip 6 (MIM:232700)" ön tanısı koyularak *PYGL* dizi analizi yapıldı ancak, sonuç normal olarak bulundu. Olguya ait aile ağacı şekil 6.23.'te gösterilmiştir.

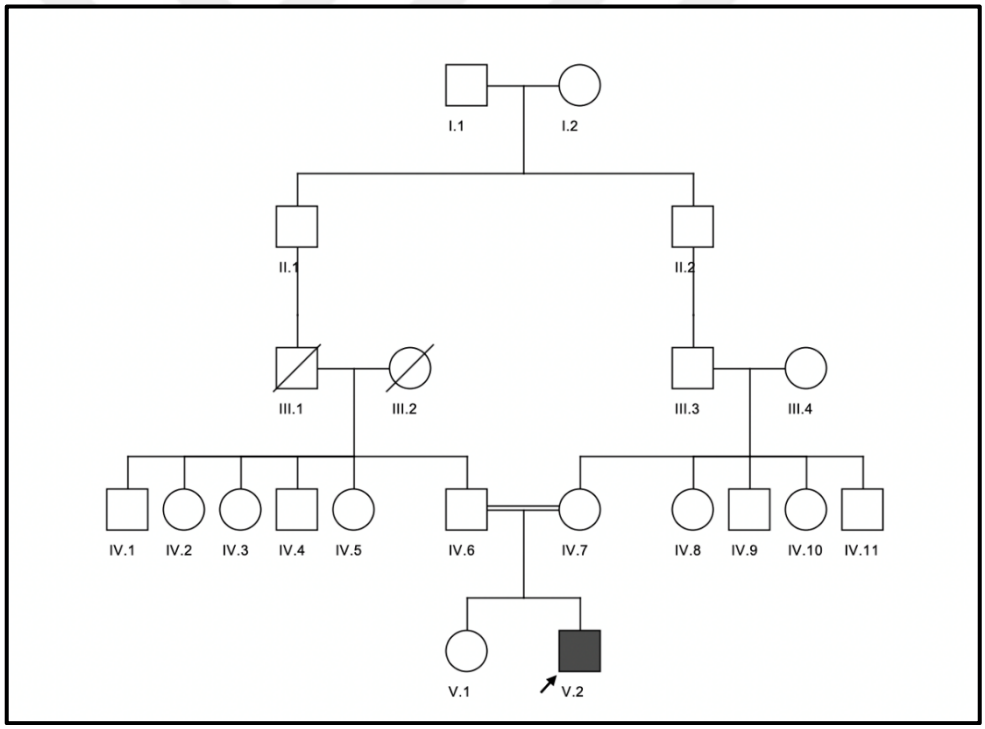


Şekil 6.23. Olgu 9'a ait aile ağacı

Hastaya tüm bulgular sonucunda m-RNA dizileme analizi yapıldı. Ancak yapılan çalışma sonucunda klinik ile ilişkili olabilecek RNA değişikliği saptanmadı.

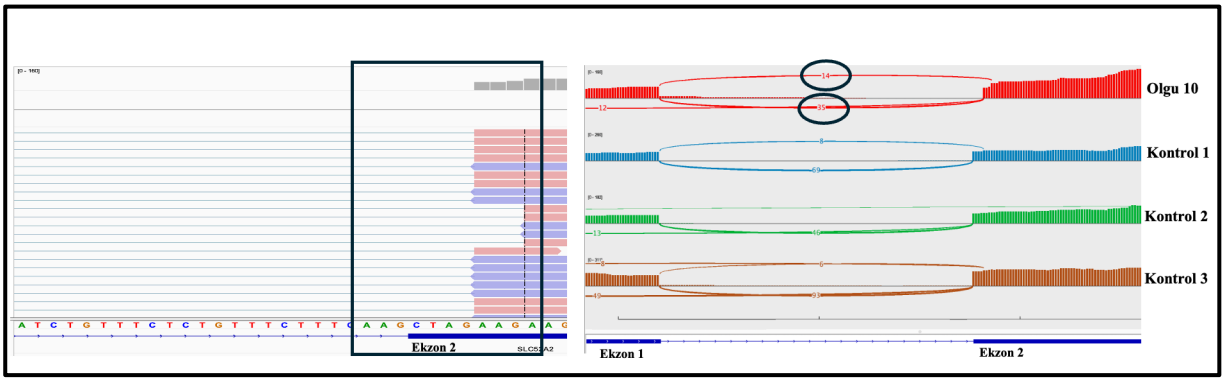
6.10. Olgu 10

Prenatal dönemde anlamlı bir öyküsü ve daha önce bilinen bir hastalığı olmayan 19 yaşındaki erkek hastanın, ilk kez 13 yaşında iken kollarda uyuşma ve alt ekstremitede güçsüzlük yakınmaları nedeniyle yapılan testlerinde laktik asit ve kreatin kinaz miktarlarında artış ve EKO'da hipertrofik kardiyomyopati tespit edildiği öğrenildi. Hastanın SNP-array, tüm ekzom dizileme, mitokondriyal genom analizlerinde, klinik ile ilişkili olabilecek patojenik / olası patojenik herhangi bir varyant tespit edilmediği öğrenildi. Olguya ait aile ağacı şekil 6.24.'te belirtilmiştir.



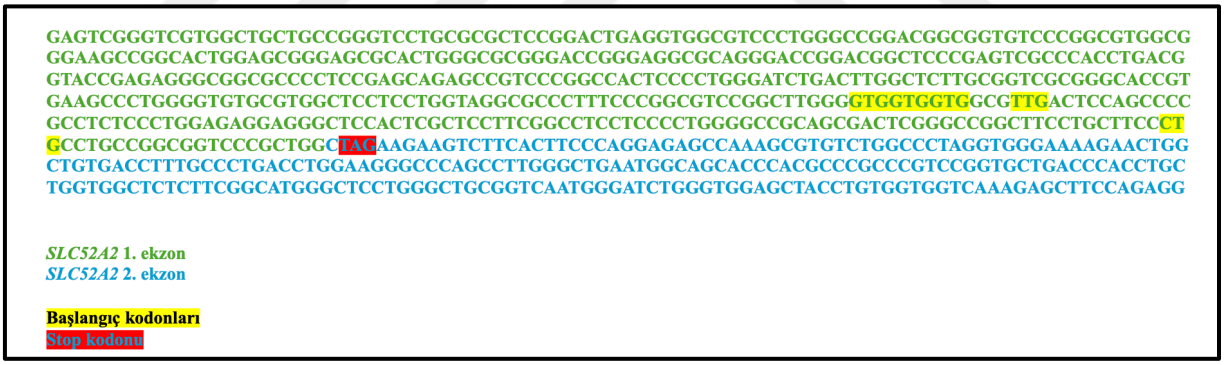
Şekil 6.24. Olgu 10'a ait aile ağacı

Hastaya tüm bulgular sonucunda m-RNA dizileme analizi yapıldı. *SLC52A2* geninin 2.ekzonunda 4 baz ve 7 baz ekzon atlaması yapan RNA fragmanları tespit edildi. (Şekil 6.25.) Daha önce yapılan genetik testlerin ham verileri tekrar incelendiğinde *SLC52A2* (NM_001363118.2): c.-110-1G>A varyantının homozigot olarak saptandığı görüldü.

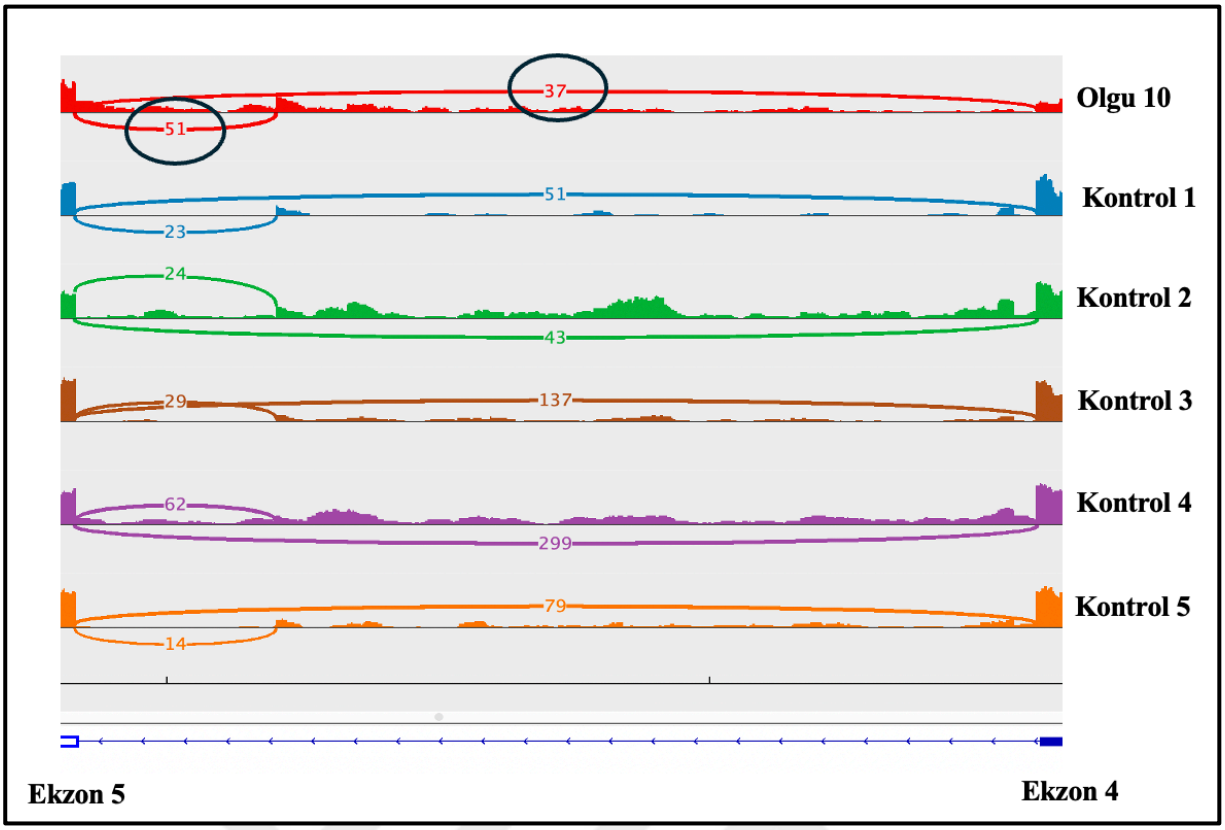


Şekil 6.25. Olgu 10'a ait RNA çalışması sonucunda elde edilen *SLC52A2* genine ait IGV ve Sashimi plot görüntüsü (Sol: IGV görüntüsü, Ekzon 2'de 4 bp ve 7 bp'lik ekzon atlamasının gösterimi, Sağ: Sashimi plot görüntüsü, ekzon 1'den ekzon 2'ye geçen; 35 fragmanda 4 bp'lik ekzon atlanmasının, 14 fragmanda ise 7 bp'lik ekzon 2 atlanmasının gösterimi)

SLC52A2 geninin 5'UTR bölgesinde bulunan uORF'lerden bazılarının başlangıç ve bitiş noktası aşağıdaki şekilde görüldüğü gibidir. (Şekil 6.26.) RNA dizileme analizi ile tespit edilen ekzon atlaması sonucunda, uORF'lerin stop kodonunun ortadan kalkmasıyla, uORF'lerin çerçeve kaymasına neden olacağı öngörüldü.



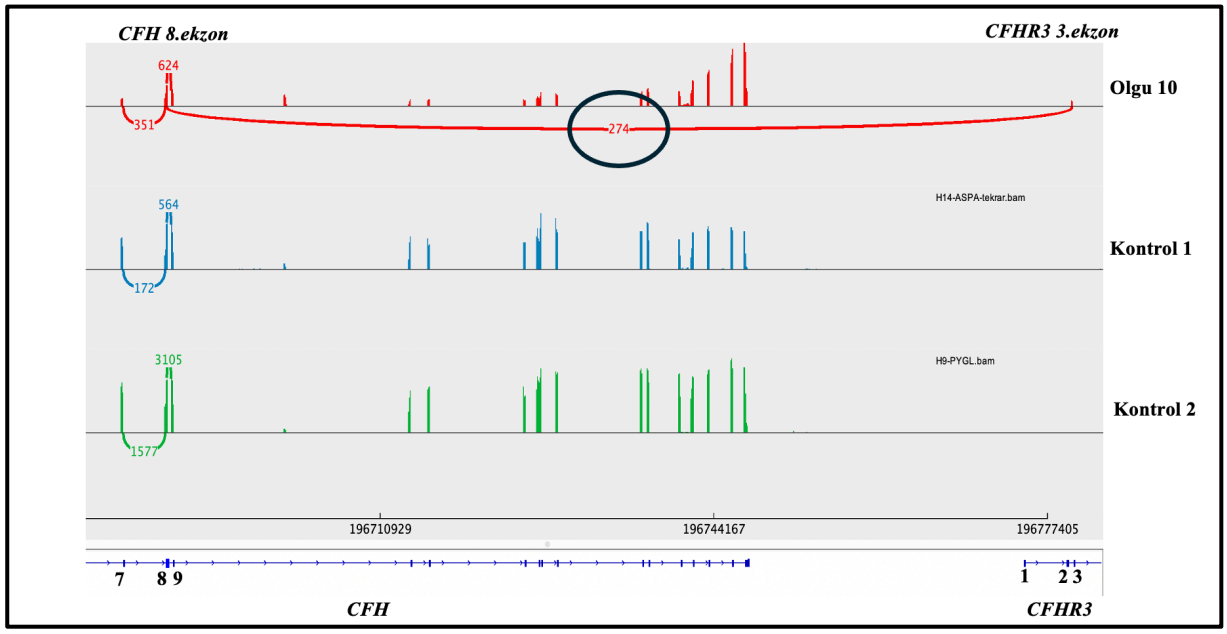
Şekil 6.26. Olgu 10'a ait uORF'lerin 1. ekzon ve 2. ekzondaki başlangıç ve stop kodonlarının yerleşimi



Şekil 6.27. Olgu 10'a ait *POLG2* genine ait Sashimi plot görüntüsü (Ekzon 5 dizisini içeren fragmanların sayısı daire içerisine alınarak gösterilmiştir.)

Ayrıca *POLG2* geninde ekzon 4 – ekzon 5 dizisine sahip olan RNA fragmanlarının, intron 5 – ekzon 5 dizisine sahip RNA fragmanlarından daha az (37 fragman – 51 fragman) okunduğu ve kontrol verileriyle karşılaştırıldığında kanonikal transkript *POLG2*-201'in benzer ekspresyona sahip olduğu ancak intron 5'teki bölge ile ilişkili *POLG2*-208 ve *POLG2*-212'in ekspresyonunda artış olduğu saptandı. (Şekil 6.27.)

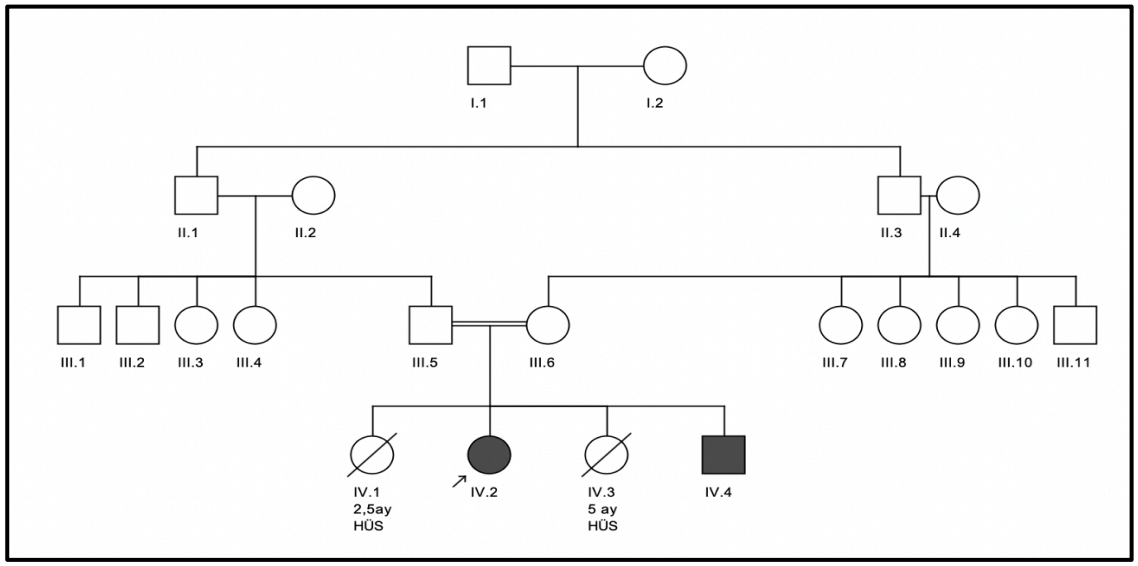
Olguda ayrıca insidental olarak *CFH* geni 1-8.ekzon ile *CFHR3* geninin 3. ekzonunu içeren ve füzyon lehine değerlendirilen bir RNA değişikliği saptandı. Hastanın daha önceki genetik testinin verisi yeniden analiz edildiğinde 9. intronda bulunan c.1336+2T>G değişikliğinin heterozigot olarak bulunduğu görüldü. (Şekil 6.28.) Bu mutasyonun yeniden düzenleme ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için SNP-array analizi planlandı.



Şekil 6.28. Olgu 10 *CFH-CFHR3* genlerine ait Sashimi plot görüntüsü (*CFH* genine ait RNA fragmanlarında 8.ekzona ait dizinin devamında *CFHR3* geninin 3.ekzonuna ait dizi içeren 274 RNA fragmanı daire içerisinde gösterilmiştir.)

6.11. Olgu 11

Prenatal dönemde anlamlı öyküsü olmayan 14 yaşındaki kadın hastanın, 1 yaşındayken idrar renginin koyulaşması şikayeti nedeniyle araştırıldığında idrarda artmış homogentisik asit saptanması üzerine "Alkaptonüri hastalığı" tanısı aldığı öğrenildi. Ayrıca el ve ayak bileklerinde ağrı şikayeti nedeniyle artrit bulgusuyla takip edilen hastaya moleküler genetik tanı için yapılan *HGD* dizi analizi ve tüm ekzom dizileme analizinin normal olarak sonuçlandığı öğrenildi. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.29.'da gösterilmiştir.

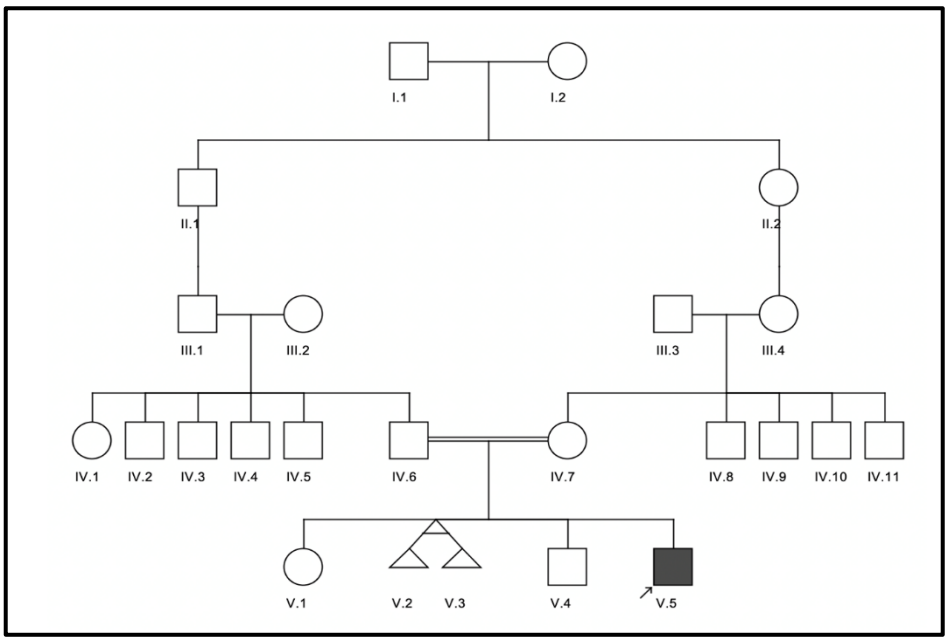


Şekil 6.29. Olgu 11'e ait aile ağacı (HÜS: Hemolitik üremik sendrom)

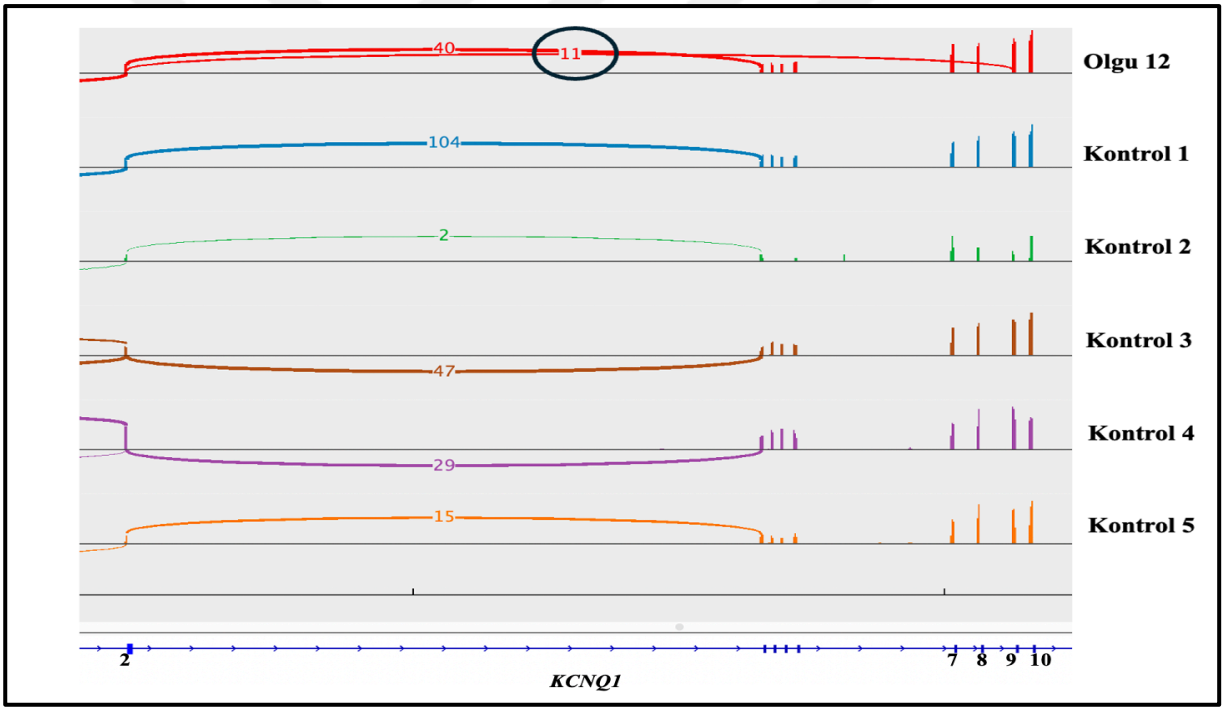
Hasta m-RNA dizileme çalışmasına alındı. *HGD* geninin periferik kan/ PBMC/ fibroblast örneklerinde ekspresyon seviyesinin düşük olması nedeniyle m-RNA dizileme çalışmasının idrar kültürü örneğinden elde edilecek RNA ile yapılması planlandı. Ancak hem hastanın kendisi hem de aynı tanıya sahip erkek kardeşinden 2 kez idrar hücre kültürü yapılmasına rağmen, sonuç alınamadı. Bu nedenle m-RNA dizileme analizi periferik kan örneği ile yapıldı. Ancak periferik kan örneğinde *HGD* geninin düşük ekspresyona sahip olması nedeniyle ilk m-RNA dizileme çalışması başarısız oldu.

6.12. Olgu 12

Prenatal dönemde oligohidroamniyoz ve IUGR nedeniyle izlenen 3 yaşında erkek hastanın, postnatal 2.gününde gelişen hipoglisemi ve tetkikleri sırasında saptanan hiperinsülinemi ile takip edildiği öğrenildi. Term dönemde 2150 gram olarak doğan hastada hiperinsülinemik hipoglisemi nedeniyle yapılan tüm ekzom dizileme analizinde klinik ile ilişkili olabilecek patojenik / olası patojenik herhangi bir varyant tespit edilmedi. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.30.'da gösterilmiştir.



Şekil 6.30. Olgu 12'ye ait aile ağacı



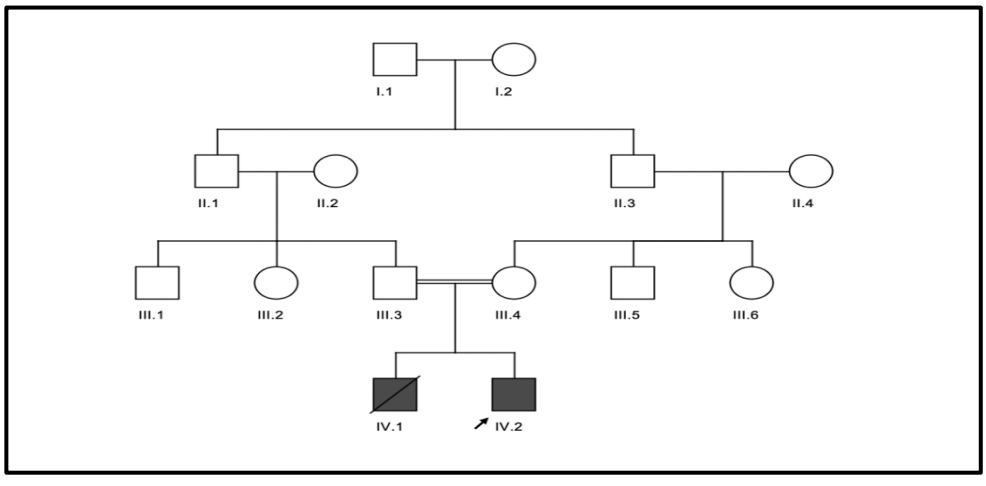
Şekil 6.31. Olgu 12'ye ait *KCNQ1* geninin ekzon 2-10 bölgesini içeren Sashimi plot görüntüsü (*KNCQ1* geninde 2. Ekzon dizisinin devamında 9.ekzona ait diziyi içeren 11 RNA fragmanı daire içerisinde gösterilmiştir.)

Hastaya tüm bulgular sonucunda m-RNA dizileme analizi yapıldı. *KCNQ1* geninde ekzon 2'den çıkan 51 adet fragmanın 11'inde ekzon 3-8 atlanmasına işaret eden bulgu saptandı. (Şekil 6.31.)

Ekspresyon çalışmasında *CDKN1C* geninin 209 adet GTEx tam kan örneklerinden elde edilen kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ekspresyonunda 6,5 kat artış saptanmıştır. Bu bulgu belirtilen ekzonları içeren bölgenin delesyonuyla veya kırpılma işlemini etkileyerek bu ekzonların atlanmasına neden olacak bir mutasyon sonucunda ortaya çıkmış olabilir. Delesyon ihtimalini değerlendirmek için SNP-array ve 11p15 bölgesine yönelik metilasyon spesifik MLPA çalışması yapıldı ve normal olarak sonuçlandı. Ekzon atlamasına neden olacak mutasyon değerlendirmesi için, olgunun tüm ekzom dizileme analizinin ham datasında, ekzon-intron bileşkelerinden ± 30 baz incelendi ve bu bulguya neden olabilecek bir mutasyon saptanmadı.

6.13. Olgu 13

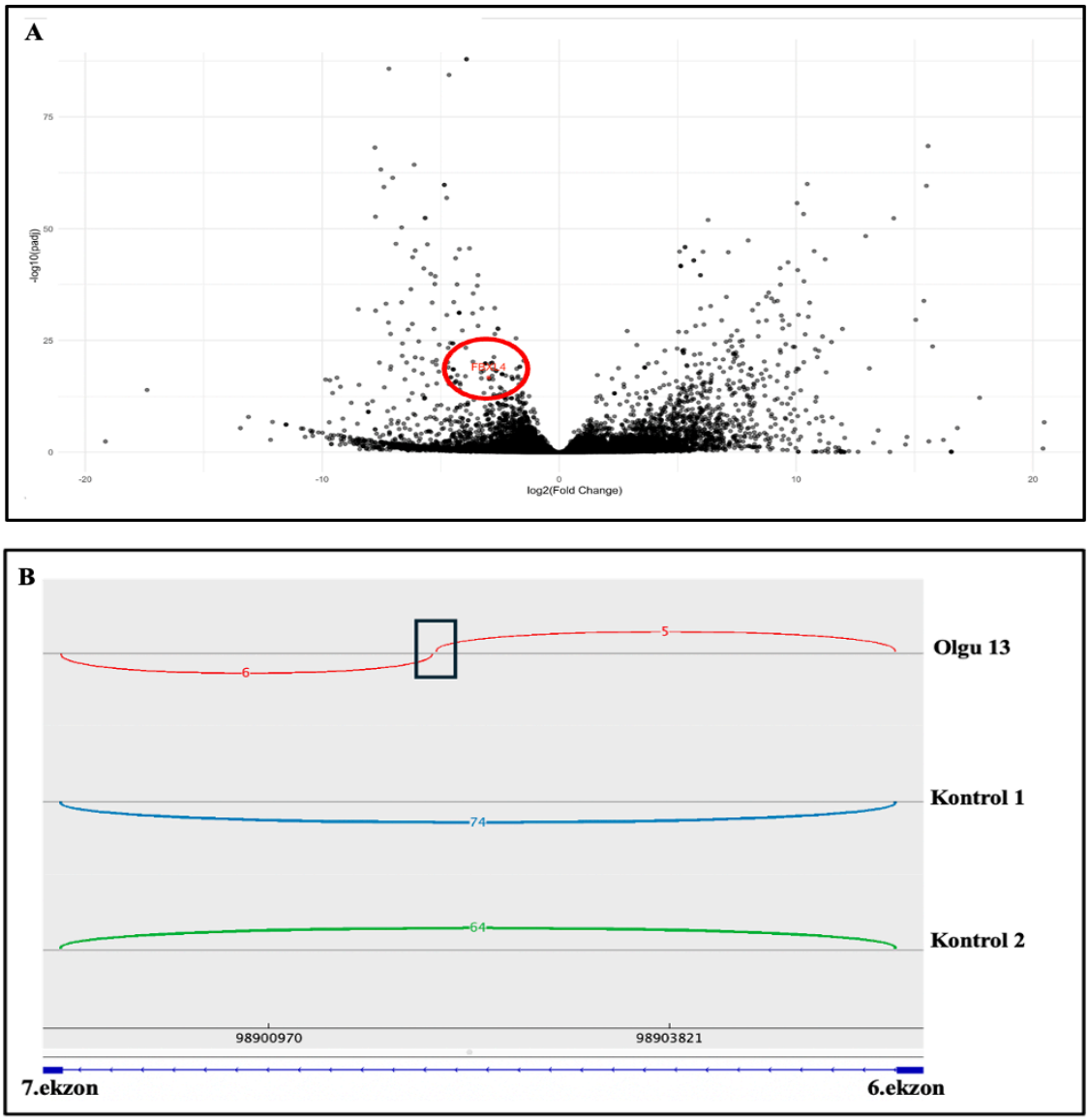
Prenatal dönemde anlamlı öyküsü bulunmayan 12 yaşındaki erkek hastanın, 6 aylıkken kusma şikayetlerinin başladığı ve yapılan tetkiklerinde laktik asidoz saptandığı öğrenildi. Hipotonik olması yanında, halen desteksiz yürüyemediği görülen hastanın nöromotor gelişme geriliğinin dışında katarakt, uzun QT, nötropeni, hipogammaglobinemi bulgularının olduğu öğrenildi. Hastanın daha önce yapılan mikroarray, WES analizleri normal raporlandığı görüldü. Benzer şikayetleri olan (kusma,hipotoni, gelişme geriliği) 4 yaşında iken erkek kardeşinin akciğer enfeksiyonu nedeniyle kaybedildiği öğrenildi. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.32.'de gösterilmiştir.



Şekil 6.32. Olgu 13'e ait aile ağacı

Hastanın tüm bulguları sonucunda m-RNA dizileme analizi yapıldı. Klinik bulgular, *Human Phenotype Ontology* (HPO) terimlerine dönüştürüldü. Ham veriler kullanılarak *R Studio*'da *DESeq2* kütüphanesi ile diferansiyel ekspresyon analizi gerçekleştirildi. İfadesi

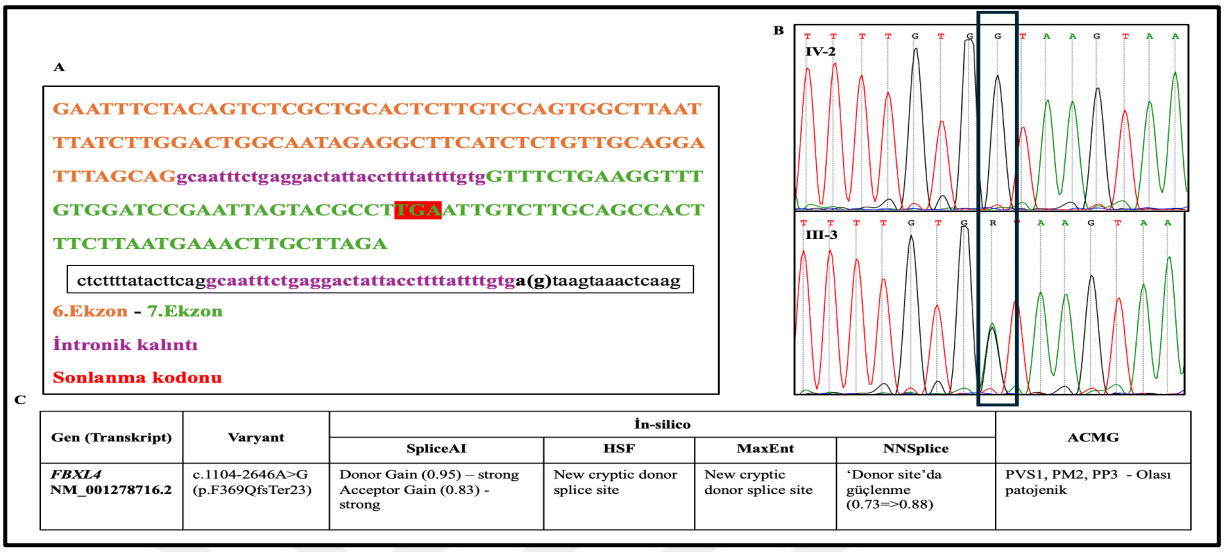
azalan (fold change < 0) ve ifade değişikliği anlamlı olan (p < 0,05) genler belirlendi. HPO terimleri ile ilişkili olan genler filtrelendi. Klinik bulguları ile ilişkili olduğu düşünülen ve yaklaşık 8.5 kat ifadesinde azalma saptanan *FBXL4* genindeki ifade değişimi istatiksel olarak anlamlı ($p < 1.53133 \times 10^{-19}$) bulundu. *FBXL4* geninin diğer genler içerisindeki konumunu görselleştirmek için kullanılan volcano plot grafiği Şekil 6.33.-A'da gösterilmiştir. *FBXL4* genindeki anormal kırpılma olayları değerlendirildiğinde intron 6'da 34 bp'lık intron kalıntısı tüm fragmanlarda tespit edildi. (Şekil 6.33.- B)



Şekil 6.33. Olgu 13'e ait Volcano Plot grafiği (A) ve Sashimi plot görüntüsü (B) (A: FBXL4 geni kırmızı daire ile gösterilmiştir. B : intron kalıntısı siyah dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir.)

Hastaya ait DNA örneği kullanılarak intron kalıntısının 200'şer baz 5' ve 3' bölgeleri dizilendi. Analiz sonucunda *FBXL4*(NM_001278716.2):c.1104-2646A>G (pF369QfsTer23)

mutasyonu homozigot olarak saptandı. Babada yapılan segregasyon analizinde aynı mutasyon heterozigot olarak tespit edildi. (Şekil 6.34.B) *(Annenin (III-4) materyaline ulaşılamadığı için segregasyon çalışması yapılamamıştır.)*



Gen (Transkript)	Varyant	İn-silico				ACMG
		SpliceAI	HSF	MaxEnt	NNSplice	
FBXL4 NM_001278716.2	c.1104-2646A>G (p.F369QfsTer23)	Donor Gain (0.95) – strong Acceptor Gain (0.83) - strong	New cryptic donor splice site	New cryptic donor splice site	'Donor site'da güçlenme (0.73=>0.88)	PVS1, PM2, PP3 - Olası patojenik

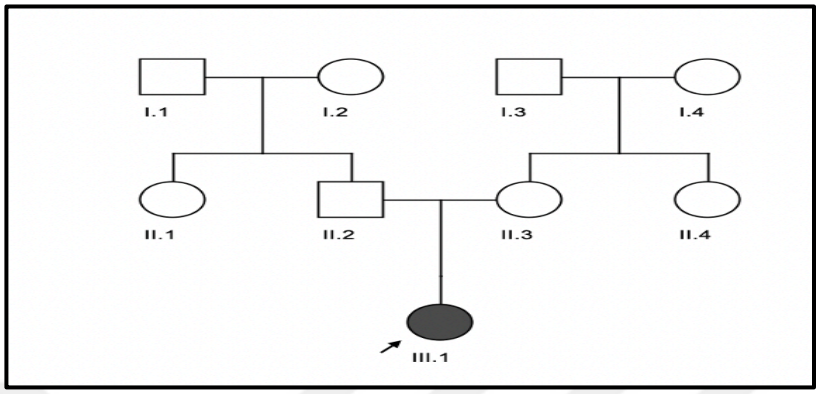
Şekil 6.34. Olgu 13'te saptanan derin intronik varyantın değerlendirilmesi ve segregasyon sonuçları A- İntron kalıntısı ve sonlanma kodonu B- DNA materyallerinden yapılan çalışma sonucunda elde edilen olgu 13 (IV-2) ve babasına (III-3) ait intronik bölgenin elektroferogram görüntüleri C- Saptanan mutasyonun yorumlanmasına ait skorlama bilgileri

Yapılan m-RNA dizileme analizi sonucunda mutasyonun erken sonlanma kodonuna yol açtığı belirlenmiştir. (PVS1). Mutasyona popülasyon veri tabanlarında (GnomAD: 0) rastlanmamıştır (PM2). Varyantın proteine etkisi in-siliko programları tarafından zararlı olarak tahmin edilmiştir (PP3). Mevcut bilgiler ile, tespit edilen bu mutasyon "ACMG 2015" rehberine göre olası patojenik olarak değerlendirilmiştir.

6.14. Olgu 14

Prenatal dönemde anlamlı öyküsü olmayan 8 yaşındaki kadın hastanın 5 aylıkken başını tutamama ve göz takibinin olmaması şikayetleri üzerine yapılan görme ve işitme muayenesinin normal olarak sonuçlandığı, kraniyal MRG ve MR Streskopi testlerinde ise lökodistrofi ile uyumlu bulguların olduğu ve N-asetil aspartik asit düzeyinin yüksek bulunduğu öğrenildi. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.35.'te gösterilmiştir. Canavan hastalığı ön tanısıyla *ASPA* geni dizi analizi yapıldığında c.548C>A varyantının heterozigot olarak bulunması üzerine diğer aleldeki

mutasyonun saptanabilmesi amacıyla *ASPA* geni MLPA analizine alındığı ancak normal olarak sonuçlandığı öğrenildi. Ayırıcı tanılar için yapılan SNP-array ve tüm ekzom dizileme analizinde klinik ile ilişkili olabilecek patojenik / olası patojenik ek bir mutasyon saptanmadığı bildirildi.



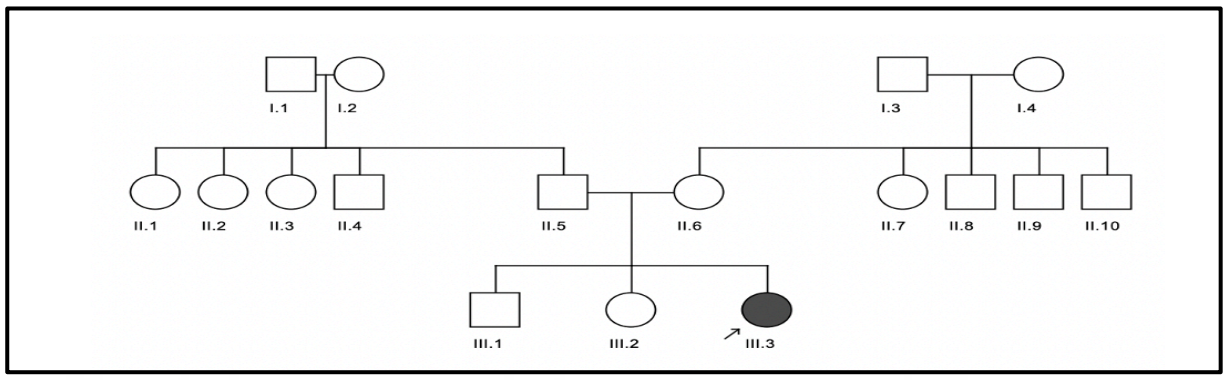
Şekil 6.35. Olgu 14'e ait aile ağacı

Hastaya tüm bulgular sonucunda m-RNA dizileme analizine alındı. *ASPA* geninin periferik kanda ve idrar hücrelerinde ekspresyon seviyesinin düşük olması nedeniyle m-RNA dizileme çalışmasının fibroblast kültürü ile yapılması planlandı. Ancak fibroblast örneğinden yapılan ilk m-RNA dizileme çalışması başarısız oldu.

6.15. Olgu 15

Prenatal dönemde anlamlı öyküsü bulunmayan 13 yaşında kadın hasta gelişim geriliği ve dismorfik bulguları olması nedeniyle genetik açıdan değerlendirildi. Olguya ait aile ağacı Şekil 6.36.'da gösterilmiştir. Olgunun, sezaryen ile 4500 gram (> 97p> 2 SDS) olarak doğduğu belirtildi. Postnatal dönemde büyüme / motor-dil gelişiminde gerilik ile izlendiği, desteksiz yürümesi ve konuşmasının olmadığı öğrenildi. Baş tutmasının 4 aylıkken, desteksiz oturmasının ise 2,5 yaşında olduğu belirtildi. Boy, ağırlık <1 persentil ve baş çevresi < 3 persentil olarak hesaplandı. Dismorfik muayenesinde mikrosefali, yüz kıllanmasında artış, kalın kaşlar, sinorfiz, uzun kirpikler, geniş ve silik filtrum, ince üst dudak, çukur damak, çene gamzesi, küçük el, sol el 5. parmakta hipoplazi ve her iki ayak dorsumunda ödem benzeri görünüm ve geniş baş parmak saptandı. Kraniyal MR görüntülemesinde serebral atrofi, tüm ventriküler sistemde genişleme, ince korpus kallosum ve posterior periventriküler beyaz cevherde volüm kaybı saptandı. Postnatal dönemde yapılan EKO incelemesinde tespit edilen atriyal septal defekt için kapatma operasyonu olduğu öğrenildi. Görme-işitme muayenesi, abdominal USG ve metabolik testleri

normal olarak sonuçlandı. Nöbet öyküsü olmamasına rağmen EEG'de multifokal ve jeneralize aktif epileptik aktivite saptandı. Karyotip, SNP-array, Prader-Willi sendromuna yönelik metilasyon analizi ve tüm ekzom dizileme sonucunda klinik ile ilişkili olabilecek patojenik/olası patojenik bir değişiklik saptanmadı.



Şekil 6.36. Olgu 15'e ait aile ağacı

Hastaya tüm bulgular sonucunda m-RNA dizileme analizi yapılması planlandı. GTEx veritabanındaki 209 kontrol kan örneği ile karşılaştırdı. Ekspresyon analizi sırasında kontrol verilerinin <%1.5 ve >%98.5 bölgesine gelen genler anlamlı kabul edildi. Klinik bulgular HPO kodlarına dönüştürülerek karşılık gelen genler filtrelendi. Ekspresyonu anlamlı miktarda azalmış ve artmış genlerin 5'UTR varyantları, ayıklama değişiklikleri, alel-spesifik ifadeleri incelendi. Ancak klinik ile ilişkili bir değişiklik tespit edilmedi.

6.16. İdrar Derive Hücrelere ait RNA Ekspresyon Verilerinin Fibroblast ve Tam Kan Örnekleriyle Karşılaştırılması

Ayrıca, 9. Olgunun idrar örneğinden yapılan mRNA dizileme çalışmaları sonucunda elde edilen veriler, karşılaştırmalı analiz amacıyla R Studio'da değerlendirildi ve Transcripts Per Kilobase Million (TPM) değerleri hesaplandı. TPM >10 olan genlerin ekspresyonu, RNA dizileme çalışmaları için yeterli kabul edildi. GTEx veritabanından fibroblast ve tam kan kontrol örneklerine ait ortalama TPM değerlerini içeren veri setine ulaşıldı. Yaklaşık 1300 gen içeren kalıtsal metabolik hastalık panelindeki genler filtrelendi ve kontrol örnekleriyle karşılaştırıldı. İdrar örneğinde 793 (%60), fibroblast örneklerinde 887 (%67) ve tam kan örneklerinde 441 (%33) genin TPM >10 olduğu belirlendi. Bu bulgular doğrultusunda, idrar örneklerinin fibroblast örnekleriyle benzer oranda yeterli gen ekspresyonuna sahip olduğu tespit edildi.

7. TARTIŞMA

Teknolojinin gelişmesiyle, son yıllarda WES ve WGS çalışmaları hızlanmış ve böylece genetik hastalıklarda tanı koyma oranı artmıştır. Ancak bu artışa rağmen tanı oranları %30-50'yi geçememektedir. WES ile incelenen bölgelerin sadece ekzonlar ve ekzon-intron bileşkeleri ile sınırlı kalması, WGS ile saptanan varyantların yorumlanmasındaki zorluk, alternatif tanı imkanlarının bulunmasını gerektirmektedir. Literatürde, hastaların kliniği ile ilişkili olabilecek patojenik / olası patojenik varyantların yaklaşık %30'unun kodlamayan bölgelere denk geldiği ve ekzonlarda yer alan mutasyonların da yaklaşık %10'unun RNA işlenmesini etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. (63-65).

RNA dizileme çalışmasıyla, genlerin ifade düzeyleri yanında alel-spesifik ifade ve kırpılma değişikleri incelenerek RNA miktarındaki ve RNA dizisindeki değişiklerin araştırılması mümkün olmaktadır. Cumming ve arkadaşlarının 2017 yılında ilk kez nadir hastalıklarda RNA dizileme çalışmalarını tanı amaçlı kullandıkları görülmektedir. Bu çalışmada moleküler tanısı konulamamış 27 tane kas hastalığı bulunan olguyu incelenmiş ve bunlardan klinik bulgular ve DNA dizi analizleriyle aday bir gen tanımlanan olguların %67'sine, herhangi bir aday gen belirlenemeyen olguların ise %27'sine tanı koyularak RNA dizilemenin tanı koymadaki etkisini gösterilmiştir. (35). Kremer ve arkadaşları ise mitokondriyal hastalık ön tanısı olan ancak moleküler genetik etiyolojisi aydınlatılamayan 48 olguda RNA dizileme çalışması yaparak olguların %10'una (5 olguya) tanı koyabilme başarısı göstermişlerdir (66). Yepez ve arkadaşları ise, 300'den fazla nadir genetik hastalık ön tanısı olan olguda WES ve RNA dizileme çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. İki testin kümülatif verisi sonucunda, WES ile kesin olarak sonuçlandırılamayan olguların %16'sında RNA dizileme çalışmaları ile moleküler etiyolojisinin aydınlatıldığını gösterilmiştir (37). Çalışmamızda yaptığımız m-RNA dizileme çalışması sonucunda, rutin genetik testler tanı alamayan 15 olgunun 3 tanesinde ifade değişikliği, 4 olguda intron kalıntısı ve 5 olguda ekzon atlaması gibi anormal transkriptler tanımlayarak 9 olguda (9/15, %60) kliniklerini açıklamaya katkı sağladık.

RNA dizilemenin kısıtlılıklarından birisi, genlerin dokulardaki ekspresyonu birbirinden farklı olduğu için, çalışmada kullanılacak RNA'nın elde edileceği dokunun seçimidir. Çalışılacak örneğin hastalığa özgü seçimi, RNA dizileme testinin duyarlılığını artıracaktır. Yepez ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, en çok OMIM geni (%67 – 2564 gen) ifade eden dokunun fibroblast olduğunu belirtmişlerdir (37). Ancak fibroblast eldesinin invaziv olması nedeniyle, fibroblast kadar tanı amaçlı yarar sağlayan daha az invaziv veya invaziv olmayan

girişimler ile elde edilecek örnekler önemlidir. Ludwig ve arkadaşları klinik olarak osteogenezis imperfekta tanısı almış 45 olguda idrardan derive hücre kültürü sonucunda elde ettikleri RNA ile RNA dizileme çalışması yapmışlardır (67). Bu çalışma sonucunda elde ettikleri genlerin ekspresyon profillerini GTEx veritabanındaki fibroblast ve tam kan örneklerinin ekpresyon verileri ile karşılaştırmışlar ve *Transcripts per kilobase million*,TPM> 10 üzerinde olan genlerin ekpsresyonunu yeterli olarak değerlendirmişlerdir. Kemik metabolizması panelindeki 41 genin 25 tanesinde (%61) ve osteogenezis imperfekta ile ilişkili 32 genin 25 tanesinde (%78) TPM düzeyini >10 olarak bildirmişlerdir.İdrardan derive hücreler ile fibroblastlarınyeterli ekpresyon düzeylerine sahip genler açısından benzerlik gösterdikleri ve RNA dizileme çalışmalarında idrar örneğinin fibroblasta alternatif olarak kullanabileceği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda Olgu 9'un idrar örneği ile yaptığımız idrardan derive hücre kültürü sonucunda elde ettiğimiz RNA ile başarılı bir şekilde RNA dizileme analizi gerçekleştirdik. Metabolik / mitokondriyal hastalıklar ile ilişkili olan 1310 genin ekspresyon verisini, GTEx veritabanında elde ettiğimiz fibroblast ve tam kan örneklerinin verisini kontrol grubu olarak kullanarak karşılaştırdık. Ludwig ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde fibroblastlara benzer ekspresyon düzeyleri saptadık. Sunduğumuz bu çalışma idrardan derive hücre kültürü ile RNA dizileme yapılan Türkiye'deki ilk çalışmadır.

RNA dizilemesi ile, genlerin ekspresyon düzeyleri, RNA kırpılma anomalileri ve alel-spesifik ifade (monoalelik ekspresyon – MAE) dahil olmak üzere RNA miktarındaki ve RNA dizisindeki varyasyonların araştırılması mümkün olmaktadır.

Olgu 1'de *GNPTAB* geninde ekzon 18 ve ekzon 19 arasında 147 baz uzunluğunda intron 18'e ait intronik kalıntı saptandı. İntronik kalıntının çevresi Sanger yöntemi ile dizilendiğinde c.3434+641G>T (p. K1146Ifs37) mutasyonu homozigot olarak tespit edildi. Bu mutasyon nedeniyle oluşacak erken sonlanma kodonunun, daha kısa bir proteine ve dolayısıyla fonksiyon kaybına yol açacağı öngörüldüğünden olgudaki klinik bulguları açıkladığı düşünüldü. Bu mutasyonun *GNPTAB* geninde saptanan ilk derin intronik mutasyondur.

Olgu 2'de daha önce yapılan *BCKDHA*, *BCKDHB, DBT, PPM1K* genlerinin dizi analizi sonucunda patojenik / olası patojenik mutasyon tespit edilmemiştir. Yapılan analizin ham verileri incelendiğinde *BCKDHA* ekzon 4'te diğer ekzonlarla karşılaştırıldığında göreceli olarak daha az okuma alındığı görüldü. RNA dizileme çalışmasında "ekzon 4" atlanması ve sonrasında yapılan PCR ile homozigot "ekzon 4" delesyonu saptandı. Böylece yeni nesil dizileme platformları ile yapılan dizi analizlerinde yanlış hizalama sonucunda oluşacak yanlış

negatif sonuçların tespitinde RNA dizileme çalışmalarının klinik tanıya önemli katkı sağlayacağı düşünüldü. Bremer ve arkadaşlarının saptadıkları *BCKDHA* genindeki homozigot "ekzon 4" delesyonun kırık noktaları ile, olgumuzdaki kırık noktaları birebir olarak aynı saptandı (58). Abiri ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da tüm ekzon 4'ü kapsayan delesyon bildirmiştir, ancak kırık noktaları için ayrı bir çalışma yapmamışlardır (68). Bu iki olgunun bizim hastamızla yakın coğrafi konumları nedeniyle, bu mutasyonun kurucu etkisi olabileceği ileri sürülebilir.

Olgu 3'ün topuk kanı taramasında biyotinidaz enzim aktivitesinde düşüklük nedeniyle yapılan *BTD* dizi analizi sonucunda 1309G>C (p.V437L) mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştı. m-RNA dizileme çalışmasında klinik ile ilişkili olabilecek ek başka bir değişiklik saptanmadı. Yapılan ekspresyon analizinde GTEx veritabanından elde edilen 209 tam kan örneğiyle karşılaştırılarak olgunun *BTD* geni ekspresyonda - 4.42477 kat değişim saptanarak, kontrol örneklerine göre ekspresyonun azaldığı tespit edildi. Bu ekspresyon değeri kontrol verisine göre <%1'e karşılık geldiği için anlamlı olarak değerlendirildi.

Olgu 4'ün m-RNA dizileme çalışmasında *IDS* geninde ekzon 7 ve ekzon 8'e ait okuma tespit edilmedi. Olgu erkek ve *IDS* geni X kromozomunda yer aldığı için dizi analizine ait ham veriden delesyon analizi yapıldı ancak delesyon saptanmadı. Tang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *IDS* geni dizi analizi sonucunda mutasyon saptanmayan, "mukopolisakkaridoz tip 2" tanılı 4 adet olguya RNA dizileme çalışması gerçekleştirilmiş ve bizim olgumuzda olduğu gibi ekzon 7-8 atlaması olan transkriptler ve *IDSP1* psödogenini de içerecek şekilde komşuluğundaki *EOLA1* geniyle oluşturduğu füzyon transkriptlerinin tespit edildiği gösterilmiştir (39). Çalışmamızda ekzon atlamaları tespit edildikten sonra, uygun primerlerle yapılan PCR ile *IDS-IDSP1* yeniden düzenlenmesi gösterildi ve IGV platformunda gerçekleştirilen analizler sonucunda da *EOLA1* geninin ekzon 2'si ile oluşturduğu füzyon transkriptleri tespit edildi. Sonuç olarak *IDS-IDSP1* genlerindeki yüksek homoloji nedeniyle oluşan yeniden düzenlenmenin hastalığın kliniği ile ilişkili olduğu düşünüldü.

Olgu 5'te *HLCS* geninde ekzon 9 ve ekzon 10 arasında 118 baz uzunluğunda intron 9'a ait intronik kalıntı saptandı. İntronik kalıntının çevresi Sanger yöntemi ile dizilendiğinde c.2237-669T>G (p.G746VfsTer21) mutasyonu homozigot olarak tespit edildi. Bu mutasyon sonucunda oluşacak erken sonlanma kodonu nedeniyle kısalan proteinin fonksiyon kaybı oluşturabileceği öngörüldüğünden olgunun kliniğini açıklayabileceği düşünüldü. Bu mutasyon *HLCS* geninde saptanan ilk derin intronik mutasyondur.

Olgu 7'de *GLB1* geninde ekzon 10 ve ekzon 11 arasında 156 baz uzunluğunda intron 10'a ait intronik kalıntı ve ekzon 15 atlaması tespit edildi. Fragmanların yarısında bu değişiklikler görüldüğü için, heterozigot mutasyonların neden olduğu düşünüldü. İntron 10'da tespit edilen mutasyon sonucunda "SF2/ASF" proteini için yeni bağlanma motifi oluştuğu, "hnRNP" proteini için ise mevcut bağlanma motifinin kaybolduğu saptandı (69). Lin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada serin/arjinin tekrarlarından zengin SR proteinlerinin (SF2/ASF, SC35, SRp20, SRp40, SRp55, SRp75, SRp30c, 9G8, ve SRp54) kırpılma işlemi sırasında bulunduğu yerde kırpılmayı güçlendirici etkide bulunduğu ve kırpılmayı artırdığı belirtilmiştir(70, 71). İntron 10'da saptanan mutasyonun in-siliko değerlendirmeleri sonucunda farklı öngörüler olduğundan varyantı "klinik önemi belirsiz" olarak sınıflandırdık. Segregasyon analizinde bu iki değişikliğin aynı ebeveynden kalıtılmadığı kanıtlanırsa, kliniğe katkı sağlayabilir. Tüm ekzom dizileme çalışmasının ham verisinden ekzon 15'in kırpılma bölgesi incelendiğinde ekzon atlamasına neden olabilecek bir mutasyon saptanmadı. Bölgeye uygun primerler ile PCR yapıldığında ekzon 15 delesyonunu taşıyan alel ve normal alel çoğaltılarak kırık noktaları belirlendi. Heterozigot ekzon delesyonlarını dizi analizi yöntemleri ile her zaman tespit etmek mümkün olmamaktadır, bu yöntemlerin yanlış negatif / yanlış pozitif oranları yüksektir. Mikroarray yöntemi ise dar bir bölgenin incelenmeye çalışıldığı veya incelenecek bölgede prob sayısının az olduğu durumlarda işlevsel olmamaktadır. MLPA yöntemi ise her gen için uygulanabilir bir yöntem değildir. Heterozigot ekzon delesyonunun incelenmesi gereken olgularda RNA dizileme güçlü bir alternatif olarak kullanılabilir.

uORF'lar, protein kodlayan genlerin 5'UTR bölgelerinde yer alır. McGillivray ve arkadaşları uORF bölgelerini tahmin edip belirleyebilmek için, Ribo-seq ve kütle spektrometrisi verilerini kullanarak 11.171 insan geninde 188.802 olası aktif uORF tanımlamıştır. Çalışmasında *SLC52A2* geninde 44 adet çeşitli uORF belirlenmiştir (72). uORF'ler "leaky-scanning", "ribosome-stalling" ve "translation reinitiation" mekanizmaları ile translasyonu etkileyebilir. Literatürde 5' uORF'lerin Mendelyen hastalıklarla ilişkisini belirten çok sayıda çalışma vardır. (73, 74). Bu tür varyantlar yeni uORF'ye yol açan bir uAUG oluşturabilir veya mevcut olan uORF'leri bozabilir. Filatova ve arkadaşları, *PAX6* genindeki 5'UTR bölgesinde yer alan varyantların mevcut uORF'leri bozarak m-RNA düzeylerinde anlamlı değişim gözlenmemesine rağmen hücrelerdeki protein miktarında belirgin bir azalmaya neden olarak translasyon aktivitesinin olumsuz etkilediğini göstermişlerdir. (75). Olgu 10'da *SLC52A2* geninde tespit edilen RNA değişimlerinin uORF'lerin sonlanma kodonunun bozulmasına yol açarak çerçeve kayması etkisi oluşturacağı ve uORF'ların uzamasına neden

olacağı beklenir. Bunun sonucunda ana ORF etkilenerek translasyon veriminin düşmesi ve üretilen *SLC52A2* proteinin azalması ile karşılaşılacağı düşünülmüştür.

SLC52A2 geninin bialelik patojenik ve olası patojenik varyantlarının flavin mononükleotidi (FMN) ve flavin adenin dinükleotidinin (FAD) öncüsü olan riboflavinin taşıyıcılarını etkileyerek Brown-Vialetto-Van Laere sendromu tip 2'ye (MIM:614707) neden olduğu bilinmektedir. Hastalarda genellikle çocukluk çağında değişken hipotoni veya kas güçsüzlüğü, ataksi, optik atrofi, sensörinöral işitme kaybı ve bulbar palsiler görülür. Hastalık klinik heterojenite gösterir; daha hafif formlar ikinci veya üçüncü dekatta ortaya çıkarken, şiddetli formlar infantil dönemde ortaya çıkıp, ölümle sonuçlanabilir. Nimmo ve arkadaşları ile Yılmaz ve arkadaşları daha hafif klinik bulgularla tanı koyulan, mitokondriyal kompleks II eksikliğine benzer bulgular veren, kas biyopsisinde mitokondriyal miyopatiye işaret eden kompleks II eksikliği ve 'ragged-red fibers'görülen olguların olduğunu belirtmişlerdir (76, 77). Tüm bu bulgular ile *SLC52A2* geninde saptanan RNA değişimlerinin ilgili fenotip ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

1q32'de yer alan ve alternatif kompleman sistemi ile ilişkili olan *CFH/CFHR* gen kümesi 5 adet gen içerir. *(CFHR3, CFHR1, CFHR4, CFHR2 ve CFHR5)* Bu bölge genomik duplikasyon sonucu oluştuğu ve tekrar bölgeleri içerdiği için bu bölgede yapısal değişiklikler görülebilir. Günümüze kadar *CFH/CFHR* gen kümesinde altı tip hibrit gen tespit edilmiştir (78). *CFH* mutasyonu olan atipik hemolitik üremik sendromda (aHÜS) hastalarının penetransının %59 ve *CFH/CFHR* hibrit geninin olduğu durumda ise bu oranın %33 olduğu bildirilmiştir (79, 80). Olgu 10'da yapılan RNA dizileme çalışması ile insidental olarak belirlenen *CFH/CFHR3* füzyonu, şu anda hastalığın kliniğini açıklamada yarar sağlamasa da DNA dizi analizi yöntemleri ile açıklanamayacak durumlar için yol gösterici olacaktır.

Pankreas beta hücrelerinde ve kardiyomyositlerde ifade olan *KCNQ1* geni tarafından kodlanan Kv7.1 proteinindeki voltaj kapılı K kanalıyla ilişkili mutasyonların hiperinsülinemik hipoglisemi ve uzun QT sendromu ile sonuçlandığı bilinmektedir (81-83). Olgu 12'de yapılan RNA çalışması sonucunda ekzon 3-8 atlanmasına işaret eden bulgular saptanmasına rağmen, bu RNA değişikliğinin nasıl oluştuğu net olarak gösterilemedi. Delesyon ihtimalini değerlendirmek için yapılan SNP-array ve metilasyon spesifik MLPA testleri normal olarak sonuçlandı. Ancak hastada mozaik bir delesyon var ise, bu tekniklerin mozaik durumları (<%20-%30) tespit etmede yeterli olmaması nedeniyle yapılan testler normal olarak sonuçlanmış olabilir. Ayrıca hastada yeni nesil dizilemede gözden kaçabilecek ve ekzon

atlanmasına neden olabilecek insersiyon veya delesyon olabilir. Bersell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *KCNQ1* geni 15. ekzonunda daha önce yapılan NGS analizlerinde saptanamayan 52 bazlık bir insersiyon tespit edilmiştir (84).

Beckwith– Wiedemann sendromu (BWS, OMIM 130650) ve Silver–Russell sendromu (SRS, OMIM 180860) ile ilişkilendirilen 11p15.5 bölgesindeki imprit genlerden olan *KCNQ1'*in paternal alelden kalıtımı sırasında oluşan değişiklikler, o bölgedeki *KCNQ1OT1* geninin susturulması sonucu meydana gelen *CDKN1C* ve *PHLDA2'*nin ekspresyon artışı intrauterin büyüme geriliği (IUGR) ile ilişkilendirilmiştir (85). Olgu 12'de de gözlenen IUGR/SGA bulgusunun, RNA çalışması sırasında saptanan *KCNQ1* ekzon 3-8 atlanması ve *CDKN1C* geninin ekspresyon artışı sonucunda meydana gelmiş olabileceği düşünülmüştür.

Olgu 13'te RNA dizisindeki değişiklikler analiz edilmeden önce tüm genler ifade değişiklikleri açısından incelendi. FC<0, $p < 0,05$ olan ve klinik bulguların ilişkili olabileceği genler filtrelendi. *FBXL4* geninin ifadesinde anlamlı kabul edilebilecek azalma saptandı. Bu sonuç hem dizi değişikliklerini incelemede kolaylık sağlarken hem de saptanan dizi değişikliklerinin anlamlandırılmasına yardımcı oldu. *FBXL4* geninde ekzon 6 ve ekzon 7 arasında 34 baz uzunluğunda intron 6'ya ait intronik kalıntı saptandı. İntronik kalıntının çevresi Sanger yöntemi ile dizilendiğinde c.1104-2646A>G (p.F369Qfs*23) mutasyonu homozigot olarak tespit edildi. Bu mutasyon sonucunda oluşacak erken sonlanma kodonu nedeniyle, daha kısa bir protein ve buna bağlı fonksiyon kaybı oluşacağı öngörüldüğünden olgudaki klinik bulguları açıklayabileceği düşünülmüştür. Bu mutasyon *FBXL4* geninde saptanan ilk derin intronik mutasyondur.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Rutin genetik testler ile moleküler genetik tanı alamamış olgular m-RNA dizileme ile incelenerek, olguların %60'ına (9/15) tanı koyma başarısı gösterilmiştir. Bu tanılar doğrultusunda olguların klinik takibi net olarak yapılmakta, kırpılmayı hedefleyen tedavi stratejileri ve prenatal tanı / PGT uygulamaları açısından uygunluk değerlendirmeleri yapılabilmektedir.

2. RNA dizileme ile *GNPTAB, HLCS, GLB1, FBXL4* genlerinde tespit edilen intronik kalıntılar, derin intronik varyantların varlığına işaret etmiş ve ilgili genlerde literatürde ilk kez tanımlanan bu varyantların ortaya konmasını sağlamıştır. Bu durum, RNA dizilemenin intronik bölgelerdeki değişikliklerin fonksiyonel etkilerini ortaya çıkarabilme kapasitesini göstermekte; özellikle rutin dizileme yöntemleriyle tespit edilemeyen varyantların tanımlanmasında önemli bir araç olduğunu ortaya koymaktadır.

3. RNA dizileme ile *IDS, GLB1, SLC52A2, KCNQ1* genlerinde tespit edilen ekzon atlama olayları, yapısal varyantların varlığına işaret eden önemli bulgular sundu. Diğer yöntemlerle (NGS, Mikroarray, MLPA) tespiti oldukça zor olan heterozigot ekzon delesyonunun incelenmesi gereken olgularda RNA dizileme güçlü bir alternatif olarak kullanılabilir. Ayrıca, bu analiz sayesinde yeniden düzenlenmeler ve füzyon transkriptlerinin varlığı da ortaya konuldu, böylece yapısal varyantların RNA üzerindeki etkileri daha kapsamlı bir şekilde değerlendirildi.

4. Olgularda saptanan gen ifade değişilikleri ek başka bir varyant tespit edilmediği durumlarda tanıya katkı sağlamaktadır. Ayrıca, olgularda mevcut klinik ve genetik bilgilerle spesifik bir ön tanı veya tanı düşünülmediği durumlarda, gen ifade değişiklikleri incelenerek tanısal sürece katkı sağlanması hedeflenmektedir. Bu yaklaşım, hastalığa özgü gen ifade profillerin ortaya konmasına yardımcı olarak, olası tanıların filtrelenmesine, ön tanı oluşturulmasına ve elde edilen varyantların biyolojik anlamlandırılmasına olanak sağlar.

5. RNA dizileme çalışmalarının 5'UTR bölgesindeki varyantların fonksiyonel etkilerini değerlendirmedeki rolü, Olgu 10'daki bulgularla desteklenmektedir. Bu olguda, 5'UTR'de saptanan 4 ve 7 bazlık ekzon kayıpları uORF'ları bozarak genin ekspresyon seviyesini

değiştirmemekle birlikte translasyonel verimliliği azalttığı ve bu mekanizma üzerinden patogeneze katkı sağladığı öngörülmüştür.

6. RNA çalışmalarında kritik basamaklardan biri, çalışma yapılacak doku/hücre tipinin seçimidir; çünkü gen ekspresyonu dokuya özgü farklılıklar gösterir. Rutin olarak periferik kan ve fibroblast hücreleri kullanılmakla birlikte, fibroblast elde edilmesinin invaziv bir işlem gerektirmesi nedeniyle bu yaklaşım her zaman uygun değildir. İdrar, non-invaziv elde edilebilmesi ve renal kök hücre içeriği nedeniyle, alternatif bir RNA kaynağı olarak değerlendirilmelidir. Bu çalışma, Türkiye'de idrardan derive hücre kültürü kullanılarak yapılan ilk RNA dizileme çalışmasıdır.

7. RNA dizileme, WES ve WGS gibi diğer dizi analizi yöntemlerinin sınırlılıklarını tamamlayıcı nitelikte güçlü bir araçtır. Bu nedenden dolayı, RNA çalışmaları rutin uygulanan genetik testlerle tanı konulamayan ancak genetik hastalık şüphesi bulunan olgularda, tanı sürecine önemli ölçüde katkı sağlayabilir. Tanıda tek başına kullanılabileceği gibi diğer yöntemlerle (WES, WGS, optik haritalama) kombine olarak kullanılabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Saudubray JM, Garcia-Cazorla À. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. Pediatr Clin North Am. 2018;65(2):179-208.
2. Önal H. Doğumsal Metabolizma Bozukluklarına Yaklaşım. Klinik Tıp Aile Hekimliği. 2018;10(4).
3. Arnold GL. Inborn errors of metabolism in the 21st century: past to present. Annals of translational medicine. 2018;6(24).
4. Nagpal R, Goyal RB, Priyadarshini K, Kashyap S, Sharma M, Sinha R, et al. Mucopolysaccharidosis: A broad review. Indian J Ophthalmol. 2022;70(7):2249-61.
5. Penon-Portmann M, Blair DR, Harmatz P. Current and new therapies for mucopolysaccharidoses. Pediatr Neonatol. 2023;64 Suppl 1:S10-s7.
6. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. Nature Reviews Disease Primers. 2016;2(1):16080.
7. Hong S, Kim S, Kim K, Lee H. Clinical Approaches for Mitochondrial Diseases. Cells. 2023;12(20).
8. Ng YS, Turnbull DM. Mitochondrial disease: genetics and management. J Neurol. 2016;263(1):179-91.
9. Yatsuga S, Fujita Y, Ishii A, Fukumoto Y, Arahata H, Kakuma T, et al. Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. Ann Neurol. 2015;78(5):814-23.
10. Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. Lancet Neurol. 2011;10(9):806-18.
11. Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. Ann Neurol. 2016;79(2):190-203.
12. Tankeu AT, Van Winckel G, Elmers J, Jaccard E, Superti-Furga A, Wolf B, et al. Biotinidase deficiency: What have we learned in forty years? Mol Genet Metab. 2023;138(4):107560.
13. Blackburn PR, Gass JM, Vairo FPE, Farnham KM, Atwal HK, Macklin S, et al. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. Appl Clin Genet. 2017;10:57-66.
14. Liu Q, Li F, Zhou J, Liu X, Peng J, Gong L. Neonatal maple syrup urine disease case report and literature review. Medicine (Baltimore). 2022;101(50):e32174.
15. Hannah WB, Derks TGJ, Drumm ML, Grünert SC, Kishnani PS, Vissing J. Glycogen storage diseases. Nat Rev Dis Primers. 2023;9(1):46.
16. Liu B, Wu B, Lu Y, Zhang P, Xiao F, Li G, et al. A Novel, Recurrent, 3.6-kb Deletion in the PYGL Gene Contributes to Glycogen Storage Disease Type VI. J Mol Diagn. 2020;22(12):1373-82.
17. Eminoğlu FT. Glikojen depo tip 1a ve tip 1b olgularında klinik özellikler ve hastalığın seyri. Türk Pediatri Arşivi. 2013;48(2).
18. Bley A, Denecke J, Kohlschütter A, Schön G, Hischke S, Guder P, et al. The natural history of Canavan disease: 23 new cases and comparison with patients from literature. Orphanet J Rare Dis. 2021;16(1):227.

19. Dominguez Gonzalez CA, Bell K, Rajagopalan R, de Silva MG, Lemes A, Zabala C, et al. A Diagnostic Blind Spot: Deep intronic SVA_E Insertion identified as the most Common Pathogenic Variant Associated with Canavan Disease. medRxiv. 2024:2024.12.18.24318806.
20. Palladino AA, Stanley CA. The hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2010;11(3):171-8.
21. Marasco LE, Kornblihtt AR. The physiology of alternative splicing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2023;24(4):242-54.
22. Akinyi MV, Frilander MJ. At the Intersection of Major and Minor Spliceosomes: Crosstalk Mechanisms and Their Impact on Gene Expression. Front Genet. 2021;12:700744.
23. Tan K, Stupack DG, Wilkinson MF. Nonsense-mediated RNA decay: an emerging modulator of malignancy. Nat Rev Cancer. 2022;22(8):437-51.
24. Kernohan KD, Boycott KM. The expanding diagnostic toolbox for rare genetic diseases. Nat Rev Genet. 2024;25(6):401-15.
25. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. Nature. 2017;550(7676):345-53.
26. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics. 2016;107(1):1-8.
27. Uhlen M, Quake SR. Sequential sequencing by synthesis and the next-generation sequencing revolution. Trends Biotechnol. 2023;41(12):1565-72.
28. International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature. 2004;431(7011):931-45.
29. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. Biology (Basel). 2023;12(7).
30. McFarland KN, Liu J, Landrian I, Godiska R, Shanker S, Yu F, et al. SMRT Sequencing of Long Tandem Nucleotide Repeats in SCA10 Reveals Unique Insight of Repeat Expansion Structure. PLoS One. 2015;10(8):e0135906.
31. Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bzikadze AV, Mikheenko A, et al. The complete sequence of a human genome. Science. 2022;376(6588):44-53.
32. Smail C, Montgomery SB. RNA Sequencing in Disease Diagnosis. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2024;25(1):353-67.
33. Berger K, Arafat D, Chandrakasan S, Snapper SB, Gibson G. Targeted RNAseq Improves Clinical Diagnosis of Very Early-Onset Pediatric Immune Dysregulation. J Pers Med. 2022;12(6).
34. Sun T, Sun Z, Jiang Y, Ferguson AA, Pilewski JM, Kolls JK, et al. Transcriptomic Responses to Ivacaftor and Prediction of Ivacaftor Clinical Responsiveness. Am J Respir Cell Mol Biol. 2019;61(5):643-52.
35. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, Lek M, Donkervoort S, Foley AR, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. Sci Transl Med. 2017;9(386).
36. Frésard L, Smail C, Ferraro NM, Teran NA, Li X, Smith KS, et al. Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts. Nat Med. 2019;25(6):911-9.
37. Yépez VA, Gusic M, Kopajtich R, Mertes C, Smith NH, Alston CL, et al. Clinical implementation of RNA sequencing for Mendelian disease diagnostics. Genome Med. 2022;14(1):38.

38. Bonder MJ, Smail C, Gloudemans MJ, Frésard L, Jakubosky D, D'Antonio M, et al. Identification of rare and common regulatory variants in pluripotent cells using population-scale transcriptomics. Nat Genet. 2021;53(3):313-21.
39. Tang J, Chang G, Wei M, Li X, Chen H, Qin Y, et al. Diagnosis of patients with mucopolysaccharidosis type II via RNA sequencing. Clin Chim Acta. 2022;537:38-45.
40. Encarnação M, Coutinho MF, Cho SM, Cardoso MT, Ribeiro I, Chaves P, et al. NPC1 silent variant induces skipping of exon 11 (p.V562V) and unfolded protein response was found in a specific Niemann-Pick type C patient. Mol Genet Genomic Med. 2020;8(11):e1451.
41. Matos L, Gonçalves V, Pinto E, Laranjeira F, Prata MJ, Jordan P, et al. Functional analysis of splicing mutations in the IDS gene and the use of antisense oligonucleotides to exploit an alternative therapy for MPS II. Biochim Biophys Acta. 2015;1852(12):2712-21.
42. Matos L, Canals I, Dridi L, Choi Y, Prata MJ, Jordan P, et al. Therapeutic strategies based on modified U1 snRNAs and chaperones for Sanfilippo C splicing mutations. Orphanet J Rare Dis. 2014;9:180.
43. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. NPJ Genom Med. 2018;3:16.
44. Zhang Y, McNeill E, Tian H, Soker S, Andersson KE, Yoo JJ, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. J Urol. 2008;180(5):2226-33.
45. Zhou Q, Cheng Y, Sun F, Shen J, Nasser MI, Zhu P, et al. A Comprehensive Review of the Therapeutic Value of Urine-Derived Stem Cells. Front Genet. 2021;12:781597.
46. Ludwig K, Wu Z, Bardai G, Mason P, Ward LM, Moffatt P, et al. RNA Sequencing of Urine-Derived Cells for the Characterization and Diagnosis of Osteogenesis Imperfecta. Journal of Bone and Mineral Research. 2023;38(8):1125-34.
47. Hiraide T, Shimizu K, Miyamoto S, Aoto K, Nakashima M, Yamaguchi T, et al. Genome sequencing and RNA sequencing of urinary cells reveal an intronic FBN1 variant causing aberrant splicing. Journal of Human Genetics. 2022;67(7):387-92.
48. Hiraide T, Shimizu K, Okumura Y, Miyamoto S, Nakashima M, Ogata T, et al. A deep intronic TCTN2 variant activating a cryptic exon predicted by SpliceRover in a patient with Joubert syndrome. Journal of human genetics. 2023;68(7):499-505.
49. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics. 2012;29(1):15-21.
50. van der Auwera G, O'Connor BD. Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra: O'Reilly Media, Incorporated; 2020.
51. Köhler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen JOB, Danis D, Gourdine JP, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D1018-d27.
52. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. Nat Genet. 2013;45(6):580-5.
53. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. Nucleic Acids Res. 2005;33(Database issue):D514-7.
54. Mertes C, Scheller IF, Yépez VA, Çelik MH, Liang Y, Kremer LS, et al. Detection of aberrant splicing events in RNA-seq data using FRASER. Nat Commun. 2021;12(1):529.

55. Zhang D, Reynolds RH, Garcia-Ruiz S, Gustavsson EK, Sethi S, Aguti S, et al. Detection of pathogenic splicing events from RNA-sequencing data using dasper. bioRxiv. 2021:2021.03.29.437534.
56. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. Cell. 2019;176(3):535-48.e24.
57. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 2010;26(1):139-40.
58. Bremer S, Bliksrud YT, Rootwelt H, Woldseth B, Tangeraas T, Sæves I, et al. Identification of a novel BCKDHA deletion causing maple syrup urine disease. Meta Gene. 2016;10:86-9.
59. Hattori Y, Kido J, Sugawara K, Sawada T, Matsumoto S, Nakamura K. Rapid genotyping of inversion variants in Mucopolysaccharidosis type II using long-range PCR: A case report. Mol Genet Metab Rep. 2024;41:101139.
60. Lualdi S, Regis S, Di Rocco M, Corsolini F, Stroppiano M, Antuzzi D, et al. Characterization of iduronate-2-sulfatase gene-pseudogene recombinations in eight patients with Mucopolysaccharidosis type II revealed by a rapid PCR-based method. Hum Mutat. 2005;25(5):491-7.
61. Kosuga M, Mashima R, Hirakiyama A, Fuji N, Kumagai T, Seo JH, et al. Molecular diagnosis of 65 families with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) characterized by 16 novel mutations in the IDS gene: Genetic, pathological, and structural studies on iduronate-2-sulfatase. Mol Genet Metab. 2016;118(3):190-7.
62. Doimo M, Trevisson E, Airik R, Bergdoll M, Santos-Ocaña C, Hildebrandt F, et al. Effect of vanillic acid on COQ6 mutants identified in patients with coenzyme Q10 deficiency. Biochim Biophys Acta. 2014;1842(1):1-6.
63. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. 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(6):665-77.
64. Chong R, Insigne KD, Yao D, Burghard CP, Wang J, Hsiao YE, et al. A Multiplexed Assay for Exon Recognition Reveals that an Unappreciated Fraction of Rare Genetic Variants Cause Large-Effect Splicing Disruptions. Mol Cell. 2019;73(1):183-94.e8.
65. Soemedi R, Cygan KJ, Rhine CL, Wang J, Bulacan C, Yang J, et al. Pathogenic variants that alter protein code often disrupt splicing. Nat Genet. 2017;49(6):848-55.
66. Kremer LS, Bader DM, Mertes C, Kopajtich R, Pichler G, Iuso A, et al. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. Nat Commun. 2017;8:15824.
67. Ludwig K, Wu Z, Bardai G, Mason P, Ward LM, Moffatt P, et al. RNA Sequencing of Urine-Derived Cells for the Characterization and Diagnosis of Osteogenesis Imperfecta. J Bone Miner Res. 2023;38(8):1125-34.
68. Abiri M, Karamzadeh R, Karimipoor M, Ghadami S, Alaei MR, Bagheri SD, et al. Identification of six novel mutations in Iranian patients with maple syrup urine disease and their in silico analysis. Mutat Res. 2016;786:34-40.
69. Russo A, Siciliano G, Catillo M, Giangrande C, Amoresano A, Pucci P, et al. hnRNP H1 and intronic G runs in the splicing control of the human rpL3 gene. Biochim Biophys Acta. 2010;1799(5-6):419-28.

70. Lin S, Fu XD. SR proteins and related factors in alternative splicing. Adv Exp Med Biol. 2007;623:107-22.
71. Chandradas S, Deikus G, Tardos JG, Bogdanov VY. Antagonistic roles of four SR proteins in the biosynthesis of alternatively spliced tissue factor transcripts in monocytic cells. J Leukoc Biol. 2010;87(1):147-52.
72. McGillivray P, Ault R, Pawashe M, Kitchen R, Balasubramanian S, Gerstein M. A comprehensive catalog of predicted functional upstream open reading frames in humans. Nucleic Acids Res. 2018;46(7):3326-38.
73. Romanelli Tavares VL, Kague E, Musso CM, Alegria TGP, Freitas RS, Bertola DR, et al. Craniofrontonasal Syndrome Caused by Introduction of a Novel uATG in the 5'UTR of EFNB1. Mol Syndromol. 2019;10(1-2):40-7.
74. Wright CF, Quaife NM, Ramos-Hernández L, Danecek P, Ferla MP, Samocha KE, et al. Non-coding region variants upstream of MEF2C cause severe developmental disorder through three distinct loss-of-function mechanisms. Am J Hum Genet. 2021;108(6):1083-94.
75. Filatova AY, Vasilyeva TA, Marakhonov AV, Sukhanova NV, Voskresenskaya AA, Zinchenko RA, et al. Upstream ORF frameshift variants in the PAX6 5'UTR cause congenital aniridia. Hum Mutat. 2021;42(8):1053-65.
76. Nimmo GAM, Ejaz R, Cordeiro D, Kannu P, Mercimek-Andrews S. Riboflavin transporter deficiency mimicking mitochondrial myopathy caused by complex II deficiency. Am J Med Genet A. 2018;176(2):399-403.
77. Yılmaz B, Ceylaner S, Mungan N. Brown Vialetto Van Laere syndrome: presenting with left ventricular non-compaction and mimicking mitochondrial disorders. Turk J Pediatr. 2021;63(2):314-8.
78. Sugawara Y, Kato H, Nagasaki M, Yoshida Y, Fujisawa M, Minegishi N, et al. CFH-CFHR1 hybrid genes in two cases of atypical hemolytic uremic syndrome. J Hum Genet. 2023;68(6):427-30.
79. Sansbury FH, Cordell HJ, Bingham C, Bromilow G, Nicholls A, Powell R, et al. Factors determining penetrance in familial atypical haemolytic uraemic syndrome. J Med Genet. 2014;51(11):756-64.
80. Francis NJ, McNicholas B, Awan A, Waldron M, Reddan D, Sadlier D, et al. A novel hybrid CFH/CFHR3 gene generated by a microhomology-mediated deletion in familial atypical hemolytic uremic syndrome. Blood. 2012;119(2):591-601.
81. Torekov SS, Iepsen E, Christiansen M, Linneberg A, Pedersen O, Holst JJ, et al. KCNQ1 long QT syndrome patients have hyperinsulinemia and symptomatic hypoglycemia. Diabetes. 2014;63(4):1315-25.
82. Sung JY, Bae EJ, Park S, Kim SY, Hyun YJ, Park SS, et al. Large deletion in KCNQ1 identified in a family with Jervell and Lange-Nielsen syndrome. Ann Lab Med. 2014;34(5):395-8.
83. Lubberding AF, Juhl CR, Skovhøj EZ, Kanters JK, Mandrup-Poulsen T, Torekov SS. Celebrities in the heart, strangers in the pancreatic beta cell: Voltage-gated potassium channels K(v) 7.1 and K(v) 11.1 bridge long QT syndrome with hyperinsulinaemia as well as type 2 diabetes. Acta Physiol (Oxf). 2022;234(3):e13781.
84. Bersell K, Montgomery JA, Kanagasundram AN, Campbell CM, Chung WK, Macaya D, et al. Partial Duplication and Poly(A) Insertion in KCNQ1 Not Detected by Next-Generation Sequencing in Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2016;9(6).

85. De Crescenzo A, Sparago A, Cerrato F, Palumbo O, Carella M, Miceli M, et al. Paternal deletion of the 11p15.5 centromeric-imprinting control region is associated with alteration of imprinted gene expression and recurrent severe intrauterine growth restriction. J Med Genet. 2013;50(2):99-103.

10. EKLER

EK-1: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın adı: DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan genetik hastalıklarda m-RNA dizileme yöntemi ile moleküler etiyolojinin araştırılması

Araştırıcılar: Dr. Öğr. Üyesi Timur TUNCALI, Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ, Dr. Okan KURTÇU, Prof. Dr. Fatma Tuba EMİNOĞLU

Araştırmanın yürütüleceği yer: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Sayın Katılımcı,

Araştırmanın amacı rutin moleküler genetik testler ile tanı alamayan genetik hastalıklarda m-RNA dizileme yöntemi ile araştırılarak moleküler genetik tanı konulmasıdır.

Sizin/Çocuğunuz bu çalışmaya genetik tanısı koyulamamış hastalığı bulunması nedeniyle davet edilmiş bulunuyor. Araştırmanın amacı rutin moleküler genetik testler ile tanı alamayan olguların m-RNA dizileme yöntemi ile araştırılarak moleküler genetik tanı konulmasıdır. Yapılan genetik incelemeler sonunda, uygulanan testler klinik bulguları açıklayamamaktadır. Bu araştırmada rutin genetik testler ile hastalığı açıklanamayan olgulara; farklı, yeni bir teknoloji olan m-RNA dizileme yöntemi kullanılarak tanı konması planlanmaktadır.

Bu araştırma ile çalışmanın sonucunda bulmayı öngördüğümüz değişikliği tespit edebiliriz veya edemeyebiliriz. Her iki sonucu da sizin istemeniz durumunda sizinle sonuç paylaşılacak ve ayrıntılı açıklanacaktır. Bir değişiklik bulmamız durumunda; sonuçlar kısa sürede, doğrudan sizin takip ve tedavinizi değiştirmeyebilir ancak tıp dünyasındaki bilgilere katkı sağlanmasına yardımcı olacaktır. Bu amaçla kimlik bilgileriniz gizli tutularak, sizin beyanınız doğrultusunda, sizde belirlenen genetik değişiklik bilimsel yayınla paylaşılabilecektir. İnceleme sonucunda bulunan sonuç, aile içindeki diğer bireyler açısından da bilgi taşıyabilir. Ailede olguların tekrarlaması olasılığında erken tanı amaçlı kullanılabilir. Bazen bulunan sonuç doğrudan hastanın klinik seyri konusunda bilgi verebilir.

Çalışmaya katılacak gönüllülerin kimlikleri gizli tutulacak, elde edilen genetik örnekler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda saklanarak bilimsel amaçlarla diğer araştırmalarda da sizin beyanınız doğrultusunda kullanılabilecektir.

Bu çalışma size ve bağlı olduğunuz sosyal güvenlik kurumuna mali yük getirmeyecektir. Size de bir ödeme yapılmayacaktır.

Sizin/Çocuğunuzun çalışmaya katılmasını kabul etmeniz durumunda, sizden/çocuğunuzdan kan örneği/idrar örneği/ cilt biyopsisi örneği alınacaktır. Kan ve idrar örneği alma işlemi polikliniklere yapılan günlük uygulama kapsamındaki kan/idrar alma işlemi gibi yaklaşık 4 ml (yaklaşık 2 yemek kaşığı) kan alınacaktır. Kan veya idrar örneği ile çalışmaya uygun olmayan hasta gruplarında ise cilt biyopsi örneği alınması gerekmektedir. Bu işlem uygun koşullarda "deri ve zührevi hastalıklar" veya "çocuk cerrahisi" polikliniklerinde gerçekleştirilmektedir. Cildinizden küçük bir parçanın kısa ve basit bir işlem ile alınmasına "cilt biyopsisi" denir. Biyopsi alınacak deri bölgesi lokal anestezik ile uyuşturulduktan sonra, silindir biçiminde bir kesiciden ibaret olan biyopsi aleti bu alanın üzerine konulur, hafifçe bastırılır ve çevrilir. Dairesel olarak kesilmiş olan 0,5x0,5 cm büyüklüğünde deri parçası bistüri adı verilen cerrahi bıçak ile yerinden ayrılır. Kanamayı durdurmak için bölgeye tampon ile 3-5 dakika baskı yapılır, kanama kontrolü sağlandıktan sonra, deri parçasının alındığı alan ortalama 2-3 adet cerrahi dikiş ile kapatılır. Son olarak biyopsi alınan bölge steril bir şekilde gazlı bez ve flaster ile kapatılır. Bu işlem yaklaşık olarak 30 dakika içinde tamamlanır. Biyopsi işleminin yapıldığı gün evinize gidebilirsiniz. Her cerrahi işlemde olduğu gibi, nadir de olsa, biyopsi alanının enfekte olma ihtimali vardır.

Uygun materyal elde edildikten sonraki çalışma laboratuvar ortamında yapılacak olup size/çocuğunuza herhangi bir zarar verme olasılığı yoktur.

Çalışmaya katılmayı kabul etmeyebilirsiniz. Kabul etseniz bile istediğiniz zaman çalışmadan ayrılabilirsiniz. Hiçbir durumda takip ve tedavi süreciniz etkilenmeyecektir. Bunların dışında araştırıcıların kararı doğrultusunda çalışmadan çıkarılmanız planlanabilir.

Tekrar bilgilendirilmek için 053*6*8**** numaralı telefondan Dr. Okan KURTÇU'ya ulaşabilirsiniz.

ONAM FORMU

Ben ....., "DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan genetik hastalıklarda m-RNA dizileme yöntemi ile moleküler etiyolojinin araştırılması" başlıklı çalışma ile ilgili yukarıdaki açıklamayı okudum. Konu ile ilgili sorularımı sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım.

1-Bu bilgiler ışığında bu çalışmaya katılmayı gönüllü olarak;

o Kabul ediyorum.

o Kabul etmiyorum

2-Bu çalışmanın sonucu ile ilişkili olarak, bilgilendirilmek

o İstiyorum

o İstemiyorum

3-Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı arşivinde genetik materyalinizin depolanmasına izin veriyor musunuz?

o evet, onay veriyorum.

o hayır, onay vermiyorum.

4-Eğer onay veriyorsanız;

o Tarafımdan alınmış kodlanmış örneğin yalnızca hastalığım ile ilişkili çalışmalarda kullanımı için onaylıyorum.

o Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca hastalığım ile ilişkili çalışmalarda kullanılması için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

o Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin gelecekte her türlü çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

o Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin gelecekte de her türlü çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılsa dahi, tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

5-Bu seçeneklerden birini seçtiyseniz araştırmanın sonucu ile ilişkili olarak;

o Olası tüm yeni tanılar/ bulgular ile ilişkili olarak bilgilendirilmek istiyorum.

o Olası tüm yeni tanılar/ bulgular ile ilişkili olarak bilgilendirilmek istemiyorum. 6-Bilgilendirilmek istiyorsanız, size ulaşılamadığı durumlarda;

o Tarafımdan alınmış kodlanmış örnek araştırma amacıyla kullanılabilir.

o Tarafımdan alınmış kodlanmış örnek araştırma amacıyla kesinlikle kullanılamaz.

6-Bilgilendirilmek istiyorsanız, size ulaşılamadığı durumlarda;

o Tarafımdan alınmış kodlanmış örnek araştırma amacıyla kullanılabilir.

o Tarafımdan alınmış kodlanmış örnek araştırma amacıyla kesinlikle kullanılamaz.

7- Kimlik bilgilerim korunmak kaydıyla, araştırma sonuçlarının bilimsel yayınlar paylaşılmasına

o Evet, onay veriyorum.

o Hayır, onay vermiyorum.

Gönüllünün

Adı-soyadı:

İmzası:

Tarih: Telefon:

Sorumlu araştırmacının

Adı-soyadı:

İmzası:

Tarih: Telefon:

EK-2: Hasta Takip Form

Araştırmanın Adı: DNA dizi analizi yöntemleri ile sonuç alınamayan genetik hastalıklarda m-RNA dizileme yöntemi ile moleküler etiyolojinin araştırılması

Araştırıcılar: Dr. Öğr. Üyesi Timur TUNCALI, Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ, Dr. Okan KURTÇU, Prof. Dr. Fatma Tuba EMİNOĞLU

Hasta Adı:

Yaş:

Klinik Bulguları:

Enzim/metabolit düzeyi:

Kraniyal MR görüntülemesi:

Ailede bilinen genetik hastalık öyküsü:

Akraba evliliği:

Örnek geliş tarihi:

Genetik testler: