



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



***SERPING1* MUTASYONU OLMAYAN HEREDİTER
ANJİOÖDEM HASTALIĞININ MOLEKÜLER PATOGENEZİNDE
GENETİK FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Aycan AŞIK

Tıbbi Biyoloji

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**SERPING1 MUTASYONU OLMAYAN HEREDİTER
ANJİOÖDEM HASTALIĞININ MOLEKÜLER
PATOGENEZİNDE GENETİK FAKTÖRLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Aycan AŞIK

Danışman
Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

Tıbbi Biyoloji
Doktora

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Cümhur GÜNDÜZ

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Haluk AKIN

Üye : Doç.Dr. Çığır BİRAY AVCI

Üye : Prof.Dr. Tuba EDGÜNLÜ

Üye : Doç.Dr. Aşlı TETİK VARDARLI

Üye : Doç.Dr. Tuğçe BALCI OKCANOğLU

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: .././202.

Önsöz

İçinde bulunduğumuz dünya, dönüş hızından daha büyük bir hızla değişiyor, her yönüyle üstelik. İnsanlık tarihinin her yüz yıl verdiği büyük sınavlardan birkaçının tamda içinde yaşıyoruz ve bazı durumlar için çok daha büyük tehlikelerle karşı karşıyayız. Bu şartlar altında uzmanlaşmaya çalıştığım bilim dalının kat ve kat daha önemli hale geldiğini görüyor ve hissediyorum. Bu inanç ve motivasyonla çalışmaya ve üretmeye devam edeceğim.

İzmir, 04.01.2022

Aycan AŞIK



Özet

***SERPING1* Mutasyonu Olmayan Herediter Anjiödem Hastalığının Moleküler Patogenezinde Genetik Faktörlerin Araştırılması**

Herediter Anjiödem (HAÖ), tekrarlayan ve ölümcül olabilen anjiödem ataklarıyla karakterize otozomal dominant kalıtmımlı nadir hastalıktır. Hastalığa büyük oranda *SERPING1* genindeki mutasyonlar neden olmaktadır. Bu mutasyonlar sonucunda *SERPING1*'in kodladığı C1INH proteini ya yetersiz üretilmekte (Tip I HAÖ-C1INH) ya da üretilen protein yeterli fonksiyon gösterememektedir (Tip II HAÖ-C1INH). Bunların yanı sıra klinik olarak normal C1INH protein ve fonksiyonel seviyesi bulunan farklı bir tip HAÖ varlığı (HAÖ-nC1INH) da vardır. Bu HAÖ tipi *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF* ve *HS3ST6* genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir ve her biri farklı alt tip olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca *SERPING1* gen mutasyonu bulunmayan, C1INH düzeyi ve fonksiyonu düşük olgular da bildirilmiştir. *SERPING1* gen mutasyonu bulunmayan Tip I HAÖ-C1INH olgularında hastalığın moleküler patolojisi ile ilişkili farklı gen mutasyonları bulunabileceği tez çalışmamızın hipotezini oluşturmaktadır. Bu bağlamda, *SERPING1* gen mutasyonu bulunmayan Tip I HAÖ-C1INH tanılı beş hastada tüm ekzom dizileme çalışması gerçekleştirilerek hastalığın moleküler patolojisi ile ilişkili olabilecek gen varyasyonlarının saptanması amaçlandı. Beş hastadan periferik kan alımı, periferik kandan genomik DNA izolasyonu, genomik DNA kullanılarak yeni nesil dizileme hazırlık işlemleri ve son olarak yeni nesil dizileme işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen ham veriler “CLC Genomics Workbench 20.0.4” yazılımında referans insan genomu GRCh38’e haritalandırılarak, tüm ekzom dizi analizine uygun akışta analiz edildi. Analiz sonucu saptanan varyantlar, öncelikle ClinVar veri tabanında yer alıp almadığı, ClinVar’da yoksa dbSNP veri tabanında yer alıp almadığı değerlendirilerek ClinVar veri tabanında yer alanlar, ClinVar’da yer almayıp yalnızca dbSNP’de yer alanlar ve her iki veri tabanında tanımlanmamış varyantlar olarak üç başlık altında toplandı. Varyantların anlamlılığını saptamak amacıyla VarSome ve Franklin veri tabanlarında tarama gerçekleştirildi. İki hastada ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış *SERPING1* gen varyasyonu saptandı. Birinci hastada saptanan heterozigot c.-22-2A>G varyasyonu bu çalışma ile ilk kez Türk popülasyonunda da var olduğu gösterildi. İkinci hastada saptanan c.826_832del p.Arg276* varyasyonu ise ilk kez bu çalışma ile ortaya çıkarıldı. Bu

varyasyonların ailesel olduğu yüksek  z n rl kl  erime analizi (HRM) ve Sanger dizilime ile gösterildi. *SERPING1* mutasyonu olmayan HA 'n n moleküler patolojisinde yer alan epigenetik değişimlerin saptanabilmesi için transkriptomik analizlerinin ve C1INH'nin RNA molekülleri ya da diğer proteinlerle olası etkileşimlerinden kaynaklanan fonksiyonel epigenetik etkenlerin ortaya çıkarılması için ileri epigenetik çalışmaların yapılmasını önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler; Hereditör Anjioödem, *SERPING1*, Tüm Ekzom Dizileme



Abstract

Investigation of Genetic Factors in Molecular Pathogenesis of Hereditary Angioedema Disease without *SERPING1* Mutation

Hereditary Angioedema (HAE) is a rare autosomal dominant disease characterized by recurrent and fatal angioedema attacks. The disease is mostly caused by mutations in the *SERPING1* gene. As a result of these mutations, the C1INH protein encoded by *SERPING1* is either insufficiently produced (Type I HAE-C1INH) or the produced protein cannot function adequately (Type II HAE-C1INH). In addition, there is a different type of HAE (HAE-nC1INH) with clinically normal C1INH protein and functional level. This type of HAE is associated with mutations in the *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF*, and *HS3ST6* genes, each classified as a different subtype. In addition, cases without *SERPING1* gene mutation having low C1INH level and function have also been reported. Our thesis study hypothesizes that there may be different gene mutations associated with the molecular pathology of the disease in Type I HAE-C1INH cases without *SERPING1* gene mutation. In this context, it was aimed to detect gene variations that may be associated with the molecular pathology of the disease by performing whole-exome sequencing in five patients diagnosed with Type I HAE-C1INH without the *SERPING1* gene mutation. Peripheral blood collection from five patients, isolation of genomic DNA from peripheral blood, preparation for next-generation sequencing using genomic DNA, and finally next-generation sequencing were performed. The raw data obtained were mapped to the reference human genome GRCh38 in the "CLC Genomics Workbench 20.0.4" software and analyzed in a flow suitable for whole-exome sequence analysis. The variants detected as a result of the analysis were firstly evaluated whether they are in the ClinVar and then gathered under the three titles "variants in the ClinVar database", "variants in only the dbSNP database", and "unidentified variants excluding ClinVar and dbSNP". VarSome and Franklin databases were searched to determine the significance of the variants. *SERPING1* gene variation unidentified in the ClinVar and dbSNP databases was detected in two patients. The heterozygous c.-22-2A>G variation detected in the first patient was demonstrated for the first time in the Turkish population with this study. The c.826_832del p.Arg276* variation detected in the second patient was revealed for the first time in this study. The hereditary nature of these variations was demonstrated by high-resolution melting analysis (HRM) and

Sanger sequencing. We suggest transcriptomic analyzes to detect epigenetic changes in the molecular pathology of HAE without *SERPING1* mutation and further epigenetic studies to reveal functional epigenetic factors arising from possible interactions of C1INH with RNA molecules or other proteins.

Keywords; Hereditary Angioedema, *SERPING1*, Whole-Exome Sequencing



İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	XIII
Kısaltma Listesi	XV
Giriş	1
Genel Bilgiler	3
2.1. Herediter Anjioödem	3
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Sınıflandırma ve Genetik.....	6
2.1.3. Patofizyoloji	11
2.1.4. Klinik Profil	16
2.1.5. Tanı ve Tedavi	18
Gereç ve Yöntem	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Çalışma Grubu	21
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar, Kitler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar	21
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	23
3.2.2. Tüm Ekzom Dizileme.....	24
3.2.3. Validasyon Deneyleri	53
Bulgular.....	59
4.1. Tüm Ekzom Dizileme Analiz Bulguları	59
4.1.1. Tüm Ekzom Dizileme Referans Genoma Haritalandırma Hedef Bölge Kapsam Raporları.....	59
4.1.2. Tüm Ekzom Dizileme Sonucu Saptanan Varyantlar.....	60
4.1.3. Klinik anlamlılığı bilinen varyantlar.....	65
4.1.4. ClinVar dışı dbSNP varyantlar	80

4.1.5. ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış varyantlar	87
4.2. Validasyon Deneylerinden Elde Edilen Bulgular.....	92
4.2.1. Konvansiyonel PCR ürünleri agaroz jel görüntüleri.....	92
4.2.2. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM) Bulgusu	92
4.2.3. Sanger Dizileme Bulgusu.....	93
Tartışma	97
Sonuç ve Öneriler.....	109
Kaynaklar	113
Ekler	126
Teşekkür	132
Özgeçmiş	136

Tablolar Dizini

Tablo 1. Anjioödem Tipleri.....	3
Tablo 2. HAÖ tedavideinde güncel terapötik seçenekler (Fijen, Bork, ve Cohn, 2021)	20
Tablo 3. HAÖ tedavideinde gelişim aşamasındaki terapötik seçenekler (Fijen vd., 2021)	20
Tablo 4. Çalışmaya dahil edilen beş hastanın demografik ve klinik bilgileri	21
Tablo 5. Çalışmada kullanılan kitler, kimyasallar ve sarf malzemeler ve markaları	22
Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları	22
Tablo 7. Fragmentasyon, uç tamiri ve A-ilavesi reaksiyon şartları.....	25
Tablo 8. FX reaksiyon karışım hazırlama için bileşenler ve hacimleri (her bir örnek için)	26
Tablo 9. Ligasyon “Master Mix” hazırlama için bileşenler ve hacimleri (her bir örnek için)	26
Tablo 10. Kütüphane amplifiasyonu için reaksiyon şartları.....	27
Tablo 11. Kütüphane zenginleştirme için reaksiyon karışımı	28
Tablo 12. Problar ve boklama reaktifleri ile kütüphane havuzunu tamamlama.....	29
Tablo 13. Hibridizasyon yakalama için inkübasyon koşulları	29
Tablo 14. Yakalama sonrası amplifikasyon şartları	32
Tablo 15. Yakalama sonrası amplifikasyon için reaksiyon karışımı.....	32
Tablo 16. İçeride aktarımda kullanılan parametreler.....	34
Tablo 17. Kırılma işleminde kullanılan parametreler	35
Tablo 18. Referans genom haritalandırma işleminde kullanılan parametreler.....	39
Tablo 19. Haritalarda yinelenen okumaların uzaklaştırılması işleminde kullanılan parametreler.....	41
Tablo 20. Indellerin ve yapısal varyantların çağrılması için kullanılan parametreler.....	42
Tablo 21. Rehber varyant sistem dosyası oluşturulması için kullanılan parametreler	43
Tablo 22. Lokal yeniden hizalama işleminde kullanılan parametreler.....	44
Tablo 23. “Fixed Ploidy Variant Detection” aracı ile varyant çağırma için kullanılan parametreler.....	45
Tablo 24. Marjinal varyantların uzaklaştırılması işleminde kullanılan parametreler	47

Tablo 25. ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşen varyantların filtrelenmesi işleminde kullanılan parametreler.....	49
Tablo 26. ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşmeyen varyantların filtrelenmesi işleminde kullanılan parametreler	50
Tablo 27. Varyantların hangi gen ve transkriptlerde bulunduğu dair bilgilerin elde edilmesi işleminde kullanılan parametreler	51
Tablo 28. <i>SERPING1</i> gen varyasyonlarını içeren gen bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan spesifik primerlerin dizileri ve oluşacak ampikon uzunlukları	53
Tablo 29. Konvansiyonel PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları	53
Tablo 30. Konvansiyonel PCR reaksiyon şartları	54
Tablo 31. HRM analizi için reaksiyon bileşenleri ve miktarları	55
Tablo 32. HRM analizi qPCR reaksiyon şartları.....	55
Tablo 33. BigDye uygulaması reaksiyon bileşenleri ve miktarları	57
Tablo 34. BigDye uygulaması reaksiyon şartları	57
Tablo 35. Hedef bölge için kapsam raporları	59
Tablo 36. Hedef bölge kapsam yüzdeleri	59
Tablo 37. Saptanan varyant miktarları ve zigositelere göre hastalardaki dağılımları	60
Tablo 38. H1 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fitrelemelere göre miktarları	61
Tablo 39. H2 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fitrelemelere göre miktarları	62
Tablo 40. H3 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fitrelemelere göre miktarları	63
Tablo 41. H4 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fitrelemelere göre miktarları	64
Tablo 42. H5 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fitrelemelere göre miktarları	65
Tablo 43. ClinVar ile kesin eşleşen varyantların klinik anlamlılık değerlerine göre hastalardaki sayısal dağılımı	66
Tablo 44. VarSome ve Franklin Genomics veri tabanında taranan ClinVar’da tanımlı varyantların VarSome veri tabanındaki anlamlılık düzeyine göre hastalardaki sayısal dağılımı	68

Tablo 45. HAÖ patolojisinden sorumlu genlerde bulunan ClinVar’da yer alan varyantların klinik anlamlılık değeri ve zigosite durumlarına göre hastalardaki dağılımı	69
Tablo 46. ClinVar veri tabanında klinik anlamlılık değeri patojenik ve patojenik/olası patojenik olarak saptanan sinonim dışı varyantlar, bulundukları genler, veri tabanlarındaki anlamlılıkları ve hastalardaki dağılımları.....	71
Tablo 47. Beş hastada saptanan VarSome veri tabanında patojenik ve olası patojenik anlamlılıktaki varyantlar, bulundukları genler ve veri tabanlarındaki anlamlılıkları	73
Tablo 48. ClinVar tanımlı yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan ortak homozigot varyantlar	74
Tablo 49. ClinVar tanımlı yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan ortak heterozigot varyantların ve farklı zigositeye bulunan varyantların varyasyon tiplerine göre genlerdeki sayısal dağılımı	75
Tablo 50. ClinVar tanımlı yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan ortak heterozigot varyantların ve farklı zigositeye bulunan varyantların VarSome veritabanında VUS, VUS-Olası patojenik ve VUS-Patojenik olarak saptanan varyantlar	77
Tablo 51. ClinVar tanımlı yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarının en az birinde saptanan varyantların, anlamlılık değeri, VarSome ve Franklin veri tabanında aynı anda her ikisinde VUS olmamak üzere, VUS, VUS-Olası patojenik, VUS-Patojenik, olası patojenik ve patojenik olanlarının bulunduğu genler ve hastalardaki dağılımı	78
Tablo 52. ClinVar tanımlı yalnızca H2 ve H4 hastalarının en az birinde saptanan varyantların, anlamlılık değeri, VarSome ve Franklin veri tabanında aynı anda her ikisinde VUS olmamak üzere, VUS, VUS-Olası patojenik, VUS-Patojenik, olası patojenik ve patojenik olanlarının bulunduğu genler ve hastalardaki dağılımı	79
Tablo 53. ClinVar veri tabanı ile kesin eşlememesine rağmen ClinVar’da yer aldığı saptanan dbSNP varyantların klinik anlamlılık değerlerine göre miktarları.....	80
Tablo 54. ClinVar veri tabanında tanımlı olduğu saptanan dbSNP veri tabanı ile eşleşen, klinik anlamlılık değeri patojenik olan sinonim ve intronik dışındaki varyantlar	82
Tablo 55. HAÖ patolojisinden sorumlu genlerde bulunan ClinVar’da yer almayıp dbSNP’de yer alan varyantların VarSome ve Franklin veri tabanlarındaki anlamlılık değeri ve zigosite durumlarına göre hastalardaki dağılımı	84

Tablo 56. Tanımlanmamış olarak saptanan varyantların VarSome veri tabanında belirtilen anlamlık düzeyine göre hastalardaki sayısal dağılımı	87
Tablo 57. <i>SERPING1</i> geninde saptanan ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış varyantlar, VarSome ve Franklin veri tabanındaki anlamlılıkları ve hastalardaki dağılımı	88
Tablo 58. <i>SEPING1</i> geni dışında, VarSome veri tabanında anlamlılığı patojenik, olası patojenik, VUS-patojenik ve VUS-olası patojenik olan ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış olarak saptanan varyantların bulunduğu genler	89
Tablo 59. <i>SEPING1</i> geni dışında, VarSome veri tabanında anlamlılığı patojenik olan ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış olarak saptanan varyantların bulunduğu genler, Franklin veri tabanındaki anlamlılıkları ve hastalardaki dağılımları	90

Şekiller Dizini

Şekil 1. Herditer anjioödem sınıflandırılması.....	7
Şekil 2. Kontakt aktivasyon sistemi, fibrinolitik sistem, koagülasyon sistem, kompleman sistem etkileşimi ve C1INH'nin bu yolaklardaki inhibisyonundan sorumlu olduğu serin proteazlarla etkileşim şeması. FXIIa, aktif FXII; PKa, plazma kallikrein; HK, yüksek molekül ağırlıklı kininojen; BK, Bradikinin; tPA, doku plazminojen aktivatörü; uPA, ürokinaz plazminojen aktivatörü;Plg, plazminojen; Plm, plazmin; FXIa, aktif FXI; FIXa, aktif FIX; FXa, aktif FX; Prthr, Protrombin; Thr, Trombin; Fbg, Fibrinojen; Fbn, Fibrin.....	14
Şekil 3. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” içe aktarım parametre seçim görüntüsü	35
Şekil 4. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” kırpma kalitesi parametre seçim görüntüsü.....	36
Şekil 5. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” adaptörlerin kırpılması parametre seçim görüntüsü.....	37
Şekil 6. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” homopolimerlerin kırpılması parametre seçim görüntüsü	37
Şekil 7. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” dizi filtrelemesi parametre seçim görüntüsü.....	38
Şekil 8. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” referans genom seçim görüntüsü	40
Şekil 9. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” haritalandırma ayarları parametre seçim görüntüsü.....	40
Şekil 10. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” haritalarda yinelenen okumaların uzaklaştırılması parametre seçim görüntüsü	41
Şekil 11. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” Indellerin ve yapısal varyantların çağrılması parametre seçim görüntüsü.....	42
Şekil 12. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” rehber varyant sistem dosyası oluşturulması parametre seçim görüntüsü.....	43
Şekil 13. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” lokal yeniden hizalama işlemi parametre seçim görüntüsü	44
Şekil 14. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” “Fixed Ploidy Variant Detection” aracı ile varyant çağırma parametre seçim görüntüsü.....	46

Şekil 15. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” variant çağırma genel parametre seçim görüntüsü.....	46
Şekil 16. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” variant çağırma gürültü filtreleme parametre seçim görüntüsü	47
Şekil 17. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” marjinal varyantların uzaklaştırılması parametre seçim görüntüsü	48
Şekil 18. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşen varyantların filtrelenmesi parametre seçim görüntüsü.....	49
Şekil 19. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşmeyen varyantların filtrelenmesi parametre seçim görüntüsü	50
Şekil 20. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” varyantların bulunduğu gen ve transkript bilgilerinin elde edilmesi parametre seçimi görüntüsü.....	52
Şekil 21. Hasta H2, annesi, babası ve kardeşine ait <i>SERPING1</i> (uçbirleştirme) primerleri ile çoğaltılan amplikonların agaroz jel görüntüsü.....	92
Şekil 22. Hasta H4, annesi, babası ve iki çocuğuna ait <i>SERPING1</i> (çerçeve kayması) primerleri ile çoğaltılan amplikonların agaroz jel görüntüsü.....	92
Şekil 23. H2 ve aile bireylerine ait sağlıklı kontrole göre (yabanıl tip) normalize edilmiş yüksek çözünürlüklü erime eğrileri.....	93
Şekil 24. H4 ve aile bireylerine ait sağlıklı kontrole göre (yabanıl tip) normalize edilmiş yüksek çözünürlüklü erime eğrileri.....	93
Şekil 25. H2 ve aile bireylerine ait Sanger dizileme baz okuma pikleri.....	94
Şekil 26. H4 ve aile bireylerine ait Sanger dizileme baz okuma pikleri.....	95
Şekil 27. H4 ve aile bireylerine ait poliakrilamid jel (%12) görüntüsü.....	95
Şekil 28. Tüm ekzom dizi analizi H4’te <i>SERPING1</i> geni delesyon saptanan bölgenin okuma görüntüsü.....	96
Şekil 29. Tüm ekzom dizi analizi H4’te <i>SERPING1</i> geni delesyon saptanan bölgedeki okumanın blast sonucu.....	96

Kısaltma Listesi

ABPA	: Alerjik bronkopulmoner aspergillozis
ACE	: Anjiyotensin I dönüştürücü enzim
AMD	: Yaşla-ilişkili maküler dejenerasyon
ANGPT1	: Anjiyopoietin 1
AP2	: Amino peptidaz-2
ARB-AE	: Anjiyotensin reseptör bloker indüklü anjiyoödem
B1R	: Kinin B1 reseptörü
B2R	: Kinin B2 reseptörü
CIP	: Çelişkili patojenite yorumu
CNV	: Kopya sayısı varyasyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FXII	: Faktör oniki
HAÖ	: Herediter anjiyoödem
HGMD	: İnsan geni mutasyon veri tabanı
HK	: Yüksek ağırlıklı kininojen
HS	: Heparan sülfat
HS3ST6	: Heparan sülfat-glukozamin 3-sülfotransferaz 6
İNDEL	: Küçük insersiyon ve delesyonları
KAS	: Kontakt aktivasyon sisteminin
KDR	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2

KKS	: Kallikrein-kinin sistemi
KNG1	: Kininojen 1
KSÜ	: Kronik spontan ürtiker
LK	: Düşük ağırlıklı kininojen
MASP-1	: Mannoza bağlayan lektin ilişkili serin proteaz-1
MGUS	: Monoklonal gammopati
MNV	: Multi nukleotit varyasyon
MYOF	: Miyoferlin
NEP-24.11	: Nötral endopeptidaz 24.11
NGS	: Yeni nesil dizileme
NO	: Nitrik oksit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PI ₂	: Prostaglandin I ₂
PLG	: Plazminojen
SERPING1	: Serpin ailesi üyesi G 1
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
TIE2	: Tunica interna endotelial hücre kinaz 2
UTR	: İfade edilmemiş bölge
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
VUS	: Belirsiz anlam

WES

: Tüm ekzom dizileme



Giriş

Hereditör anjioödem (HAÖ), çoğunlukla deride, sindirim sisteminde, ekstremitelerde ve üst solunum yolunda görülen tekrarlı ve ön görülemeyen ödem atakları ile karakterize olan, otozomal dominant kalıtmı nadir bir hastalıktır (Konrad Bork, Meng, Staubach, ve Hardt, 2006). Çoğu ataklar kendi kendini sınırlandırır, fakat abdominal ataklar, şiddetli ağrı, bulantı ve kusmaya neden olabilir ve ayrıca larinksi etkileyen bu ataklar, boğulma nedeniyle ölümcül olabilir (Konrad Bork vd., 2006; Mete Gökmen vd., 2018). Klasik olarak HAÖ, C1 estera inhibitör proteininin (C1INH) plazma seviyesine ve aktivasyon durumuna göre iki tipe ayrılmaktadır; düşük C1INH plazma seviyesi ile Tip I HAÖ ve normal C1INH seviyesi ile fakat düşük fonksiyonel aktivite ile Tip II HAÖ (Cicardi vd., 2014; Csuka D, Szilágyi Á, 2015). Her iki HAÖ tipinde, C1INH proteinini kodlayan *SERPING1* geninde mutasyon varlığı söz konusudur. Tip I HAÖ’de missense (yanlış anlamlı), nonsense (anlamsız), insersiyon ya da delesyonlar, Tip II HAÖ’de ise genellikle proteinin fonksiyonel aktivasyonunu engelleyen missense mutasyonlar olmak üzere yüksek oranda heterojen yapı sergileyerek 500’den fazla *SERPING1* geninde mutasyon olduğu bildirilmiştir (Ponard vd., 2020). C1INH, kompleman (klasik yolak, C1r ve C1s; lektin yolağı, MASP1 ve MASP2), kontakt aktivasyon (Faktör XII ve kallikrein), koagülasyon (Faktör XI ve trombin) ve fibrinolitik (tPA ve plazmin) sistem olmak üzere farklı plazmatik kaskatlardaki çeşitli serin proteazların inaktivasyonunu yöneten bir multi-fonksiyonel serin proteaz inhibitör proteindir (Ghannam vd., 2016). Hastalığın patofizyolojisinde yetersiz C1INH fonksiyonu nedeniyle kontrolsüz olarak kompleman ve kontakt aktivasyon sistem kaskatları aracılığıyla yüksek moleküler ağırlıklı kininojenden artmış bradikinin üretimi yer almaktadır. Bir vazodilatör peptit olan bradikininin artışı endotelial hücrelerdeki bradikinin B2 reseptörünün (B2R) aşırı aktivasyonuna yol açmaktadır. B2R aktivasyonu sonucu gerçekleşen vazodilasyon, vasküler permeabilite artışı ve lokalize ekstrasvazasyon nedeniyle anjioödem durumu ortaya çıkmaktadır (S. De Maat, Hofman, ve Maas, 2018).

HAÖ, iki klasik tipin yanı sıra, klinik olarak normal C1INH protein ve fonksiyonel seviyesi bulunan ve klasik tiplere nazaran çok daha nadir seyreden farklı bir tip HAÖ varlığı (HAÖ-nC1INH) tanımlanmıştır. HAÖ-nC1INH, koagülasyon faktör XII’yi kodlayan *F12* geni, plasminojeni kodlayan *PLG* geni, anjiopietin-1’i kodlayan *ANGPT1*, kininojen-1’i kodlayan *KNG1* geni, myoferlini kodlayan *MYOF* geni ve

heparan sülfat glukozamin 3-sülfotransferaz 6 enzimini kodlayan *HS3ST6* genindeki mutasyonlarla ilişkilendirilerek her biri farklı alt tip olarak sınıflandırılmaktadır (Santacroce, D'andrea, Maffione, Margaglione, ve D'Apolito, 2021).

Mutasyon varlığı ile ifade edilen klasik tip HAÖ ve diğer tip HAÖ'nün yanı sıra, mutasyon varlığı görülmeyen klasik tip HAÖ fenotipi sergileyen C1INH defektif HAÖ tanılı hastanın var olduğu birkaç çalışma ile bildirilmiştir (Bautista-Llácer, Alberola, Vendrell, Fernández, ve Pérez-Alonso, 2010; Kalmár vd., 2003; Kang vd., 2006; Mete Gökmen vd., 2018; Pappalardo vd., 2008; Speletas vd., 2015). Mutasyon bulunmayan klasik tip HAÖ'de *SERPING1* geninde mutasyon varlığı görülmediği halde tanı için yapılan biyokimyasal analizlerde C1INH fonksiyonu düşük ve/veya C1INH seviyesi düşük bulunmaktadır. Mutasyon barındırmayan klasik tip HAÖ'de, mutasyon varlığı ile tanımlanmış klasik tip HAÖ'den farklı kılan moleküler alt yapı tanımlanmamıştır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Alerji ve İmmünoloji Polikliniği'nde biyokimyasal analizler sonucu Tip I HAÖ tanısı konmuş 5 hastada yapılan *SERPING1* hedefli dizi analizi sonucu *SERPING1* gen mutasyon varlığı görülmediği belirlenmiştir (Mete Gökmen vd., 2018). Bu hastaların 2'sinde aile öyküsü mevcutken 3'ünde aile öyküsü bulunmamaktadır. Hastaların 4'ünde plazma C1INH protein seviyesinde ve protein fonksiyonunda bu düşüklük saptanırken, 1'inde plazma C1INH protein seviyesi normal ve düşük protein fonksiyonu olduğu saptanmıştır. Bu tez kapsamında, “*SERPING1* gen mutasyonu bulunmayan Tip I HAÖ-C1INH hastalarında HAÖ patolojisinin altta yatan nedeni, *SERPING1* geninde tanımlanamamış olası bir varyasyon ya da *SERPING1* geni dışında farklı genlerdeki olası varyasyonların varlığı olabilir mi?” araştırma sorusu sorularak, *SERPING1* gen mutasyonu bulunmayan Tip I HAÖ-C1INH hastalarında, yeni nesil tüm ekzom dizileme analizi gerçekleştirerek hem *SERPING1* geninde hem de *SERPING1* geni dışında farklı genlerde HAÖ patolojisi ile ilişkili olabilecek olası varyasyonların varlığı veya yokluğunun ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Genel Bilgiler

Anjioödem, kan damarlarındaki geçici lokalize permeabilite artışı ile doku şişmesine neden olan derin dermal/subkütanöz dokuların veya mukozal/submukozal dokuların bir vasküler reaksiyonu olarak tanımlanan ödem tipidir (Maurer vd., 2018). Çukurlaşmayan, bağımsız ve asimetrik bir oluşum olan şişlikler, vücudun herhangi bir bölgesini etkilese de özellikle dudaklar, dil ve periorbital bölge olmak üzere yüz, farinks, gırtlak, karın bölgesi, genital bölge ve ekstremiteler anjioödem predileksiyon bölgeleridir (Kaplan, 2008).

Anjioödem çeşitli tipleri bulunmaktadır ve literatürde farklı ana başlıklar altında sınıflandırılabilir. Bununla birlikte oluşum mekanizmasındaki araçlara göre temel olarak ikiye ayrılabilir; histamin başta olmak üzere prostoglandin, lökotrien gibi mast hücre kaynaklı araçlar ile indüklenen anjioödem ve bradikinin ile indüklenen anjioödem (Tablo 1) (Misra, Khurmi, ve Trentman, 2016). Mast hücre kaynaklı araçlar ile indüklenen anjioödem tiplerinde anjioödeme ürtiker eşlik edebilirken, bradikinin indüklü anjioödem tiplerinde ise ürtiker varlığı görülmemektedir; bu bilgiye dayanarak anjioödem tipleri, ürtikerli anjioödem ve ürtikersiz anjioödem olarak genel başlık altında da incelenebilmektedir (Loverde, Files, ve Krishnaswamy, 2017).

Tablo 1. Anjioödem Tipleri

Mast hücre kaynaklı araçlar
Alerjik anjioödem
İdiopatik histaminerjik anjioödem
Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaç-indüklü anjioödem (Psödoalerjik anjioödem)
Bradikinin
Hereditör anjioödem
Kazanılmış anjioödem (Kazanılmış C1INH eksikliği)
İdiopatik non-histaminerjik anjioödem
Anjiotensinojen dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEi) indüklü anjioödem

2.1. Hereditör Anjioödem

Hereditör anjioödem (HAÖ), deride, sindirim sisteminde, ekstremitelerde ve üst solunum yolunda görülen tekrarlı ve ön görülemeyen ödem atakları ile karakterize

olan, 1/10000-1/150000 görülme sıklığına sahip otozomal dominant kalıtmımlı nadir bir hastalıktır (Bork vd., 2006; Papadopoulou-Alataki vd., 2008). Çoğu ataklar kendi kendini sınırlandırmaktadır; fakat tekrarlayan şiddetli karın ağrısı, bulantı ve kusma atakları neredeyse her beş hastadan birinde yanlılıkla Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA/Familial Mediterrenian Fever-FMF) tanısının konulmasına ve gereksiz akut batın teşhisi ile cerrahi müdahalelere yol açabilmektedir (Mete Gökmen vd., 2018). Ayrıca larinksi etkileyen ödem atakları, gerekli tedaviyi alamayan ya da geç kalınan vakalarda boğularak ölüme neden olabilir (Banerji vd., 2015). HAÖ, fiziksel ve zihinsel sağlık, eğitim, kariyer ve iş verimliliğini olumsuz yönde etkileyerek önemli derecede insani ve ekonomik yük oluşturmaktadır (Bork vd., 2006; Mete Gökmen vd., 2018).

2.1.1. Tarihçe

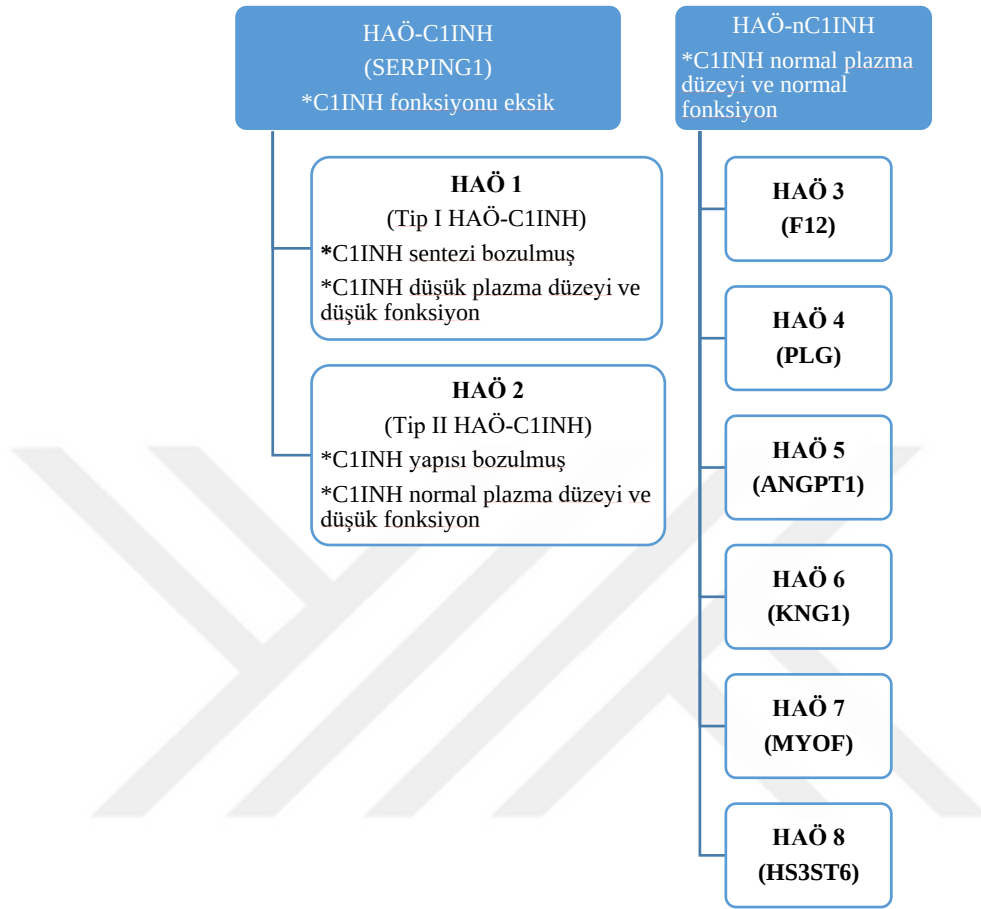
Literatürde, anjioödem için ilk klinik tam tıbbi raporun, 1882 yılında, Kiel'in Christian-Albrechts Üniversitesi'nde çalışan Alman Doktor Heinrich Ireanus Quincke tarafından bildirildiği belirtilmektedir (Reshef, Kidon, ve Leibovich, 2016). Quincke'nin klinik takibindeki akut başlangıçlı ve iyi tanımlanmış şişlik olarak tanımlanan 14 anjiyoödem vakası ile ilgili bir inceleme, Quincke'nin öğrencisi Eugen Dinkelacker tarafından doktora tezi olarak sunulmuş ve hemen ardından, 1882'de Quincke bu çalışmanın özeti olan klinik raporu yayınlamıştır (Gülbahar ve E Germenis, 2021; Quincke, 1882). Bu tarihten itibaren kullanılmaya başlanılan “Quincke'nin ödemi” terimi, birçok ülkede, özellikle yüz ve dudaklardaki ödemi tanımlamak için halen kullanılmaktadır (Reshef vd., 2016). Paroksizmal noktürn timeroglobinüriyi ilk tanımlayan Paul Strübing, 1885'te yayınladığı makalesinde "anjio-nörotik ödem" terimini kullanmış ve sinir sistemi ile ödem oluşum süreci arasındaki potansiyel ilişkiye değinmiştir (Reshef vd., 2016; Strubing, 1885). Quincke'nin raporundan altı yıl sonra, 1888'de anjioödem in hereditör yapısı ilk olarak Sir William Osler tarafından ortaya çıkarılmıştır. Osler'in takip ettiğı ana vaka olan 24 yaşındaki kadının, çocukluktan beri 1-4 gün süreli, tekrarlı ve kaşıntısız şişlik atakları sergilediğı ve en şiddetli ataklarına karın ağrıları, bulantı ve kusma eşlik ettiğı belirtilmiştir. Vaka, ailesinden 5 kuşaktan 28 kişinin daha aynı belirtilere sahip olduğunu ve 2 kişinin larengal şişlikler nedeniyle boğularak öldüğünü belirtmiştir. Bu klinik takip sonucu Osler, “Hereditör Anjiyonörotik Ödem” başlıklı makalesi yayınlamış ve bu makalede hastalığın halen geçerliliğini koruyan üç önemli özelliğini

vurgulamıştır; "vücudun çeşitli bölgelerinde lokal şişlikler, kronik gastrointestinal rahatsızlıklar ve güçlü bir şekilde belirgin kalıtsal yatkınlık" (Osler, 1888). Crowder'lar beş jenerasyonunda 15'i laringeal tutulum sonucu ölen 28 etkilenen üyesi olan bir ailede kalıtım kalıplarını incelemişler ve hastalığın otozomal dominant kalıtım şekli ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (Crowder & Crowder, 1917; Reshef vd., 2016). Uzun süre hastalığın bir nevroz sonucu gerçekleştiği kabul edilmiştir (Zuraw ve Christiansen, 2016). Hastalığın mekanizmasına dair ilk gözlem Landerman ve arkadaşları (1962) tarafından gerçekleştirilmiştir. HAÖ hastalarının plazmalarında plazma kallikrein ve şimdiki adıyla FXII olan plazma dilüsyon faktörünün inhibisyonunda bir problem varlığı gözlemlemişler, fakat bu problemin nedenini açıklayamamışlardır (Landerman, Webster, Becker, ve Ratcliffe, 1962; Zuraw ve Christiansen, 2016). Kolobrasyon halinde oldukları Donaldson ve arkadaşları ise inceledikleri üç ailede etkilenen bireylerin serumunda c1 esteraz inhibitör (C1INH) proteini yokken, etkilenmeyen bireylerin serumunda ise mevcut olduğunu saptamışlar ve bazı henüz semptom geliştirmemiş genç bireylerde de inhibitör yokluğunu keşfederek bu biyokimyasal anomalinin hastalığın kalıtsal özelliğini gösterdiğini vurgulamışlardır (Donaldson ve Evans, 1963). Ayrıca C1INH etkinliğinin hastalıktaki rolünü saptayabilmek için önemli hedefleri olan kompleman sistemin elemanlarının miktarlarını değerlendirmişler ve kompleman c4'ün de inhibitör yokluğuna bağlı olarak bu hastalarda düşük olduğunu belirlemişlerdir (Donaldson ve Rosen, 1964). Bu iki çalışma sonucu HAÖ patolojisi için daha net bir biyokimyasal açıklama getirmişlerdir (Zuraw ve Christiansen, 2016). Aynı ekibin yaptığı bir sonraki çalışmada normal serum C1INH protein seviyesi varlığına rağmen fonksiyonel aktivite yokluğu olan HAÖ hasta grubu varlığını tanımlamışlar ve iki farklı genetik kalıtımın varlığını vurgulayarak ilk kez iki farklı HAÖ tipi olabileceğini göstermişlerdir. (Rosen, Charache, Pensky, ve Donaldson, 1965). Hastalığın biyokimyasal karakteristiğini ortaya çıkaran çalışmaların ilerlemesi sonucu 1970'lerden sonra "nörotik" terimi kullanımdan kalkmıştır (Reshef vd., 2016). C1INH'yi kodlayan gen *SERPING1*'in 1986'da klonlanması, HAÖ ilişkili genetik varyasyon çalışmalarının gerçekleştirilebilmesini sağlamış ve o tarihten günümüze kadar yapılan bu çalışmalarla C1INH'nin miktar ya da fonksiyonel yoksunluğuna yol açan bir çok *SERPING1* gen varyasyonları ortaya çıkarılmıştır (Bock vd., 1986; Reshef vd., 2016; Zuraw ve Christiansen, 2016). Bork ve Binkley 2000 yılında yaptıkları çalışmalar ile C1INH'nin

antijenik seviyesinin ve fonksiyonel aktivitesinin normal olduğu HAÖ hasta profillerini tanımlamışlardır. İlk kez üçüncü bir tip HAÖ profilinin varlığını ortaya çıkarmış oldukları bu çalışmalarında, Bork bu profilin kadınlarda daha yaygın olduğunu, Binkley ise patolojisinin östrojen bağımlı olarak FXII ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (Binkley ve Davis III, 2000; Konrad Bork, Barnstedt, Koch, ve Traupe, 2000).

2.1.2. Sınıflandırma ve Genetik

Hereditör anjioödem, C1 esteraz inhibitör proteininin (C1INH) plazma seviyesine ve fonksiyonel aktivite derecesine göre üç tipe ayrılmaktadır: düşük C1INH protein seviyesi ve yetersiz C1INH fonksiyonu ile Tip I HAÖ; normal C1INH seviyesi sergilemesine rağmen yetersiz fonksiyon ile Tip II HAÖ; normal C1INH seviyesi ve normal fonksiyonla seyreden HAÖ (Cicardi vd., 2014; Csuka, Veszeli, Varga, Prohászka, ve Farkas, 2017). C1INH fonksiyonunun yetersiz olduğu Tip I ve Tip II HAÖ, tek bir başlık altına alınıp C1 inhibitör eksikliğine bağılı hereditör anjioödem HAÖ-C1INH olarak adlandırılmaktadır (HAE; Online Mendelian Inheritance in Man; OMIM #106100). Tüm HAÖ-C1INH olgularının yaklaşık %85'ini Tip I HAÖ oluştururken, %15'ini Tip II HAÖ oluşturmaktadır (Zuraw, 2008). Normal C1INH seviyesi ve normal fonksiyonla seyreden hereditör anjioödem hastalıkları ise normal C1INH ilişkili hereditör anjioödem HAÖ-nC1INH olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.) (Csuka vd., 2017). HAÖ-nC1INH ise, faktör XII, plasminojen, anjiopoietin-1, kininojen-1, myoferlin ve heparan sülfat glukozamin 3-sülfotransferaz 6 proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlarla ilişkilendirilerek her biri farklı alt tip olarak sınıflandırılmaktadır (Santacrose vd., 2021).



Şekil 1. Herditer anjioödem sınıflandırılması

HAÖ-C1INH hastalarında, C1INH proteinini kodlayan 11. kromozom (11q12-q13.1) üzerindeki 8 ekzonlu *SERPING1* (serpin peptidaz inhibitör, (C1 inhibitör), üye 1) (OMIM no. 606860; GenBank NM_000062.2) geninde mutasyon varlığı söz konusudur (Csuka D, Szilágyi Á, 2015). Günümüze kadar HAÖ-C1INH ile ilişkili 59 tanesi tek nukleotit polimorfizmi (SNP) olmak üzere 748 farklı *SERPING1* gen varyasyonu bildirilmiştir. Bunların %36,2'sini çerçeve kaymasına neden olabilen kısa delesyonlar, duplikasyonlar ve indeller, %32,1'ini yanlış anlamlı (missense) varyantlar, %13,6'sını uçbirleştirme (splicing) defektleri, %9'unu anlamsız (nonsense) varyantlar, %8,2'sini büyük delesyon ve duplikasyonlar ve %0,9'unu 5' – 3' UTR

(trasnslasyona uğramayan bölge) dizilerindeki birkaç varyant oluşturmaktadır ve bunların 500'den fazlası HAÖ kliniğinden sorumlu mutasyonlar olarak HGMD'de (İnsan geni mutasyon veri tabanı) yer almaktadır (Ponard vd., 2020).

C1INH eksikliğine bağlı hereditör anjioödem olgularının %80-85'ini oluşturan Tip I HAÖ-C1INH'de, mutasyon sonucu eksik ya da yanlış katlanmış C1INH sentezlenmekte ve bu bozuk protein hücre dışına salgılanamayarak hücre içerisinde polimerize olup birikmekte ve bunun sonucunda plazma C1INH düzeyinin düşük olması ve bu nedenle C1INH fonksiyonunun da düşük olmasına yol açmaktadır (Caccia vd., 2018). Tip I HAÖ-C1INH'de mutasyonlar tüm gen boyunca görülebilirken, C1INH eksikliğine bağlı hereditör anjioödem olgularının %15-20'ini oluşturan Tip II HAÖ-C1INH'de genellikle ekzon 8'de dağılım gösteren proteinin fonksiyonel aktivasyonunu engelleyen yanlış anlamlı mutasyon varlığı yaygındır (Henao, Kraschnewski, Kelbel, ve Craig, 2016). Bunların içerisinde de büyük çoğunluğu proteinin karboksil ucunda yer alan reaktif bölgesinde değişime yol açmaktadır ve bu değişimlerden en yaygın olarak görülenleri, reaktif bölgede P1 olarak adlandırılan kısımdaki Arg466Pro ve Thr467Pro değişimleridir (Johnsrud vd., 2015; Ponard vd., 2020). Öncesinde %20-25 olduğu belirtilmekle birlikte, güncel bilgilere göre olguların yaklaşık %5,6 sında *de novo* mutasyon gelişimi olmaktadır (Germenis, Rijavec, ve Veronez, 2021). Genel özelliğe bakıldığında yaygın olarak heterozigot otozomal dominant kalıtım gösteren mutasyonların mevcut olduğu görülmekte; bununla birlikte hem Tip I hem de Tip II fenotip için homozigot otozomal resesif kalıtım gösteren mutasyonların varlığı da söz konusudur (Germenis, Rijavec, vd., 2021; Ponard vd., 2020).

HAÖ, iki klasik tipin yanı sıra, klinik olarak normal C1INH protein ve fonksiyonel seviyesi bulunan HAÖ hasta tanısı ile farklı HAÖ tipi varlığı tanımlanmıştır; HAÖ-nC1INH. Klasik tiplere nazaran çok daha nadir görülen HAÖ-nC1INH, %24,5 vakada koagülasyon faktör XII'yi (FXII) kodlayan 14 ekzonlu *F12* geninde tanımlanmış mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (K. Bork, Wulff, Witzke, ve Hardt, 2015). FXII-HAÖ-nC1INH'de (HAÖ 3, OMIM 610618), en çok katalitik domain dışında kalan proline zengin bölgede oluşan ve yer alan T309 yanlış anlamlı mutasyonu (ekzon 9, c.1032C>A p.T309K ya da c.1032C>G p.T309R değişimleri) olmak üzere ve yine bu bölgeyi etkileyen delesyon/insersiyon (ekzon 9/intron 9 c.971_1018+24del72*) ve duplikasyon (ekzon 9, c.892_909dup) mutasyonlarının görüldüğü bildirilmiştir

(Konrad Bork vd., 2011; Dewald ve Bork, 2006; Kiss vd., 2013). *F12* mutasyonları, muhtemel olarak FXII fonksiyon kazanımına yol açmaktadır (Santacroce vd., 2021). Son zamanlarda FXII mutasyonu olmayan HAÖ-nC1INH olgularında muhtemel mutasyonların tanımlanması HAÖ çalışmalarının yaygın konusu olmuştur. Genetik alt yapısı bilinmeyen bu normal C1INH'li HAÖ vakalarındaki muhtemel mutasyonların tanımlanması amacıyla yapılan farklı çalışmalarda normal C1INH'li HAÖ için diğer potansiyel alt tipleri oluşturan beş farklı gende mutasyon tanımlanmıştır.

Bunlardan ilki fibrinolitik sistemin (plazminojen sistemi) önemli molekölü plasminojeni kodlayan 6. kromozom üzerindeki 19 ekzonlu *PLG* geninde bulunmuştur (HAÖ 4, OMIM 619360). Bork vd. (2018), belirsiz genetik altyapıdaki normal HAÖ'lü hastalarda yeni genetik anomalileri tanımlamak amacıyla 7 aileden 22 örnek (20 hasta, 2 non-semptomatik) ile yaptıkları tüm ekzom dizileme çalışması sonucu *PLG* geninde K330E (K3 domaininde K76E) değişimine yol açan ekzon 9'da lokalize bir yanlış anlamlı mutasyon (c.988A>G) tespit etmişler ve otozomal dominant kalıtımla heterozigot genotip sergilediğini belirtmişlerdir (K. Bork vd., 2018). Aynı zamanlarda Dewald ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada yine aynı *PLG* gen bölgesinde lokalize K311E (K3 domaininde K57E) değişimine yol açan bir yanlış anlamlı mutasyon (c.1100A>G), varlığı bildirilmiştir (Dewald, 2018). Bu mutasyon, Bork ve arkadaşları tarafından bildirilen orijinal mutasyona benzemekle birlikte, Dewald ve ark., izoelektrik odaklama ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanarak plazminojen protein paternini incelediklerinde PLG-HAE'li hastaların “displazminojenemi” olarak adlandırılan değişmiş plazminojen protein paternleri olduğunu bulmuşlardır (Dewald, 2018; Sharma vd., 2021). PLG-HAÖ-nC1INH'nin moleköl mekanizması bilinmemekle birlikte bu lizin aminoasit değişimlerinin zimojen protein plazminojen ve aktif formu plazminin düzensiz ve/veya yeni ligand etkileşim şekli oluşturacak diğer molekölle bağlama özelliğini değiştirmiş olabileceği öne sürülmüştür (K. Bork vd., 2018; S. De Maat vd., 2018; Dewald, 2018).

HAÖ-nC1INH alt tipini oluşturan bir diğer gen mutasyon, bir multimerik glikoprotein anjiopietin-1'i kodlayan 8. kromozom üzerindeki 9 ekzonlu *ANGPT1* geninde bulunmuştur (HAÖ 5, OMIM 619361). Bafunno vd. (2018), 25 belirsiz genetik altyapıdaki normal HAÖ'lü hasta bulunan 10 İtalyan aile bireylerinde yapılan tüm ekzom dizileme sonucu anjiopietin-1 (*ANGPT1*) geninde bir yanlış anlamlı

varyasyon (c.807G>T, p.A119S) tespit etmişlerdir (Bafunno vd., 2018). Vasküler sızıntılara karşı damar bütünlüğünü koruma fonksiyonu gösteren anjiopietin-1'in sarmal bobin domaininde yer alan bu mutasyon, proteinin multimer yapı oluşturmalarını engelleyerek vasküler dengenin bozulmasına yol açmaktadır (S. De Maat vd., 2018; Sharma vd., 2021). Diğer potansiyel patojenik varyantlar p.Ala8Val (c.23C>T); p.Gln370H (c.1110G>C) ise, bir ön çalışma ile ortaya çıkarılmıştır, fakat bu varyantlar destekleyen kanıt sunacak çalışmalara gereksinim duymaktadır (Cagini vd., 2018; Santacroce vd., 2021).

HAÖ-nC1INH alt tipini oluşturan üçüncü gen mutasyonu hem yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HK) hem de düşük molekül ağırlıklı kininojeni (LK) kodlayan 3. kromozom üzerindeki 11 ekzonlu *KNG1* geninde bulunmuştur (HAÖ 6, OMIM 619363). Bork ve ark. (2019), bilinen bir genetik varyasyona sahip olmayan HAÖ-nC1INH'li bir ailenin etkilenmiş altı üyesinin hepsinde ekzon 10'da yer alan p.Met379Lys (c.1136 T>A) değişimini saptamışlardır. Otozomal dominant kalıtımla aktarıldığı belirtilen bu değişim, HK ve LK'nin N-terminal kesim bölgesinde değişiklik yaratmaktadır (Konrad Bork vd., 2019).

HAÖ-nC1INH alt tipini oluşturan dördüncü gen mutasyonu miyoblast ve endotelial membranında yer alan tip II integral membran proteini miyoflerin proteinini kodlayan 10. kromozom üzerinde yer alan 59 ekzonlu *MYOF* geninde bulunmuştur (HAÖ 7, OMIM 619366). Ariano ve ark. (2020), HAÖ-nC1INH'li bir anne ve iki kızında, ekzon 7'de yer alan bilinen bir varyasyon olan p.Arg217Ser (c.651G>T, rs1256778304) değişimini saptamışlardır. Otozomal dominant kalıtımla aktarıldığı belirtilen bu bilinen değişimin, HAÖ kliniği için patojenik bir değişim olduğu kabul edilmiştir (Ariano vd., 2020; Sharma vd., 2021).

HAÖ-nC1INH bilinen son alt tipini oluşturan gen mutasyonu heparan sülfat (HS) biyosentezinin son aşamasında görev alan heparan sülfat glukozamin 3-sülfotransferaz 6 proteinini kodlayan 16. kromozom üzerinde yer alan 4 ekzonlu *HS3ST6* geninde bulunmuştur (HAÖ 8, OMIM 619367). Bork ve ark., (2021), bir ailenin etkilenmiş üç bireyinde tamamlanmamış HS biyosentezine yol açan p.Thr144Ser (c.430A>T) değişimini saptamışlardır (Konrad Bork, Wulff, vd., 2021).

2.1.3. Patofizyoloji

Hastalığın patofizyolojisini bir vazodilatör peptit olan bradikininin artmış üretimi nedeniyle gelişen vasküler reaksiyonlar oluşturmaktadır (Walford ve Zuraw, 2014). Bradikinin, histamin gibi, vasküler düz kasları gevşeterek kan basıncını düşürmekte ve vasküler geçirgenliği artırmaktadır. Ani gelişen alerjik reaksiyonun geç fazında anjioödeme aracılık edebilmesiyle birlikte, temel olarak histaminin aksine alerjik olmayan anjiodeme aracılık etmektedir (Obtułowicz, 2016).

2.1.3.1. Bradikinin ve Bradikinin Üretim Mekanizması

Bradikinin, plazma kallikrein-kinin sistemi ile plazmada öncüsü olan yüksek molekül ağırlıklı kininojenden (HK, 110 kDa) üretilen dokuz amino asitlik (RPPGFSPFR) bir peptittir (Levi, Cohn, ve Zeerleder, 2019). Diğer önemli kinin ise, dokuda, düşük moleküler ağırlıklı kininojenin (68 kDa) doku kallikreinleri tarafından kesilmesi sonucu oluşan N-terminalinde ilave bir lizin amino asiti içeren on amino asitlik (KRPPGFSPFR) peptid olan ve kallidin olarak isimlendirilen lizil-bradikininidir (S. De Maat vd., 2018). Kinin metabolizması, kininleri ve diğer peptidleri hidrolize edebilen kininazlar tarafından düzenlenmektedir. Anjiotensin-dönüştürücü enzim (ACE) ya da diğer adıyla kininaz II, nötral endopeptidaz 24.11 (NEP-24.11), aminopeptidazlar ve karboksipeptidazlar bilinen kinazlardır. Endojen plazma kininlerinin yarılanma ömrü 20 saniyeden azdır (Hamid, Rhaleb, Kassem, ve Rhaleb, 2020). Kallidin, aminopeptidazlarla bradikinine dönüştürülebilmektedir (Kaplan ve Ghebrehiwet, 2010). Kininler, biyolojik etkilerini iki ayrı G-protein bağlı kinin resptörleri, reseptör kinin B2 reseptörü (B2R) ve kinin B1 (B1R) reseptörü aracılığıyla iletmektedir (Zuraw ve Christiansen, 2016). Bradikinin ve kallidin, ligand olarak vasküler endotelial hücrelerde yapısal olarak ifade edilen G-protein bağlı yedi geçişli transmembran reseptör B2R tarafından tanınmaktadır. Aktiflenen reseptör, G-proteinleri aracılığıyla nitrik oksit (NO), prostaglandin I₂ (prostasiklin) ve/veya prostaglandin E₂ (PGE₂) gibi ikincil vazodilatörlerin, düz kas hiperpolarizasyon faktörünün ve süperoksitin üretim ve salınımlarını uyarmaktadır (Alvin H. Schmaier ve McCrae, 2007). B2R bir kez aktiflendiğinde, hızla duyarsızlaştırılmakta ve “downregüle” edilmektedir (Zuraw ve Christiansen, 2016). İndüklenebilir koşulda ifade edilen B1R’nin ligandlarını ise, karboksipeptidazlar ya da diğer adıyla kininaz I (karboksipeptidaz N ve karboksipeptidaz M) tarafından kininlerin karboksi ucundaki

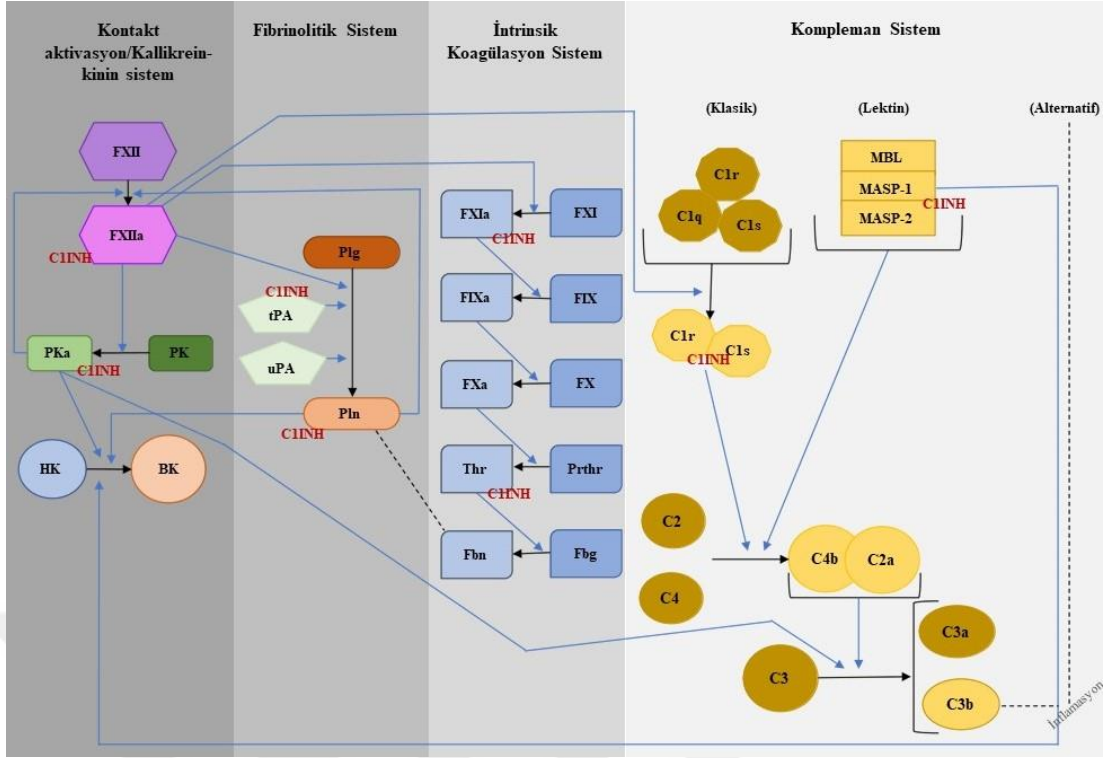
arjinin rezidüsünden kesilmesi ile oluşan bradikinin ve kallidinin biyoaktif metabolitleri [des-Arg9]-bradikinin ve [des-Arg10]-Lys-bradikinin oluşturmaktadır (Hamid vd., 2020).

Plazma kallikrein-kinin sistemi (KKS) ya kontakt aktivasyon sisteminin (KAS) bir parçası ya da sinonimi olarak ifade edilebilmektedir. KAS, negatif yüklü yüzeyler üzerinde faktör XII'nin (FXII) otomatik aktivasyonu ile başlatılan bir proteolitik sistemi ifade etmektedir (A. H. Schmaier, 2016). Bir serin proteaz olan FXII aktive olduğunda (FXIIa), prekallikrein (PK) başka bir serin proteaz olan plazma kallikreinine (PKa) dönüşümünü katalizlemekte ve oluşan PKa da resiprokal olarak FXII aktivasyonunu tetiklemektedir. Bununla birlikte, endotelial hücre yüzeyinde, endotelial hücre türevli ısı şok protein 90 ve prolikarboksipeptidaz aracılığıyla FXII bağımsız olarak PK'nın PKa'ya dönüşümü gerçekleşebilmektedir (Hofman, de Maat, Hack, ve Maas, 2016). FXIIa, aynı zamanda FXI'in aktivasyonunu sağlayarak intrinsik koagülasyon sistemini aktive edebilmektedir. PKa da FXI yokluğunda FIX'un aktivasyonunu katalizleyerek intrinsik koagülasyon sistemine katılabilmektedir (Visser vd., 2020). FXIIa ve PKa, sırasıyla C1r-C1s ve C3 serin proteazlarının aktifleyici kesimlerini sağlayabilmeleri ile kompleman sistem aktivasyonuna da katılabilmektedir (Kaplan ve Maas, 2017; López Lera, 2021). Hem PKa hem de FXIIa plazminojen aktivatörü olarak rol oynamaları ile genellikle koagülasyon sistemi ile eş zamanlı aktive olduğu belirtilen fibrinolitik sistemine de katılmaktadır. Fibrinolitik sistemin önemli elemanı plazmin, düşük bir etkinlikte FXII'nin kesimini tetikleyerek kontakt aktivasyon sistemini aktive edebilmektedir. Plazmin ayrıca, tek bir amino asit farkı ile neredeyse PKa ile aynı şekilde HK'yi spesifik olarak kesebilmekte ve böylece bradikinin üretimine katılabilmektedir (S. De Maat vd., 2018). Öyle ki, bradikinin üretim mekanizmasında kontakt aktivasyon ve fibrinolitik sistemin etkileşim halinde olduğu belirtilmektedir (Kaplan ve Maas, 2017). Ayrıca, bu sistemlerden ayrı olarak, HK'nin, kompleman sistemde yer alan mannoz-bağlayan lektin-ilişkili serin proteaz-1 (MASP-1) tarafından doğrudan kesilebilmesi ile de bradikinin oluşumu gerçekleşebilmektedir (Kaplan ve Joseph, 2017).

2.1.3.2. HAÖ-C1INH'de Patofizyolojik Mekanizması

Başlıca hepatositlerde olmak üzere, genel olarak monositler, fibroblastlar ve endotelial hücrelerde üretilen C1INH, kompleman (klasik yolak, C1r ve C1s; lektin

yolağı, MASP1 ve MASP2), kontakt aktivasyon (Faktör XII ve kallikrein), koagülasyon (Faktör XI ve trombin) ve fibrinolitik (tPA ve plazmin) sistem olmak üzere farklı plazmatik kaskatlardaki çeşitli serin proteazların inaktivasyonunu yöneten bir multi-fonksiyonel serin proteaz inhibitör proteindir (Ghannam vd., 2016). 2.1.3.1. “Bradikinin ve Bradikinin Üretim Mekanizması” başlığı altında da ifade edildiği gibi, C1INH tarafından kontrol edilen bu yollar, aralarındaki bağlantı nedeniyle birbirlerinin aktivasyonunu tetikleyebilmektedir (Şekil 2). C1INH bozukluğu ya da yetersizliği nedeniyle bu yollardaki inhibisyonun ortadan kalkması, C1INH’nin FXIIa’nın %93’ünün inhibisyonundan, PKa’nın %52’sinin inhibisyonundan sorumlu olması nedeniyle özellikle kontakt sistemin kontrolsüz aktivasyonuna yol açmakta ve böylece HAÖ-C1INH kliniğini ortaya çıkaran HK’den bradikinin oluşumundaki aşırı artışa sebebiyet vermektedir (S. De Maat vd., 2018; Hofman vd., 2016). Artmış bradikinin, endotel hücrelerdeki bradikinin B2 reseptörüne (B2R) bağlanıp onun aşırı aktivasyonuna yol açmakta ve böylece vasküler permeabilitede ve lokalize ekstrasvazasyondaki kontrolsüz artış ile anjioödem gelişmektedir (S. De Maat vd., 2018; Walford ve Zuraw, 2014). C1INH eksikliğinde inhibe edilemeyen PKa’nın, yaklaşık %48’i, diğer önemli düzenleyicisi α -2 makroglobulin tarafından inhibe edilerek eksiklik giderilmeye çalışılmaktadır, öyle ki HAÖ atakları sırasında PKa+ α -2 makroglobulin komplekslerinin arttığı bildirilmiştir (S. De Maat vd., 2018; Kaufman vd., 1991; López Lera, 2021).



Şekil 2. Kontakt aktivasyon sistemi, fibrinolitik sistem, koagülasyon sistem, kompleman sistem etkileşimi ve C1INH'nin bu yollardaki inhibisyonundan sorumlu olduğu serin proteazlarla etkileşim şeması. FXIIa, aktif FXII; PKa, plazma kallikrein; HK, yüksek molekül ağırlıklı kininojen; BK, Bradikinin; tPA, doku plazminojen aktivatörü; uPA, ürokinaz plazminojen aktivatörü; Plg, plazminojen; Plm, plazmin; FXIa, aktif FXI; FIXa, aktif FIX; FXa, aktif FX; Prthr, Protrombin; Thr, Trombin; Fbg, Fibrinojen; Fbn, Fibrin.

2.1.3.3. HAÖ-nC1INH'de Patofizyolojik Mekanizma

Kontakt aktivasyon sistemin önemli bir bileşeni olan FXII'de bulunan mutasyonlar sonucu nasıl HAÖ kliniğine yol açtığına dair iki hipotez sunulmuştur. Birine göre, T309K ve T309R mutasyonları, FXII'nin O-bağlı glikozilasyonunun engellemekte ve böylece FXII'nin çözülebilir polianyonlara afinitesinin artmasına neden olmaktadır. Diğerine göre ise, T309K ve T309R mutasyonları ile delesyon/insersiyon mutasyonunda FXII'nin plazmin tarafından enzimatik kesim bölgesi artmaktadır. Her iki hipoteze göre sonuç olarak, FXII, fonksiyonel artış sergilemekte ve böylece angioödem ataklarına yol açan artmış bradikinin üretimine yol açmaktadır (Bjorkqvist vd., 2015; Steven de Maat vd., 2016).

Faktör XII'nin plazmin tarafından aktivasyona daha duyarlı hale geldiği F12 gen mutasyonunun aksine, PLG-HAÖ hastalarında, faktör XII'nin plazmine karşı normal duyarlılıkta olduğu bulunmuştur (Maas, 2019). N-terminal ön aktivasyon kısa peptit bölgesi (11 amino asit), 5 kringle alanı (K1-K5), bir aktivasyon bölünme alanı ve bir

katalitik alan içeren 791 amino asitlik PLG proteinin kringle 3 alanındaki gen mutasyonları, protein yapısını ve işlevini değiştirebilmektedir (Christen, Frank, Schaller, ve Llinás, 2010). Kringle 3 alanı, PLG proteininin çoklu endotelial reseptör proteinlerine bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Mutant PLG proteini bu nedenle doku aktivatörleri için daha yüksek afinite sergileyebilmektedir. Bu durum, fibrinolitik sistemin aktivasyonunun artmasına, ardından plazmin oluşumunun artmasına, KKS'nin aktivasyonuna ve nihayetinde BK üretiminin artmasına neden olabilmektedir (Sharma vd., 2021).

Hematopoietik kök hücreler, hematopoietik öncü hücreler, megakaryositler, vasküler düz kas hücreleri, plateletler, perisitler, monositler ve nötrofillerde yapısal olarak ifade edilen ve salınan 70 kDa'luk bir glikoprotein olan angiopoietin, damar endotelinde bulunan dimerik endotel hücre reseptörü "tunica interna endothelial cell kinase 2" (TIE2) reseptörüne bağlanarak vasküler sızıntılara karşı damar bütünlüğünü korumakta ve anjiyogenez sürecini düzenlemektedir (Charles vd., 2021; S. De Maat vd., 2018; Zhou, Ding, ve Morrison, 2015). *ANGPT1* mutasyonu nedeniyle proteinin dimerik ve trimerik formları oluşurken multimer formu oluşamamaktadır ve bu nedenle TIE2 reseptörüne bağlanma kabiliyeti bozulmaktadır (Bafunno vd., 2018). Böylece normalde bu reseptör üzerinden inhibisyonunu gerçekleştirdiği, bradikinin ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) aracılı olarak üretilen hücre içi vasküler sızıntı faktörleri inhibe edilemediğinden permeabilite artışı ile vasküler sızıntının oluşması sonucu hereditör anjiyoödem kliniği görülmektedir (Bafunno vd., 2018; Sharma vd., 2021).

KNG1-HAÖ-nC1-INHli hastalarda C1INH antijen seviyesi, fonksiyonu, C4 seviyesi, plazminojen aktivitesi ve FXII/FXI koagülasyon aktivitelerinin normal olmasının yanı sıra PK ve HK seviyeleri de normaldir. Kliniğe yol açan durum, mutasyon nedeniyle oluşan HK ve LK'nin N-terminal kesim bölgesindeki değişimin anormal bradikinin üretimine yol açmasıdır. Bu anormal bradikinin fonksiyonel olarak aktiftir, ancak ACE veya amino peptidaz-2 (AP2) gibi enzimler tarafından kesilmeye dirençli hale gelebilmekte ve bu da yarı ömrünün uzamasına ve normal aktiviteden daha yüksek olmasına neden olmaktadır (Konrad Bork vd., 2019).

Myoferlin, miyoblastlarda ve endotel hücrelerinde membran onarımını, tirozin kinaz reseptör fonksiyonunu ve endositozu düzenleyen çok sayıda kalsium bağımlı fosfolipid bağlama özelliği sağlayan C2 alanı içeren bir tip II transmembran proteindir

(Blomme vd., 2017). Endotelyal hücre membranında bulunan KDR (vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2) seviyesini düzenleyerek VEGF sinyal iletimine katkı sağlamaktadır (Bernatchez vd., 2007). MYOF genindeki p.Arg217Ser değişimi fonksiyon kazanımına yol açarak, endotelyal hücre membranında lokalize KDR miktarında artışa neden olmakta ve böylece VEGF aracılı vasküler sızıntıdaki artış ile HAÖ kliniği ortaya çıkmaktadır (Ariano vd., 2020; Sharma vd., 2021).

Heparan sülfat (HS) 3-O-sülfotransferazlar, heparan sülfatların ve heparin polisakkaritlerin glukozamin rezidülerine 3-O pozisyonuna sülfat transfer eden bir enzim grubudur. HS3ST6, bu enzim grubunun farklı substrat spesifikliğine sahip yedi izoformundan biridir (Xu vd., 2005). Tam mekanizması kesin olmamakla birlikte, *HS3ST6* genindeki mutasyon nedeniyle gerçekleşen tamamlanmamış HS biyosentezinin, anjioödem oluşumundaki kilit aktörlerin hücre yüzeyi etkileşimlerini etkilediği ve bunun bradikinin aşırı üretimine yol açarak HAÖ kliniğine neden olduğu belirtilmiştir (Konrad Bork, Wulff, vd., 2021; Santacrose vd., 2021).

2.1.4. Klinik Profil

HAÖ'nün çok sayıda görünüm ve semptom içeren oldukça değişken bir klinik seyri vardır. Tüm HAÖ tiplerinde ortak klinik özellik, kütanöz şişmeye neden olan tekrarlayan anjioödem, gastrointestinal anjioödem kaynaklı abdominal semptomlar (şiddetli karın ağrısı, bağırsak tıkanıklığı, iştahsızlık, bulantı, kusma, diyare gibi) ve solunum yolu tutulumu kaynaklı solunum semptomlarıdır (Busse vd., 2021). HAÖ, ürtiker ve kaşıntı ile ilişkili değildir; bununla birlikte HAÖ-C1INH'de ürtikeri taklit edebilen geçici, kaşıntısız bir maküler döküntü olan eritema marginatumun prodromal semptomları görülebilmektedir (Busse vd., 2021; Fu, Freedman-Kalchman, Betschel, ve Sussman, 2016). HAÖ-nC1INH hastalarında eritema marginatum yoktur, ancak sıklıkla anjioödem arkasından cilt içine kanama (ekimoz) olabilmektedir (Fu vd., 2016). Ataklar spontan gelişebilmekle birlikte, travma, medikal ya da dental prosedürler, duygusal stres, menstrüasyon, enfeksiyon, eksojen östrojenler veya anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ile tetiklenebilmekte ve ayrıca bunlar genellikle mevcut semptomları daha da kötüleştirmektedir (Busse vd., 2021; Patel ve Pongracic, 2019). Atak süresince, şişme, histamin indüklü anjioödemle kıyasla daha uzun süreli olarak gerçekleşir; genellikle ilk 24 saat içinde yavaş ama amansız bir şekilde şiddetlenmekte, daha sonra 48-72 saat içinde ise yavaş yavaş azalmaktadır (Fu

vd., 2016). Öyle ki, etkin bir tedavi alınmazsa, önemli morbidite ve mortalite riski ile semptomun tamamen çözümü 3-5 gün sürmektedir (Busse vd., 2021). HAÖ semptomları, antihistaminler, kortikosteroidler gibi mast hücre hedefli tedavilere yanıt vermez. HAÖ'deki şişlikler, bahsedilen tedavilere yanıt veren, kronik spontan ürtikerli (KSÜ) hastalardaki tekrarlayan mast hücre aracılı anjioödem kaynaklı şişlikler gibi haftalarca veya daha uzun süre kalıcı değildir (Busse vd., 2021; Maurer vd., 2018). KSÜ'de anjioödem, sıklıkla yoğun kaşıntılı (pruritik) kabarcık ve birden alevlenen deri reaksiyonları (kurdeşen) ile ilişkili olmakla birlikte, bu hastalarda yalnızca anjioödem gelişebilmesi ve bu hastalığın HAÖ hastalarını da etkileyebilmesi nedeniyle bu klinik özellikler, ayrıca, ayırıcı tanı kriteri taşımaktadır (Maurer vd., 2018). HAÖ'de, şişme şiddeti ve sıklığı, aynı aile üyesinde hastalar arasında bile oldukça değişkendir; ayrıca şişlik bölgesi de farklı hastalar arasında ve tek bir hasta kapsamında, ataklar arasında değişkenlik gösterebilmektedir (Busse vd., 2021; Fu vd., 2016).

HAE-C1INH, bazen 2 yaş kadar erken bir dönemde görülebilmek üzere, tipik olarak çocukluk veya genç erişkinlik döneminde semptomatik hale gelmektedir (Fu vd., 2016). HAE-C1INH'li olguların yaklaşık %50'si, 10 yaşına kadar şişlik semptomları göstermekte ve ergenlikle birlikte sıklığı ve şiddeti artmaktadır (Busse vd., 2021; Fu vd., 2016). Çocuklarda en sık bildirilen başlangıç semptomu, karın ağrısı ile sonuçlanan bağırsak duvarı ödemidir ve nadir olmakla birlikte solunum yolu şişmesi yüksek mortalite riski ile çocuklarda görülen ilk semptom olabilmektedir. Nadiren, yeni doğanlarda HAE-C1INH'nin ilk göstergesi olarak eritema marginatum olabilmektedir (Busse vd., 2021). HAE-C1INH'li olguların büyük bir çoğunluğu 20 yaşına kadar semptom göstermektedir; bununla birlikte yaklaşık %4'ü ilk atağını 40 yaşından sonra yaşayabilmekte ve hatta çok daha nadir bir kısmı hiç semptom göstermeyebilmektedir (Busse vd., 2021; Henao vd., 2016).

HAÖ-nC1INH olguları, bazı farklılıklarla birlikte genel olarak HAÖ-C1INH olguları ile benzer klinik profil sergilemektedir (Busse vd., 2021). HAÖ-C1INH olgularına kıyasla, abdominal semptomlar daha az, yüz ve özellikle HAÖ 4'te (HAÖ-PLG) olmak üzere dili etkileyen semptomlar daha sıktır ve ayrıca HAÖ-nC1INH penetransı genellikle daha düşüktür (Busse vd., 2021; Cicardi vd., 2014; Sharma vd., 2021). Kadınlarda HAÖ-nC1INH görülme sıklığı erkeklere nazaran daha sıktır ve daha fazla semptomatiktir. Semptomlar östrojene duyarlı olabilmektedir; özellikle, HAÖ 3'te

(HAÖ-F12) yüksek endojen veya eksojen östrojenlere maruz kalma, HAÖ 5'te (HAÖ-MYOF) menstrüasyon güçlü bir tetikleyicidir (Busse vd., 2021; Sharma vd., 2021). HAÖ-nC1INH semptomları, genel olarak 20'li yaşlarda başlamakla birlikte, HAÖ-F12'li olguların yaklaşık %10-14'ü 12 yaşından önce semptom gösterebilmektedir. Ayrıca prevalansı kadınlarda daha yüksek olmasına rağmen, erkeklerin 4 yaşı gibi genç bir yaşta semptom geliştirebildiği bildirilmiştir (Busse vd., 2021).

2.1.5. Tanı ve Tedavi

Bir hasta tekrarlayan anjioödem atakları öyküsü ile başvurduğunda HAÖ'den şüphelenilmeli ve bu şüphe, hastaların şu koşulları bildirmesi ile doğrulanmalıdır: 1) Pozitif bir aile öyküsü (de novo mutasyondan da kaynaklanabilir), 2) Semptomların çocukluk/ergenlik döneminde başlaması, 3) Tekrarlayan ve ağrılı karın semptomların varlığı, 4) Üst solunum yolu ödemi oluşumu, 5) Antihistaminikler, glukokortikoidler veya epinefrine yanıt vermemesi, 6) Şişliklerden önce prodromal belirti veya semptomların varlığı ve 7) ürtiker yokluğu (Maurer vd., 2018).

HAÖ şüphesi olduğunda, rutin olarak belirli biyokimyasal tanı testleri uygulanmaktadır; bu testler, C1INH, C4 ve C1q serum konsantrasyonlarının belirlenmesi ve C1INH fonksiyonel analizidir (Manning, 2020). C1INH, C4 ve C1q serum konsantrasyonları, radyal immünodifüzyon, nefelometrik/turbidimetrik veya ELISA yöntemleri kullanılarak, C1INH fonksiyonel analizi ise kromojenik analiz ya da ELISA yöntemleri kullanılarak belirlenmektedir (Grumach, Veronez, Csuka, ve Farkas, 2021). Tip I HAÖ-C1INH'de C1INH'nin hem konsantrasyonu hem de fonksiyonu düşüktür, Tip II HAÖ-C1INH'de C1INH konsantrasyonları ya normaldir ya da yüksektir, C1INH fonksiyonu ise azalmıştır. HAÖ-C1INH hastalarında C4 seviyeleri genellikle düşüktür, ancak duyarlılığı ve özgüllüğü sınırlıdır. Anormal sonuçlar doğrulanmalıdır (Maurer vd., 2018). C1q seviyesinin belirlenmesi, semptomları ve temel tanısal laboratuvar profili (C1-INH fonksiyonu, C1-INH ve C4 serum konsantrasyonu) Tip I HAÖ-C1INH'ninkilere benzeyen kazanılmış C1IH eksikliğine bağlı anjioödem (AAE-C1INH) dışlamak amacıyla ayırıcı tanı testi olarak yapılmaktadır (Grumach vd., 2021). HAÖ'de C1q seviyesi hemen hemen her zaman normal iken, AAE-C1INH'li hastaların %75'inde C1q seviyesi düşüktür. Düşük C1q seviyelerinin bulunmasının yanı sıra, daha ileri yaşta başlangıç, lenfoma veya iyi huylu monoklonal gammopati (MGUS) gibi altta yatan hastalıkların varlığı, B semptomları adı verilen kilo kaybı, ateş ve terleme gibi bulguların varlığı AAE-C1INH için ayırıcı

linik profildir (Maurer vd., 2018). Ayrıca, AAE-C1INH'li birçok hastanın, C1-INH'yi inaktive eden otoantikörlara sahip olduğu bilinmekte ve bu nedenle anti-C1INH antikörlarının ölçümü önemli biyokimyasal ayırıcı tanı olabileceği için ELISA temelli metotlar geliştirilmektedir (Grumach vd., 2021).

Rutin testler, tüm kriterlerin (C1-INH fonksiyonu, C1-INH ve C4 serum konsantrasyonu) normal seviyede olması nedeniyle HAÖ-nC1INH'de yalnızca HAÖ-C1INH'yi dışlamak için kullanılmaktadır (Sharma vd., 2021). HAÖ-nC1INH için henüz spesifik biyokimyasal tanı testi mevcut değildir ve HAÖ-C1INH'nin dışlanması sonrası tanı için genetik testler uygulanmalıdır (Grumach vd., 2021).

Bazı çalışmalar, HAÖ tiplerinin ayırıcı tanısında kullanılabilecek potansiyel biyobelirteç olabilecek birkaç molekül önermiştir; bununla birlikte tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesindeki yetersizlik nedeniyle bu potansiyel belirteçler, rutin klinik tanı yaklaşımında kullanılması için henüz uygun gözükmemektedir (Sharma vd., 2021)

HAÖ için uygulanan tedavi yaklaşımları, akut ("on demand") ve profilaktik tedavi şeklindedir. Akut tedavide amaç, bir atak sırasında HAÖ semptomlarını en aza indirmek iken, profilaktik tedavide ise ya beklenen bir tetiklenme süresince şişme olasılığını azaltmak (kısa süreli profilaksi) ya da tekrarlı anjioödem ataklarını bütünüyle azaltmaktır (uzun süreli profilaksi) (Konrad Bork, Anderson, vd., 2021). HAÖ için terapötik seçenekler, hastalığın patogenezinin anlaşılmasındaki ilerleme ile gelişmiştir. Bu seçenekler, ya defektif proteinin yerinin doldurulmasına yönelik ya da bradikinin veya bradikinin reseptörünün üretiminde yer alan çeşitli moleküllerin bloke edilmesine yöneliktir (Banday, Kaur, Jindal, Rawat, ve Singh, 2020). Güncel tedavi seçenekleri ve gelişimsel aşamadaki tedavi seçenekleri sırasıyla Tablo 2 ve Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 2. HAÖ tedavidinde güncel terapötik seçenekler (Fijen, Bork, ve Cohn, 2021)

İlaç	Mekanizma	İndikasyon	Uygulama	Yaş indikasyonu
Zayıflatılmış androjenler (Danazol, Oxandrolone ve Stanozol)	Aminopeptidaz P aktivitesini indükler ve C1INH sentezini ve C1INH mRNA ekspresyonunu artırır	LTP, STP	Oral	≥18
Berotrastat (BCX7353)	Kallikrein inhibitörü	LTP	Oral	FDA: ≥12 (EMA için 12 yaş altı uygun)
Plazma türevli C1INH (Berinert)	Plazma türevli C1INH birikimi	ODP, STP	İntravenöz	Tüm yaş grubu
Plazma türevli C1INH (Cinryze)	Plazma türevli C1INH birikimi	LTP, ODP, STP	İntravenöz	LTP ≥6, ODT ve STP ≥2
Conestat alfa	Rekombinant C1INH birikimi	ODT	İntravenöz	FDA: Ergenler ve yetişkinler; EMA: ≥2
Plazma türevli C1INH (Haegarda)	Plazma türevli C1INH birikimi	LTP	Subkütanöz	≥12
Ecallantide	Kallikrein inhibitörü	ODT	Subkütanöz	≥12
Icatibant	Bradikinin reseptör B2 (BKRB2) antagonisti	ODT	Subkütanöz	FDA: ≥18; EMA: ≥2
Lanadelumab	Kallikrein inhibitörü	LTP	Subkütanöz	≥12
Tranexamic acid	Plazminojen-aracılı FXII aktivasyonu yarışmalı inhibitörü	LTP	Oral	Ergenler ve yetişkinler

LTP:Uzun süreli profilaksi, STP:Kısa süreli profilaksi, ODT:”On demand” tedavi

Tablo 3. HAÖ tedavidinde gelişim aşamasındaki terapötik seçenekler (Fijen vd., 2021)

İlaç	Mekanizma	Planlanan İndikasyon	Uygulama	Durum
ALN-F12	RNA interferans ile FXII hedefleme	LTP	Subkütanöz	Preklinik oluşum
ARC-F12	RNA interferans ile FXII hedefleme	LTP	Subkütanöz	Preklinik oluşum
ATN-249	Kallikrein inhibitörü	LTP	Oral	Faz 1 tamamlanmış
BMN 331	Adeno-ilişkili virüs aracılı antikor taşınımı	LTP	İntravenöz	Preklinik oluşum
Garadacimab	İnsanlaştırılmış anti-FXIIa monoklonal antikor	LTP	Subkütanöz	Faz 2 aşamasında
IONIS-PKK-L	Prekallikrein hedefleyen antisens oligonükleotit	LTP	Subkütanöz	Faz 2 tamamlanmış
KVD824	Kallikrein inhibitörü	LTP	Oral	Faz 2 tamamlanmış
KVD900	Kallikrein inhibitörü	ODT	Oral	Faz 2 tamamlanmış
NTLA-2002	KLKB1 geninin CRISPR/Cas9 ile düzenlenmesi	LTP	İntravenöz	Preklinik oluşum
PHA022121	Bradikinin reseptör B2 (BKRB2) antagonisti	LTP, ODT	Oral	Faz 2 aşamasında

LTP:Uzun süreli profilaksi, STP:Kısa süreli profilaksi, ODT:”On demand” tedavi

Gereç ve Yöntem

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu tez çalışması, Ege Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Dekanlığı Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu tarafından alınan 18-10.2T/34 nolu karar doğrultusunda ve Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğün'nce TOA-2020-21840 numaralı proje ile desteklenerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya, Ege Üniversitesi Allerji ve İmmünoloji Polikliniğinde *SERPING1* geninde mutasyon olmayan Tip I hereditör anjioödem tanısı almış beş hasta ve çalışma süreci içerisinde iki hastanın aile bireyleri dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireylerden aydınlatılmış onam formu imzalatılarak periferik kan örnekleri alınmıştır. Beş hastanın demografik ve klinik bilgileri Tablo 4'de gösterildiği gibidir.

Tablo 4. Çalışmaya dahil edilen beş hastanın demografik ve klinik bilgileri

Hasta	Doğum yılı	Cinsiyet	Hastalık başlama yaşı	Hastalık yaşı	Aile öyküsü	Atak lokalizasyonu	Yıllık atak sayısı	EM	C1INH fonksiyon (%70-130)	C1INH (21-39 mg/dL)	C4 (10-40 mg/dL)	C1q (170-430 mg/L)
H1	1967	K	5	45	yok	P, GIS, Y, G, L	120	+	36.6	7.48	5	197
H2	1978	K	12	26	var	P, GIS, Y, G, L	24	+	42	13	9.4	206
H3	1956	E	15	45	var	P, GIS, Y, G, L	30	+	78	3	7	270
H4	1977	K	16	22	Yok*	P, GIS, Y, G, L	20	-	11	6.2	6.3	204
H5	1977	K	9	30	yok	P, GIS, Y, G, L	24	+	23.3	6	4	293

K:Kadın, E:Erkek, EM:Eritema marginatum, P:Periferik, GIS:Gastrointestinal, G:genital, Y:Yüz, L:Larinks.

*Ailede hereditör anjioödemle en çok karışan hastalık olan ailevi akdeniz ateşi tanısı almış hastalar bulunmaktadır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar, Kitler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan kitler, kimyasallar ve sarf malzemeler Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kitler, kimyasallar ve sarf malzemeler ve markaları

Kitler, kimyasallar ve sarf malzemeler	Marka
“QIAamp DNA Mini Kit” (51304)	Qiagen
“QIAseq FX DNA Library Kit”	Qiagen
“QIAseq Human Exzome Kit”	Qiagen
“LightCycler 480 HighResolution Melting Master Kit”	Roche
“BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit”	ThermoScientific
“NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300)”	Illumina
“Agencourt AMPure XP beads”	Beckman Coulter
RNaz A	Qiagen
“Qubit dsDNA HS Assay Kit”	Thermo Fisher Scientific

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz	Marka
Light Cycler 480	Roche
Konvansiyonel termal döngüleyici	SensoQuest
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific
Qubit 4	Thermo Fisher Scientific
Illumina NovaSeq 6000	Illumina
Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Termal blok	EuroClone

3.2. Yöntem

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Tüm ekzom dizi analizi ve validasyon deneylerinde kullanılmak üzere beş hastanın ve iki hastanın aile bireylerinin tüm kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon, “QIAamp DNA Mini Kit” kullanılarak kit protokolüne göre aşağıda belirtilen basamaklar halinde gerçekleştirilmiştir.

1. 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpü içerisine 40 µl Proteinaz K konuldu.
2. Tüm kan örneğinden 400 µl tüp içerisine ilave edildi ve pipetleyerek karıştırıldı.
3. RNA’sız genomik DNA elde etmek için tüp içerisine 8 µl RNaz A (100 mg/ml) ilave edildi ve 15 sn vortekleseyerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında (15-25°C) 2 dk inkübe edildi. (Bu basamak opsiyoneldir ve RNaz A “Buffer AL” ilave edilmeden önce konulmalıdır).
4. Tüp içerisine 400 µl “Buffer AL” ilave edildi ve 15 sn vortekleseyerek karıştırıldı.
5. Örnek ısıtıcı blokta 60°C’de 10 dk inkübe edildi.
6. Kapak içerisindeki damlacıkları uzaklaştırmak için 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpü kısa süreli santrifüj edildi.
7. Tüp içerisine 400 µl etanol (%96-100) (örnek hacmi kadar) ilave edildi ve 15 sn vortekleseyerek karıştırıldı. Kapak içerisindeki damlacıkları uzaklaştırmak için 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpü kısa süreli santrifüj edildi.
8. Tüp içerisindeki karışımın bir kısmı 2 ml’lik toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş QIAamp Mini spin kolonuna kolonun ağız kısmını ıslatmamaya dikkat edilerek aktarıldı.
9. Kapak kapatıldı, 6000 x g (8000 rpm)’de 1 dk santrifüj edildi. Place the QIAamp Mini spin kolonu temiz bir 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi, filtratı içeren tüp atıldı.
10. Kalan karışım QIAamp Mini spin kolonuna aktararak 9. basamak tekrar edildi.

11. QIAamp Mini spin kolonunun kapağı dikkatlice açıldı ve içerisine 500 µl “Buffer AW1” ilave edildi. Kapak kapatıldı, 6000 x g (8000 rpm)’de 1 dk santrifüj edildi. QIAamp Mini spin kolonu temiz bir 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi, filtratı içeren tüp atıldı.
12. QIAamp Mini spin kolonunun kapağı dikkatlice açıldı ve içerisine 500 µl “Buffer AW2”. Kapak kapatıldı ve tam hızda (20.000 x g; 14.000 rpm) 3 dk santrifüj edildi.
13. (Önerilir) QIAamp Mini spin kolonu yeni bir 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi ve filtratı içeren eski toplama tüpü atıldı. Tam hızda 1 dk santrifüj edildi.
14. QIAamp Mini spin kolonu temiz bir 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve filtratı içeren toplama tüpü atıldı. QIAamp Mini spin kolonunun kapağı dikkatlice açıldı ve içerisine 65 µl “Buffer AE” ilave edildi. Oda sıcaklığında (15-25°C) 1 dk inkübe edildi ve sonrasında 6000 x g (8000 rpm)’de 1 dk santrifüj edildi.

3.2.1.1. Genomik DNA konsantrasyonlarının ölçümü ve saflıklarının belirlenmesi

İzole edilen genomik DNA’ların saflıklarının ve konsantrasyonlarının ölçümü sırasıyla spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle belirlendi. Spektrofotometrik yöntem için örneklerin konsantrasyonu ve saflıkları, Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) cihazında A260/280 nm ve A260/230 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. Florometrik yöntem için örneklerin konsantrasyonu, çift iplikli DNA’ya spesifik “Qubit dsDNA HS Assay Kit” kullanarak “Qubit 4.0 Fluorometer” (Thermo Fisher Scientific) cihazında gerçekleştirildi. Tüm ekzom dizileme çalışması için florometrik ölçümler kullanıldı.

3.2.2. Tüm Ekzom Dizileme

Bugün itibariyle, spesifik varyasyonlar barındığında kalıtılabilir monogenik hastalıklara neden olabilecek 6.000’den fazla gen tanımlanmıştır. DNA’nın yeni-nesil dizileme (NGS), tek nukleotit polimorfizmler (SNP’ler), kopya sayısı varyasyonu (CNV) ve küçük insersiyon ve delesyonları (İndel’ler) içeren genetik varyasyonları belirlemek için birincil araçtır. Açık etiyolojiye sahip spesifik hastalık gruplarına odaklanan gen panelleri gibi hedef-zenginleştirme teknolojileri, hastalık-nedeni

mutasyonları saptamada yüksek oranda etkin olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, genetik orijini bilinmeyen ya da belirsiz etiyolojiye sahip kalıtsal hastalıklar, hastalık-nedeni mutasyonları tanımlamak ya da henüz ilişkili olmayan genleri bir hastalıkla ilişkilendirmek için daha kapsamlı analizler gerektirmektedir. Tüm ekzom dizileme (WES), insan genomunun tüm ekzonlarını kapsayan hedeflenmiş DNA hedefli DNA dizilemenin en kapsamlı yaklaşımıdır.

SERPING1 geni mutasyonu olmayan Tip I HAÖ-C1INH tanılı beş hastada, hastalığın mpleküler patolojisinden sorumlu olabilecek varyasyonları ortaya çıkarabilmek amacıyla WES işlemi gerçekleştirildi. Beş hastadan izole edilen genomik DNA'lar, sırasıyla "QIAseq FX DNA Library Kit" ile kütüphane hazırlama işlemi ve "QIAseq Human Exzome Kit" ile havuz oluşturma işleminden geçilerek dizileme cihazına yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

3.2.2.1. Kütüphane Hazırlama

Kütüphane hazırlama işlemleri, "QIAseq FX DNA Library Kit" kullanılarak gerçekleştirildi. Kütüphane hazırlık aşaması; fragmentasyon, uç tamiri, A-ilavesi, adaptör ligasyon ve kütüphane amplifikasyonu basamaklarından oluşmaktadır.

Fragmentasyon, uç tamiri, A-ilavesi

1. Tablo 7'ye göre termal döngüleyici programlandı. Kapak sıcaklığı 70°C'ye ayarlandı.

Tablo 7. Fragmentasyon, uç tamiri ve A-ilavesi reaksiyon şartları

Adım	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon zamanı
1	4 °C	1 dk
2	32 °C	22 dk
3	65 °C	30 dk
4	4 °C	Hold

2. Program başlatıldı. Termal döngüleyici bloğu, 4 °C'ye ulaştığında program duraklatıldı.
3. Tablo 8'e göre girdi DNA 50 ng olacak şekilde bir PCR tüpünde FX reaksiyon karışımı bir soğuk blok üzerinde hazırlandı. Yavaşça pipetleyerek iyice karıştırıldı.

Tablo 8. FX reaksiyon karışım hazırlama için bileşenler ve hacimleri (her bir örnek için)

Bileşen	Hacim (µl)
“FX Buffer”, 10x	5
DNA (50 ng)	Değişken
Nukleazsız su	Değişken
“FX Enzyme Mix” harici total	40

- Her reaksiyona 10 µl “FX Enzyme Mix” eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı.
- PCR tüpleri kısaca döndürüldü ve hemen önceden soğutulmuş termal döngüleyiciye (4°C) aktarıldı. Döngüleme programı devam ettirildi.
- Termal döngüleyici programı tamamlandığında ve örnek bloğu 4°C’ye döndüğünde, örnekleri çıkarıldı ve soğuk blok üzerine yerleştirildi.

Adaptör ligasyon

- Bir önceki adımdan gelen her 50 µl örneğe her bir örnek için ayrı olarak QIAseq UDI Y-adaptörlerinden (ikili indeks içerir) 5 µl aktarıldı. Her örnek için kullanılan her adaptör numarası takip edildi.
- Buz üzerinde ayrı bir PCR tüpünde Tablo 9’a göre ligasyon “Master Mix” hazırlandı ve pipetleyerek iyice karıştırıldı.

Tablo 9. Ligasyon “Master Mix” hazırlama için bileşenler ve hacimleri (her bir örnek için)

Bileşen	Hacim (µl)
“DNA Ligase Buffer”, 5x	20
“DNA ligase”	10
Nukleazsız su	15
Total	45

- Total 100 µl için her örneğe 45 µl ligasyon Master Mix eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı. Termal döngüleyicinin kapak ısıtması kapalı şekilde, ligasyon reaksiyonu 15 dk 20 °C’de inkübe edildi.
- “Agencourt AMPure XP” boncuklarından 0.8x (80 µl) kullanılarak adaptör ligasyon temizlik adımına geçildi.
- Her ligasyon örneğine 80 µl resüspanse “Agencourt AMPure XP” boncuğu eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı.

12. Karışım 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Boncukların, 2 dk manyetik stant üzerinde toplanması sağlandı, sonrasında dikkatlice süpernatant atıldı.
13. Boncukları yıkamak için 200 µl %80 etanol eklendi. Boncukların, manyetik stant üzerinde toplanması sağlandı ve süpernatant atıldı. Toplamda 2 etanol yıkaması için yıkama bir kez daha tekrarlandı. Mümkün olduğunca fazla etanol uzaklaştırıldı.
14. Boncuklar, 5-10 dk ya da kuruyana kadar (aşırı kurutmadan) manyetik stantta inkübe edildi.
15. Örnekler 52 µl Buffer EB ile resüspanse edilerek ayrıştırıldı. Boncukların toplanması sağlandı ve 50 µl süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
16. Resüspanse Agencourt AMPure XP boncuktan 1,0x (50µl) eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı.
17. Adım 14, 15 ve 16, tekrarlandı ve sonrasında 26 µl “Buffer EB” ’de resüspanse edilerek örnekler ayrıştırıldı.
18. Boncukların toplanmasını sağlandı ve dikkatlice 23.5 µl yeni bir PCR tüpüne aktarıldı.

Kütüphane Amplifikasyonu

21. Tablo 10’a göre ısıtılmalı kapaklı bir termal döngüleyici amplifikasyon için reaksiyon şartlarında ayarlandı.

Tablo 10. Kütüphane amplifiasyonu için reaksiyon şartları

Süre	Sıcaklık	Döngü sayısı
2 dk	98 °C	1
20 sn	98 °C	7
30 sn	60 °C	
30 sn	72 °C	
1 dk	72 °C	1
∞	4 °C	Hold

22. Amplifikasyon için reaksiyon karışımı Tablo 11’e göre hazırlandı.

Tablo 11. Kütüphane zenginleştirme için reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim (µl)
“HiFi PCR Master Mix”, 2x	25
“Primer Mix Illumina Libr. Amp” (10 µM)	1.5
Kütüphane DNA	23.5
Total reaksiyon hacmi	50

23. PCR tüpü termal döngüleyiciye aktarıldı ve program başlatıldı.

24. PCR tamamlandıktan sonra, her reaksiyona (50 µl) 50 µl resüspanse Agencourt AMPure XP boncukları eklendi ve iyice karışması pipetlendi ve adım 12, 13 ve 14 teki gibi temizlik işlemleri gerçekleştirildi.

25. Örnekler 25 µl Buffer EB iel resüspanse edilerek ayrıştırıldı. Boncukların manyetik stantta toplanmasını sağlandı. Dikkatlice 23 µl süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.

26. QIAGEN QIAxcel kapiler elektroforez cihazı kullanarak kütüphane kalitesi ve miktarını hesaplandı.

27. Saflaştırılmış kütüphane, dizileme işleminde kullanılabilecek kadar bir DNA LoBind tüpünde -30 - -15°C’de saklandı.

3.2.2.2. Hibrit Yakalama Havuzu oluşturma

QIAseq Human Exome Kit

QIAseq Human Exome Kit, indekslenmiş tüm genom kütüphanelerinden insan genomunun ekzonik dizilerini spesifik olarak zenginleştirmek için bir hibridizasyon yakalama-temelli hedef zenginleştirme yaklaşımını kullanır.

Kütüphanelerin havuzlanması ve indekslenmiş kütüphane havuzunun kurutulması

Amplifiye edilmiş, indekslenmiş tüm genom kütüphanelerinin havuzlanması, çoklu kütüphanelerin tek bir hibridizasyon-yakalama reaksiyonunda işlenmesine imkân tanır.

1. Bir yakalama havuzunda, her bir kütüphane için girdi miktarı 400 ng olarak ayarlandı. Her kütüphane için hesaplanan hacim, 1,5’ml’lik bir LoBind tüpe aktarıldı.

2. Tablo 12'ye göre kütüphane havuzuna Human Exome Prob Set'i ve bloklama reaktifleri eklendi.

Tablo 12. Problar ve boklama reaktifleri ile kütüphane havuzunu tamamlama

Bileşen	Hacim (µl)
İndekslenmiş kütüphane havuzu	~80
Human Exome Probe Set	4
One-4-All Blocking Oligos	8
One-4-All Blocking Solution	5

3. Tamamlanmış kütüphane havuzunu karıştırmak için vurum-vorteks yapıldı ve kısa santrifüj (pulse-spin) yapıldı
4. SpeedVac evaporator cihazı kullanarak tamamlanmış kütüphane havuzunun tüm sıvı içeriği tamamen evapore edildi.
5. Tamamlanmış kütüphane havuzunun evaporasyonu tamamlandığında, kuru kütüphane havuzu buz üzerinde muhafaza edildi ve hemen hibridizasyon yakalama işlemi ile devam edildi.

Hibridizasyon yakalama

Hibridizasyon adımı boyunca, “QIAseq Exome Probes” ’lar havuzdaki hedeflenmiş kütüphane fragmentlerine spesifik olarak bağlanmaktadır.

6. Vapor-Lock reaktifi çözüldü ve oda sıcaklığına dengelendi. Fast Hybridization solüsyonu, bir ısıtıcı blokta 10 dk 65°C'ye ısıtıldı. Vortekslendi ve tüm çökeltinin çözüldüğüne dikkat edildi. Fast Hybridization solüsyonu, kullanılana kadar 65°C'de tutuldu.
7. Tablo 13'e göre bir termal döngüleyici programlandı. Kapak sıcaklığı, evaporasyonu engellemek için 85 °C'ye ayarlandı.

Tablo 13. Hibridizasyon yakalama için inkübasyon koşulları

Adım	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon süresi
1	95°C	1 dk
2	95°C	5 dk
3	60°C	1 saat
4	60°C	Hold

8. Program başlatıldı. Termal döngüleyici bloğu 95°C'ye ulaştığında, adım 1'de program duraklatıldı.
9. 65 °C Fast Hybridization solüsyonu vortekslendi ve hemen adım 7'den gelen kuru tamamlanmış kütüphane havuzunu içeren tüpe, 20 µl aktarıldı.
10. Tüp 5 sn vortekslendi, sonra 65 °C'de 2 dk inkübe edildi.
11. Adım 12, 2 kez daha tekrar edildi, sonra tüp kısa santrifüj (pulse-spin) yapıldı.
12. Bütün solüsyon, 0,2 ml'lik bir PCR tüpüne aktarıldı. Baloncuk olmamasına dikkat edildi.
13. Vapor-Lock reaktifinden 30 µl eklendi. Tüm sıvının tüpün alt kısmında olduğundan emin olmak için tüp kısa santrifüj (pulse-spin) yapıldı.
14. Tüp termal döngüleyiciye yerleştirildi ve program 95 °C'de devam ettirildi.
15. Yakalanmış kütüphane fragmentlerinin Streptavidin boncuklarına bağlamak için hazır olana kadar, hibridizasyon reaksiyonu termal döngüleyicide bırakıldı (60°C'de tutuldu). Hibridizasyon tamamlanmadan en az 30 dk önce "hibridize hedefleri Streptavidin boncuklarına bağlama" protokolü ile devam edildi.

Hibridize Hedeflerin Streptavidin Boncuklara Bağlanması

Bu adımda, biyotin-bağlanmış Human Exome Probes'lar ve onların hibridize hedefleri, Streptavidin boncukları ile yakalanmaktadır. Spesifik olmayan hedefler, bir seri yıkama adımı sırasında yıkanarak uzaklaştırılmaktadır.

16. "Wash Buffer A" 'dan 400 µl'yi 70°C'ye, "Wash Buffer B" 'den 700 µl'yi 48°C'ye termal bloklarda önceden ısıtıldı. Gerek duyulana kadar yıkama tamponları termal bloklarda bırakıldı.
17. Önceden oda sıcaklığına dengelenmiş Streptavidin bağlayan boncuklar, vortekslenerek homojenize edildi. Yeni bir 1,5 ml LoBind tüpe 100 µl homojenize Streptavidin bağlayan boncuk aktarıldı.
18. 200 µl "Post Capture Binding Buffer" eklendi ve pipetleyerek karıştırıldı.
19. Bir dk ya da solüsyon berraklaşana kadar, boncuklar bir manyetik stantta inkübe edildi, sonrasında berrak süpernatant, pelleti dağıtmadan atılarak uzaklaştırıldı. Manyetik stanttan uzaklaştırıldı.

20. Totalde 3 yıkama adımı içi adım 18 ve 19, 2 kere daha tekrar edildi.
21. Üçüncü yıkamadaki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, son bir 200 µl “Post Capture Binding Buffer” eklendi ve boncuklar vorteksleyerek homojenize edildi. Homojenize boncuk bulamacı gerek duyulana kadar oda sıcaklığında tutuldu.
22. Hibridizasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra, termal döngüleyicinin kapağını açıldı, tüp açıldı ve Vapor-Lock içeren tam hacim, hızlı bir şekilde, adım 21’deki boncuk bulamacını içeren tüp içerisine aktarıldı. Pipetleyerek iyice karıştırıldı.
23. Karışım, boncukların çökmesini engellemek için çalkalayıcıda oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
24. Tüm sıvının tüpün alt kısmında olduğundan emin olmak için tüpü kısa santrifüj (pulse-spin) yapıldı.
25. Solüsyon berraklaşana kadar, boncuklar bir manyetik stant üzerinde 1 dk inkübe edildi, sonrasında pelleti dağıtmadan Vapor-Lock içeren berrak süpernatant atılarak uzaklaştırıldı.
26. Tüp, manyetik stanttan uzaklaştırıldı ve içerisine 200 µl önceden 70°C’ye ısıtılmış “Wash Buffer A” eklendi. Pipetleyerek karıştırıldı. 70 °C’de 5 dk inkübe edildi.
27. Bir dk ya da solüsyon berraklaşana kadar, tüp manyetik stanta yerleştirildi, sonrasında pelleti dağıtmadan berrak süpernatant atılarak uzaklaştırıldı.
28. “Wash Buffer A” ile totalde iki yıkama olması için adım 26 ve 27 tekrarlandı.
29. Tüp kısa santrifüj (pulse-spin) yapıldı ve tüm hacim, boncukları içeren yeni bir 1,5 ml LoBind tüpe aktarıldı.
30. Bir dk ya da solüsyon berraklaşana kadar, tüp manyetik stanta yerleştirildi, sonrasında pelleti dağıtmadan berrak süpernatant atılarak uzaklaştırıldı.
31. Tüp manyetik stantan uzaklaştırıldı ve içerisine 200 µl önceden 48 °C’ye ısıtılmış “Wash Buffer B” eklendi. Pipetleyerek karıştırıldı. Tüp, kısa santrifüj (pulse-spin) yapıldı, sonrasında 5 dk 48 °C’de inkübe edildi.

32. Bir dk ya da solüsyon berraklaşana kadar, tüpü manyetik stanta yerleştirildi, sonrasında pelleti dağıtmadan berrak süpernatant atılarak uzaklaştırıldı.
33. “Wash Buffer B” ile totalde üç yıkama olması için adım 31 ve 32, iki kez daha tekrarlandı.
34. Son yıkama sonrasında, tüm kalan süpernatantı uzaklaştırmak için 10 µl’lik bir pipet kullanıldı. Boncukların kurumasına izin verilmeden hemen bir sonraki adıma geçildi.
35. Tüp manyetik stantan uzaklaştırıldı ve içerisine 45 µl RNaz-içermeyen su eklendi. Pipetleyerek homojenize edildi ve boncuk bulamacı buz üzerinde tutuldu. Hemen “Yakalama sonrası amplifikasyon” ile devam edildi.

Yakalama Sonrası Amplifikasyonu

Streptavidin Bağlı Boncuklara bağlı yakalanmış hedefler, kit içerisindeki “QIAGENs Post Hybrid-Capture PCR Mix”i kullanılarak amplifiye edildi.

36. Tablo 14’e göre termal döngüleyici ayarlandı.

Tablo 14. Yakalama sonrası amplifikasyon şartları

Süre	Sıcaklık	Döngü sayısı
2 dk	98 °C	1
20 sn	98 °C	7
30 sn	60 °C	
30 sn	72 °C	
1 dk	72 °C	1
∞	4 °C	Hold

37. Tablo 15’e göre soğuk blok üzerinde bir PCR tüpüne bileşenler eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 15. Yakalama sonrası amplifikasyon için reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim (µl)
Yakalanmış hedefli boncuk bulamacı (Adım 35’ten)	25.5
“Post Hybrid-Capture PCR Mix”	25
“Primer Mix Illumina Library Amplification”	2.5
Total reaksiyon hacmi	50

38. PCR tüpü, termal döngüleyiciye aktarıldı ve program başlatıldı.
39. PCR tamamlandığında 50 µl'lik reaksiyona 75 µl resüspanse Agencourt AMPure XP boncukları eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı.
40. Karışım oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Boncuklar, manyetik stant üzerinde toplanması sağlandı ve dikkatlice süpernatant atıldı.
41. Boncukların yıkanması için 200 µl %80'lik etanol eklendi. Boncukların, manyetik stant üzerinde toplanmasını sağlandı ve süpernatant atıldı. Totalde iki etanol yıkaması olması için yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Mümkün olduğunca fazla etanolü uzaklaştırıldı.
42. Boncuklar kuruyana kadar 5-10 dk (aşırı kurumadan) manyetik stantta inkübe edildi. Manyetik stanttan uzaklaştırıldı.
43. Örneğe "Buffer EB" 'den 32 µl eklenerek resüspanse edilerek ayrıştırıldı. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
44. Boncukların, manyetik stant üzerinde toplanmasını sağlandı. Dikkatlice 30 µl berrak süpernatant yeni bir tüp içerisine aktarıldı.
45. QIAGEN QIAxcel kapiler elektroforez cihazında hibrit yakalama kütüphane havuzunun kalite ve ölçü dağılımı değerlendirildi. Dizilmeme adımı için "QIAseq Library Quant Assay Kit" ile qPCR analizi yapılarak hibrit yakalama kütüphane havuzunun miktarı ölçüldü.
46. Saflaştırılmış hibrit yakalama kütüphane havuzu, dizileme için kullanılabilecek kadar bir DNA LoBind tüpünde -20°C'de saklandı.

3.2.2.3. Dizileme

Dizileme işlemi, Illumina NovaSeq 6000 dizilime platformunda "S2 Flow cell" ve "NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit v1.5 (300)" kullanılarak gerçekleştirildi.

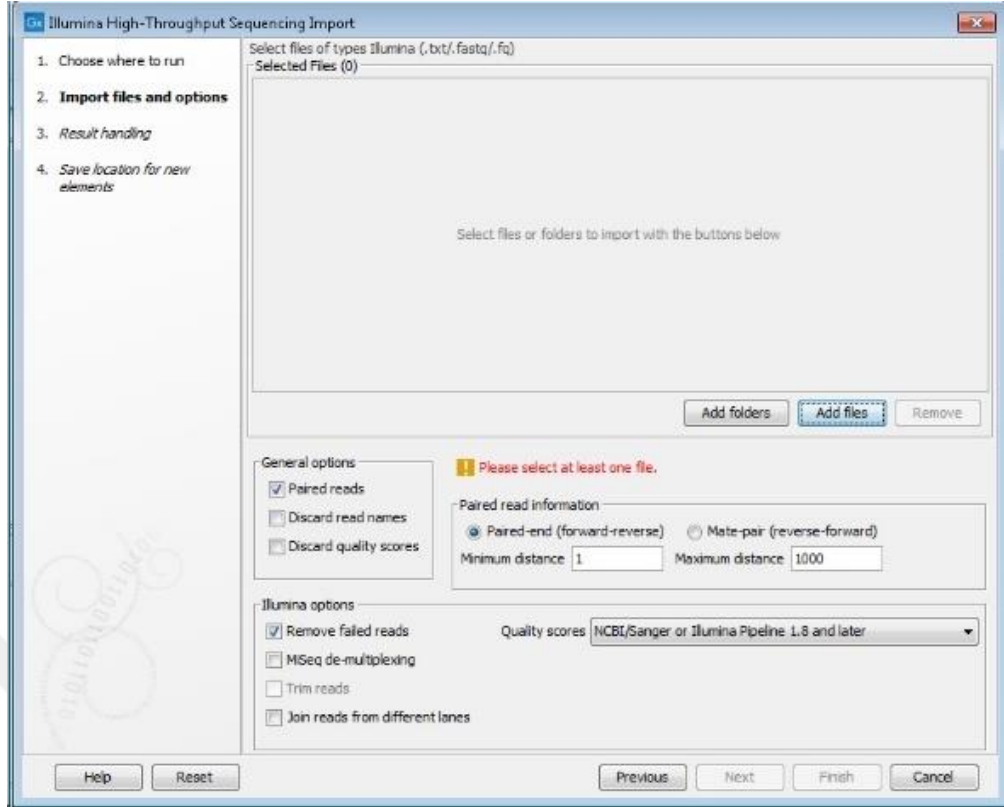
3.2.2.4. Analiz

Tüm ekzom dizileme çalışması sonunda elde edilen ham verilerin biyoinformatik analizi “CLC Genomics Workbench 20.0.4” yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz aşağıda belirtilen sıra ile gerçekleştirilmiştir.

1. Elde edilen ham veriler, her bir hastaya ait olan ileri primer okumaları ve geri primer okumaları için ayrı ayrı olmak üzere ikişer adet “fastq” uzantılı dosyalar şeklindedir. İlk olarak fastq dosyaları, “import” seçeneği altında yer alan Illumina dizileme platformlarından elde edilen ham veriler için uygun olan “Illumina” seçeneği kullanılarak eşleştirilmiş okumalar şeklinde içe aktarılmıştır. İçe aktarımda kullanılan parametreler Tablo 16 ve Şekil 3’te gösterildiği gibidir.

Tablo 16. İçe aktarımda kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Genel Ayarlar	Eşleştirilmiş okumalar (paired reads)
	<u>Eşleştirilmiş okuma oryantasyonu</u> “Paired-end (forward-reverse)” Minimum uzaklık: 1 Maksimum uzaklık: 1000
Illumina Ayarları	Başarısız okumaları uzaklaştır
	<u>Kalite Skorları</u> “NCBI/Sanger or Illumina Pipeline 1.8 and later”



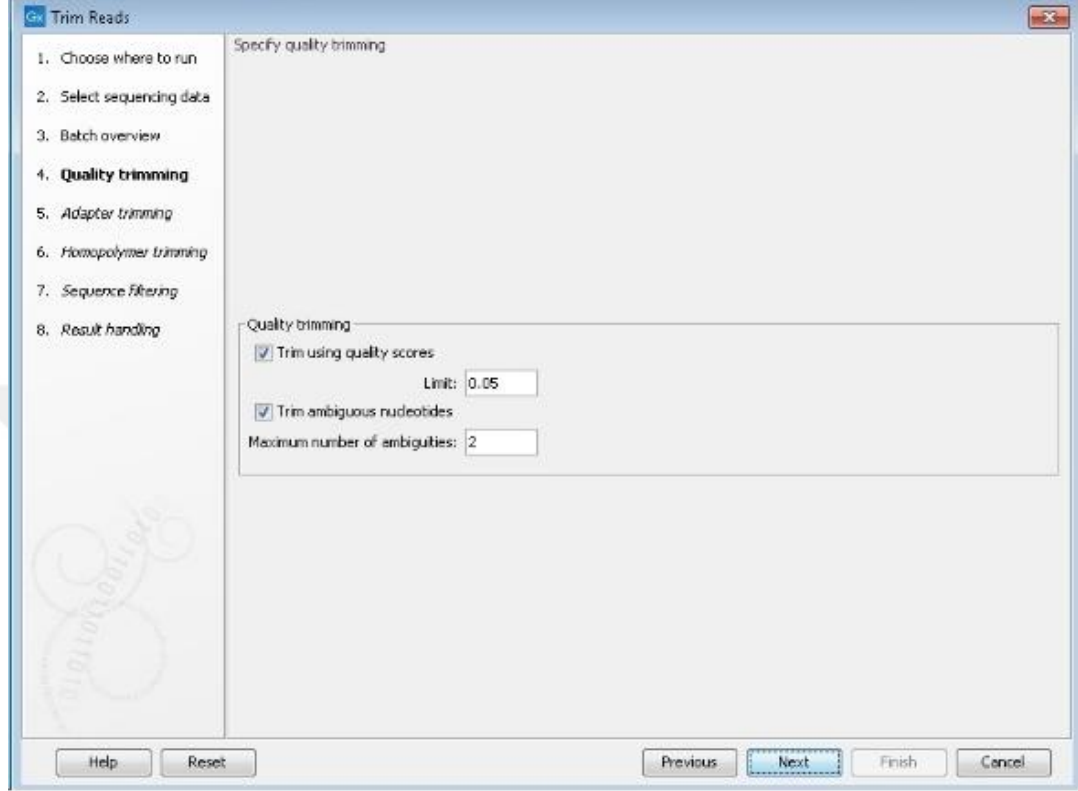
Şekil 3. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” içe aktarım parametre seçim görüntüsü

2. Eşleştirilmiş okumalar, araç kutusundaki “Prepare Sequencing Data” seçeneği altında yer alan “Trim reads” aracı kullanılarak kırılmıştır. Kırılma işleminde kullanılan parametreler Tablo 17 ve sırasıyla Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6 ve Şekil 7’de gösterildiği gibidir.

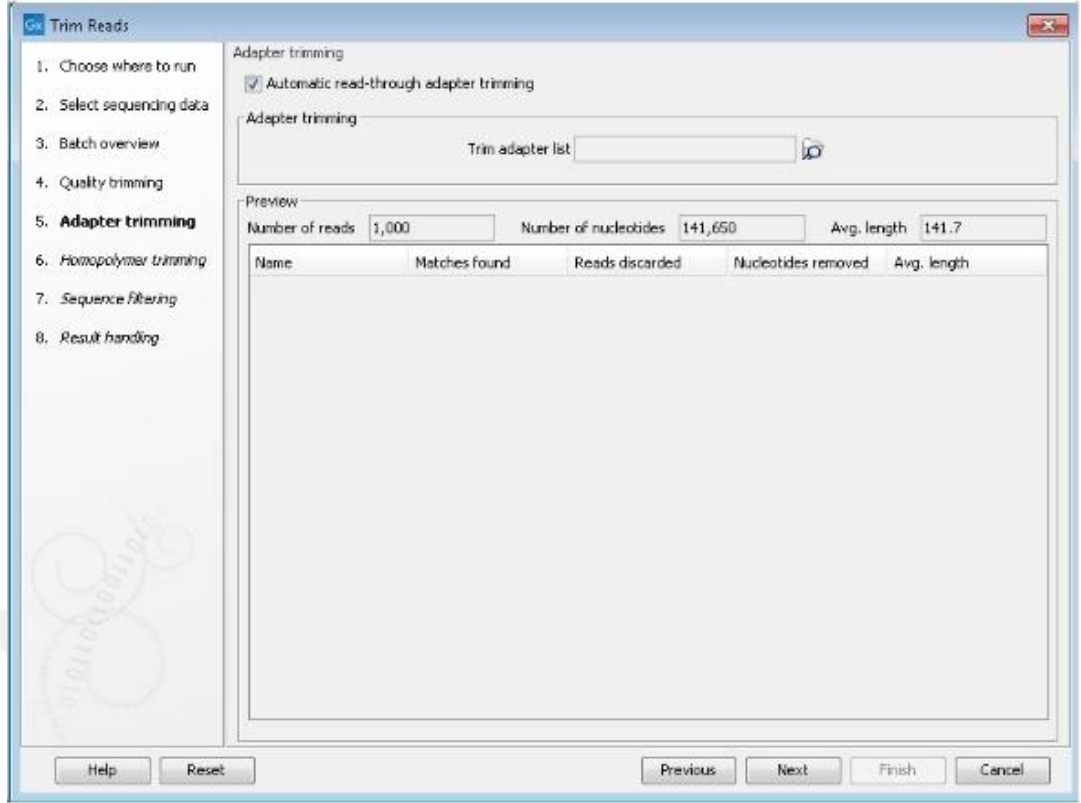
Tablo 17. Kırılma işleminde kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Kırılma kalitesi	<u>Kaliteli kırılma</u> - Kalite skoru kullanılarak kırılma Limit: 0,05 - Kuşkulu nukleotitlerin kırılması Kuşkulu nukleotit miktarı: 2
Adaptörlerin kırılması	Otomatik okuma adaptörü kırılması
Homopolimerlerin kırılması	Seçim yapılmadı
Dizi filtreleme	<u>Sabit sayıda bazları uzaklaştır</u> - Seçim kapalı <u>Okumalar, sabit uzunlukta olana kadar bazların uzaklaştırılması</u> - Maksimum uzunluk: 150

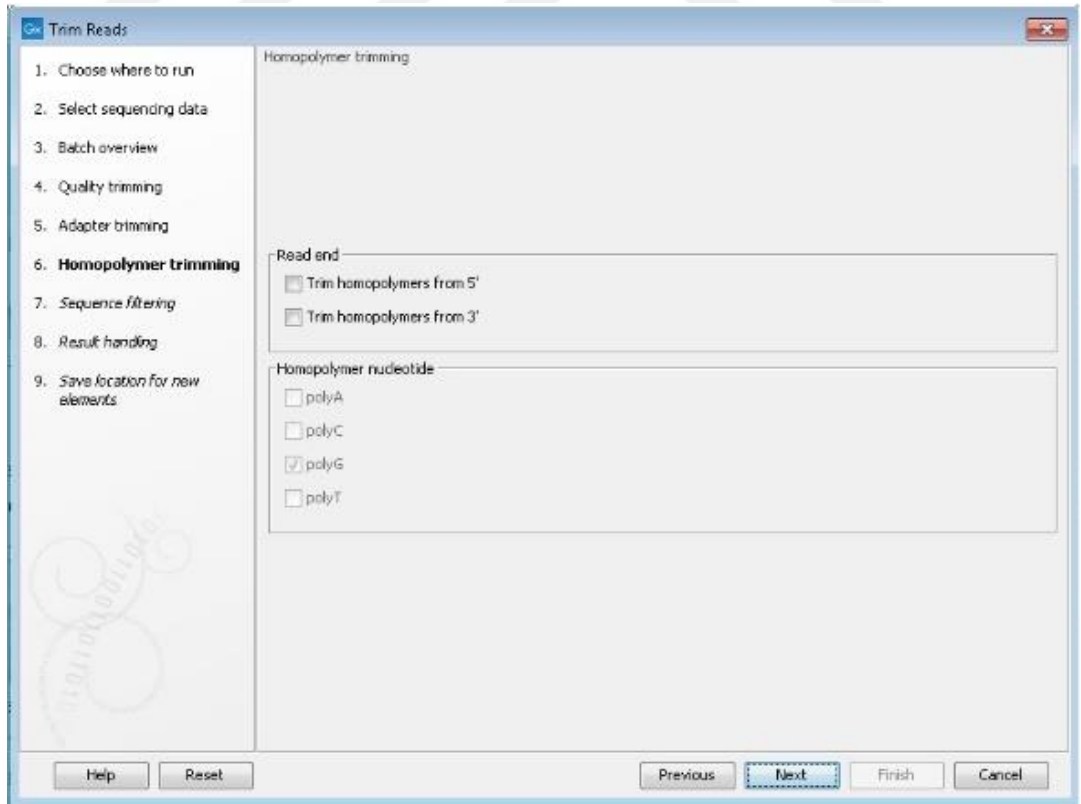
	- Kırpma yönü: 3' uç <u>Uzunluk filtreleme</u> - Seçim yapılmadı
--	---



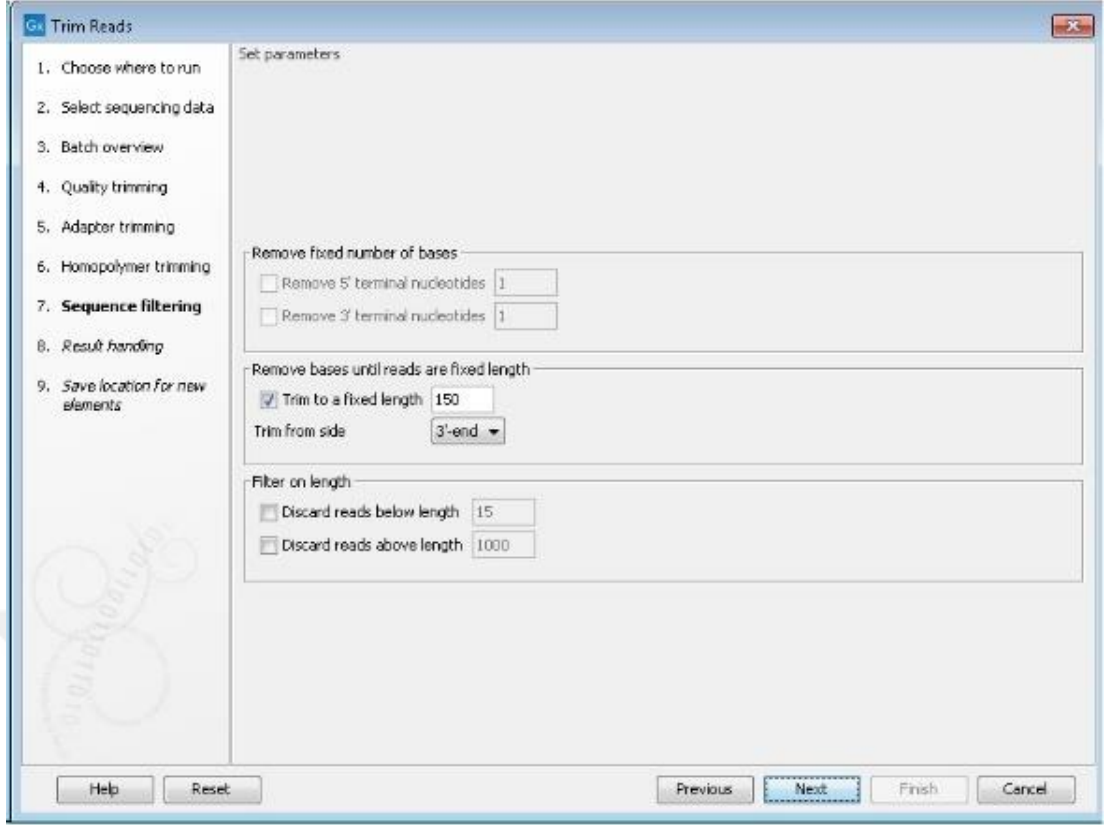
Şekil 4. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” kırpma kalitesi parametre seçim görüntüsü



Şekil 5. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” adaptörlerin kırılması parametre seçim görüntüsü



Şekil 6. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” homopolimerlerin kırılması parametre seçim görüntüsü

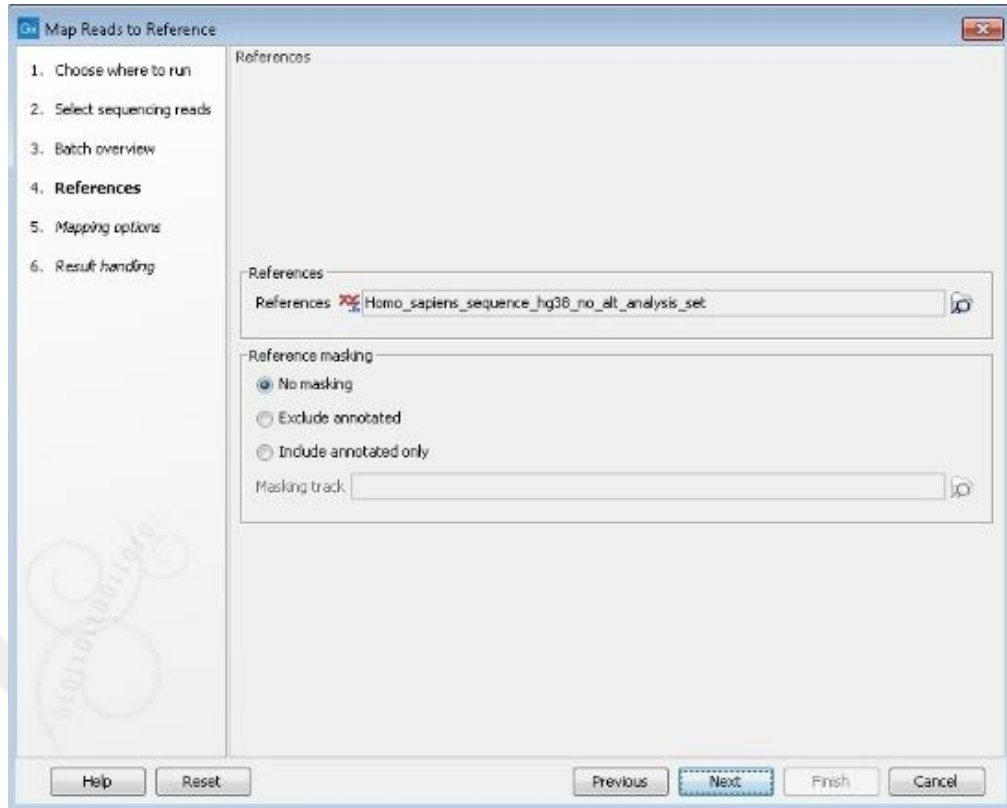


Şekil 7. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” dizi filtrelemesi parametre seçim görüntüsü

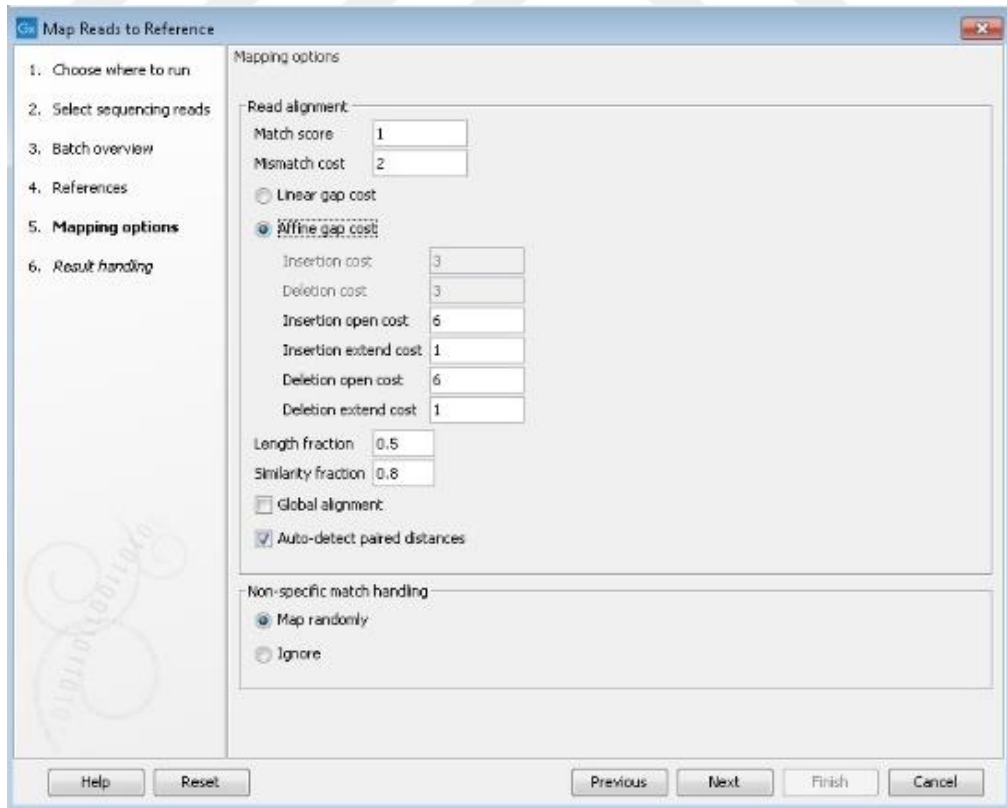
3. Kırpılmış eşleştirilmiş okumalar, araç kutusundaki “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Map Reads to Reference” aracı kullanılarak, yazılım içerisinde yer alan QIAGEN referans veri kütüphanesindeki “Homo sapiens sequence hg38 no alt analysis set” referans dizisine hizalayarak haritalandırılmıştır. Haritalama işleminde kullanılan parametreler Tablo 18 ve Şekil 8 ve Şekil 9’da gösterildiği gibidir.

Tablo 18. Referans genoma haritalandırma işleminde kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Referanslar	<u>Referanslar</u> - Referans: “Homo sapiens sequence hg38 no alt analysis set” <u>Referans maskeleme</u> - Maskeleme yok
Haritalama ayarları	<u>Okuma hizalama</u> - Eşleşme skoru: 1 - Yanlış eşleşme değeri: 2 - İnsersiyonların ve delesyonların değeri: Afın boşluk değeri İnsersiyon açık değeri: 6 İnsersiyon uzatma değeri: 1 Delesyon açık değeri: 6 Delesyon uzatma değeri: 1 - Uzunluk fraksiyonu: 0,5 - Benzerlik fraksiyonu: 0,8 - Global hizalama: Seçim yapılmadı - Eşleştirilmiş uzaklıkları otomatik olarak algıla <u>Spesifik olmayan eşleşme yönetimi</u> - Rastgele haritalandır



Şekil 8. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” referans genom seçim görüntüsü

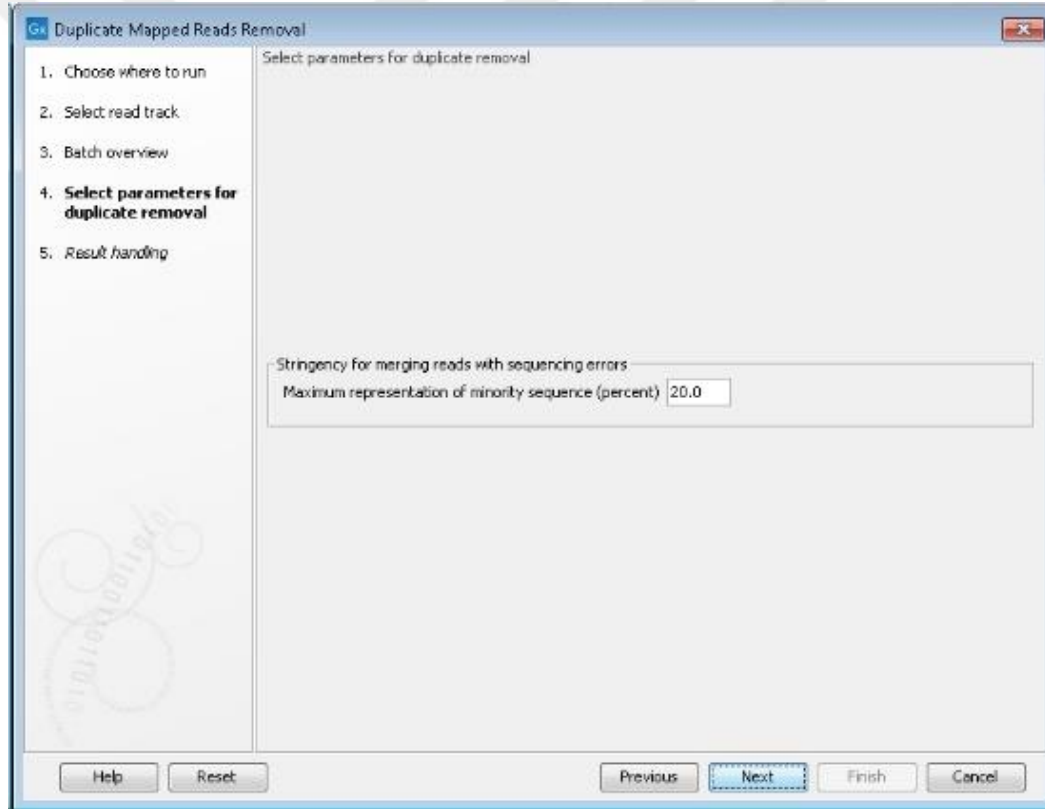


Şekil 9. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” haritalandırma ayarları parametre seçim görüntüsü

4. Elde edilen okuma haritalarından, araç kutusundaki “Resequencing analysis” seçeneği altında yer alan “Remove duplicated mapped reads” aracı kullanılarak, örnek hazırlama sırasında PCR amplifikasyonu ya da zenginleştirme basamaklarının kullanılması nedeniyle oluşmuş olabilecek yinelenen okumaların uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yinelenen okumaların uzaklaştırılması işleminde kullanılan parametreler Tablo 19 ve Şekil 10’da gösterildiği gibidir.

Tablo 19. Haritalarda yinelenen okumaların uzaklaştırılması işleminde kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Parametre seçimi	<u>Dizileme hataları olan okumaları birleştirmek için darlık</u> Azınlık dizinin maksimum temsili (yüzde): 20



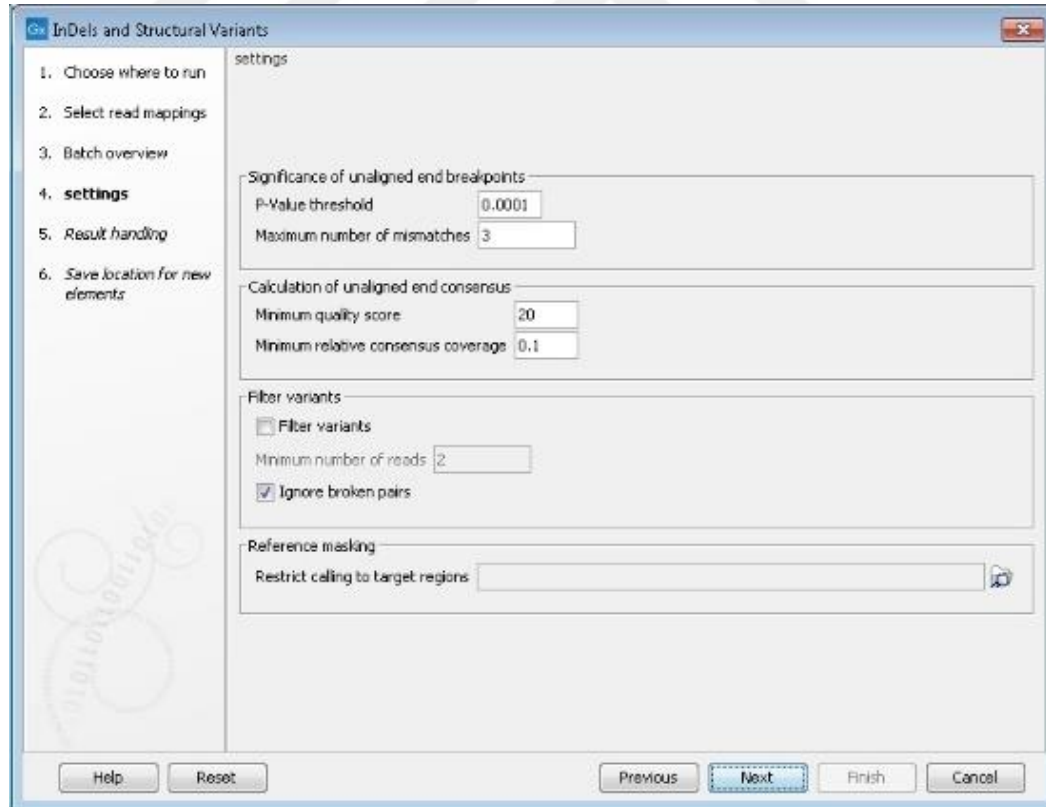
Şekil 10. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” haritalarda yinelenen okumaların uzaklaştırılması parametre seçim görüntüsü

5. Yinelenen okumaların uzaklaştırıldığı haritalardan, araç kutusundaki “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Variant detection” seçeneği içerisindeki “InDels and Structural Variants” aracı kullanılarak indellerin ve yapısal varyantların çağrılması gerçekleştirilmiştir. Bu işlem

sonucunda her bir harita için bir indel bir de yapısal varyantlar için olmak üzere iki sistem dosyası oluşmaktadır. İndellerin ve yapısal varyantların çağrılması işleminde kullanılan parametreler Tablo 20 ve Şekil 11’de gösterildiği gibidir.

Tablo 20. İndellerin ve yapısal varyantların çağrılması için kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Ayarlar	<u>Hizalanmamış uç kesim noktalarının anlamlılığı</u> - P-değeri eşiği: 0,0001 - Maksimum yanlışleşme miktarı: 3 <u>Hizalanmamış uç konsensusun hesaplanması</u> - Minimum kalite skoru: 20 - Minimum nispi konsensus kapsamı: 0,1 <u>Varyantların filtrelenmesi</u> - Varyantları filtrele: Seçim yapılmadı - Kırık çiftleri yoksay <u>Referans maskeleme</u> - Seçim yapılmadı

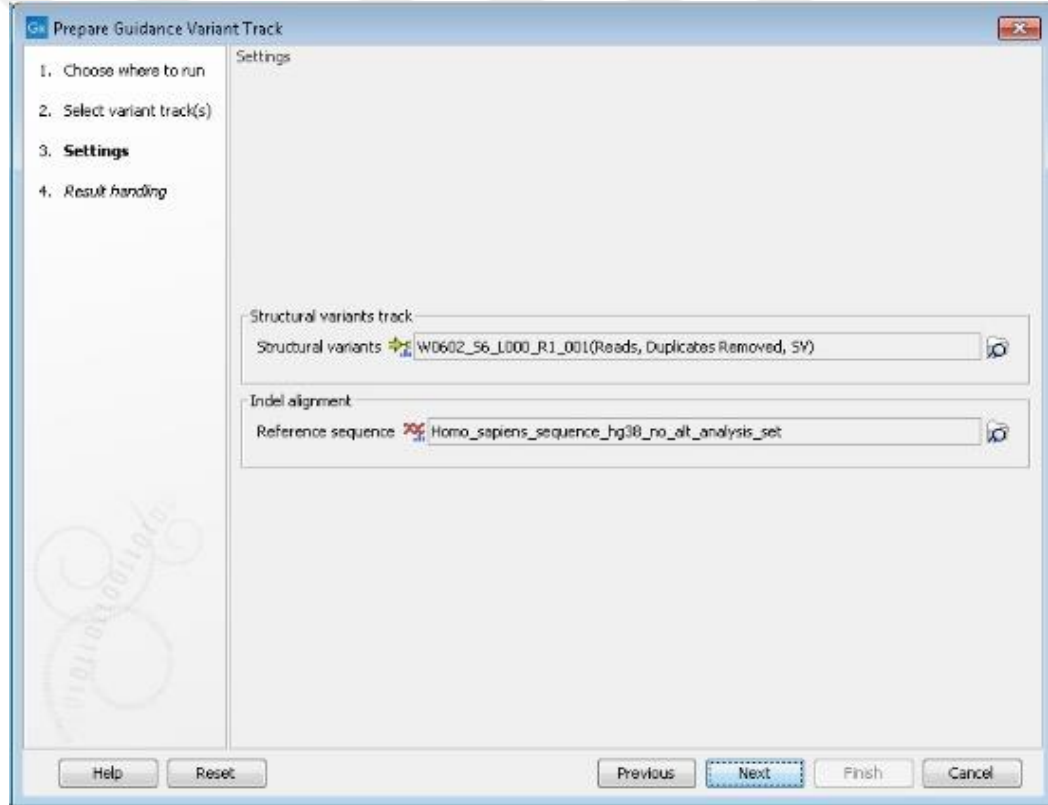


Şekil 11. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” İndellerin ve yapısal varyantların çağrılması parametre seçim görüntüsü

6. İndel sistem dosyaları ile, araç kutusundaki “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Prepare Guidance Variant Track” aracı kullanılarak referans diziye hizalama yapılması ile rehber varyant sistem dosyası oluşturulmuştur. Bu işlemde kullanılan parametreler Tablo 21 ve Şekil 12’de gösterildiği gibidir.

Tablo 21. Rehber varyant sistem dosyası oluşturulması için kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Ayarlar	<u>Yapısal varyant sistem dosyası</u> - Yapısal varyantlar: İlgili haritaya ait yapısal varyant sistem dosyası <u>İndel hizalama</u> - Referans dizi: “Homo sapiens sequence hg38 no alt analysis set”



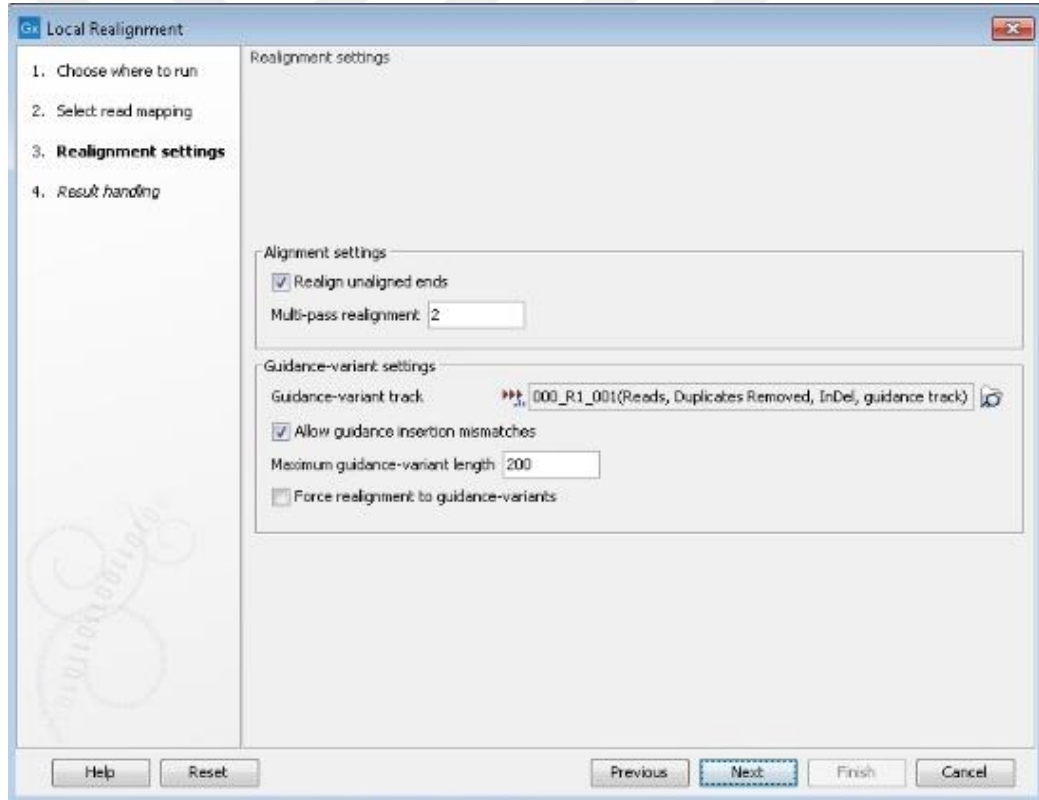
Şekil 12. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” rehber varyant sistem dosyası oluşturulması parametre seçim görüntüsü

7. Yinelenen okumaların uzaklaştırıldığı haritalar, okumaların hizalamalarını iyileştirmek amacıyla, araç kutusunda yer alan “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Local Realignment” aracı kullanılarak lokal olarak

yeniden hizalanmıştır. Lokal yeniden hizalama işleminde kullanılan parametreler Tablo 22 ve Şekil 13'te gösterildiği gibidir.

Tablo 22. Lokal yeniden hizalama işleminde kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Ayarlar	<u>Hizalama ayarları</u> - Hizalanmamış uçları yeniden hizala - Çok-geçişli yeniden hizalama: 2 <u>Rehber varyant ayarları</u> - Rehber varyant dosyası: Bir önceki adımda oluşturulan rehber varyant dosyası - Rehber insersiyon yanlış eşleşmelerine izin ver - Maksimum rehber-varyant uzunluğu: 200 - Rehber varyantlara yeniden hizalamaya zorla: Seçim yapılmadı



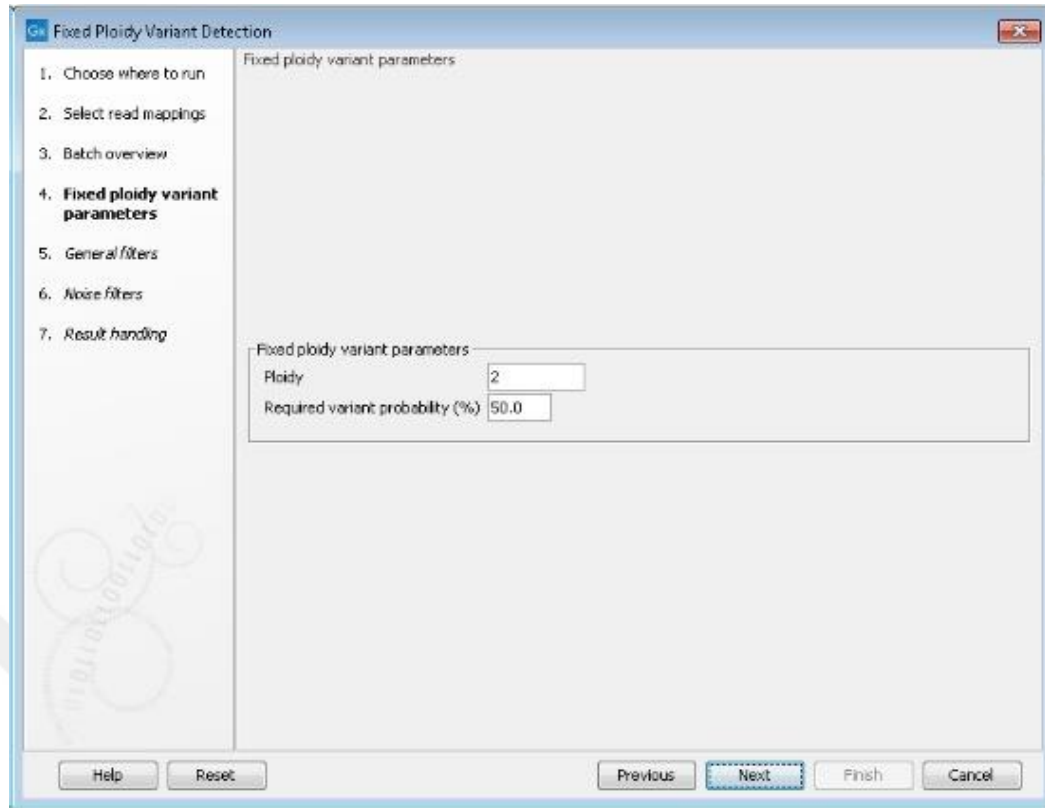
Şekil 13. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” lokal yeniden hizalama işlemi parametre seçim görüntüsü

- Lokal yeniden hizalaması yapılmış haritalardan, araç kutusundaki “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Variant detection” seçeneği içerisindeki “Fixed Ploidy Variant Detection” aracı kullanılarak varyantların çağırılması gerçekleştirilmiştir. Bu varyant çağırma aracı,

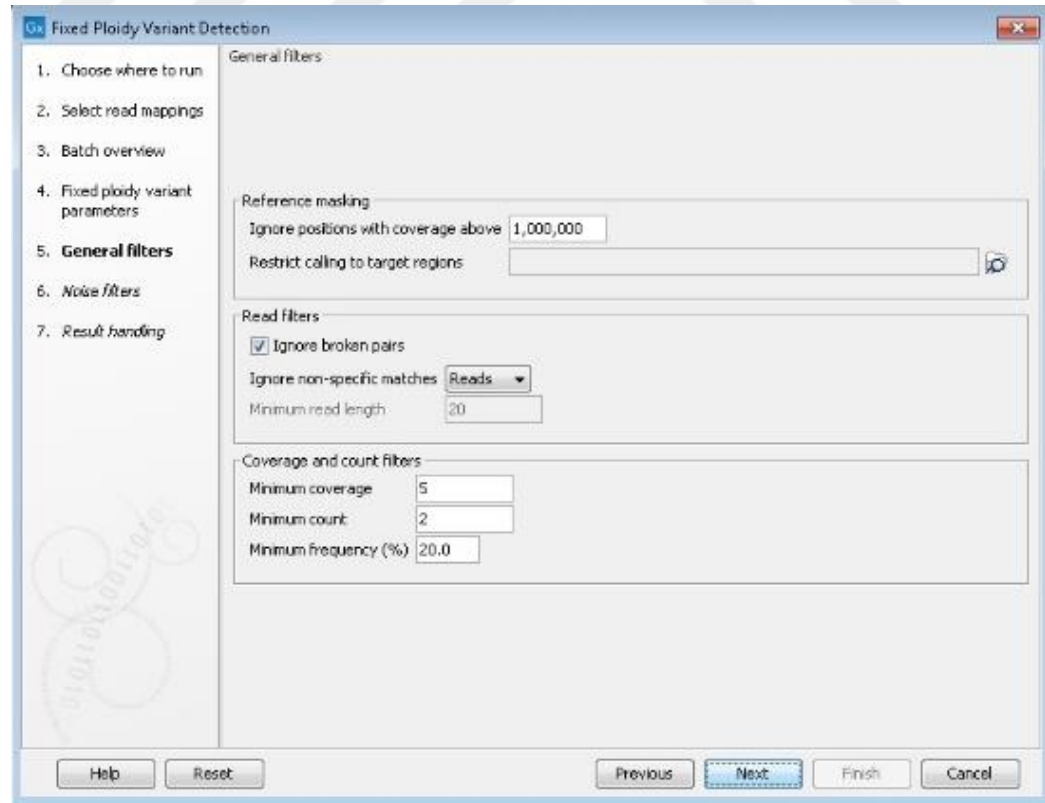
maksimum olabilirlik yöntemli Bayesian istatistik modeli ile birleştirilmiş bir algoritmayı kullanarak ploidi sayısı belirli olan örnekler için yüksek spesifiklikte varyantların belirlenmesini sağlamaktadır. Varyantların çağrılması işleminde kullanılan parametreler Tablo 23 ve sırasıyla Şekil 14, Şekil 15 ve Şekil 16’da gösterildiği gibidir.

Tablo 23. “Fixed Ploidy Variant Detection” aracı ile varyant çağırma için kullanılan parametreler

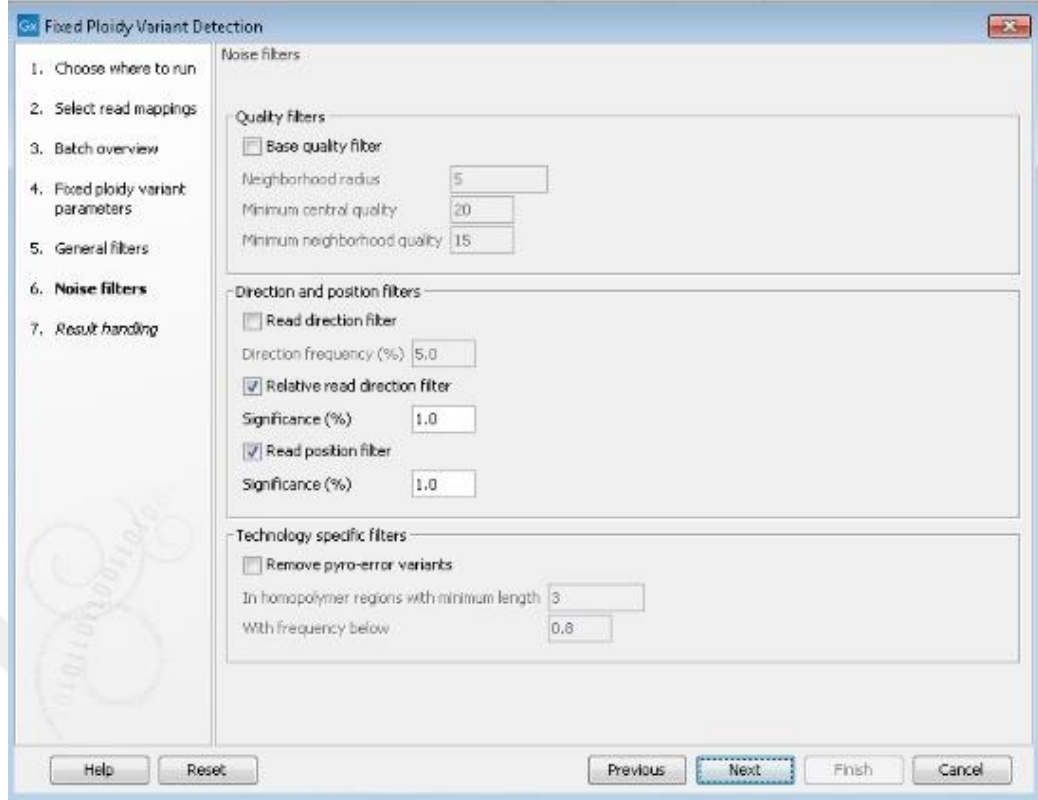
	Seçilen Parametreler
“Fixed ploidy” varyant parametreleri	- Ploidi: 2 - Gereken varyant olasılığı (%): 50
Genel filtreler	<u>Referans maskeleme</u> - Kapsamı şunun üzerinde olan pozisyonları yoksay: 1.000.000 <u>Okuma filtreleri</u> - Kırık çiftleri yoksay - Spesifik olmayan eşleşmeleri yoksay: ‘okumalar’ <u>Kapsam ve “count” filtreleri</u> - Minimum kapsam: 5 - Minimum “count”: 2 - Minimum frekans (%): 20
Gürültü filtreleri	<u>Kalite filtreleri</u> - Seçim yapılmadı <u>Yön ve pozisyon filtreleri</u> - Nispi okuma yönü filtresi Anlamlılık (%): 1 - Okuma yönü filtresi: Seçim yapılmadı - Okuma pozisyonu filtresi Anlamlılık (%): 1 <u>Teknoloji spesifik filtreler</u> - Seçim yapılmadı



Şekil 14. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” “Fixed Ploidy Variant Detection” aracı ile varyant çağırma parametre seçim görüntüsü



Şekil 15. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” variant çağırma genel parametre seçim görüntüsü

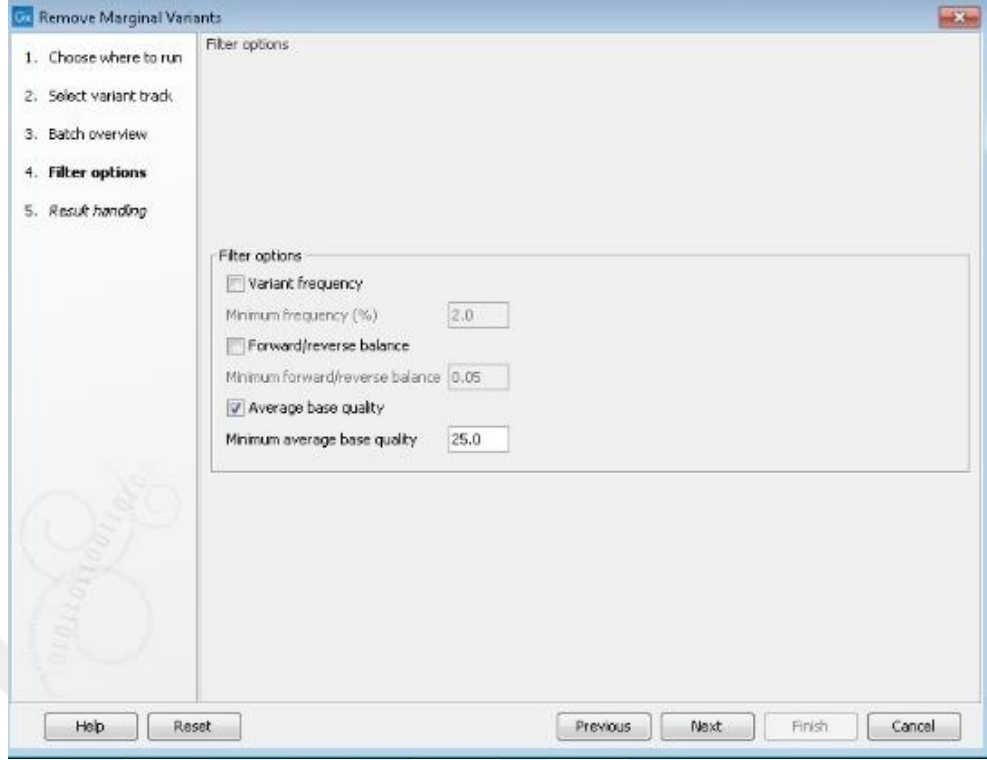


Şekil 16. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” variant çağırma gürültü filtreleme parametre seçim görüntüsü

9. Bir önceki adım sonrası oluşan varyant çağırma dosyalarından, “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Variant Filtering” seçeneği içerisindeki “Remove Marginal Variants” aracı kullanılarak olası yanlış pozitif varyantların uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde kullanılan parametreler Tablo 24 ve Şekil 17’de gösterildiği gibidir.

Tablo 24. Marjinal varyantların uzaklaştırılması işleminde kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Filtre ayarları	- Varyant frekansı: Seçim yapılmadı - İleri/Geri dengesi: Seçim yapılmadı - Ortalama baz kalitesi Minimum ortalama baz kalitesi: 25



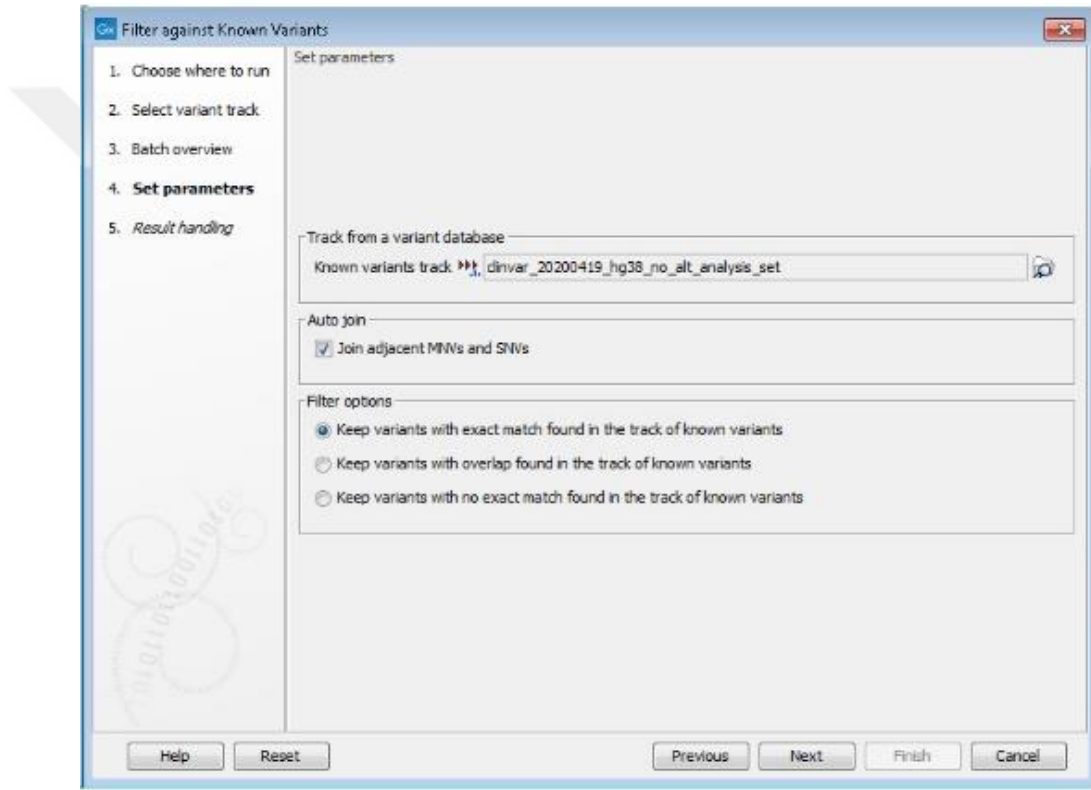
Şekil 17. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” marjinal varyantların uzaklaştırılması parametre seçim görüntüsü

10. Varyantların veri tabalarında tanımlı olup olmadıklarını değerlendirmek amacıyla filtreleme işlemleri gerçekleştirildi.

- a. Klinik anlamlılık taşıyan varyantları elde edebilmek amacıyla, adım 9 sonrası oluşan varyant çağırma dosyalarından, “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Variant Filtering” seçeneği içerisindeki “Filter against Known Variants” aracı kullanılarak QIAGEN referans veri kütüphanesindeki “ClinVar 20200419” ile kesin eşleşen varyantları filtrelenmesi gerçekleştirildi. “ClinVar 20200419” ile kesin eşleşen varyantların filtrelenmesi işleminde kullanılan parametreler Tablo 25 ve Şekil 18’de gösterildiği gibidir.

Tablo 25. ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşen varyantların filtrelenmesi işleminde kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Genel ayarlar	<u>Bir varyant veritabanı dosyası</u> - Bilinen varyant dosyası: “clinvar 20200419 hg38 no alt analysis set” <u>Otomatik katma</u> - Bitişik MNV ve SNV’leri kat <u>Filtreleme ayarları</u> - Bilinen varyant dosyasında kesin eşleştiği bulunan varyantları tut



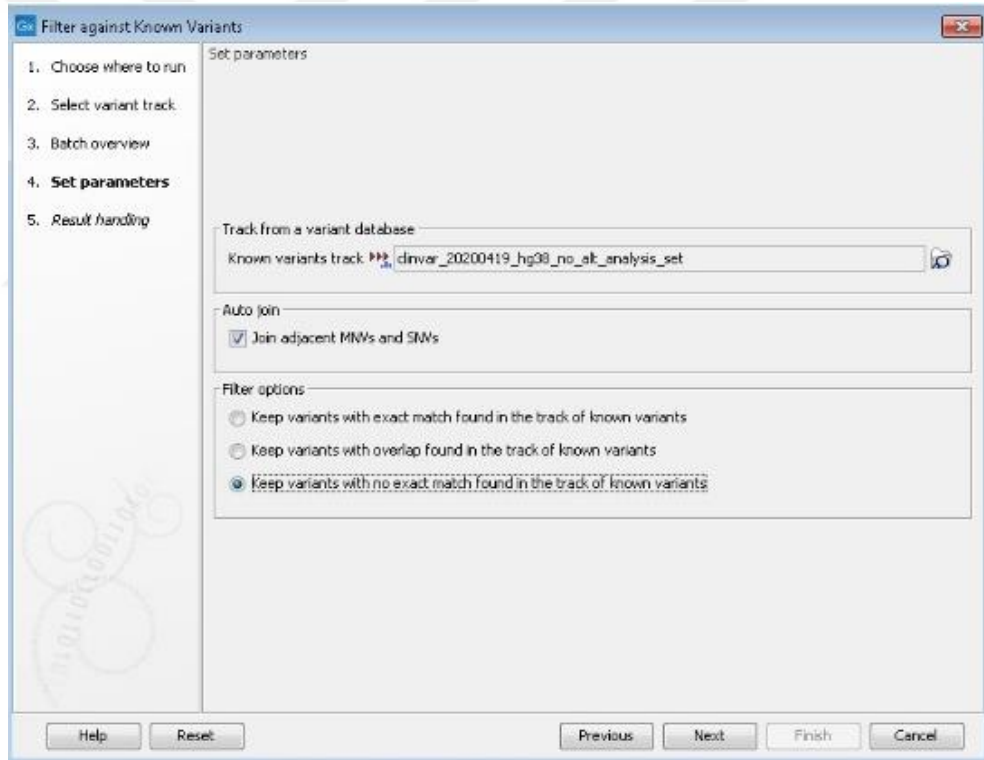
Şekil 18. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşen varyantların filtrelenmesi parametre seçim görüntüsü

- b. ClinVar veri tabanında yer almayan varyantları elde edebilmek amacıyla, adım 9 sonrası oluşan varyant çağırma dosyalarından, “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Variant Filtering” seçeneği içerisindeki “Filter against Known Variants” aracı kullanılarak QIAGEN referans veri kütüphanesindeki “ClinVar 20200419” ile kesin eşleşmeyen varyantların filtrelenmesi gerçekleştirildi. “ClinVar 20200419” ile kesin eşleşmeyen varyantların

filtrelenmesi işleminde kullanılan parametreler Tablo 26 ve Şekil 19’da gösterildiği gibidir.

Tablo 26. ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşmeyen varyantların filtrelenmesi işleminde kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Genel ayarlar	<u>Bir varyant veritabanı dosyası</u> - Bilinen varyant dosyası: “clinvar 20200419 hg38 no alt analysis set” <u>Otomatik katma</u> - Bitişik MNV ve SNV’leri kat <u>Filtreleme ayarları</u> - Bilinen varyant dosyasında kesin eşleşme bulunmayan varyantları tut



Şekil 19. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşmeyen varyantların filtrelenmesi parametre seçim görüntüsü

- c. dbSNP veri tabanı ile eşleşen varyantları bulmak için QIAGEN referans veri kütüphanesindeki dbSNP varyant dosyası yerine <https://ftp.ncbi.nih.gov/snp/> sitesinden manuel olarak indirilen tüm dbSNP v151 varyantlarını içeren “All 20180418” dosyası kullanıldı. ClinVar’da yer almayıp dbSNP veri tabanında yer alan varyantları elde

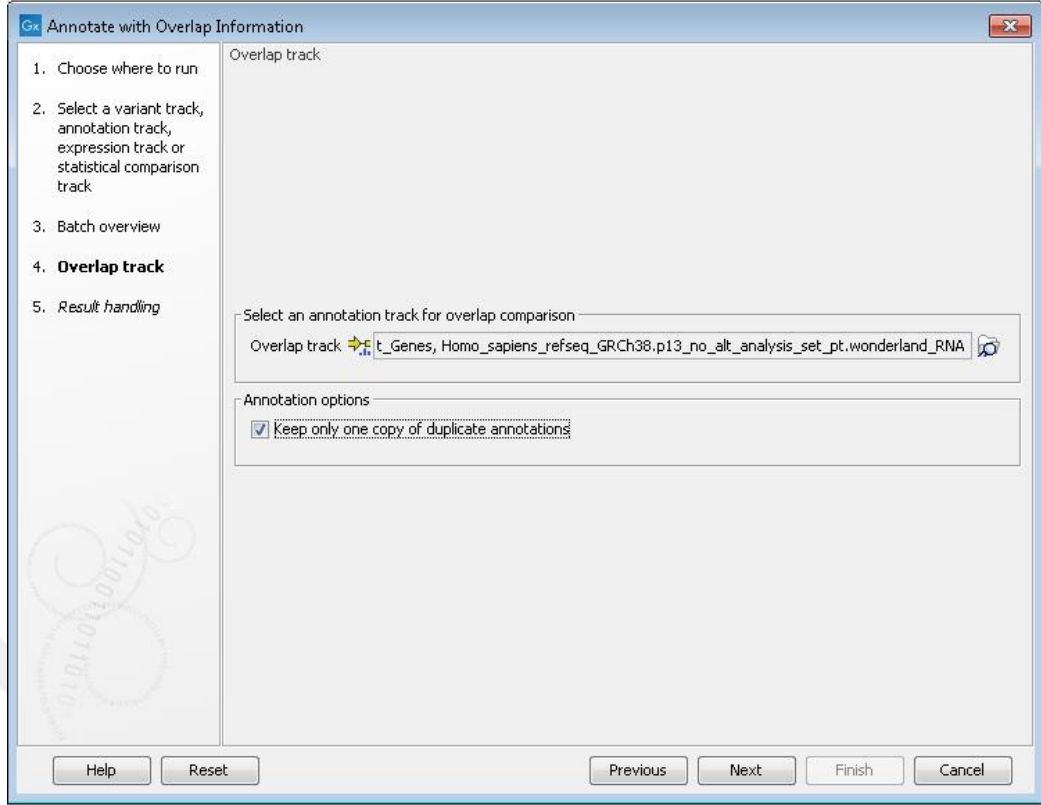
edebilmek amacıyla, adım 10-b sonrası oluşan filtrelenmiş varyant dosyalarından, “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Variant Filtering” seçeneği içerisindeki “Filter against Known Variants” aracı kullanılarak “All 20180418” ile kesin eşleşen varyantların filtrelenmesi gerçekleştirildi. Bu işlemde kullanılan parametreler, bilinen varyant dosyası olarak “All 20180418” ‘in seçilmesi ile adım 10-a daki gibi gerçekleştirilmiştir.

- d. Veri tabanların tanımlanmayan varyantları elde edebilmek amacıyla, adım 10-b sonrası oluşan filtrelenmiş varyant dosyalarından, “Resequencing Analysis” seçeneği altında yer alan “Variant Filtering” seçeneği içerisindeki “Filter against Known Variants” aracı kullanılarak “All 20180418” ile kesin eşleşmeyen varyantların filtrelenmesi gerçekleştirildi. Bu işlemde kullanılan parametreler, bilinen varyant dosyası olarak “All 20180418” ‘in seçilmesi ile adım 10-b’deki gibi gerçekleştirilmiştir.

11. Tanımlanmış ve tanımlanmamış olarak elde edilen varyantların hangi gen ve transkriptlerde bulunduğu dair bilgilerin elde edilmesi amacıyla, “Track Tools” seçeneği altında yer alan “Annotate and Filter” seçeneği içerisindeki “Annotate with overlap Information” aracı ile QIAGEN referans veri kütüphanesindeki dosyalar kullanılarak ek açıklama (annotate) işlemi gerçekleştirildi. Gen ve transkript bilgilerinin ek açıklama işlemi ile elde edilmesi için kullanılan parametreler Tablo 27 ve Şekil 20’de gösterildiği gibidir.

Tablo 27. Varyantların hangi gen ve transkriptlerde bulunduğu dair bilgilerin elde edilmesi işleminde kullanılan parametreler

	Seçilen Parametreler
Örtüşme dosyası	<u>Örtüşme karşılaştırması için bir ek açıklama dosyası seçin</u> - Örtüşme dosyası: “Homo sapiens refseq GRCh38.p3 no alt analysis set pt.wonderland RNA” ve “Homo sapiens refseq GRCh38.p13 no alt analysis set Genes” <u>Ek açıklama ayarları</u> - Yinelenen ek açıklamaların yalnızca tek bir kopyasını tut



Şekil 20. “CLC Genomics Workbench 20.0.4” varyantların bulunduğu gen ve transkript bilgilerinin elde edilmesi parametre seçimi görüntüsü

Ayrıca, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme bölgesi bozulması tahmin analizleri ve “1000 genome phase 3” veri tabanı alel frekans verileri, ekzon verileri için de ek açıklama (annotate) işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.5. İleri Biyoinformatik Analizler

Varyantların anlamlılık değerini değerlendirmek amacıyla, VarSome ve Franklin varyant tarama veri tabanlarında tarandı. Varyantların anlamlılık değerleri ACMG/AMP 2015 rehberine göre patolojik, olası patojenik, benign, olası benign ve VUS olarak ifade edilmektedir.

“1000 genome phase 3” veri tabanı alel frekans verileri için gerçekleştirilen ek açıklama işlemi sonucu elde edilen eksik alel frekans verilerini sağlamak ve homozigot alel miktarı verilerini elde etmek amacıyla ilgili varyantlar, gnomAD veri tabanında tarandı.

3.2.3. Validasyon Deneyleri

Tüm ekzom dizileme çalışması analiz sonuçlarında hasta H2 ve H4 örneklerinde *SERPING1* geninde HAÖ için patojenik olabilecek varyasyon saptamamız nedeniyle, bu varyasyonların ailesel olup olmadığını değerlendirmek amacıyla ilgili gen bölgesi için spesifik primerler kullanılarak validasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle validasyon deneylerinde kullanılmak üzere ilgili *SERPING1* gen bölgelerinin amplifikasyonu için konvansiyonel PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında konvansiyonel PCR ürünleri kullanılarak her iki hasta ve aile bireylerinin örnekleri kullanılarak HRM, H2 ve aile bireylerinin örnekleri kullanılarak Sanger dizileme ve H4 ve aile bireylerinin örnekleri kullanılarak hedefli yeni nesil dizileme validasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Konvansiyonel PCR

Hasta H2, annesi (H2-A), babası (H2-B) ve kardeşi (H2-K) için saptanan uçbirleştirme bölgesi bozulması varyasyonunu içeren bölge ve hasta H4, annesi (H4-A), babası (H4-B), çocukları (H4-C1 ve H4-C2) için saptanan çerçeve kayması varyasyonunu içeren bölge spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir (Tablo 28). Konvansiyonel PCR için reaksiyon karışımı özellikleri Tablo 29’da, reaksiyon şartları ise Tablo 30’da gösterildiği gibidir.

Tablo 28. *SERPING1* gen varyasyonlarını içeren gen bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan spesifik primerlerin dizileri ve oluşacak ampikon uzunlukları

Hasta	Primer tipi	Primer dizisi	Ampikon uzunluğu
H2 ve aile bireyleri	İleri primer	5'-GGGAGGAGCCAGGGAGAAG-3'	208 bp
	Geri primer	5'-AGGGTCAGCAGGGTCAGC-3'	
H4 ve aile bireyleri	İleri primer	5'-AGAGTCCTAAGCAACAACAGTG-3'	471 bp
	Geri primer	5'-TCAAAGTTTGGTCAATGAAATGGG-3'	

Tablo 29. Konvansiyonel PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Hacim (µl)
2X SYBR Mix	10
İleri Primer	2 (0,5 µM)
Geri Primer	2 (0,5 µM)

Nukleazsız su	4
Genomik DNA	2
Total	20

Tablo 30. Konvansiyonel PCR reaksiyon şartları

Süre	Sıcaklık	Döngü sayısı
15 dk	95 °C	1
30 sn	95 °C	40
30 sn	60 °C	
30 sn	72 °C	
1 dk	72 °C	1
∞	4 °C	Hold

3.2.3.2. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM)

Yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi, nükleik asit dizilerindeki genetik varyasyonları tanımlamak için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu sonrası (post-PCR) analizidir. Analiz, bir çift iplikli DNA (dsDNA) bağlayan boya varlığında ilgilenilen bölgenin PCR amplifikasyonu ile başlamaktadır. Boya, dsDNA'ya bağlandığında yüksek bir floresansa ve bağlanmamış durumda ise düşük floresansa sahiptir. Amplifikasyonu takiben, kademeli sıcaklık artışıyla PCR ürünü yavaş yavaş çift iplikli yapıdan tek iplikçiğe ayrılmaktadır. dsDNA tek iplikçiklere ayrıldığında (veya eridiğinde) boya salınarak floresanda bir değişikliğe neden olmaktadır. Sıcaklıktaki değişiklik başına çok sayıda floresan veri noktasını yüksek hassasiyetle yakalanarak ampliconun karakteristik bir erime eğrisi profili oluşmaktadır. Hasta H2, H4 ve her iki hastanın aile bireyleri için HRM analizi, içeriğinde “ResoLight” boyası bulunan “Master Mix” içeren “LightCycler 480 HighResolution Melting Master Kit” kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon, LightCycler 480 kantitatif PCR (qPCR) cihazında gerçekleştirildi. HRM analizi için reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 31’de, reaksiyon şartları ise Tablo 32’de gösterildiği gibidir.

Tablo 31. HRM analizi için reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Hacim (µl)
2X Master Mix	5
MgCl ₂	0,8 (2mM)
İleri Primer	1,2 (0,6 µM)
Geri Primer	1,2 (0,6 µM)
DNA (PCR ürünü) (50ng)	1,8
Total	10

Tablo 32. HRM analizi qPCR reaksiyon şartları

Program	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık geçiş hızı	Yakalama
İlk denatürasyon	95 °C	10 dk	4,4 °C/sn	
Döngü (40)	95 °C	10 sn	4,4 °C/sn	
	60 °C	15 sn	2,2 °C/sn	
	72 °C (Tek)	10 sn	4,4 °C/sn	
Erime	95 °C	1 dk	4,4 °C/sn	
	40 °C	1 dk	2,2 °C/sn	
	60 °C	1 sn	1 °C/sn	
	90 °C	Devamlı	0,02 °C/sn	25 (her °C)
Soğutma	40 °C	10 sn	2,2 °C/sn	

3.2.3.3. Sanger Dizileme

Sanger dizileme, *in vitro* DNA replikasyonu sırasında zincir sonlandırıcı dideoksinukleotitlerin (ddATP, ddCTP, ddGTP ve ddTTP) DNA polimeraz tarafından zincire dahil edilmesi temeli dayanan klasik DNA dizileme yöntemidir. Bir kapiler elektroforez işlemi sonrası, zincire eklenen dideoksinukleotitlere bağlı farklı floresan boyaların bir lazer sistemi ile saçılan ışınimleri belirlenerek dizi spesifik floresan pikleri elde edilir. Hasta H2’de saptanan *SERPING1* geni uçbirleştirme bölgesi bozulması varyasyonunun validasyonu için H2 ve aile bireylerine ait konvansiyonel

PCR örnekleri ve hasta H4'te saptanan *SERPING1* çerçeve kayması varyasyonunun validasyonu için H4 ve aile bireylerine ait konvansiyonel PCR örnekleri kullanılarak Sanger dizileme yöntemi gerçekleştirildi. Sanger dizileme için deneysel basamaklar sırasıyla, PCR örneklerinin saflaştırılması, BigDye uygulaması, ikinci saflaştırma ve cihaza yükleme şeklindedir.

PCR örneklerinin saflaştırılması

PCR örneklerinin saflaştırılması, “GeneDireX Kit” ile reaktif miktarları optimize edilerek kit protokolü göre gerçekleştirildi.

1. 20 µl PCR ürününe 100 µl “Buffer B” ilave edildi ve vortekslenerek karıştırıldı.
2. Karışım, bir toplama tüpü içerisine yerleştirilen “PG kolonu” içerisine aktarıldı ve 14000 x g’de 30 sn santrifüj edildi.
3. Filtrat boşaltıldı. Kolon, aynı toplama tüpü içerisine tekrar yerleştirildi.
4. Kolon içerisine 200 µl “Buffer W1” ilave edildi ve 14000 x g’de 30 sn santrifüj edildi.
5. Filtrat boşaltıldı. Kolon, aynı toplama tüpü içerisine tekrar yerleştirildi.
6. Kolon içerisine 300 µl “Buffer W2” (içerisine etanol ilave edilmiş) ilave edildi ve 14000 x g’de 30 sn santrifüj edildi.
7. Filtrat boşaltıldı. Kolon, aynı toplama tüpü içerisine tekrar yerleştirildi.
8. Kalan “Buffer W2”yi uzaklaştırmak için 14000 x g’de 2 dk tekrar santrifüj edildi.
9. Kolon, temiz bir 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirildi. Kolonun tam ortasına 50 µl “Buffer E” ile ilave edildi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında 14000 x g’de 2 dk santrifüj edilerek saflaştırılmış ürün elüe edildi.

BigDye uygulaması

“BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” kullanılarak spesifik ileri ve geri primerler ile iki ayrı amplifikasyon reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyon konvansiyonel PCR cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 33’te, reaksiyon şartları ise Tablo 34’de gösterildiği gibidir.

Tablo 33. BigDye uygulaması reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Reaktifler	Miktar (İleri primer)	Miktar (Geri primer)
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing ready reaction mix	2 µl	2 µl
“BigDye Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer”	4 µl	4 µl
İleri primer	1 µl	-
Geri primer	-	1 µl
dH2O	10 µl	10 µl
Saflaştırılmış örnekler	3 µl	3 µl

Tablo 34. BigDye uygulaması reaksiyon şartları

Sıcaklık	Süre	Döngü
96 °C	1 dk	1
96 °C	10 sn	25
50 °C	5 sn	
60 °C	4 dk	
4 °C	hold	

İkinci saflaştırma

ZR DNA Sequencing Clean-Up Kit kullanılarak BigDye uygulaması yapılan örneklerin saflaştırılması gerçekleştirildi.

1. 20 µl’lik her bir dizileme reaksiyonuna 240 µl “Sequencing Binding Buffer” ilave edildi.
2. Karışım bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş “Zymo-Spin IB” kolonu içerisine aktarıldı ve 13000 rpm’de (15000-16000 xg) 30 sn santrifüj edildi.
3. Kolon içerisine 300 µl “Sequencing Wash Buffer” ilave edildi ve 13000 rpm’de (15000-16000 xg) 30 sn santrifüj edildi.
4. Kolon matriksine doğrudan 20 µl su ilave edildi. Kolon 1,5 ml’lik bir mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirildi ve 13000 rpm’de (15000-16000 xg)

15 sn santrifüj edilerek dizileme işlemi için hazır ultra saf DNA örnekleri elüe edildi.

Cihaza yükleme

Saflaştırılmış DNA örnekleri, dizileme işlemi yapılması için uygun plakalara aktarıldı. Cihaza yüklemeden önce 96 °C’de 10 dk inkübe edildi ve sonrasında soğuk blok üzerine alındı. Dizileme işlemi için plaka, “Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer” cihazına yüklendi ve dizileme verilerinin toplanması “3500 Series Data Collection Software 3” veri toplama yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

Analiz

Elde edilen ham veriler “Clc Genomics workbench 20.0.4 kullanılarak *SERPING1* gen dizisi referans alınarak değerlendirildi.



Bulgular

4.1. Tüm Ekzom Dizileme Analiz Bulguları

4.1.1. Tüm Ekzom Dizileme Referans Genoma Haritalandırma Hedef Bölge Kapsam Raporları

Her bir hastada, hedef bölge için genel kapsam raporları Tablo 35’te, minimum kapsam yüzdeleri Tablo 36’da verilmiştir.

Tablo 35. Hedef bölge için kapsam raporları

	H1	H2	H3	H4	H5
Hedef bölge sayısı	192.264	192.264	192.264	192.264	192.264
Hedeflenen bölgelerin total uzunluğu	33.936.165	33.936.165	33.936.165	33.936.165	33.936.165
Ortalama kapsam	145,5	164,1	161,5	122,2	146,9
Medyan kapsam	142,0	158,0	156,0	119,0	142,0
Kapsamı 30’un altında olan hedef bölgelerin sayısı	4.649	4.303	4.228	4.779	4.258
Kapsamı 30’un altında olan pozisyonları içeren hedef bölgelerin total uzunluğu	1.268.347	1.154.265	1.149.371	1.165.798	1.047.191
Kapsamı 30’un altında olan hedef bölge pozisyonlarının total uzunluğu	686.244	653.997	622.857	677.908	643.955

Tablo 36. Hedef bölge kapsam yüzdeleri

Kapsam	H1	H2	H3	H4	H5
1X	%98,61	%98,65	%98,76	%98,65	%98,65
5X	%98,46	%98,49	%98,61	%98,49	%98,50
10X	%98,35	%98,38	%98,50	%98,37	%98,40
20X	%98,15	%98,22	%98,32	%98,18	%98,23
40X	%97,74	%97,88	%97,94	%97,71	%97,91
80X	%94,39	%96,12	%95,00	%86,16	%94,28
100X	%84,32	%90,39	%89,18	%66,95	%83,86

4.1.2. Tüm Ekzom Dizileme Sonucu Saptanan Varyantlar

“Fixed PloidyVaryant Detection” aracı ile varyant çağırma sonucu ve ileri filtrelemeler sonucu elde edilen tüm varyant sayıları zigosite durumları belirtilmiş olarak Tablo 37’de verilmiştir. Manuel olarak, ClinVar ve dbSNP veri tabanlarına göre filtrelemelere ilaveten elde edilen varyantların “count” (ilgili genomik pozisyonu örten okuma sayısı) ≥ 25 olan ileri/geri okuma dengesi $\geq 0,25$ ve ekzon bilgisi olmayan (muhtemel gen dışı bölgeler) varyantlar dışlanmıştır. Tanımlanmamış varyantlarda, bu üç koşula ilaveten referans genom kaynaklı klonal bölgelerin olması nedeniyle saptanan klonal varyantlar da dışlanmıştır.

Tablo 37. Saptanan varyant miktarları ve zigositelere göre hastalardaki dağılımları

		“ Fixed Ploidy” varyant çağırma	Marjinal varyantların uzaklaştırılması	ClinVar ile kesin eşleşenler	Manuel Filtreleme	Clinvar dışı dbSNP’ler	Manuel Filtreleme	Bilinmeyenler	Manuel Filtreleme
H1	Toplam	195.557	185.242	10.752	7.198	165.629	52.556	8.861	276
	Heterozigot	131.881	122.062	6.782	4.511	107.624	30.692	7.656	243
	Homozigot	63.676	63.180	3.970	2.687	58.005	21.864	1.205	33
H2	Toplam	208.503	197.224	11.210	7.376	175.934	54.985	10.080	277
	Heterozigot	138.639	127.907	6.883	4.527	112.467	32.204	8.557	237
	Homozigot	69.864	69.317	4.327	2.849	63.467	22.781	1.523	40
H3	Toplam	203.509	192.500	10.923	7.336	172.517	54.785	9.060	255
	Heterozigot	133.693	123.173	6.698	4.544	108.650	31.505	7.825	216
	Homozigot	69.816	69.327	4.225	2.792	63.867	23.280	1.235	39
H4	Toplam	188.142	177.297	10.633	6.862	158.199	46.937	8.465	256
	Heterozigot	124.213	113.930	6.451	4.038	100.100	25.650	7.379	230
	Homozigot	63.929	63.367	4.182	2.824	58.099	21.287	1.086	26
H5	Toplam	201.425	189.925	10.864	7.080	170.075	52.419	8.986	245
	Heterozigot	133.324	122.397	6.640	4.318	107.984	30.091	7.773	211
	Homozigot	68.101	67.528	4.224	2.762	62.091	22.328	1.213	34

“Fixed PloidyVaryant Detection” aracı ile varyant çağırma sonucu ve ileri filtrelemeler sonucu elde edilen tüm varyantların varyasyon tipleri, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme (“splicing”) bölge etkisi durumlarına göre sayıları her bir hasta için sırasıyla Tablo 38, Tablo 39, Tablo 40, Tablo 41 ve Tablo 42’de gösterildiği gibidir.

Tablo 38. H1 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fıtirelemelere göre miktarları

H1	“ Fixed Ploidy,” varyant çağırma	Marjinal varyantların uzaklaştırılması	ClinVar ile kesin eşleşenler	Manuel Fıtireleme	Clinvar dış dbSNP'ler	Manuel Fıtireleme	Bilinmeyenler	Manuel Fıtireleme
Varyasyon tipleri								
SNV	161.382	153.796	9.915	6.675	137.072	47.171	6.809	177
MNV	3.214	2.957	63	40	2.033	518	861	12
İnsersiyon	13.223	12.927	368	214	12.243	2.264	316	18
Delesyon	17.279	15.137	406	269	14.152	2.561	579	31
Yeni yerleşim (Replacement, Delins)	459	425	0	0	129	42	296	38
Amino asit değişimleri								
Sinonim	1.228	1.225	2.345	23	9.872	9.379	33	19
Sinonim olmayan	12.678	12.614	1.936	1.846	10.529	9.605	149	92
Uçbirleştirme bölgesi etkisi								
Bölgede olası bozulma	588	584	82	73	486	371	16	5

Tablo 39. H2 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fıtirelemelere göre miktarları

H2	Fixed Ploidy” varyant çağırma	Marjinal varyantların uzaklaştırılması	ClinVar ile kesin eşleşenler	Manuel Fıtireleme	Clinvar dış dbSNP’ler	Manuel Fıtireleme	Bilinmeyenler	Manuel Fıtireleme
Varyasyon tipleri								
SNV	171.579	163.157	10.287	6.821	145.041	49.151	7.829	174
MNV	3.521	3.254	67	38	2.198	554	989	17
İnsersiyon	14.104	13.828	412	224	13.063	2.491	353	22
Delesyon	18.821	16.541	441	291	15.499	2.491	601	24
Yeni yerleşim (Replacement, Delins)	478	444	3	2	133	38	308	40
Amino asit değişimleri								
Sinonim	12.112	12.081	2.306	2.265	9.731	9.286	44	26
Sinonim olmayan	12.446	12.367	1.872	1.800	10.358	9.481	137	77
Uçbirleştirme bölgesi etkisi								
Bölgede olası bozulma	576	569	71	62	480	370	18	8

Tablo 40. H3 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların filtrelemelere göre miktarları

H3	Fixed Ploidy” varyant çağırma	Marjinal varyantların uzaklaştırılması	ClinVar ile kesin eşleşenler	Manuel Filtreleme	Clinvar dış dbSNP’ler	Manuel Filtreleme	Bilinmeyenler	Manuel Filtreleme
Varyasyon tipleri								
SNV	167.632	159.446	10.048	6.801	142.406	48.883	6.992	155
MNV	3.321	3.047	64	38	2.155	612	828	12
İnsersiyon	13.862	13.605	395	225	12.899	2.486	311	13
Delesyon	18.207	15.945	416	272	14.909	2.761	620	33
Yeni yerleşim (Replacement, Delins)	487	457	0	0	148	43	309	42
Amino asit değişimleri								
Sinonim	12.148	12.107	2.343	2.307	9.724	9.249	40	22
Sinonim olmayan	12.639	12.569	1.883	1.808	10.561	9.703	125	72
Uçbirleştirme bölgesi etkisi								
Bölgede olası bozulma	567	563	96	87	454	355	13	5

Tablo 41. H4 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fıtirelemelere göre miktarları

H4	Fixed Ploidy” varyant çağırma	Marjinal varyantların uzaklaştırılması	ClinVar ile kesin eşleşenler	Manuel Fıtireleme	Clinvar dış dbSNP’ler	Manuel Fıtireleme	Bilinmeyenler	Manuel Fıtireleme
Varyant tipleri								
SNV	155.302	147.142	9.780	6.379	130.793	42.383	6.569	165
MNV	2.993	2.737	59	38	1.912	481	766	7
İnsersiyon	12.561	12.279	372	187	11.625	1.901	282	19
Delesyon	16.834	14.721	421	258	13.730	2.138	570	33
Yeni yerleşim (Replacement, Delins)	452	418	1	0	139	34	278	32
Amino asit değişimleri								
Sinonim	11.854	11.801	2.305	2.248	9.461	8.947	35	22
Sinonim olmayan	12.406	12.329	1.900	1.825	10.289	9.306	140	105
Uçbirleştirme bölgesi etkisi								
Bölgede olası bozulma	559	551	81	72	458	341	12	3

Tablo 42. H5 için varyasyon tipi, amino asit değişimleri ve uçbirleştirme etkisine göre saptanan varyantların fitrelemelere göre miktarları

H5	Fixed Ploidy” varyant çağırma	Marjinal varyantların uzaklaştırılması	ClinVar ile kesin eşleşenler	Manuel Filtreleme	Clinvar dış dbSNP’ler	Manuel Filtreleme	Bilinmeyenler	Manuel Filtreleme
Varyant tipleri								
SNV	166.055	157.450	10.023	6.562	140.478	47.015	6.949	156
MNV	3.326	3.031	70	42	2.143	535	818	19
İnserسیون	13.625	13.331	385	224	12.634	2.310	312	8
Delesyon	17.959	15.686	384	251	14.705	2.531	597	29
Yeni yerleşim (Replacement, Delins)	460	427	2	1	115	28	310	33
Amino asit değişimleri								
Sinonim	12.004	11.962	2.252	2.212	9.670	9.214	40	25
Sinonim olmayan	12.474	12.404	1.865	1.801	10.438	9.571	101	64
Uçbirleştirme bölgesi etkisi								
Bölgede olası bozulma	564	554	91	83	445	344	18	4

4.1.3. Klinik anlamlılığı bilinen varyantlar

“CLC Genomics Workbench 20.0.4” yazılımı ile yapılan analiz sonucunda ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşen varyantları içeren veri dosyası elde edilmiştir. Bu veri dosyasında bir kısım varyant için anlamlılık değeri açısından verilen bilgilerde eksiklik olması nedeniyle “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>” ClinVar’da yer alan tüm varyantları içeren veri dosyası alınmıştır. Analiz sonucu elde edilen varyantlar veri tabanından alınan dosyadaki bilgiler ile manuel olarak tekrar

değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucu klinik anlamlılık değerlerine göre varyantların hastalardaki sayısal dağılımı Tablo 43’te gösterildiği gibidir.

Tablo 43. ClinVar ile kesin eşleşen varyantların klinik anlamlılık değerlerine göre hastalardaki sayısal dağılımı

	H1		H2		H3		H4		H5	
Klinik anlamlılık değeri	Clinvar kesin eşleşen tümü	Manuel filtreleme	Clinvar kesin eşleşen tümü	Manuel filtreleme	Clinvar kesin eşleşen tümü	Manuel filtreleme	Clinvar kesin eşleşen tümü	Manuel filtreleme	Clinvar kesin eşleşen tümü	Manuel filtreleme
Benign*	9.418	6.220	9.877	6.434	9.608	6.375	9.392	5.953	9.642	6.204
Olası benign*	287	206	301	209	281	192	282	192	292	196
VUS*	139	98	168	115	166	114	152	113	145	110
Olası patojenik*	8	6	10	7	8	7	6	6	9	6
Patojenik*	16	13	16	14	16	13	18	16	14	13
Benign/Olası benign	525	429	441	366	484	412	461	372	411	326
Patojenik/Olası patojenik	3	3	2	2	3	3	2	2	2	2
“Drug response”¹	75	43	89	53	77	54	61	38	73	45
“Association”²	15	5	19	5	19	6	13	6	14	6
“Risk factor”³	28	16	34	18	36	21	23	16	32	16
“Protective”⁴	4	2	4	2	5	4	3	3	7	5
“Affects”⁵	2	1	1	-	2	1	4	3	3	2
“Conflicting interpretations of pathogenicity” (CIP)⁶	119	95	129	97	114	85	118	89	119	94
“Other”⁷	4	-	5	-	3	-	-	-	-	-
Not provided”⁸	36	22	33	17	27	11	30	18	26	18
“Affects” ve “Risk factor”	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
Benign ve “Association”	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Benign ve “Drug response”	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Benign ve “Risk factor”	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-
Benign ve “Other”	2	2	1	1	1	1	1	-	2	2
Benign ve “Confers sensitivity”⁹	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-
Benign ve “Association” ve “Confers sensitivity”	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1
Olası benign ve “Other”	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Olası benign ve “Drug response” ve “Other”	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1
Patojenik ve “Protective”	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Patojenik ve “Risk factor”	1	-	2	1	1	-	-	-	1	-
Patojenik ve “Protective” ve “Risk factor”	-	-	1	1	2	2	2	2	2	2
Benign/Olası benign ve “Other”	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
Patojenik/Olası patojenik ve “Other”	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
“Protective” ve “Risk factor”	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
CIP ve “Affects”	1	1	1	1	1	1	-	-	1	1
CIP ve “Other”	2	2	1	1	1	1	2	2	3	3
CIP ve “Protective”	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
CIP ve “Risk factor”	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-
CIPve “Drug response” ve “Other”	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
CIP ve “Other” ve “Risk factor”	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-
Klinik anlamlılık değeri tanımlanmamış	57	28	66	26	61	28	54	25	59	25

*Anlamlılık değeri ACMG/AMP tarafından önerildiği şekilde olan varyantlar.

¹ Bir hastalığı değil, ilaç yanıtını etkileyen varyantlar.

² GWAS çalışmasında tanımlanmış ve klinik anlam açısından yorumlanmış varyantlar.

³ Bir hastalık nedeni olarak değil, hastalık riskini artırır olarak yorumlanan varyantlar.

⁴ Enfeksiyonlar da dahil olmak üzere hastalık riskini azaltan varyantlar.

⁵ Laktoz intoleransı gibi hastalık dışı bir fenotipe neden olan varyantlar.

⁶ Bir konsorsiyum içerisinde çelişkili yorumlamaya sahip, fakat ClinVar’da tek bir gönderimi olan varyantlar.

⁷ Uygun tanımlamaya sahip olmayan varyantlar.

⁸ Klinik anlamı yorumlanmayan varyantlar.

⁹ Duyarlılık oluturabilir varyantlar

ClinVar ile eşleşen varyantların manuel filtreleme sonucunda kalanlarının, belirli beş bağımsız özelliğe göre 1310 adedi, VarSome ve Franklin Genomics varyant tarama veritabanlarında taranmıştır. Tercih edilen beş bağımsız varyant özelliğine göre taranan varyantlar şöyledir; birincisi, ClinVar klinik anlamlılık değeri patojenik, olası patojenik, patojenik/olası patojenik, VUS, CIP olan varyantlar; ikincisi, CLC Genomics yazılımı ile yapılan ClinVar veri tabanı ile kesin eşleştirme sonucu elde edilen varyantlara ait varyasyon tipi bilgileri temel alınarak patojenik olma ihtimali yüksek olan anlamsız, çerçeve kayması, çerçeve içi delesyon ya da insersiyon varyasyon tipi sergileyen varyantlar; üçüncüsü, CLC Genomics yazılımı ile yapılan uçbölgesi birleştirme etkisi analizi sonucu olası uçbirleştirme bölgesi bozulması özelliği taşıyan varyantlar; dördüncüsü, HAÖ sınıflandırmasını oluşturan ve hastalağın

patolojisinden sorumlu olarak tanımlanmış genlerde bulunan varyantlar; beşincisi, H2 ve H4 hastalarında bulunmayan yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında bulunduğu saptanan varyantlardır. Taranan varyantların VarSome veri tabanında belirtilen anlamlılık düzeyine göre hastalardaki sayısal dağılımı Tablo 44'te gösterildiği gibidir.

Tablo 44. VarSome ve Franklin Genomics veri tabanında taranan ClinVar'da tanımlı varyantların VarSome veri tabanındaki anlamlılık düzeyine göre hastalardaki sayısal dağılımı

	H1	H2	H3	H4	H5
Benign¹ (879)	545	289	530	499	533
Olası Benign² (99)	29	25	27	31	32
Patojenik³ (18)	7	4	4	7	5
Olası Patojenik⁴ (23)	9	8	6	11	9
VUS⁵ (169)	68	61	54	51	63
VUS-Benign⁶ (6)	2	2	4	1	1
VUS-Patojenik⁷ (31)	15	7	17	12	9
VUS-Olası Patojenik⁸ (85)	32	28	36	31	34

¹Franklin veri tabanında bu varyantlardan 44'ünün olası benign, 17'sinin VUS-olası benign, 12'sinin VUS, 3'ünün VUS-Olası patojenik, 1'inin olası patojenik ve 1'inin patojenik olduğu saptanmıştır.

²Franklin veri tabanında bu varyantlardan 12'sinin benign, 19'unun VUS-Olası benign, 18'inin VUS ve 12'sinin VUS-Olası patojenik olduğu saptanmıştır.

³Franklin veri tabanında bu varyantlardan 1'inin benign, 1'inin olası benign, 7'sinin VUS-Olası patojenik ve 4'ünün olası patojenik olduğu saptanmıştır.

⁴Franklin veri tabanında bu varyantlardan 2'sinin VUS-Olası benign, 2'sinin VUS ve 11'inin VUS-Olası patojenik olduğu saptanmıştır.

⁵Franklin veri tabanında bu varyantlardan 11'inin benign, 23'ünün olası benign 67'sinin VUS-Olası benign, 21'inin VUS-Olası patojenik ve 2'sinin olası patojenik olduğu saptanmıştır.

⁶Franklin veri tabanında bu varyantlardan 1'inin benign, 4'ünün VUS, 1'inin VUS-Olası benign olduğu saptanmıştır.

⁷Franklin veri tabanında bu varyantlardan 8'inin benign, 1'inin olası benign, 3'ünün VUS-Olası benign, 4'ünün VUS, 14'ünün VUS-Olası patojenik olduğu saptanmıştır.

⁸Franklin veri tabanında bu varyantlardan 4'ünün benign, 10'unun VUS, 29'nun VUS-Olası benign, 3'ünün olası patojenik ve 1'inin patojenik olduğu saptanmıştır.

Varyantların HAÖ patolojisi ile ilişkisi açısından değerlendirmek için öncelikle HAÖ patolojisinden sorumlu olduğu bilinen genlerdeki varyantların mevcudiyetine bakılmıştır. *SERPING1* geninde 3, *F12* geninde 5 ve *PLG* geninde 1 varyant bulunduğu saptanmıştır. *SERPING1* ve *F12* genlerinde saptanan varyantların ClinVar veri tabanında HAÖ patolojisi için doğrulanmış olarak benign olduğu belirtilmiştir. Klinik anlamlılığı benign olarak belirtilen *PLG* genindeki varyantın ise Otitis media hastalığı için benign olduğu doğrulaması var iken HAÖ için bir tanımlama yoktur. HAÖ patolojisinden sorumlu genlerde bulunan ClinVar'da yer alan varyantların klinik anlamlılık değerleri ve zigosite durumlarına göre hastalardaki dağılımı Tablo 45'te gösterildiği gibidir.

Tablo 45. HAÖ patolojisinden sorumlu genlerde bulunan ClinVar'da yer alan varyantların klinik anlamlılık değerleri ve zigosite durumlarına göre hastalardaki dağılımı

SERPING1 varyantlar	Varyasyon tipi	dbSNP	ClinVar	Kriter referans	VarSome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr11:57611697:A:G c.1030-20A>G	İntronik	2511988	Benign	ACGS Guidelines, 2013; ACMG Guidelines, 2015	Benign	Benign	Ht	Ht	Hm	Ht	Ht
chr11:57602257:G:A c.685+88G>A	İntronik	11229063	Benign	ACMG Guidelines, 2015	Benign	Benign	-	-	Ht	Ht	-
chr11:57614516:G:A c.1438G>A p.Val480Met	Yanlış anlamlı	4926	Benign	ICSL; ACGS Guidelines, 2013	Benign	Benign	-	-	Ht	Ht	-
F12 varyantlar	Varyasyon tipi	dbSNP	ClinVar	Kriter referans	VarSome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr5:177403626:G:A c.1251-9C>T	İntronik	17876032	Benign	ICSL	Benign	Benign	Ht	Ht	Hm	Hm	Hm
chr5:177404825:C:G c.619G>C p.Ala207Pro	Yanlış anlamlı	17876030	Benign	ICSL; ACMG Guidelines, 2015	Benign	Benign	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm
chr5:177409531:A:G c.-4T>C	5'UTR	1801020	Benign	ICSL; ACMG Guidelines, 2015	Benign	Benign	Ht	Hm	Hm	Hm	Hm
chr5:177404588:G:A c.711C>T p.Pro237=	Sinonim	17876047	Benign	ICSL; ACMG Guidelines, 2015	Benign	Benign	-	-	-	Ht	-
chr5:177405197:G:A c.398-12C>T	İntronik	56285942	Benign	ICSL	Benign	Benign	-	-	-	-	Ht
PLG varyantlar	Varyasyon tipi	dbSNP	ClinVar	Kriter referans	VarSome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr6:160731208:G:A c.1414G>A p.Asp472Asn	Yanlış anlamlı	4252125	Benign	-	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-

ClinVar veri tabanında 12'si sinonim, 17'si yanlış anlamlı ve 1'i anlamsız varyasyon tipinde olmak üzere klinik anlamlılık değeri patojenik olan 30 varyantın bulunduğu ve bunları 7'sinin (3 sinonim, 4 yanlış anlamlı) tüm hastalarda bulunduğu saptanmıştır. Aynı zamanda 1'i 5'UTR, 2'si sinonim ve 3'ü yanlış anlamlı olmak üzere klinik anlamlılık değeri patojenik/olası patojenik olan 6 varyantın bulunduğu saptanmıştır. ClinVar'da patojenik ve patojenik/olası patojenik olarak tanımlı sinonim dışı varyantlar, ayrıntılı olarak Tablo 46'da verilmiştir. Ayrıca VarSome veri tabanında anlamlılık açısından 2'si patojenik ve 2'si olası patojenik olmak üzere beş hastada da bulunan 4 çerçeve kayması varyasyonu saptanmıştır; bu varyantlar ayrıntılı olarak Tablo 47'de verilmiştir.



Tablo 46. ClinVar veri tabanında klinik anlamlılık değeri patojenik ve patojenik/olası patojenik olarak saptanan sinonim dışı varyantlar, bulundukları genler, veri tabalarındaki anlamlılıkları ve hastalardaki dağılımları

Gen	Bölge (hg38)	Değişim	Varyasyon tipi	ClinVar	Varsome	Franklin	AF ⁺	H1	H2	H3	H4	H5
AP3B1	chr5:78129204:A:T	c.1754T>A p.Val585Glu	Yanlış anlamlı/Ekzon 16	Patojenik	Benign	Benign	0,909	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm
PEX2	chr8:76983629:A:G	c.550T>C p.Cys184Arg	Yanlış anlamlı/Ekzon 5	Patojenik	Benign	Benign	0,996	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm
TJP2	chr9:69228107:C:A	c.1446C>A p.Asp482Glu	Yanlış anlamlı/Ekzon 9	Patojenik	Benign	Benign	0,784	Hm	Hm	Ht	Ht	Ht
IL4R	chr16:27344882:A:G	c.223A>G p.Ile75Val	Yanlış anlamlı/Ekzon 4	Patojenik*	Benign	VUS-Olası benign	0,453	Hm	Ht	Ht	Hm	Ht
F5	chr1:169549811:C:T	c.1601G>A p.Arg534Gln	Yanlış anlamlı/Ekzon 10	Patojenik ^a	Patojenik	VUS-Olası patojenik	0,007	-	Ht	-	-	-
CX3CR1	chr3:39265765:C:T	c.745G>A p.Val249Ile	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	Patojenik ^b	Benign	Benign	0,095	-	Ht	Hm	Ht	Ht
CX3CR1	chr3:39265671:G:A	c.839C>T p.Thr280Met	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	Patojenik ^b	Benign	Benign	0,154	-	-	Ht	Ht	Ht
ANTXR2	chr4:79984836:C:G	c.1069G>C p.Ala357Pro	Yanlış anlamlı/Ekzon 13	Patojenik	Benign	Benign	0,809	Hm	Hm	-	Ht	Hm
MBL2	chr10:52771475:C:T	c.161G>A p.Gly54Asp	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	Patojenik	Benign	VUS-Olası benign	0,135	Ht	Ht	-	-	-
MBL2	chr10:52771482:G:A	c.154C>T p.Arg52Cys	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	Patojenik	Benign	VUS-Olası patojenik	0,029	-	-	-	-	Ht
SLC39A13	chr11:47410152:A:G	c.58A>G p.Thr20Ala	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	Patojenik	Benign	Benign	0,079	-	-	Ht	-	Ht
PTPRJ	chr11:48123823:A:C	c.827A>C p.Gln276Pro	Yanlış anlamlı/Ekzon 5	Patojenik	Benign	VUS-Olası benign	0,191	-	Hm	-	-	Hm
KCNJ18	chr17:21704005:C:T	c.1219C>T p.Gln407Ter	Anlamsız/Ekzon 3	Patojenik	Benign	Patojenik	0,007	-	-	-	-	Ht

BRCA1	chr17:43071077:T:C	c.4900A>G p.Ser1634Gly	Yanlış anlamlı/Ekzon 16	Patojenik	Benign	Benign	0,366	-	Ht	Hm	Ht	-
BRCA1	chr17:43094464:T:C	c.1067A>G p.Gln356Arg	Yanlış anlamlı/Ekzon 10	Patojenik	Benign	Benign	0,024	-	-	-	Ht	-
NPC1	chr18:23560468:T:C	c.644A>G p.His215Arg	Yanlış anlamlı/Ekzon 6	Patojenik	Benign	Benign	0,234	-	-	Ht	Hm	-
OTC	chrX:38408967:A:G	c.809A>G p.Gln270Arg	Yanlış anlamlı/Ekzon 8	Patojenik	VUS-Patojenik	Benign	0,018	Ht	-	-	-	-
GLUD2	chrX:121049176:T:G	c.1492T>G p.Ser498Ala	Yanlış anlamlı/Ekzon 1	Patojenik	Benign	VUS-Olası benign	0,029	-	-	-	Hm	-
RBM8A	chr1:145927447:C:T	c.-21G>A	5'UTR	Patojenik/Olası patojenik ^c	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası benign	0,011	-	-	Ht	-	-
NPHS2	chr1:179552605:G:A	c.871C>T p.Arg291Trp	Yanlış anlamlı/Ekzon 7	Patojenik/Olası patojenik	Patojenik	Patojenik	0,0002	-	-	-	-	Ht
MYO7A	chr11:77142737:T:C	c.47T>C p.Leu16Ser	Yanlış anlamlı/Ekzon 3	Patojenik/Olası patojenik	Benign	Benign	0,486	Hm	Hm	Hm	Ht	-
PSG2	chr19:43080959:C:G	c.352G>C p.Gly118Arg	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	Patojenik/Olası patojenik	Benign	Benign	0,085	Ht	-	-	-	-

AF⁺ : “1000 genome phase 3” veya “genomAD” veritabanlarından elde edilen populasyon alel frekans bilgileri

*Bu varyantın aynı zamanda “protective” klinik anlamlılık değeri taşıdığı saptanmıştır.

^aBu varyantın aynı zamanda “risk factor” klinik anlamlılık değeri taşıdığı saptanmıştır.

^bBu varyantın aynı zamanda “protective” ve “risk factor” klinik anlamlılık değeri taşıdığı saptanmıştır.

^cBu varyantın aynı zamanda “other” klinik anlamlılık değeri taşıdığı saptanmıştır.

Tablo 47. Beş hastada saptanan VarSome veri tabanında patojenik ve olası patojenik anlamlılıktaki varyantlar, bulundukları genler ve veri tabanlarındaki anlamlılıkları

Gen	Bölge (hg38)	Değişim	Varyasyon tipi	ClinVar	Varsome	Franklin	AF ⁺	H1	H2	H3	H4	H5
KMT2C	chr7:152247986::T	c.2449dup p.Ile817AsnfsTer11	Çerçeve kayması/Ekzon 14	Benign	Patojenik	Olası patojenik	0,00005	Ht	Ht	Ht	Ht	Ht
PITRM1	chr10:3166375::GCAC GCTAGGGAAGAGA GAGGAATG	c.272_273insCATTCCTCTCTCTTC CCTAGCGTGC p.Gln91HisfsTer25	Çerçeve kayması/Ekzon 4	VUS	Patojenik	Olası patojenik	0,619	Hm	Ht	Ht	Ht	Ht
SETBP1	chr18:44876705::TCTT	c.680_681insTCTT p.Thr228LeufsTer8	Çerçeve kayması/Ekzon 4	Benign	Olası patojenik	Olası patojenik	0,490	Ht	Ht	Ht	Ht	Hm
SLAIN1	chr13:77698132::GG	c.218_219insGG p.Gly74ValfsTer126	Çerçeve kayması/Ekzon 1	Benign	Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	1,000	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm

AF⁺: “1000 genome phase 3” veya “genomAD” veritabanlarından elde edilen populasyon alel frekans bilgileri

Tanımlanmamış varyantlar başlığı altında belirtildiği gibi H2 ve H4 hastalarında HAÖ patolojisi ile ilişkili olabilecek *SERPING1* gen varyasyonu saptanmıştır. Bu nedenle H1, H3 ve H5 hastalarında HAÖ patolojisi ile ilişkili olabilecek genler için ortak varyantlar ayrıntılı olarak taranmıştır. H2 ve H4 hastalarında bulunmayan, H1, H3 ve H5 hastalarında toplam 252 varyant varlığı saptanmıştır. Bu varyantların üç hastadaki zigosite dağılımları incelendiğinde ortak homozigot olarak bulunan biri aynı gende diğerleri farklı gende bulunmak üzere 13 adet varyant saptanmıştır. ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşen yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan ortak homozigot varyantlar bulundukları genler, ClinVar klinik anlamlılık değerleri, VarSome ve Franklin veri tabanlarındaki anlamlılıkları Tablo 48’de gösterildiği gibidir.

Tablo 48. ClinVar tanımlı yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan ortak homozigot varyantlar

Gen	Bölge (hg38)	Değişim	Varyasyon tipi	ClinVar	Varsome	Franklin	AF ⁺
TNNT2	chr1:201368042:A:G	c.163+120T>C	İntronik/İntron 6	Benign	Benign	Benign	0,864
RYR2	chr1:237566474:G:A	c.3215-93G>A	İntronik/İntron 27	Benign	Benign	Benign	0,824
CRYGB	chr2:208145834:A:G	c.192T>C p.Pro64=	Sinonim/Ekzon 2	Benign	Benign	Benign	0,398
NIPBL	chr5:37036348:TA:	c.5863-12_5863-11del	İntronik/İntron 32	Benign	Benign	Benign	0,506
SYNE1	chr6:152308680:C:T	c.17203-48G>A	İntronik/İntron 90	Benign	Benign	Benign	0,881
PMS2	chr7:5997427:A:	c.706-4del	İntronik/İntron 6	Benign	Benign	Benign	0,446
SOS2	chr14:50160118:C:T	c.1197-32G>A	İntronik/İntron 9	Benign	Benign	Benign	0,857
SOS2	chr14:50204247:G:C	c.213+37C>G	İntronik/İntron 2	Benign	Benign	Benign	0,862
INF2	chr14:104714147:C:T	c.3041-56C>T	İntronik/İntron 20	Benign	Benign	Benign	0,841
PAFAH1B1	chr17:2670358:C:T	c.568+27C>T	İntronik/İntron 6	Benign	Benign	Benign	0,901
CACNA1A	chr19:13334330:C:T	c.1198+48G>A	İntronik/İntron 8	Benign	Benign	Benign	0,664
CYP2A7	chr19:40875742:A:C	c.1436T>G p.Val479Gly	Yanlış anlamlı/Ekzon 9	Benign	Benign	Benign	0,704
CSF2RA	chrX:1303975:G:A	c.1101G>A p.Val367=	Sinonim/Ekzon 12	Benign	Benign	Benign	0,369

AF⁺ : “1000 genome phase 3” veya “genomAD” veritabanlarından elde edilen populasyon alel frekans bilgileri

H2 ve H4 hastalarında bulunmayan, H1, H3 ve H5 hastalarındaki diğer 239 varyantın 145 farklı gende bulunmak üzere 132'sinin ortak heterozigot olarak bulunduğu, 97'sinin ise üç hastada farklı zigositede bulunduğu saptanmıştır. Bu varyantların varyasyon tiplerine göre genlerdeki sayısal dağılımı Tablo 49'da gösterildiği gibidir.

Tablo 49. ClinVar tanımlı yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan ortak heterozigot varyantların ve farklı zigositede bulunan varyantların varyasyon tiplerine göre genlerdeki sayısal dağılımı

Varyasyon tipi	Genler ve varyant adedi						
Yanlış anlamlı	A2M (1)	AGT (1)	ANOS1 (1)	ATIC (1)	AXIN2 (1)	CARD9 (1)	CDKN1B (1)
	CEP57 (1)	CPA6 (1)	CTLA4 (1)	F5 (1)	FLVCR2 (2)	FRAS1 (3)	GALC (1)
	GATM (1)	HPSE2 (1)	IL7R (2)	KCNQ4 (1)	KDR (1)	KIF7 (2)	KRT14 (1)
	MOGS (2)	MTX1 (1)	NEB (1)	NLRP7 (1)	OR13C5 (2)	OR52E6 (1)	PDE6C (1)
	PECAM1 (1)	PITX1 (1)	PKHD1 (2)	RINT1 (1)	RP1L1 (4)	SERPINA1 (1)	SLC22A4 (1)
	SPINK5 (1)	TNK2 (1)	TUBA1A (2)	TXNRD2 (1)	WNK1 (1)	WRN (1)	
Çerçeve içi delesyon	KRT1 (1)						
Çerçeve içi insersiyon	PRDM6 (1)						
Sinonim	ACAD9 (2)	ADAR (1)	ANG (1)	ANGPT2 (1)	ANOS1 (1)	AXIN2 (1)	CARD9 (1)
	CCND2 (1)	CDH23 (1)	CEP290 (1)	COA8 (1)	CUBN (1)	DNAH11 (1)	ERCC4 (1)
	EVC (1)	F5 (2)	FLNB (1)	FLVCR2 (2)	FRAS1 (2)	GALC (1)	GATM (1)
	HDAC9 (1)	HSPG2 (2)	INPP5E (2)	ITGB3 (3)	JAG1 (1)	KIF7 (1)	KMT2D (1)
	KRT1 (1)	KRT83 (1)	LAMB1 (1)	LHX3 (1)	MTMR2 (1)	MYH2 (3)	NFKBIA (1)
	NLRC4 (2)	NLRP12 (1)	NLRP7 (1)	OR13C5 (2)	PDE6C (2)	PRDM5 (2)	PXDN (1)
	RPGR (1)	SLC2A1 (1)	SLC7A7 (1)	SLITRK6 (1)	SMARCB1 (1)	SMCHD1 (1)	SNAPC4 (2)
	SPINK5 (1)	STIM1 (1)	STT3A (1)	TGFBI (1)	TMC1 (1)	TRAPPC9 (1)	TTL1 (1)
	TXNRD2 (1)	UGT1A7 (1)	UNC93B1 (1)	USH1C (1)	VRK1 (1)	VWF (1)	WRN (1)
İntronik	HARS (1)	IL7R (1)	INPP5E (1)	KIF2A (1)	KIF7 (2)	KLC1 (1)	KMT2D (1)

	KRT1 (1)	KRT14 (1)	LAMA2 (1)	LARS2 (1)	LIPA (1)	LYRM4 (1)	MCCC1 (1)
	MYH2 (4)	MYPN (1)	NADK2 (1)	NOTCH1 (1)	NTRK1 (1)	PDE6C (1)	POLE (1)
	POT1 (1)	PRPH2 (19)	RBM20 (1)	RPGR (1)	RYR1 (1)	RYR2 (1)	SMARCB1 (2)
	SPINK5 (3)	STT3A (1)	SYNE1 (1)	TBC1D20 (1)	TNNT1 (1)	TXNRD2 (4)	TYRP1 (2)
	VSX1 (1)	WNK1 (1)	WRN (1)	YARS (1)	ZFPM2 (1)		
5'UTR	ACAD9 (1)	ALOX12B (1)	FKRP (1)	IGF1R (1)	NLRP12 (1)	PSCA (1)	TRPS1 (1)
3'UTR	AXIN2 (1)	DICER1 (1)	ERCC4 (6)	GRIN2A (1)	IFT140 (1)	IL7R (2)	KRAS (1)
	PMP22 (1)	SMARCB1 (1)					

H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan 132'si ortak heterozigot olarak, 97'si farklı zigositide bulunan 239 varyantın ClinVar veri tabanındaki klinik anlamlılık değerleri açısından 208'inin benign, 12'sinin benign/olası benign, 8'inin olası benign, 3'ünün CIP, 1'nin "drug response", 1'nin "not provided", 1'nin "risk factor", 3'ünün VUS ve 2'sinin klinik anlamlılık değeri belirtilmemiş varyant olduğu saptanmıştır. VarSome ve Franklin Genomics veri tabanlarındaki anlamlılık değerleri ClinVar'dakine benzer olarak çoğu varyantın aynı şekilde benign olduğu saptanmıştır. Her iki veri tabanına ayrıca bakıldığında VarSome'da 239 varyantın 224'ünün benign, 3'nün olası benign, 10'unun VUS, 1'inin VUS-olası patojenik ve 1'nin VUS-patojenik olduğu saptanmıştır. Franklin Genomics'te ise 239 varyantın 225'inin benign, 1'nin olası benign, 7'sinin VUS-olası benign, 5'inin VUS ve 1'inin VUS-olası patojenik olduğu saptanmıştır. Bu varyantlardan VarSome veri tabanına göre VUS, VUS-olası patojenik ve VUS-patojenik olarak saptanan varyantlar Tablo 50'de verilmiştir. Ayrıca H2 ve H4 hastalarında saptanmayan, H1, H3 ve H5 hastalarının en az birinde saptanan varyantların, anlamlılık değeri, VarSome ve Franklin veri tabanında aynı anda her ikisinde VUS olmamak üzere, VUS, VUS-Olası patojenik, VUS-Patojenik, olası patojenik ve patojenik olanları bulunduğu genler açısından hastalardaki dağılımı Tablo 51'de verilmiştir.

Tablo 50. ClinVar tanımlı yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan ortak heterozigot varyantların ve farklı zigositelerde bulunan varyantların VarSome veritabanında VUS, VUS-Olası patojenik ve VUS-Patojenik olarak saptanan varyantlar

Gen	Varyant	Değişim	Mutasyon tipi	VarSome	Franklin	ClinVar	AF*
CEP63	chr3:134558353::T	c.1673+5_1673+6insT	İntron/İntron 13	VUS	VUS	Benign	0,268
PRDM6	chr5:123090276::CCTCCGCCT	c.261_262insCCTCCGCCT p.Ser87_Thr88insProProPro	Çerçeve içi insersiyon/Ekzon 2	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	Benign	0,221
SPINK5	chr5:148124742::T	c.2667-24dup	İntronik/İntron 27	VUS	Benign	Benign	0,503
PKHD1*	chr6:52050158:G:A	c.2278C>T p.Arg760Cys	Yanlış anlamli/Ekzon 22	VUS-Patojenik	Benign	Benign	0,386
FOXP2	chr7:114663436::T	c.1770-15dup	İntronik/İntron 14	VUS	VUS-Olası benign	CIP	0,321
CNTNAP2	chr7:147108136::G	c.551-12_551-11insG	İntronik/İntron 4	VUS	VUS-Olası benign	Benign	0,418
TRPS1	chr8:115623645::A	c.-8_-7insT	5'UTR	VUS	VUS-Olası benign	Benign	0,317
OR13C5	chr9:104599170:GC:AG	c.243_244delGCinsCT	Sinonim/Ekzon 1	VUS	VUS-Olası benign	Yok	0,670
INPP5E	chr9:136433147::CGCCCACCCCTCCAGCC A	c.1159+8_1159+9insTGGCTGGAGGGGTGG GCG	İntronik/İntron 4	VUS	VUS	Benign/Olası benign	0,258
KIF7	chr15:89630503::AG	c.3112-10_3112-9insCT	İntronik/İntron 15	VUS	VUS	Benign	0,485
VSX1	chr20:25076555::A	c.809-5_809-4insT	İntronik/İntron 4	VUS	VUS	Benign	0,236
SMARCB1	chr22:23834293::G	c.*112_*113insG	3'UTR	VUS	VUS-Olası benign	Benign	0,122

AF* : “1000 genome phase 3” veya “genomAD” veritabanlarından elde edilen populasyon alel frekans bilgileri

*Bu varyantın aynı zamanda uçbirleştirme bölgesi bozulması etkisi taşıdığı saptanmıştır.

Tablo 51. ClinVar tanımlı yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarının en az birinde saptanan varyantların, anlamlılık değeri, VarSome ve Franklin veri tabanında aynı anda her ikisinde VUS olmamak üzere, VUS, VUS-Olası patojenik, VUS-Patojenik, olası patojenik ve patojenik olanlarının bulunduğu genler ve hastalardaki dağılımı

Genler	Varyant tipi	VarSome	Franklin	Hastalar
ACSF3	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
ADAMTS19	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H5 (Ht)
AR	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H5 (Ht)
AUTS2	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Patojenik	VUS-Olası patojenik	H3 (Ht)
BCHE	Yanlış anlamlı	VUS-Olası patojenik	Patojenik	H5 (Ht)
CACNA1A	Yanlış anlamlı	VUS	VUS-Olası patojenik	H5 (Ht)
CD96	Çerçeve kayması	Patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
CFTR	Yanlış anlamlı	VUS	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
CHAT	Yanlış anlamlı	VUS-Olası Patojenik	Olası patojenik	H3 (Ht)
CHIT1	Anlamsız	VUS	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht), H3 (Ht)
CTDP1	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Patojenik	VUS-Olası patojenik	H3 (Ht)
CYP26C1	Çerçeve kayması	Patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
CYP2F1	Çerçeve kayması	VUS	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
DCAF15	Çerçeve kayması	Patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht), H3 (Hm)
DCLRE1C	Yanlış anlamlı	VUS-Olası patojenik	VUS	H5 (Ht)
DNAH5	Yanlış anlamlı	VUS-Patojenik	VUS	H3 (Ht)
ERBB2	Yanlış anlamlı	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H3 (Ht)
GALNS	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	VUS	H1 (Ht)
GAN	Yanlış anlamlı	VUS	VUS-Olası patojenik	H5 (Ht)
GPR39	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
GRIA1	Frameshift/Ekzon 1	Patojenik	VUS-Olası patojenik	H5 (Ht)
HLCS	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Olası patojenik	H3 (Ht)
KCNN3	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
KCNN3	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
LAMA5	Yanlış anlamlı	VUS-Patojenik	VUS-Olası patojenik	H3 (Ht)
MAGI1	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht), H3 (Hm)
MASP1	Yanlış anlamlı	VUS	VUS-Olası patojenik	H5 (Ht)
MEN1	Yanlış anlamlı	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H3 (Ht)
MFSD8	Yanlış anlamlı	VUS	VUS-Olası patojenik	H5 (Ht)
MICA	Çerçeve kayması	Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
MLC1	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht)
MSH3	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H3 (Ht)
MSH6	İntronik	VUS	Olası patojenik	H1 (Ht)
MYBPC3	Yanlış anlamlı	VUS-Olası patojenik	VUS	H5 (Ht)
NPHS2	Yanlış anlamlı	Patojenik	Patojenik	H5 (Ht)
PASK	Uçbirleştirme bölgesi bozulması	VUS-Patojenik	VUS-Olası patojenik	H3 (Ht)
PCLO	Çerçeve içi delin	VUS-Olası patojenik	Olası patojenik	H1 (Hm)
PLEC	Yanlış anlamlı	VUS-Olası patojenik	VUS	H3 (Ht)
PPP2R2B	İntronik	VUS	VUS-Olası patojenik	H1 (Ht), H5 (Ht)
PRDM5	Çerçeve kayması	Olası patojenik	Olası patojenik	H1 (Ht), H3 (Ht)
PSPH	Uçbirleştirme bölgesi bozulması	VUS-Patojenik	VUS	H3 (Ht)
RELN	Çerçeve içi delin	VUS-Olası patojenik	VUS-LP	H3 (Ht)
RPL14	Çerçeve içi insersiyon	VUS-Olası patojenik	VUS-LP	H1 (Ht)
SLC22A5	Yanlış anlamlı	Patojenik	VUS-LP	H3 (Ht)
SMR3B	Çerçeve kayması	Olası patojenik	VUS-LP	H5 (Ht)
TMPRSS3	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	VUS-LP	H5 (Ht)
TRAP1	Çerçeve içi insersiyon	VUS-P	VUS-LP	H1 (Ht)
TYR	Yanlış anlamlı	VUS-P	VUS	H1 (Ht), H3 (Ht)
UGT1A1	Yanlış anlamlı	VUS-P	VUS-LP	H1 (Ht)
USH2A	Yanlış anlamlı	VUS-Olası patojenik	VUS	H3 (Ht)
WRAP53	Çerçeve kayması	Patojenik	VUS-LP	H5 (Ht)

H1, H3 ve H5 hastalarında saptanmayan H2 ve H4 hastalarının en az birinde saptanan varyantların, anlamlılık değeri, VarSome ve Franklin veri tabanında aynı anda her ikisinde VUS olmamak üzere, VUS, VUS-Olası patojenik, VUS-Patojenik, olası patojenik ve patojenik olanları bulunduğu genler açısından hastalardaki dağılımı Tablo 52’de verilmiştir.

Tablo 52. ClinVar tanımlı yalnızca H2 ve H4 hastalarının en az birinde saptanan varyantların, anlamlılık değeri, VarSome ve Franklin veri tabanında aynı anda her ikisinde VUS olmamak üzere, VUS, VUS-Olası patojenik, VUS-Patojenik, olası patojenik ve patojenik olanlarının bulunduğu genler ve hastalardaki dağılımı

Genler	Varyant tipi	VarSome	Franklin	Hastalar
ABCA4	Yanlış anlamlı/Ekzon 11	VUS	Olası Patojenik	H2 (Ht)
ADA2	Yanlış anlamlı/Ekzon 7	Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht)
COQ8A	Yanlış anlamlı/Ekzon 6	Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht)
COX4I2	Yanlış anlamlı/Ekzon 4	VUS-Olası patojenik	VUS	H2 (Ht)
CTNNA1	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht)
CUBN	*Yanlış anlamlı/Ekzon 28	Patojenik	Patojenik	H4 (Ht)
DMKN	*Çerçeve içi/Ekzon 5	VUS-Olası patojenik	VUS	H2 (Ht)
DNAAF11	Yanlış anlamlı/Ekzon 12	VUS-Olası patojenik	VUS	H4 (Ht)
EGF	Çerçeve kayması/Ekzon 24	Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H4 (Ht)
EPM2A	Yanlış anlamlı/Ekzon 4	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H4 (Ht)
F5	Yanlış anlamlı/Ekzon 10	Patojenik	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht)
FAT4	Yanlış anlamlı/Ekzon 10	VUS-Olası patojenik	VUS	H4 (Ht)
FLNC	Yanlış anlamlı/Ekzon 25	VUS	VUS-Olası patojenik	H4 (Ht)
FOXC1	Çerçeve içi/Ekzon 1	VUS-Patojenik	VUS-Olası patojenik	H4 (Ht)
GAA	Yanlış anlamlı/Ekzon 16	Patojenik	Patojenik	H4 (Ht)
GUCY2D	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	VUS	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht)
IFIH1	Anlamsız/Ekzon 2	Patojenik	Patojenik	H4 (Ht)
LARS	Yanlış anlamlı/Ekzon 26	VUS-Olası patojenik	VUS	H4 (Ht)
LMBRD1	Uçbirleştirme bölgesi bozulması/İntron 10	Patojenik	Olası Patojenik	H2 (Ht)
MEFV	Yanlış anlamlı/Ekzon 10	Patojenik	Patojenik	H4 (Ht)
NIPBL	Yanlış anlamlı/Ekzon 12	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht)
PCSK9	Anlamsız/Ekzon 1 (Çerçeve içi)	VUS	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht)
PIBF1	Yanlış anlamlı/Ekzon 9	Olası patojenik	Olası Patojenik	H4 (Ht)
PLEC	Yanlış anlamlı/Ekzon 31	VUS-Olası patojenik	VUS	H2 (Ht)
PTCHD3	Çerçeve kayması/Ekzon 1	VUS	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht), H4 (Hm)
RP1L1	Çerçeve içi/Ekzon 4	VUS	VUS-Olası patojenik	H4 (Ht)
RP1L1	Çerçeve kayması /Ekzon 2	Olası patojenik	Olası Patojenik	H4 (Ht)
SDHB	Yanlış anlamlı/Ekzon 5	Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H2 (Ht)
SDHB	Yanlış anlamlı/Ekzon 4	VUS-Olası patojenik	VUS-Olası patojenik	H4 (Ht)
SIPA1L3	Çerçeve içi/Ekzon 3	VUS-Patojenik	VUS-Olası patojenik	H4 (Ht)
TMEM127	*Sinonim/Ekzon 3	VUS-Patojenik	VUS	H4 (Ht)

TMPRSS3	*Çerçeve kayması/İntron 7- Ekzon 8 bağı	Patojenik	Olası Patojenik	H4 (Ht)
ZEB2	Yanlış anlamlı/Ekzon 8	VUS	VUS-Olası patojenik	H4 (Ht)

*Bu varyantların aynı zamanda uçbirleştirme bölgesi bozulması etkisi taşıdığı saptanmıştır.

4.1.4. ClinVar dışı dbSNP varyantlar

“CLC Genomics Workbench 20.0.4” yazılımında dbSNP verileri ile eşleşen fakat ClinVar ile eşleşmeyen varyantlar, “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>” veri tabanından elde edilen veriler ile tekrar karşılaştırılmış ve bazı varyantların ClinVar’da yer aldığı saptanmıştır. Bu varyantların klinik anlamlılık değerleri Tablo 53’te gösterildiği gibidir.

Tablo 53. ClinVar veri tabanı ile kesin eşlememesine rağmen ClinVar’da yer aldığı saptanan dbSNP varyantların klinik anlamlılık değerlerine göre miktarları

	H1		H2		H3		H4		H5	
Klinik anlamlılık değeri	ClinVar dışı dbSNPler tümü	Manuel filtreleme	ClinVar dışı dbSNPler tümü	Manuel filtreleme	ClinVar dışı dbSNPler tümü	Manuel filtreleme	ClinVar dışı dbSNPler tümü	Manuel filtreleme	ClinVar dışı dbSNPler tümü	Manuel filtreleme
Benign	19.923	7.121	20.823	7.520	20.722	7.561	19.590	6.303	20.454	7075
Olası benign	573	142	590	152	604	150	553	139	614	155
VUS	312	128	324	127	345	124	320	113	351	124
Olası patojenik	24	13	24	9	26	11	24	9	26	10
Patojenik	45	16	52	15	48	15	43	10	52	15
Benign/Olası benign	61	38	45	22	46	26	45	23	57	26
Patojenik/Olası patojenik	7	-	6	1	4	-	9	1	10	2
“Drug response”	1	-	2	-	1	1	3	1	3	1
“Association”	14	9	13	9	14	11	9	4	11	4
“Risk factor”	2	-	4	-	3	1	2	-	3	-
“Affects”	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
CIP	49	21	46	20	44	21	40	13	46	12
Not provided”	7	2	8	4	10	6	6	5	8	4
“Confers sensitivity	3	3	3	3	1	-	3	3	3	3

Patojenik ve “Association”	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
“VUS” ve “Drug response”	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ClinVar veri tabanında tanımlı olduğu saptanan dbSNP veri tabanı ile eşleşen varyantların klinik anlamlılık değeri patojenik ve patojenik/olası aptojenik olanlara bakıldığında 4’ünün sinonim, 16’sının intronik, 2’sinin 5’UTR, 1’inin uçbirleştirme bölgesi bozulması, 8’inin yanlış anlamlı ve 1’inin anlamsız varyasyon olduğu saptanmıştır. Sinonim ve intronikler dışında ClinVar veri tabanında tanımlı olduğu saptanan dbSNP veri tabanı ile eşleşen klinik anlamlılık değeri patojenik olan varyantlar Tablo 54’de verilmiştir.

Tablo 54. ClinVar veri tabanında tanımlı olduğu saptanan dbSNP veri tabanı ile eşleşen, klinik anlamlılık değeri patojenik olan sinonim ve intronik dışındaki varyantlar

Gen	Bölge (hg38)	Değişim	Varyasyon tipi	ClinVar	Varsome	Franklin	AF ⁺	H1	H2	H3	H4	H5
MYOM3	chr1:24082701:C:T	c.1984G>A p.Gly662Arg	Yanlış anlamlı/Ekzon 17	Pathogenic	Benign	Benign	0,275	Ht	-	Ht	-	Ht
MR1	chr1:181049076:G:A	c.92G>A p.Arg31His	Yanlış anlamlı/Ekzon 3	Pathogenic	Benign	VUS	0,002	-	-	-	Ht	-
GLS	chr2:190880872::GCAGCA	c.-214_-213insGCAGCA	5'UTR	Pathogenic	VUS	VUS-Olası benign	0,036	Ht	-	-	-	-
GLS	chr2:190880872::GCAGCA GCAGCA	c.-214_-213insGCAGCAGCAGCA	5'UTR	Pathogenic	VUS	VUS-Olası benign	0,012	Ht	-	-	-	-
HLA-DQB1	chr6:32666564:A:G	c.44T>C p.Val15Ala	Yanlış anlamlı/Ekzon 1	Pathogenic	Benign	Benign	0,382	Ht	Ht	-	Ht	Hm
OR1S1	chr11:58214757:A:G	c.13A>G p.Ser5Gly	Yanlış anlamlı/Ekzon 2	Pathogenic	Benign	Benign	0,690	Ht	Hm	Ht	Ht	Hm
MS4A12	chr11:60497529:C:T	c.211C>T p.Gln71Ter	Anlamsız/Ekzon 2	Pathogenic	Benign	Benign	0,475	Ht	-	Ht	Ht	Ht
MYCBPAP	chr17:50526142:C:T	c.2044C>T p.Arg682Trp	Yanlış anlamlı/Ekzon 14	Pathogenic	Benign	Benign	0,559	-	Hm	Hm	-	Ht
LAMA1	chr18:6997872:T:C	c.4676A>G p.Glu1559Gly	Yanlış anlamlı/Ekzon 33	Pathogenic	VUS	VUS	0,000006	-	Ht	-	-	-
TJP3	chr19:3728611:G:A	TJP3(NM_001267561.2):c.83G>A p.Arg28His	Yanlış anlamlı/Ekzon 3	Pathogenic	Benign	Benign	0,302	-	Ht	Hm	Ht	-
FAM98C	chr19:38403667:G:A	c.322G>A p.Glu108Lys	Yanlış anlamlı/Ekzon 3	Pathogenic	Benign	Benign	0,030	-	-	Ht	-	Hm
CEACAM21	chr19:41586462:A:T	c.*1-2A>T	Uçbirleştirme bozulması/İntron 6	Pathogenic	Benign	Benign	0,334	-	Hm	-	-	-

AF⁺: “1000 genome phase 3” veya “genomAD” veritabanlarından elde edilen populasyon alel frekans bilgileri

*Bu varyantın aynı zamanda uçbirleştirme bölgesi bozulması etkisi taşıdığı saptanmıştır.

Elde edilen dbSNP varyanlar içerisinde HAÖ patolojisinden sorumlu olduğu bilinen genlerdeki varyantların mevcudiyetine bakılmıştır. *F12* geninde tümü intronik olmak üzere 3, *PLG* geninde 7'si sinonim ve 7'si intronik olmak toplam 14, *KNG1* geninde 2'si sinonim, 5' intronik ve 2'si yanlış anlamlı olmak üzere toplam 9, *MYOF* 5'i sinonim, 22'si intronik, 2'si 5'UTR ve 3'ü yanlış anlamlı olmak üzere toplam 32 *HS3ST6* 1'i 3'UTR, 3'ü yanlış anlamlı ve 1'i çerçeve kayması olmak üzere toplam 5 varyant bulunduğu saptanmıştır. HAÖ patolojisinden sorumlu genlerde bulunan dbSNP'de yer alan varyantların VarSome ve Franklin veri tabanlarındaki anlamlılık değerleri ve zigosite durumlarına göre hastalardaki dağılımı Tablo 55'de verilmiştir.



Tablo 55. HAÖ patolojisinden sorumlu genlerde bulunan ClinVar’da yer almayıp dbSNP’de yer alan varyantların VarSome ve Franklin veri tabanlarındaki anlamlılık değerleri ve zigosite durumlarına göre hastalardaki dağılımı

<i>F12</i> varyantlar	Değişim	Varyasyon tipi	dbSNP	ClinVar	Varsome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr5:177404118:A:G	c.1019-28T>C	İntronik	17876031	Benign	Benign	Benign	Ht	Ht	Hm	Hm	Hm
chr5:177404177:C:	c.1018+19del	İntronik	35966430	Benign	Benign	Benign	Ht	Ht	Hm	Hm	Ht
chr5:177404979:T:C	c.530-65A>G	İntronik	17876029	Benign	Benign	Benign	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm
<i>PLG</i> varyantlar	Değişim	Varyasyon tipi	dbSNP		Varsome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr6:160711114:C:T	c.330C>T p.Asn110=	Sinonim	4757	Benign	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-
chr6:160711693:T:C	c.407+502T>C	İntronik	4252086	-	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-
chr6:160716631:T:G	c.669-14T>G	İntronik	4252109	Benign	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-
chr6:160716747:T:C	c.771T>C p.Cys257=	Sinonim	14224	Benign	Benign	Benign	Ht	Ht	-	-	Ht
chr6:160718448:C:T	c.942C>T p.Phe314=	Sinonim	1130656	Benign	Benign	Benign	Ht	Ht	-	-	Ht
chr6:160718470:G:A	c.950+14G>A	İntronik	2295368	Benign	Benign	Benign	Ht	Ht	-	-	Ht
chr6:160718825:A:G	c.1083A>G p.Gln361=	Sinonim	13231	Benign	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-
chr6:160722576:T:C	c.1256+9T>C	İntronik	4252120	Benign	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-
chr6:160731165:A:G	c.1371A>G p.Thr457=	Sinonim	760815242	-	Olası benign	VUS-Olası benign	-	Ht	-	-	-
chr6:160731262:A:G	c.1438+30A>G	İntronik	4252126	Benign	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-
chr6:160739051:G:A	c.1878-17G>A	İntronik	2859879	Benign	Benign	Benign	Hm	Ht	Ht	Ht	Ht
chr6:160741374:T:C	c.2082T>C p.Ala694=	Sinonim	4252170	Benign	Benign	Benign	-	Ht	-	-	-
chr6:160752317:C:T	c.2271+57C>T	İntronik	783172	-	Benign	Benign	-	-	-	-	Ht
chr6:160752914:T:G	c.2286T>G p.Gly762=	Sinonim	11060	Benign	Benign	Benign	Ht	Hm	Ht	Ht	Hm
<i>KNG1</i> varyantlar	Değişim	Varyasyon tipi	dbSNP	ClinVar	Varsome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr3:186717581:G:A	c.39G>A p.Leu13=	Sinonim	1050274	-	Benign	Benign	-	-	-	Ht	-
chr3:186722358:A:C	c.307-79A>C	İntronik	5030100	-	Benign	Benign	-	-	Ht	-	-

chr3:186722454:G:A	c.324G>A p.Thr108=	Sinonim	1469859	-	Benign	Benign	Hm	Ht	-	-	Ht
chr3:186725044:G:C	c.392-44G>C	İntronik	1656921	-	Benign	Benign	Hm	Hm	-	-	-
chr3:186725229:T:C	c.533T>C p.Met178Thr	Yanlış anlamlı	1656922	-	Benign	Benign	Hm	Hm	-	-	Ht
chr3:186727397::A	c.672+52_672+53insA	İntronik	3841557	-	VUS	VUS- Olası benign	-	-	-	Ht	-
chr3:186741438:A:G	c.1126-84A>G	İntronik	698078	-	Benign	Benign	-	-	-	-	Hm
chr3:186742138:T:C	c.1742T>C p.Ile581Thr	Yanlış anlamlı	710446	-	Benign	Benign	Hm	Ht	-	-	Hm
chr3:186727397::A	c.672+52_672+53insA	İntronik	3841557	-	VUS	VUS-Olası benign	-	-	-	Ht	-
MYOF varyantlar	Değişim	Varyasyon tipi	dbSNP	ClinVar	Varsome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr10:93310280:A:G	c.6000-113T>C	İntronik	2761286	-	Benign	Benign	Hm	Hm	-	Hm	-
chr10:93310323:C:T	c.6000-156G>A	İntronik	2797581	-	Benign	Benign	Hm	-	-	-	-
chr10:93313149:T:C	c.5760A>G p.Arg1920=	Sinonim	787666	Benign	Benign	Benign	Hm	Hm	Ht	Hm	Hm
chr10:93313289:A:G	c.5699-79T>C	İntronik	787667	-	Benign	Benign	-	-	-	Hm	-
chr10:93323125:G:A	c.5409C>T p.Asp1803=	Sinonim	34048939	-	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-
chr10:93323137:G:A	c.5397C>T p.Asp1799=	Sinonim	35527060	-	Benign	Benign	Ht	-	-	-	-
chr10:93333862:G:A	c.4615C>T p.Pro1539Ser	Yanlış anlamlı	61861290	-	Benign	VUS-LB	-	Ht	-	Ht	-
chr10:93335910:A:G	c.4563+11T>C	İntronik	7097740	-	Benign	Benign	Ht	Ht	-	-	-
chr10:93337780:T:C	c.4437+35A>G	İntronik	1614065	-	Benign	Benign	Ht	Ht	Hm	-	Ht
chr10:93340065:G:C	c.4338+88C>G	İntronik	2761330	-	Benign	Benign	-	-	Hm	-	-
chr10:93340092:G:A	c.4338+61C>T	İntronik	2761329	-	Benign	Benign	-	Ht	Hm	-	Ht
chr10:93347671:G:A	c.4195C>T p.Arg1399Cys	Yanlış anlamlı	11187393	-	Benign	Benign	-	-	-	Ht	Ht
chr10:93349980:G:A	c.3922-11C>T	İntronik	2298158	-	Benign	Benign	Ht	Ht	-	-	-
chr10:93351959:C:A	c.3482-113G>T	İntronik	787624	-	Benign	Benign	-	-	Hm	-	-
chr10:93373148:C:T	c.2302-63G>A	İntronik	787647	-	Benign	Benign	-	Hm	Hm	Hm	Hm
chr10:93374704:C:T	c.2301+59G>A	İntronik	1886076	-	Benign	Benign	-	Ht	-	Hm	-
chr10:93379919:C:A	c.1945G>T p.Asp649Tyr	Yanlış anlamlı	776154312	-	VUS-LP	VUS	-	Ht	-	-	-
chr10:93389078:T:C	c.1533A>G p.Arg511=	Sinonim	17108594	-	Benign	Benign	-	Ht	-	Hm	Ht

chr10:93392867:T:C	c.1456+50A>G	İntronik	788084	-	Benign	Benign	Ht	Ht	Hm	Hm	Ht
chr10:93402356:G:C	c.875-9C>G	İntronik	2272177	-	Benign	Benign	-	Ht	-	-	-
chr10:93402739:A:T	c.874+121T>A	İntronik	701875	-	Benign	Benign	-	-	Hm	-	-
chr10:93402769:C:	c.874+91del	İntronik	3841653	-	Benign	Benign	-	-	Hm	-	-
chr10:93404052:G:T	c.814C>A p.Arg272=	Sinonim	12262721	-	Benign	Benign	-	-	-	-	Ht
chr10:93404126:G:A	c.792+31C>T	İntronik	56041929	-	Benign	Benign	-	Ht	-	-	-
chr10:93404283:A:G	c.730-64T>C	İntronik	788088	-	Benign	Benign	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm
chr10:93408958:C:T	c.601-43G>A	İntronik	12243458	-	Benign	Benign	-	-	-	-	Ht
chr10:93426012:T:C	c.433+59A>G	İntronik	74150231	-	Benign	Benign	-	Ht	-	-	-
chr10:93456866:A:G	c.144+16T>C	İntronik	701882	-	Benign	Benign	Hm	Ht	Hm	Hm	Hm
chr10:93482229:C:A	c.-35G>T	5'UTR	882873	-	Benign	Benign	-	Ht	Ht	Hm	-
chr10:93482242:A:C	c.-48T>G	5'UTR	947597	-	Benign	Benign	Hm	Hm	Hm	Hm	Hm
chr10:93323448:TTTC:	c.5272-93_5272-90del	İntronik	148815470	-	Benign	Benign	-	Hm	-	-	Hm
chr10:93355582::AAAAT	c.3403+46_3403+47insATTTT	İntronik	-	-	VUS	VUS-LB	-	-	Hm	-	-
HS3ST6 varyantlar	Değişim	Varyasyon tipi	dbSNP		Varsome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr16:1911550:C:T	c.*40G>A	3'UTR	1657139	-	Benign	Benign	-	-	Ht	-	Ht
chr16:1911673:G:C	c.946C>G p.Leu316Val	Yanlış anlamlı	337285	-	Benign	Benign	Ht	Ht	Ht	Hm	Ht
chr16:1912131:G:A	c.488C>T p.Ala163Val	Yanlış anlamlı	8055325	-	Benign	Benign	Ht	Ht	Ht	Ht	Ht
chr16:1912045:CG:TA	c.573_574delCGinsTA p.Ala192Thr	Yanlış anlamlı	-	-	VUS	VUS	Ht	Ht	Ht	Ht	Ht
chr16:1917981::G	c.343_344insC p.Asp115AlafsTer8	Çerçeve kayması	573199046	-	Pathogenic	VUS-LP	-	Ht	-	-	-

4.1.5. ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış varyantlar

ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış varyantların anlamlılık özellikleri VarSome ve Franklin veri tabanlarında değerlendirilmiştir. Tanımlanmamış olarak saptanan varyantların VarSome veri tabanında belirtilen anlamlılık düzeyine göre hastalardaki sayısal dağılımı Tablo 56’da verilmiştir.

Tablo 56. Tanımlanmamış olarak saptanan varyantların VarSome veri tabanında belirtilen anlamlılık düzeyine göre hastalardaki sayısal dağılımı

	H1	H2	H3	H4	H5
Benign¹ (16)	8	2	6	1	4
Olası Benign² (150)	30	33	30	24	33
Patojenik³ (22)	5	4	5	7	1
Olası Patojenik⁴ (29)	5	5	6	10	6
VUS⁵ (712)	164	179	163	153	162
VUS-Benign⁶ (36)	8	10	9	7	8
VUS-Patojenik⁷ (14)	2	4	2	4	3
VUS-Olası Patojenik⁸ (138)	54	40	34	49	28

¹Franklin veri tabanında bu varyantlardan 1’inin VUS-olası benign ve 1’inin VUS olduğu saptanmıştır.

²Franklin veri tabanında bu varyantlardan 99’unun VUS-Olası benign, 48’inin VUS ve 1’inin VUS-Olası patojenik olduğu saptanmıştır.

³Franklin veri tabanında bu varyantlardan 2’sinin VUS, 17’sinin VUS-Olası patojenik ve 3’ünün olası patojenik olduğu saptanmıştır.

⁴Franklin veri tabanında bu varyantlardan 9’unun VUS, 2’sinin VUS-Olası benign ve 16’sinin VUS-Olası patojenik olduğu saptanmıştır.

⁵Franklin veri tabanında bu varyantlardan 1’inin olası benign, 506’sının VUS-Olası benign ve 19’unun VUS-Olası patojenik olduğu saptanmıştır.

⁶Franklin veri tabanında bu varyantlardan 12’sinin VUS, 24’ünün VUS-Olası benign olduğu saptanmıştır.

⁷Franklin veri tabanında bu varyantlardan 5’inin VUS, 1’inin VUS-Olası benign ve 7’sinin VUS-Olası patojenik olduğu belirtilmektedir. Ayrıca 1 varyantın da bu veri tabanında yer almadığı saptanmıştır.

⁸Franklin veri tabanında bu varyantlardan 108’sinin VUS, 23’ünün VUS-Olası patojenik, 4’nün VUS-Olası benign ve 3’ünün olası patojenik olduğu belirtilmektedir.

ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış olarak saptanan varyantlar içerisinde HAÖ patolojisinden sorumlu olduğu bilinen genlerdeki varyantların mevcudiyetine bakılmıştır. *SERPING1* geninde 2 varyant varlığı saptanmıştır. HAÖ patolojisinden sorumlu genlerde saptanan tanımlanmamış varyantların VarSome ve Franklin veri tabanlarındaki anlamlılık değerleri ve zigosite durumlarına göre hastalardaki dağılımı Tablo 57’de verilmiştir.

Tablo 57. *SERPING1* geninde saptanan ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış varyantlar, VarSome ve Franklin veri tabanındaki anlamlılıkları ve hastalardaki dağılımı

<i>SERPING1</i> varyantlar	Değişim	Varyasyon tipi	Varsome	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
chr11:57598247:A>G	c.-22-2A>G	Uçbirleştirme bozulamsı	Patojenik	Olası patojenik	-	Ht	-	-	-
chr11:57606148:GC CGGCT:	c.826_832del p.Arg276Ter	Çerçeve kaynması	Patojenik	Olası patojenik	-	-	-	Ht	-

SERPING1 geni dışında, VarSome veri tabanında anlamlılığı patojenik, olası patojenik, VUS-patojenik ve VUS-olası patojenik olan varyantların varlığı saptanan genler Tablo 58’de verilmiştir. Patojenik anlamlılıktaki varyantlar ayrıntılı olarak Tablo 59’da verilmiştir.

Tablo 58. *SEPING1* geni dışında, VarSome veri tabanında anlamlılığı patojenik, olası patojenik, VUS-patojenik ve VUS-olası patojenik olan ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış olarak saptanan varyantların bulunduğu genler

H1											
ABL1	ACOT4	ATAD3A	C8orf48	CACNA1S	CACNA2D2	CYP1B1	CYP4F11	DMC1	DNAH8	DOCK7	DSPP
GOLGA6L2	GOLGA6L6	GRID2IP	HPSE2	IL4I1	INTS12	KIF13A	KLHDC7A	KRT6A	KRTAP5-4	LDHD	MACO1
MUC5AC	NACA	PABPC1	PABPC3	PITRM1	PSTPIP1	PTAR1	RASGRF2	SART3	SBNO2	SEC23B	SIGLEC10
TCP11L1	THAP11	TPTE	TRPC6	TRPV5	TSPAN10	TUBB6	UROC1	WDR34	ZC3H12C	ZNF676	ZSWIM4
H2											
ACOT4	AHNAK	AMHR2	ARHGAP25	ARHGEF28	CARMIL1	CCDC40	CNTNAP4	COQ7	DOCK5	DSPP	EIF2B5
EIF4EBP1	EXOSC2	FAM71D	FBXO11	GJC3	GOLGA6L2	KRTAP16-1	LCE4A	MTCL1	NEBL	NVL	ORC3
P2RY13	SERPINB8	SLC38A10	SLC41A2	SMG8	SMURF1	SPATC1L	SREBF2	STK31	TBCB	THBS1	VAV1
ZFP41											
H3											
ACCSL	ANKRD6	APOBR	BAG4	BPIFB2	C11orf21	CCDC40	CHTF18	CLMP	DSPP	FANCA	GPR155
ITIH6	KRTAP5-5	LITAF	LSP1	MUC3A	MYORG	NCOA5	NEBL	NEK4	NF1	NFE2L1	PHF24
PHF8	RP2	SSB	SVEP1	TIAM2	TTC12	UGT1A4	UHRF1BP1L	UMAD1	ZNF676		
H4											
ADRA1A	AGAP3	ANKS4B	ASPDH	AVIL	BANK1	C2CD4B	CCAR1	CENPL	CPA1	CR1L	CYP4V2
DACH1	DHX15	EHMT1	EID1	FAM120B	FAM186A	FBN2	GOLGA6L2	IL1RL1	INSL3	JAKMIP3	MAGI1
MPHOSPH8	MTHFSD	MTMR2	MTO1	MUC3A	MUC4	MUC5AC	NCSTN	NPAT	NUSAP1	PARD6G	PELI2
PLEKHN1	PPP2R3A	RAB11FIP1	SLC35A4	SNRNP27	SPATA20	STXBP5L	TENT5A	TPTE2	UBA1	VIPAS39	ZNF292
ZNF354B											
H5											
AGAP3	APOBR	ARHGAP18	ATXN3	CAP2	CCDC40	CLIP2	CNGA3	COL11A2	FBXO30	FGF13	FXD1
GCC1	GCC2	GOLGA6L2	JPH2	MEGF10	MUC3A	MUC4	NBPF12	NCAPH2	PABPC3	RASD1	RGS10
RPL23A	SELE	SLC16A7	TRIM9	ZNF717							

Tablo 59. *SEPING1* geni dışında, VarSome veri tabanında anlamlılığı patojenik olan ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında tanımlanmamış olarak saptanan varyantların bulunduğu genler, Franklin veri tabanındaki anlamlılıkları ve hastalardaki dağılımları

Gen	Bölge (hg38)	Değişim	Varyasyon tipi	Franklin	H1	H2	H3	H4	H5
ZNF354B	chr5:178883173:TTAT:	c.724_727del p.Phe242AsnfsTer6	Çerçeve kayması/Ekzon 5	VUS-Olası patojenik	-	-	-	Ht	-
TENT5A	chr6:81752018:AGTCGCCG:	c.117_124del p.Gly40ArgfsTer151	Çerçeve kayması/Ekzon 2	Olası patojenik	-	-	-	Ht	-
TRPV5	chr7:142912752:T:G	c.1520-2A>C	Uçbirleştirme bölgesi bozulması/İntron 12	VUS-Olası patojenik	-	-	-	Ht	-
PABPC1	chr8:100712709:CTGCC:T	c.815_819delGGCAGinsA p.Arg272GlnfsTer11	Çerçeve kayması/Ekzon 6	VUS-Olası patojenik	-	-	-	Ht	-
RAB11FIP1	chr8:37871281:T:	c.3521del p.His1174ProfsTer6	Çerçeve kayması/Ekzon 4	VUS-Olası patojenik	-	-	-	Ht	-
PTAR1	chr9:69718686:T:G	c.948-2A>C	Uçbirleştirme bölgesi bozulması/İntron 6	VUS-Olası patojenik	-	-	-	Ht	-
JAKMIP3*	chr10:132140571:TTGGAGGAGGTAACGAGGGTCTCCTGCCGGGTCCTGGGCTTGGAGGAGGTAACGAGGGTCTCCTGCCGGGTCCTGGG:	c.1465_1473+68del	Çerçeve kayması/Ekzon 10-İntron 10	VUS-Olası patojenik	Ht	-	-	-	-
NPAT	chr11:108172209:G:	c.2775del p.Ser927HisfsTer6	Çerçeve kayması/Ekzon 13	VUS-Olası patojenik	Ht	-	-	-	-
ZC3H12C	chr11:110159459:C:T	c.1117C>T p.Arg373Ter	Anlamsız/Ekzon 4	VUS-Olası patojenik	Ht	-	-	-	-
C11orf21	chr11:2302960:T:C	c.181+2T>C	Uçbirleştirme bölgesi bozulması/İntron 2	VUS-Olası patojenik	Ht	-	-	-	-
SLC16A7	chr12:59774744:C:	c.450del p.Met151TrpfsTer8	Çerçeve kayması/Ekzon 5	VUS-Olası patojenik	Ht	-	-	-	-
MPHOSPH8	chr13:19666495:C:G	c.2090C>G p.Ser697Ter	Anlamsız/Ekzon 10	VUS-Olası patojenik	-	Ht	-	-	-
COQ7	chr16:19078135:AT:	c.635_636del p.Tyr212PhefsTer41	Çerçeve kayması/Ekzon 6	VUS-Olası patojenik	-	Ht	-	-	-
MTCL1	chr18:8798292:G:A	c.3393+1G>A	Uçbirleştirme bölgesi bozulması/İntron 8	VUS-Olası patojenik	-	Ht	-	-	-

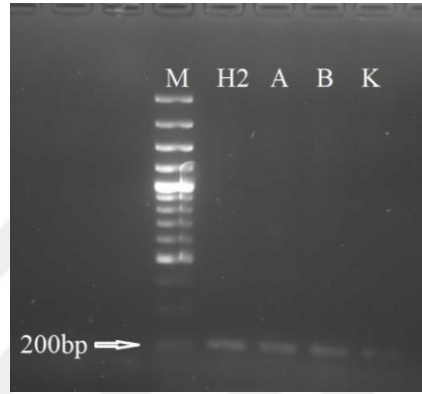
ZNF676	chr19:22180884:TCTTCAGCATGAA:	c.821_833del p.Ile274ArgfsTer220	Çerçeve kayması/Ekzon 4	VUS-Olası patojenik	-	-	Ht	-	-
ZNF676	chr19:22180902:TTATGTGTATTAA:	c.803_815del p.Leu268ArgfsTer226	Çerçeve kayması/Ekzon 3	VUS-Olası patojenik	-	-	Ht	-	-
ZNF676	chr19:22180917:GTTGAGACGCTACTAAATC:	c.782_800del p.Gly261AlafsTer231	Çerçeve kayması/Ekzon 3	VUS-Olası patojenik	-	-	Ht	-	-
VAV1	chr19:6828901:G:A	c.1265+1G>A	Uçbirleştirme bölgesi bozulması/İntron 13	VUS-Olası patojenik	-	-	Ht	-	-
NCOA5*	chr20:46065228:T:C	c.630A>G p.Lys210=	Synonym/Ekzon 6	VUS	-	-	Ht	-	-
RP2	chrX:46837107:T:A	c.7T>A p.Cys3Ser	Yanlış anlamlı/Ekzon 1	VUS	-	-	-	-	Ht

*Bu varyantların aynı zamanda uçbirleştirme bölgesi bozulması etkisi olduğu saptanmıştır.

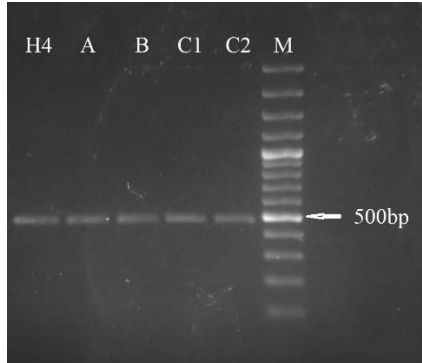
4.2. Validasyon Deneylerinden Elde Edilen Bulgular

4.2.1. Konvansiyonel PCR ürünleri agaroz jel görüntüleri

Tüm ekzom dizileme sonucunda H2 ve H4'te saptanan *SERPING1* geni varyasyonlarının ailesel olup olmadıklarını değerlendirmek için gerçekleştirilen validasyon deneylerinde kullanılmak üzere konvansiyonel PCR ile elde edilen amplikonların, agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 21 ve Şekil 22'de gösterildiği gibidir.



Şekil 21. Hasta H2, annesi, babası ve kardeşine ait *SERPING1* (uçbirleştirme) primerleri ile çoğaltılan amplikonların agaroz jel görüntüsü

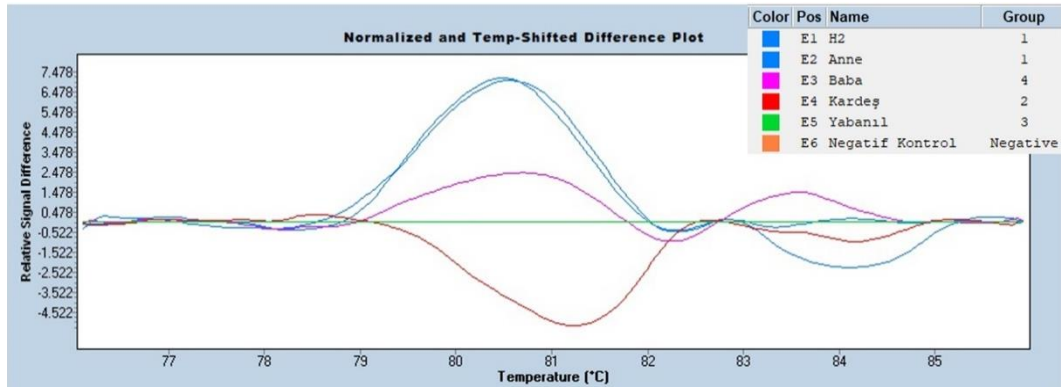


Şekil 22. Hasta H4, annesi, babası ve iki çocuğuna ait *SERPING1* (çerçeve kayması) primerleri ile çoğaltılan amplikonların agaroz jel görüntüsü

4.2.2. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRM) Bulgusu

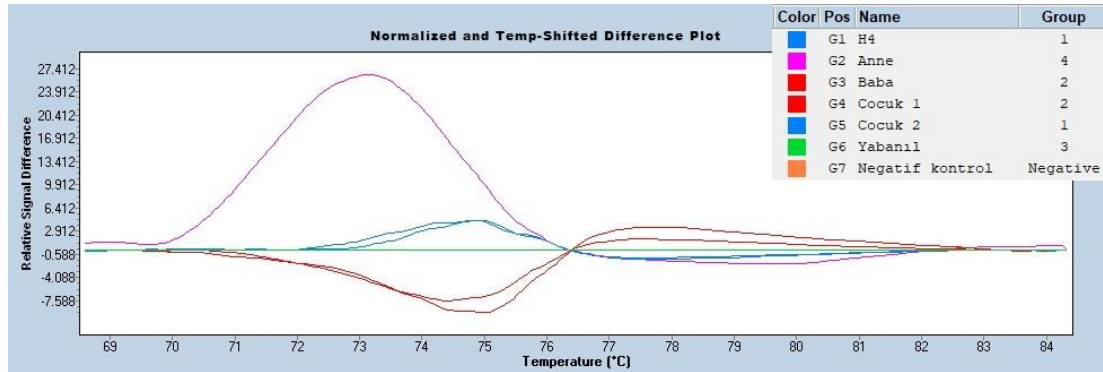
Tüm ekzom dizileme çalışması sonrası H2'de saptanan uçbirleştirme bölgesi bozulması varyantının ailesel olup olmadığını saptamak amacıyla sağlıklı kontrole (yabanıl tip) göre normalize edilerek gerçekleştirilen HRM analizinde aynı varyantın hastanın annesinde de olduğu saptandı. H2 ve aile bireylerine ait sağlıklı kontrole göre

(yabanıl tip) normalize edilmiş yüksek çözünürlüklü erime eğrileri Şekil 23'te verildiği gibidir.



Şekil 23. H2 ve aile bireylerine ait sağlıklı kontrole göre (yabanıl tip) normalize edilmiş yüksek çözünürlüklü erime eğrileri

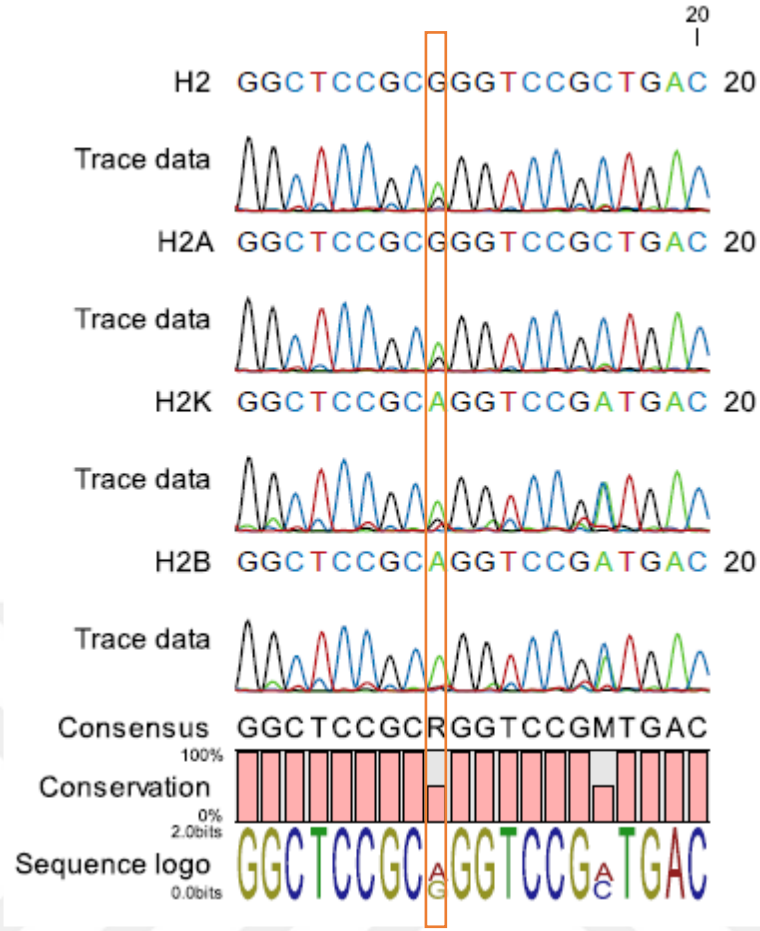
Tüm ekzom dizileme çalışması sonrası H4'de saptanan çerçeve kaymasına yol açan delesyonun ailesel olup olmadığını saptamak amacıyla sağlıklı kontrole (yabanıl tip) göre normalize edilerek gerçekleştirilen HRM analizinde aynı varyantın hastanın ikinci çocuğunda da olduğu saptandı. H4 ve aile bireylerine ait sağlıklı kontrole göre (yabanıl tip) normalize edilmiş yüksek çözünürlüklü erime eğrileri Şekil 24'de verildiği gibidir.



Şekil 24. H4 ve aile bireylerine ait sağlıklı kontrole göre (yabanıl tip) normalize edilmiş yüksek çözünürlüklü erime eğrileri

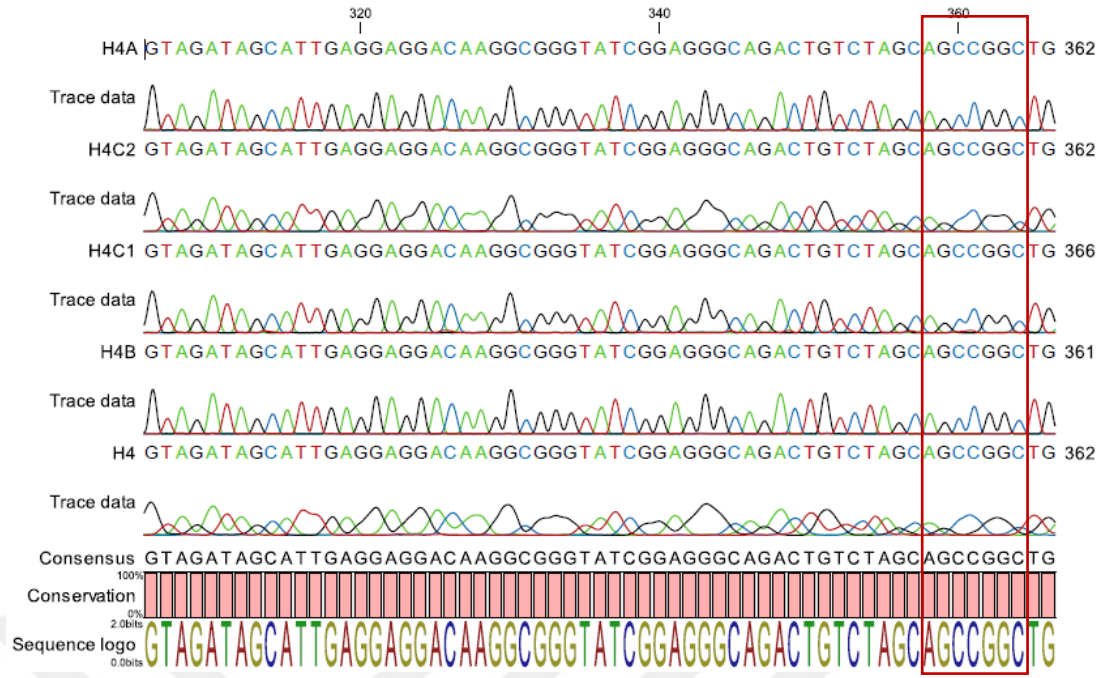
4.2.3. Sanger Dizileme Bulgusu

Tüm ekzom dizileme çalışması sonrası H2'de saptanan uçbirleştirme bölgesi bozulması varyantının ailesel olup olmadığını saptamak amacıyla gerçekleştirilen Sanger dizilemede HRM analizinde olduğu gibi aynı varyantın hastanın annesinde de olduğu saptandı. H2 ve aile bireylerine ait baz okuma pikleri Şekil 25'te verildiği gibidir.



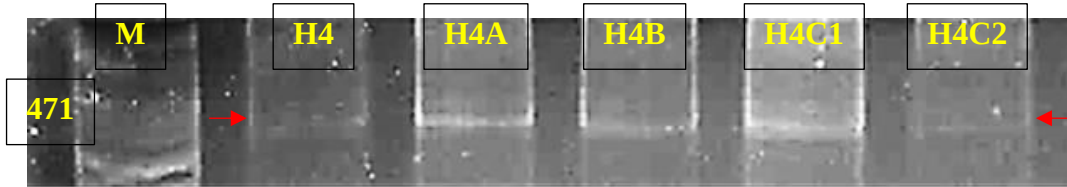
Şekil 25. H2 ve aile bireylerine ait Sanger dizileme baz okuma pikleri

Tüm ekzom dizileme çalışması sonrası H4’de saptanan çerçeve kaymasına yol açan delesyonun ailesel olup olmadığını saptamak amacıyla gerçekleştirilen Sanger dizilemede H4’te ve ikinci çocuğunda (C2) baz okuma piklerinde diğer aile bireylerine göre farklılık gösterse de net bir saptama gerçekleştirilemedi. H4 ve aile bireylerine ait baz okuma pikleri Şekil 26’da verildiği gibidir.



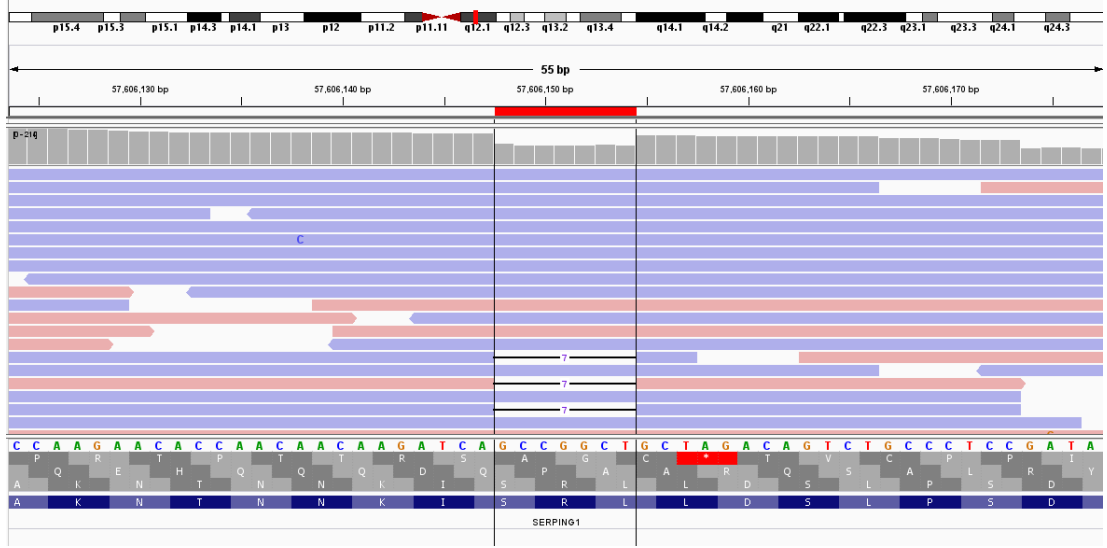
Şekil 26. H4 ve aile bireylerine ait Sanger dizileme baz okuma pikleri

Sanger dizilemede H4'te ve ikinci çocuğunda (C2) saptanan farklılığa netlik kazandırmak amacıyla H4 ve ailesine ait PCR ürünleri dikey poliakrilamid jelde yürütüldü. Görüntülemelerde Şekil 27'de görüldüğü gibi yine H4'te ve ikinci çocuğunda (C2) net olmayan bir benzerlik saptandı.



Şekil 27. H4 ve aile bireylerine ait poliakrilamid jel (%12) görüntüsü

Tüm ekzom dizi analizi sonucu net olarak elde ettiğimiz bölgeye ait okuma görüntüsü Şekil 28'de ve okunan dizinin NCBI veri tabanında "blast" analiz sonucu Şekil 29'da gösterildiği gibidir.



Şekil 28. Tüm ekzom dizi analizi H4'te *SERPING1* geni delesyon saptanan bölgenin okuma görüntüsü

Homo sapiens serpin family G member 1 (SERPING1), RefSeqGene (LRG_105) on chromosome 11
Sequence ID: [NG_009625.1](#) Length: 24300 Number of Matches: 1

Range 1: 13465 to 13620 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
252 bits(279)	1e-62	149/156(96%)	7/156(4%)	Plus/Plus
Query 1	ATAAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCTCGGACCTGTACAGCAGCAGCCCCAGAGTCCTA	60		
Sbjct 13465	ATAAGGGACACCTTTGTGAATGCCTCTCGGACCTGTACAGCAGCAGCCCCAGAGTCCTA	13524		
Query 61	AGCAACAACAGTGACGCCAACTTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAAC	120		
Sbjct 13525	AGCAACAACAGTGACGCCAACTTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAAC	13584		
Query 121	AACAAGATCA-----GCTAGACAGTCTGCCCTCC	149		
Sbjct 13585	AACAAGATCAGCCGGCTGCTAGACAGTCTGCCCTCC	13620		

Şekil 29. Tüm ekzom dizi analizi H4'te *SERPING1* geni delesyon saptanan bölgedeki okumanın blast sonucu

Tartışma

Genetik bozukluğu olduğundan şüphelenilen birçok hastada, kapsamlı genetik testlerin tamamlanmasından sonra bile, hastalık nedeni olan genetik kusurlar tanımlanamamaktadır (Hujová vd., 2020). HAÖ'nün moleküler patogenezi hakkında genişleyen boşlukların kapatılmasında yüksek verimli yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin kullanımı önem kazanmaktadır. Öyle ki, HAÖ'nün genetik nedeninin deşifre edilmesinde NGS teknolojilerinin, özellikle de tüm ekzom dizilemesinin (WES) uygulanması, HAÖ-nC1INH tiplerinin artmasıyla sonuçlanmıştır (Germenis, Vatsiou, Csuka, Zamanakou, ve Farkas, 2021).

WES'in, nadir görülen monogenik hastalıklarda nedensel mutasyonları ortaya çıkarma kapasitesine sahip önemli bir tanı aracı olma potansiyeli taşıdığı bilinmektedir (Seaby, Pengelly, ve Ennis, 2016). Monogenik hastalıkların yanı sıra, işitme kaybı, zihinsel engellilik, otizm spektrum bozuklukları ve retinitis pigmentosa gibi genetik olarak heterojen bozuklukların genetik temelini belirlemek için de etkili bir araç olabileceği vurgulanmıştır (Rabbani, Tekin, ve Mahdieh, 2014). Bununla birlikte, WES için önemli sınırlayıcılar mevcuttur; şöyle ki, genomun yalnızca %1-2'si gibi sınırlı bir hedef yakalaması, bu hedef bölgeler dışında meydana gelen klinik olarak ilişkili alellerin tamamen göz ardı edilmesine ve derin intronik bölgelerin kaybına yol açmaktadır (Seaby vd., 2016). Derin intron alanı, uygun dokuya ve gelişime özgü pre-mRNA işlenmesini güçlendirmek için daha iyi bilinen ekzon-proksimal öğelerle iş birliği yapan çeşitli uçbirleştirme ("splicing") düzenleyici öğeleri barındırdığı bildirilmiştir. İnsan genomunda yetersiz olarak açıklanan bu öğeler, rekursif uçbirleştirme ekzonlar (RS-ekzon), içekzon denen ultra-derin intronik elementler, tuzak uçbirleştirme bölgeleri, uzak dallanma noktaları (>100 nt), transkripsiyonel düzenleyici RNP'lerin bağlandığı derin intronik elementlerdir (Conboy, 2021). HAÖ-C1INH'nin yaklaşık %5'lik bir kısmının nedensel bir *SERPING1* gen mutasyonu taşımadığı belirtilmekte, bununla birlikte gelişen NGS teknolojisinin hızla gelişmesi sayesinde yeni varyantların ortaya çıkarılması ile bu %5'lik kısımda önemli bir azalma olduğu belirtilmiştir (Germenis, Rijavec, vd., 2021; Pappalardo vd., 2008). Bu azalmada özellikle derin intronik alanlarda patojenik varyasyonların keşfinin etkisi önemlidir (Germenis, Rijavec, vd., 2021). Öyle ki, 2017'ye kadar 77 farklı hastalıkla ilişkili 185 derin intronik varyant tanımlanmıştır (Vaz-Drage, Custódio, ve Carmo-

Fonseca, 2017). Bu hastalıkların yanı sıra son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda HAÖ ilişkili patojenik *SERPING1* derin intronik varyantları da bildirilmiştir. Vatsiou ve arkadaşları, beş farklı popülasyondan geleneksel genomik analizler sonucu *SERPING1* gen mutasyonu taşımadığı belirlenen Tip I HAÖ-C1INH tanılı akraba olmayan 14 hasta ile gerçekleştirdikleri çalışmada, 5' ve 3'UTR'ler, ekzonların yanı sıra derin intronik bölgeleri de içerisine alan özel NGS paneli kullanarak yürüttükleri dizileme çalışması sonrası iki hastada derin intronik bölgede yer alan, c.-22-155G>T varyasyonunu saptamışlardır. Gerçekleştirdikleri pedigrig analizi ile varyantın etkilenen bireylerde aynı alelde rs4926 (c.1438G>A) polimorfizmi ile birlikte heterozigot olarak taşındığını belirtmişler ve *in silico* analizlerle uçbirleştirme işlemindeki etkisinin önemli olduğunu vurgulayarak ACMG-AMP 2015 rehberine göre varyantın patojenik olduğunu ifade etmişlerdir (Vatsiou vd., 2020). Hujová ve arkadaşları, bir Çek ailesinin Tip I HAÖ-C1INH tanılı 24 bireyi ile gerçekleştirdikleri çalışmada, sağlıklı akrabalarda bulunmazken tüm etkilenen bireylerde ise bulunduğu yeni bir derin intronik varyantı c.1029+384A>G saptamışlardır. *In silico* analizde bu varyasyon sonucu yeni donör uçbirleştirme bölge olduğu bulgusunu elde etmişler ve bu bulguya dayanarak varyantın, de novo donör uçbirleştirme bölgesi ve varyasyondan 89 bp yukarı akışta bulunan güçlü kriptik akseptör bölgesini kullanarak psödoekzon inklüzyonuna yol açtığını önermişlerdir. Heterozigot olarak taşındığını saptadıkları bu varyantla birlikte sağlıklı bireylerde saptanan c.-21T>C, c.1029+84G>A, ve c.1030-20A>G polimorfizimlerin etkilenen bireylerde olmaması nedeniyle c.1029+384A>G varyantının hastalık nedeni olduğunu vurgulamışlar; fakat sundukları verilere göre aslında c.1030-20A>G polimorfizminin tüm hasta bireylerde heterozigot ya da homozigot taşıdığı görülmesine rağmen derin intronik varyantın bu polimorfizimle taşınmasına dair herhangi bir yorum yapmamışlardır. Bununla birlikte, ACMG-AMP 2015 rehberine göre varyantın patojenik olduğunu ifade etmişlerdir (Hujová vd., 2020). Derin intronik varyant c.1029+384A>G, ayrıca Germanis ve arkadaşlarının Tip I HAÖ-C1INH tanılı olguların bulunduğu bir Macar aile ile özel NGS paneli kullanarak gerçekleştirdikleri dizileme çalışması sonucunda da Heterozigot olarak bulunduğu saptanmıştır. Bu ailede de patojenik varyantın yanı sıra c.-21T, c.1029+84G>A ve c.1030-20A>G haplotipinin varlığı saptanmış ve sundukları bilgilere göre hasta bireylerde patojenik varyantla birlikte c.1030-20 G polimorfizmin de heterozigot olarak taşındığı

görülmesine rağmen bu raporda da bu durumla ilgili herhangi bir yorumlama yapılmayarak, yalnızca haplotipin ortak olması nedeniyle bu aile ile Hujová ve arkadaşlarının çalışmasındaki Çek aile ile akraba olabileceği vurgulanmıştır (Germenis, Vatsiou, vd., 2021).

Bu tez kapsamında, kendisi de nadir bir hastalık olan herediter anjioödem hastalığının nadir bir kısmını oluşturan ve mevcudiyeti hakkında bilgi verilirken patolojisi hakkında neredeyse hiçbir açıklamanın yapılmadığı *SERPING1* geni mutasyonu olmayan Tip I HAÖ-C1INH'nin genetik patolojisini ortaya çıkarmak adına tüm ekzom dizileme çalışması gerçekleştirilmiştir.

SERPING1 geni mutasyonu olmayan Tip I HAÖ-C1INH tanılı beş hasta ile gerçekleştirdiğimiz WES çalışması sonucunda *SERPING1* geni varyasyonlarının mevcudiyetini incelediğimizde ClinVar eşleşme analizi sonucu ClinVar tanımlı üç *SERPING1* gen polimorfizmi ve kesin eşleşme analizleri sonucunda ne ClinVar ne de dbSNP veri tabanında yer almayan iki tanımlanmamış varyasyon saptanmıştır. H1, H2, H4 ve H5'te heterozigot, H3'te homozigot olarak intronik c.1030-20A>G (rs2511988) varyantı, H3 ve H4 te Heterozigot olarak intronik c.685+88G>A (rs11229063) ve yanlış anlamlı c.1438G>A (rs4926) varyantları ClinVar veritabanında klinik anlamlılık açısından herediter anjioödem için benign olarak tanımlanmış yaygın polimorfizmlerdir. H1, H3 ve H5'te bu polimorfizmler dışında herhangi bir *SERPING1* gen varyasyonu saptanmamıştır. Bu durum, WES analizinin derin intronik alanları hedeflememesi nedeniyle bu bölgelerdeki olası varyasyonların kaçırılmasından kaynaklanmış olabilir.

H2 ve H4 olmak üzere iki hastada *SERPING1* geninde varyasyonun bulunduğu saptanmıştır. Saptanan varyasyonların, klinik amaçlı gerçekleştirilen *SERPING1* hedefli dizileme çalışmasında saptanmadığının belirtilmiş olması, bu varyasyonların dizileme çalışmasında hedeflenen bölgeler içerisinde yer almamasından ya da okuma kalitesi düşüklüğü nedeniyle göz ardı edilmiş olmasından kaynaklanabilir. Bu iki varyasyon ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında yer almamakta, yani klinik anlamlılık değeri açısından tanımlanmamıştır, bununla birlikte her iki varyasyonun da veri tabanı taramalarına göre VarSome veri tabanında patojenik ve Franklin veri tabanında olası patojenik anlamlılık taşıdığı saptanmıştır.

H2’de saptanan heterozigot c.-22-2A>G varyasyonu, uçbirleştirme bölgesi bozulmasına yol açan bir varyasyondur ve validasyon deneyi ile hastanın annesinde de heterozigot olarak bulunduğunun saptanması ile otozomal dominant olarak herediter özelliğin sergilendiği saptanmıştır. Bygum ve arkadaşları tarafından 26 Danimarkalı aileden 82 HAÖ’lü (Tip I ve Tip II) hastada gerçekleştirilen multipleks ligasyon-bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) sonrası *SERPING1* geni ekzon dizileme sonucunda bir ailede c.-22-2A>G varyasyonu saptandığı bildirilmiştir (Bygum vd., 2011). Veronez ve arkadaşları tarafından, kallikrein-kinin sistem ve ilişkili genlerdeki varyasyonları ortaya çıkarmak amacıyla, Brezilya ve Danimarka popülasyonundan oluşan 45’i hasta olan 26 HAÖ-C1INH ve 5 HAÖ-F12’lü aileden 19 sağlıklı ve 59 hasta birey ile gerçekleştirilen çalışmada, semptomatik Danimarkalı bir ailenin altı semptomatik bireyinde c.-22-2A>G varyasyonu saptandığı bildirilmiştir (Veronez vd., 2019). Yine Danimarka popülasyonundan olmak üzere Aabom ve arkadaşları tarafından, 14’ü semptomatik olan 22 HAÖ-C1INH’li çocukla gerçekleştirdikleri MLPA ve Sanger dizileme ile *SERPING1* geni spesifik mutasyon tarama çalışmasında bir hastada c.-22-2A>G varyasyonu ve aynı zamanda başka bir hastada aynı bölgede yer alan c.-22-2A>C varyasyonu saptandığı bildirilmiştir (Aabom vd., 2017). Ponard ve arkadaşları tarafından, Fransız popülasyonunda gerçekleştirilen başka bir MLPA ve Sanger dizileme çalışmasında Tip I HAÖ-C1INH’li bir hastada aynı bölgede c.-22-2A>T varyasyonu saptandığı bildirilmiştir (Ponard vd., 2020). Danimarka, Fransa ve bu tez çalışması ile saptandığı üzere Türkiye’nin yer aldığı farklı popülasyonlarda saptanan bu varyasyonun HAÖ-C1INH moleküler patolojisi nedeni olabileceği görülmektedir ve HAÖ kliniği açısından dikkate alınmalıdır.

H4’te saptadığımız c.826_832del p.Arg276* varyasyonu literatürde henüz yer almamaktadır, bu çalışma ile ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Validasyon deneylerinde görüldüğü üzere hastanın ebeveynlerinde bu varyasyon saptanamamıştır, bu nedenle bu varyasyonun *de novo* gelişmiş olabileceği düşünülmektedir. Sanger dizilemede çok açık olmamakla birlikte HRM analizinde daha kesin olmak üzere hastanın ikinci çocuğunda muhtemel olarak bu varyasyonun varlığı görülmekte ve bu nedenle bu varyasyonun da herediter özellik gösterdiği görülmektedir.

H4’ten alınan bilgilere göre, anne tarafından kuzenlerinin Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) hastası olduğu belirtilmiştir. ClinVar tanımlı yalnızca H2 ve H4 hastalarının en az

birinde saptanan varyantlara bakıldığında H4'te *MEFV* geninde heterozigot olarak c.2080A>G (p.Met694Val) varyasyonu saptanmıştır. Bu varyasyon otozomal resesif kalıtmımlı otoinflatör bir hastalık olan FMF genetik patolojisinde yer alan en yaygın mutasyondur (Eyal, Shinar, Pras, ve Pras, 2020). Özellikle abdominal atakların benzer olması nedeniyle HAÖ olgularının yanlış FMF tanısı aldıkları ve FMF tedavisi gördükleri bildirilmektedir (Soyak Aytekin, Çağdaş, Tan, ve Tezcan, 2021). Bununla birlikte bu iki hastalığın bir arada görülebileceğine dair literatürde bir olgu raporu bulunmaktadır. Raporda, abdominal atak ve ellerde şişme bulunan olguda, *MEFV* geninde FMF için tanımlı bir diğer mutasyon R202Q'nun homozigot olarak bulunduğu ve ailede HAÖ öyküsü olması nedeniyle gerçekleştirilen biyokimyasal analizler sonucu C4 ve C1INH seviyelerinin düşük olduğu, bu nedenlerle olgunun hem FMF hem de Tip I HAÖ-C1INH tanısı ve tedavisi aldığını bildirmişlerdir (Bahceci, Genel, Gulez, ve Nacaroglu, 2015). Tip I HAÖ-C1INH tanılı H4'ün aynı zamanda saptadığımız üzere FMF taşıyıcısı olması nedeniyle ileri jenerasyonlar için yanlış tanımlara yol açan bu iki hastalığın bir arada görülme olasılığı önem taşımaktadır.

SERPING1 dışında HAÖ için patojenik tanımlı diğer altı gen varyasyonlarının mevcudiyetine bakıldığında, ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşme filtrelemesi sonucu 5 adet *F12* geni varyasyonu, 1 adet *PLG* geni varyasyonu saptanmıştır. ClinVar veritabanına göre *F12* geni varyasyonları hereditör anjioödem için klinik olarak benign olduğu doğrulanmıştır. *PLG* geni varyasyonu ile ilgili ClinVar veri tabanında hereditör anjioödem ile ilgili bir doğrulama yokken genel olarak klinik anlamı benign tanımlanmıştır, ayrıca oluşma riski kalıtilabilir bir enfeksiyonel hastalık olan otitis media (orta kulak iltihabı) için benign olduğu doğrulanmıştır (Hafren, Kentala, Einarsdottir, Kere, ve Mattila, 2012). ClinVar dışı dbSNP veritabanı ile kesin eşleşme filtrelemesi sonucu 3 adet *F12* geni varyasyonu, 14 adet *PLG* geni varyasyonu, 9 adet *KNG1* geni varyasyonu, 32 adet *MYOF* geni varyasyonu ve 5 adet *HS3ST6* geni varyasyonu saptanmıştır. Ek açıklama (annotate) işlemiyle “1000 genome phase 3” veri tabanından elde edilen verilere ve gnomAD veri tabanına göre, polimorfizm olmaları nedeniyle popülasyonda alel frekansı beklendiğı üzere varyantların büyük çoğunluğunun 0,01'den büyük olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, anlamlılığı VarSome veri tabanında VUS-Olası patojenik ve Franklin veri tabanında VUS olduğu saptanan *MYOF* geni c.1945G>T (p.Asp649Tyr) varyasyonunun 1000 genome phase 3 veri tabanında alel frekans bilgisinin olmadığı, gnomAD veri tabanında ise

frekansının 0,000007 gibi çok düşük bir değerde olduğu saptanmıştır. Anlamlılığı VarSome veri tabanında patojenik ve Franklin veri tabanında VUS-Olası patojenik olduğu saptanan *HS3ST6* geni c.343_344insC (p.Asp115AlafsTer8) varyasyonunun “1000 genome phase 3” veri tabanında alel frekansının 0,0012 olduğu saptanmıştır. Her iki varyasyonun da yalnızca H2’de bulunduğu zigosite açısından heterozigot olduğu saptanmıştır. Böylece, H2’de, biri HAÖ-C1INH genetiğini oluşturan *SERPING1* genindeki valide edilmiş varyasyon olmak üzere, HAÖ patolojisi için henüz bir tanımlama yapılmamış HAÖ-nC1INH genetik alt tiplerini oluşturan *MYOF* ve *HS3ST6* genlerindeki varyasyonların saptanması sonucunda HAÖ moleküler patolojisinde heterojenite varlığından söz edilebilir. Farklı genlerdeki spesifik HAÖ ilgili mutasyonların bir arada bulunabileceğine dair bir çalışma örnek verilebilir. Bork ve arkadaşları, hasta üç kardeşin klinik verileri temelinde 13 bireyin üç kuşak akraba olduğu 14 hasta ile gerçekleştirdikleri *F12*, *SEPING1* ve *PLG* genlerinin Sanger dizileme çalışması sonucunda iki kardeşin heterozigot olarak HAÖ patojenitesi için tanımlı hem c.1480C>T (p.Arg494*) *SERPING1* geni mutasyonu, hem de c.988A>G (p.Lys330Glu) *PLG* geni mutasyonu taşıdığını, *SERPING1* geni varyasyonunu babanın taşıdığını ve ondan kalıtıldığını, *PLG* varyasyonunun annenin taşıdığını ve ondan aktarıldığını saptamışlardır. Hastalarda her iki mutasyonun da ortaya çıkmasının, kallikrein-kinin sisteminin artan kararsızlığına bağımsız olarak katkıda bulunabileceği ve bradikinin oluşumunu kolaylaştırabileceği bu nedenle de iki hastada daha şiddetli bir fenotip beklenebileceğini vurgulamışlardır. Bununla birlikte, bir hastada hafif ve diğerinde orta dereceli bir hastalık seyri olduğunu ve semptomların şimdiye kadar HAE-C1INH'ye benzediğini, öte yandan, bu hastaların her ikisinin yaşlarının küçük olması (13 ve 16 yaş) nedeniyle, yaşamın ilerleyen dönemlerinde daha ağır bir hastalık seyrinin göz ardı edilemeyeceğini vurgulamışlardır (Konrad Bork vd., 2020). H2’deki durumun benzer özellik taşıyıp taşımadığını anlayabilmek adına, hastanın semptomatik fenotip açısından klinik takibinin yapılmasının yanı sıra, öncelikle *MYOF* ve *HS3ST6* genlerindeki saptanan bu varyasyonların kalıtsallık açısından valide edilmeli, ayrıca bu varyasyonların patojenitesi değerlendirmek için fonksiyonel analizler yapılmalıdır.

ClinVar veri tabanı ile kesin eşleşen varyantlara bakıldığında H2’de aynı zamanda anlamlılığı ClinVar, Varsome ve Franklin veri tabanlarının üçünde de patojenik olan heterozigot *F5* geni c.1601G>A p.Arg534Gln varyasyonu saptanmıştır. Bu varyasyon

bir en yaygın görülen kalıtsal trombofili olan otozomal dominant kalıtmımlı FV Leiden hastalığı için tanımlanmış bir mutasyondur (Albagoush, Koya, Chakraborty, ve Schmidt, 2021). FV Leiden mutasyonları aynı zamanda aktiflenmiş protein C'nin antikoagülant direncine de yola açabilir, bu nedenle venöz tromboembolizm için de bir risk oluşturmaktadır (Franchini ve Lippi, 2010). C1INH'nin regüle ettiği bir sistem olan koagülasyon sistemindeki bu bozukluk nedeniyle HAÖ ile FV Leiden hastalığının bir arada görülmesi hastanın klinik seyri ve yönetimi için önem taşımaktadır. Çelikel ve arkadaşları, oral kontraseptif kullanım sonucu hemorajik deri nekrozu gelişimi ile karakterize Purpura Fulminans'lı bir kadın olgunun hem heterozigot FV Leiden mutasyonuna sahip olduğu ve bir Tip I HAÖ-C1INH hastası olduğu belirtilen bir olgu raporu bildirmişlerdir. HAÖ'lü hastalarda koagülasyon sistemi aktivasyonunun artmış olmasına rağmen, muhtemelen hiperfibrinoliz gibi bilinmeyen karşı etkili faktörler nedeniyle artan bir tromboembolizm prevalansı saptanmadığı belirterek, bu olgunun istisnai bir hiperkoagüle örneği olduğunu bildirmişler ve HAÖ'li kadınlar için hamilelikten veya hormon replasman tedavisine başlamadan önce faktör V Leiden mutasyonu için taranmasını önermişlerdir (Celikel, Buyukasik, Karakaya, ve Kalyoncu, 2007).

H1, H3 ve H5 hastalarında *SERPING1* geni mutasyonu olmadan gelişen HAÖ-C1INH patolojisine neden olabilecek aday gen seçebilmek adına öncelikle H2 ve H4 hastalarında saptanmayan ortak varyantlar değerlendirilmiştir.

ClinVar veritabanı kullanılarak yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında saptanan ortak homozigot varyantlar değerlendirildiğinde; *TNNT2* (intronik), *RYR2* (intronik), *CRYGB* (sinonim), *NIPBL* (intronik), *SYNE1* (intronik), *PMS2* (intronik), *SOS2* (intronik), *INF2* (intronik), *PAFAH1B1* (intronik), *CACNA1A* (intronik), *CYP2A7* (yanlış anlamlı) ve *CSF2RA* (sinonim) genlerinde varyasyonlar belirlenmiş, bu varyasyonlar ClinVar'ın yanı sıra Varsome ve Franklin veritabanlarında da benign olarak tanımlanmıştır. Tüm veri tabanlarında benign olmaları ile birlikte varyasyonlar, homozigot olarak taşınmaları nedeniyle resesif kalıtımla hastalık için patojenik olabilir mi düşüncesi ile değerlendirilmiş, fakat "1000 genome phase 3" ve gnomAD veri tabalarında yüksek homozigot alel sayısı ile alel frekanslarının yüksek (0,01'den büyük) olması bu ihtimali ortadan kaldırmıştır. Daha sonra ClinVar veritabanı kullanılarak yalnızca H1, H3 ve H5 hastalarında ortak bulunduğu saptanan 132'si tümünde heterozigot ve 97'si farklı zigozitede olan 239 varyant incelenmiştir. ClinVar

veri tabanında klinik anlamlılık açısından patojenik anlamlılık saptanamaması nedeniyle VarSome veritabanı baz alınarak anlamlılık değeri VUS, VUS-olası patojenik ve VUS-patojenik olarak saptanan varyantlar değerlendirildiğinde *CEP3* (intronik, VUS), *PRDM6* (çerçeve içi insersiyon, VUS olası patojenik), *SPINKS5* (intronik, VUS), *PKHD1* (yanlış anlamlı, VUS-patojenik), *FOXP2* (intronik, VUS), *CNTAP2* (intronik, VUS), *TRPS1* (5'UTR, VUS), *OR13C5* (sinonim, VUS), *INPP5E* (intronik,VUS), *KIF7* (intronik, VUS), *VSX* (intronik, VUS) ve *SMARCB1* (3'UTR, VUS) genlerinde varyasyonlar belirlenmiş, fakat bu varyasyonların da “1000 genome phase 3” ve gnomAD veri tabalarında alel frekanslarının yüksek (0,01'den büyük) olduğu saptanmıştır.

ClinVar dışı dbSNP veritabanı ile eşleşen varyasyonlar, ek açıklama işlemi ile elde edilen “1000 genome phase 3” verilerinde alel frekanslarının yüksek olması nedeniyle ayrıntılı olarak değerlendirilmemiştir.

ClinVar ve dbSNP veri tabanında yer almayan tanımlanmamış varyantlar incelendiğinde H1, H3 ve H5'te ortak varyant saptanamamıştır.

H1, H3 ve H5'in en az birinde saptanan, Clinvar tanımlı ve ClinVar ve dbSNP veri tabanında yer almayan tanımlanmamış varyantlar incelendiğinde dikkat çeken genler şöyledir.

H5'te heterozigot, alel frekansı 0,0003 olan, ClinVar ve VarSome veri tabanında VUS, Franklin veri tabanında VUS-olası patojenik anlamlılığındaki *MASP1* geni c.1507C>T p.Arg503Cys varyasyonu saptanmıştır. Varyasyon ClinVar'da tanımlı olmakla birlikte herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir (RCV000788551.1). Genel bilgede bahsedildiği gibi, mannoz-bağlayan lektin-ilşkili serin proteaz (*MASP1*), C1INH için bir hedef molekül olan lektin kompleman yolağı moleküllerinden biridir ve kontakt aktivasyon sisteminden bağımsız olarak yüksek molekül ağırlıklı kininojenin kesimini sağlayarak HAÖ patolojisi mekanizmasında yer alan bradikinin üretimine yola açabileceği bilinmektedir (Dobó vd., 2011). Bu varyasyon, *SERPING1* geni mutasyonu olmadan HAÖ-C1INH gelişimini ve C1INH seviyesi ve fonksiyonundaki düşüklüğü açıklamamakla birlikte, bir aktivasyon artışı söz konusu olası durumunda semptomatik şiddeti etkileyebileceğinden hastanın klinik seyri dikkatle takip edilmelidir. Ayrıca mutant *MASP1* ile C1INH protein etkileşimi ile sahip olduğu proteinaz fonksiyonu nedeniyle C1INH'nin yıkımına yol açmış olacağı düşünülebilir.

Fonksiyonel analizlerle MASP1 aktivasyonundaki değişiklikler ve C1INH ile protein etkileşim analizleri yapılarak ayrıntılı moleküler değerlendirme ile bu varyasyonun C1INH üzerinde etkisi olup olmadığı değerlendirilebilir.

NPHS2 geni, renal glomerular filtrasyon bariyerinin dış kısmını çevreleyen epitelyal hücreler olan podositlerdeki bir böbrek-spesifik stomatin integral protein podosinleri kodlar. Podosin kümeleri, yarık-diyafram düzeneğinin oluşması için gerekli nefrin oligomerizasyonu ve CD2AP adaptörünün katılımı gibi süreçlerde podosit hücre içi sinyalleşmesinde rol alır (Caridi, Perfumo, ve Ghiggeri, 2005). *NPHS2* genindeki mutasyonlar, *NPHS1*, *PLCE1*, *CD2AP*, *ACTN4*, *TRPC6*, *INF2*, *MYO1E*, *PTPRO* ve *ARHGDI*A genleri de dahil olmak üzere steroid-dirençli nefrotik sendrom (SRNS) nedeni olarak tanımlanmıştır (Bouchireb vd., 2014). SRNS, ağır proteinüri, ödem, hipoalbüminemi ve hiperlipidemi ile karakterize ve fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) gelişimi ile ilişkili olarak son-evre böbrek hastalığına ilerleyebilen otozomal resesif kalıtmı bir hastalıktır (Boute, 2000). H5'te heterozigot olarak bulunduğu saptanan hem VarSome hem de Franklin veri tabanında anlamlılığı patojenik olan *NPHS2* geni c.871C>T p.Arg291Trp varyasyonu ClinVar veritabanında da yer aldığı üzere (RCV000005700.9) SRNS için patojenik varyasyon olarak tanımlanmıştır. H5'in SRNS taşıyıcısı olması nedeniyle ileri jenerasyonlar için iki hastalığın bir arada görölme olasılığı söz konusudur. Steroid direnci nedeniyle danazol vb tedavi yaklaşımları bu olası gruplar için muhtemelen yetersiz kalacağından HAÖ ve SRNS'nin bir arada görölmesi, terapötik yaklaşımdan önem kazanmaktadır.

H1'de heterozigot olarak bulunduğunu saptadığımız ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında yer almayan tanımlanmamış varyantlardan ikisi TRPC6 (c.1687del p.Thr563LeufsTer2) ve TRPV5 (c.1520-2A>C, uçbirleştirme bozulması) genlerinde yer almaktadır. Bu iki gen, farklı dokularda da bulunabilmeleri ile birlikte hem transport hem de uyarı/sinyalizasyon süreçleri için böbrek dokularında spesifik fonksiyon gösterdiği belirtilen geçici reseptör potansiyel (TRP) iyon kanalları ailesinden kanonik alt tip üyesi TRPC6'yı ve vaniloid alt tip üyesi TRPV5'i kodlamaktadır (Venkatachalam ve Montell, 2007). TRPC6, podositlerdeki, spesifik olarak diasilgliserole bağımlı G protein sinyalleşmesine yanıt olarak aktive edilebilen, heterotetramerik, seçici geçirgen olmayan ($Ca^{2+}:Na^{+}$, 2:1) katyon kanalıdır. TRPC6 bazal aktivitesi podositlerde çok düşük olmakla birlikte podosin ile etkileşime girerek bir multiprotein kanal kompleksinin bir parçası olabildiği ve aktivasyonundaki artışın

podosit hasarına neden olabileceği iyi tanımlanmıştır (Tomilin, Mamenko, Zaika, ve Pochynyuk, 2016). Öyle ki, *TRPC6* genindeki mutasyonlar, yukarıda belirtilen steroid-dirençli nefrotik sendrom (SRNS) hastalığı ile heterojenik görülebilen aynı şekilde steroid dirençli özelliğe sahip otozomal dominant kalıtmıli fokal segmental glomerüloskleroz 2 (FSGS2) (p.Gly882fs, ClinVar:RCV001281330.1) hastalığının patolojik nedeni olarak tanımlanmıştır. Saptamış olduğumuz *TRPC6* (c.1687del p.Thr563LeufsTer2) varyasyonu hem VarSome hem de Franklin veri tabanına göre olası patojenik anlamlılık taşımakta, bunula birlikte FSGS2 ya da herhangi bir hastalık için klinik değeriendirmesi henüz bulunmamaktadır. H1'in klinik öyküsünde renal sistemle ilişkili bir şikayetinin olup olmadığı bilinmemekte, bunula birlikte bu varyasyonla birlikte olası risk taşınması nedeniyle klinik yaklaşımda dikkate alınmalıdır. TRPV5, distal kıvrık tübül ve bağlantı tübülündeki epitelyal hücrelerde bulunan Ca^{2+} için seçici geçirgen iyon kanalıdır. Bir hastalık için klinik anlamlılığı patojenik olarak tanımlanmış bir *TRPV5* geni varyasyonu olmamakla birlikte *TRPV5*^{-/-} farelerde hiperkalsinüri gelişimi nedeniyle Ca^{2+} ilişkili böbrek hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Hsu, Hoenderop, ve Bindels, 2007).

Literatürde bulunan renal hastalıkla HAÖ'nün bir arada görüldüğü durumlara örnek olabilecek iki olgu çalışmasını verebiliriz. Srinivasan ve Beck, abdominal, yüz ve laringial ödem atakları sergileyen 19 yaşında erkek bir IgA nefropatili HAÖ hastası ile ilgili sundukları olgu raporunda, kompleman sistem bağlantısı nedeniyle IgA nefropati hastalığının, HAÖ ilişkili immün düzenleyici hastalık listesine eklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Srinivasan ve Beck, 1993). Akut bağırsak anjiyoödem, hipertansiyon, akut pankreatit, böbrek yetmezliği ve şiddetli nefrotik sendrom nedeniyle genel vücut şişmesi sergileyen HAÖ'lü bir membranöz nefropati hastası için uygulanan klinik yönetim hakkında bir olgu raporu bildirilmiştir. Raporda nefrotik sendromu olan hastalarda aşırı sıvı yüklenmesi ile anjiyoödem atakları arasında ayırım yapmanın zor olduğu belirtilmiş ve nefrotik sendrom için HAÖ ataklarını tetikleyebilmesi nedeniyle ACEi ve ARB'lerin kullanılamadığı vurgulanarak bu iki hastalığın bir arada görölmesinin tedavi yönetiminde zorluk yarattığı bildirilmiştir (Majoni ve Smith, 2008). Kapiler dolaşımda, küçük proteinler (<20kDa) sırasıyla, pencereili özelleşmiş yapıdaki endotelyal hücreleri, bazal membranı, yarık diyaframı geçerek glomerular filtrasyon sisteminden üriner alana kaçabilirler fakat bunlar hızlıca proksimal tübülde geri emilirler. Patolojik şartlarda glomerular yapıdaki oluşun

hasarlar 65 kDa büyüklüğündeki albümin gibi ota büyüklükteki proteinler hatta immünoglobulin (100≤ kDa) daha büyük proteinlerin üriner alana kaçabildiği ve üriner proteomik analizi ile hastalık spesifik belirteçlerin belirlenebileceği bildirilmiştir (Julian vd., 2009). Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), IL-6, vasküler hücre adezyon molekülü-1 ve kompleman degradasyon ürünü C3d lupus renal aktivitesi için ve VEGF, ILR-1 antagonisti, IL-17, TNF- α ve CD96'nın spesifik glomerular hastalıklar için belirteç olarak önerilmiştir (Varghese vd., 2007).

Bu bilgiler ışığında, *SERPING1* gen mutasyonu olmayan HAÖ-C1INH'li hastalarda sistemik bir mekanizmanın bozulması nedeniyle C1INH proteinin (105 kDa) seviyesindeki düşüklüğün filtrasyon sisteminde kapiler alandan üriner alana olası bir kaçıştan kaynaklanabileceği ve bu nedenle üriner analizlerle HAÖ hastalarında C1INH varlığının değerlendirilmesinin önemli olduğunu düşündürmektedir.

H3'te heterozigot olarak bulunduğunu saptadığımız ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında yer almayan tanımlanmamış varyantlardan birisi uçbirleştirme bölgesi bozulması özelliğindeki *NCOA5* geni c.630A>G p.Lys210= varyasyonudur. Varyasyonun, VarSome veri tabanında patojenik ve Franklin veri tabanında VUS anlamlılık taşıdığı belirlenmiştir. Bu genin kodladığı nükleer reseptör koaktivatör 5 (*NCOA5*), spesifik olarak östrojen reseptörü alfanın (*ER α*) transkripsiyonel aktivitesini arttıran bir koaktivatördür (Sauvé vd., 2001). Östrojenin, C1INH seviyesini azalttığı ve FXII seviyesini arttırdığı bilinmektedir (Zeerleder ve Levi, 2016). *SERPING1* gen mutasyonu olmayan HAÖ-C1INH patolojisinde *ER α* ilişkili olarak bu varyasyonun C1INH eksikliğinden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

H3'te heterozigot olarak bulunduğu saptanan ClinVar ve dbSNP veri tabanlarında yer almayan tanımlanmamış varyantlardan bir diğeri *LITAF* geni c.62C>T p.Pro21Leu varyasyonudur. Varyasyonun, VarSome veri tabanında VUS-olası patojenik ve Franklin veri tabanında VUS anlamlılık taşıdığı belirlenmiştir. Bu genin kodladığı lipopolisakkarit-indüklü TNF alfa faktörü (*LITAF*), insan monosit/makrofaj hücre hattında (THP-1), immün hücre aktivasyonu ve proliferasyonu gibi süreçlerde çeşitli fonksiyona sahip bir sitokin olan TNF- α 'nın gen promotoruna spesifik olarak bağlanma özelliği ile ekspresyonunun düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (Myokai, Takashiba, Lebo, ve Amar, 1999). Ekspresyon ilişkisini göstermek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada TNF- α 'nın patojenitelerinde merkezi rol oynadığı Crohn hastalığı ve ülseratif kolitli hasta dokularında, inflamasyonsuz bölgelere göre lamina

propria makrofajlarında lokalize olarak hem TNF- α 'nın LITAF'ın mRNA and protein seviyelerinin yüksek olarak saptandığı bildirilmiştir (Stucchi vd., 2006). Interferon- γ ve - α (IFN), koloni uyarıcı faktör 1 (CSF1) IL-6 ve TNF- α 'nın çeşitli hücrelerde C1INH sentezini indüklediği bildirilmiştir (Prada, Zahedi, ve Davis, 1998). Márkus ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 20'si Tip I, 5'i Tip II olmak üzere 25 HAÖ-C1INH'li hastanın atak süresinde ve semptomsuz süredeki serum örneklerinde serum fetuin-A, TNF- α ve C-reaktif protein (CRP) konsatrasyonları değerlendirilmiş ve sağlıklı kontrollere göre serum fetuin-A'nın semptomsuz sürede azalmış, atak döneminde ise artmış, TNF- α ve CRP'nin ise her iki durumda da azalmış olarak saptandığı bildirilmiştir (Márkus, Veszeli, Temesszentandrás, Farkas, ve Kalabay, 2019). *LITAF* geninde saptadığımız bu yanlış anlamlı varyasyonun, TNF- α ilişkisi üzerinden *SERPING1* gen mutasyonu olmayan HAÖ-C1INH patolojisinde C1INH eksikliğinden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Hereditör anjioödem (HAÖ), sıklığı 1/10000-1/150000 arasında değişen, otozomal dominant kalıtmı nadir bir hastalıktır. Deride, sindirim sisteminde, ekstremitelerde ve üst solunum yolunda meydana gelen tekrarlı ve ön görülemeyen ödem atakları ile karakterizedir.

Hastalığın patofizyolojisinde bir vazodilatör peptit olan bradikininin artmış üretimi nedeniyle gelişen vasküler reaksiyonlar temel oluşturmaktadır. Bradikinin vasküler düz kasları gevşeterek kan basıncını düşürmekte ve vasküler geçirgenliği artırmaktadır. Ani gelişen alerjik reaksiyonun geç fazında anjioödeme aracılık edebilmekle birlikte, temel olarak alerjik olmayan anjiödeme aracılık etmektedir.

Özellikle larinkste meydana gelen ödem ataklarında, uygun tedavinin uygun zamanında alınamaması vakalarda boğularak ani ölüme neden olabilmektedir. Ayrıca şiddetli karın ağrısı, bulantı ve kusma atakları nedeniyle hatalı şekilde Ailevi Akdeniz Ateşi ile karıştırılmakta ve yanlış tanı hatalı tedavi sürecine neden olarak hem hastada zarara neden olmakta hem de gereksiz maddi yük oluşturabilmektedir. Özetle, HAÖ, hem fiziksel hem de zihinsel sağlık üzerinde etki oluşturarak eğitim ve iş verimliliğini olumsuz yönde etkileyerek önemli derecede insani ve ekonomik yük oluşturmaktadır.

Nadir bir hastalık olan HAÖ, aynı zamanda heterojen bir popülasyonu içermektedir. Temel olarak bu hastalık, C1 esterase inhibitör proteininin (C1INH) plazma seviyesine ve fonksiyonel aktivite derecesine göre üç tipe ayrılmaktadır: düşük C1INH protein seviyesi ve yetersiz C1INH fonksiyonu ile Tip I HAÖ; normal C1INH seviyesi sergilemesine rağmen yetersiz fonksiyon ile Tip II HAÖ; normal C1INH seviyesi ve normal fonksiyonla seyreden HAÖ. C1INH fonksiyonunun yetersiz olduğu Tip I ve Tip II HAÖ olgularının yanı sıra normal C1INH seviyesi ve normal fonksiyonla seyreden olguları içeren grup HAÖ-nC1INH olarak adlandırılmaktadır ve bu grup *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF* ve *HS3ST6* genlerindeki mutasyon durumlarına göre alt tiplere ayrılmaktadır. C1INH fonksiyonunun yetersiz olduğu, HAÖ-C1INH hastalarında, C1INH proteinini kodlayan 11q12-q13.1 üzerindeki SERPING1 geninde mutasyon bulunmaktadır ve 748 farklı varyasyon tanımlanmıştır.

Hastalığın tanısında genel olarak tekrarlayan anjioödem atakları öyküsü temel rol oynamaktadır. Bu durumda, pozitif bir aile öyküsü, semptomların çocukluk/ergenlik döneminde başlaması, tekrarlayan ve ağrılı karın semptomlarının varlığı, üst solunum

yolu ödemi varlığı, antihistaminikler, glukokortikoidler veya epinefrine yanıt vermeme, şişliklerden önce prodromal belirti veya semptomların varlığı ve ürtiker yokluğu koşulları sorgulanmaktadır. Bu koşulların varlığı durumunda HAÖ şüphesi güçlenmekte ve C1INH, C4 ve C1q serum konsantrasyonlarının belirlenmesi ve C1INH fonksiyonel analizini içeren rutin biyokimyasal tanı testleri uygulanmaktadır.

Hastalığın tedavisi ise bir atak sırasında semptomları en aza indirmeyi amaçlayan akut ve atakları bütünsel olarak hedeflemeyi amaçlayan profilaktik tedavi şeklinde iki grubu içermektedir. Bununla birlikte hastalığın patogenezinin aydınlatılması ile birlikte tedavi seçenekleri de artış göstermektedir ve hasarlı fonksiyonların yerine konmasını sağlayan tedavi stratejileri güncel protokollerde yer almaya başlamıştır.

Hastalığın temelinde yatan genetik bilginin sınırlı olması nedeniyle, güncel tedavi seçenekleri oldukça kısıtlı durumdadır. Bu nedenle hem hastaların sağ kalımının ve hayat kalitesinin yükseltilebilmesi hem de yanlış tanı ve tedavi kaynaklı insani ve maddi yükün hafifletilebilmesi için bu hastalığın genetik profilinin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

Bu nedenle tez kapsamında bu nadir olgu grubuna ait beş olgunun ve bu beş olgudan ikisinin aile bireylerini içeren çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tüm olgulardan genomik DNA izolasyonunun ardından tüm ekzom dizileme gerçekleştirilmiştir. Yeni nesil sekanslama çalışmasının ardından validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen varyantlar farklı veritabanları kullanılarak tanımlanmış ve temel özellikleri belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, bu hastalığın moleküler heterojenitesinin aydınlatılması açısından oldukça önemli bir temel oluşturmaktadır. Bu bulguların ileri deneylerle desteklenmesi ile olguların kliniğine katkı sunabilecek gelişmelerin yolunun açılacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak;

- Bu çalışma ile biri yeni olmak üzere veri tabanlarında tanımlı olmayan iki *SERPING1* gen varyasyonu saptanmıştır. H2’de saptanan heterozigot c.-22-2A>G varyasyonu bu çalışma ile ilk kez Türk popülasyonunda da var olduğu gösterilmiştir. H4’te saptanan c.826_832del p.Arg276* varyasyonu ise ilk kez bu çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Bu varyasyonların Tip I HAÖ-C1INH

patolojisinden sorumlu *SERPING1* gen mutasyonları olarak tanımlanmasını ve HAÖ genetik tanısında kullanılmasını önermekteyiz.

- H2'de *SERPING1*'in yanı sıra, sırasıyla, HAÖ7 ve HAÖ8 tiplerinin patolojisinden sorumlu genler *MYOF* ve *HS3ST6*'de olası patojenik ve patojenik varyasyonların saptanması, HAÖ tiplerinin heterojenik olarak bir arada görülme ihtimalini doğurmaktadır. Bu nedenle her iki gendeki varyasyonların kalıtsallığı valide edilmeli ve tek başlarına HAÖ patolojisinden sorumlu olup olunamayacağı araştırılmalıdır. Tiplerin bir arada görülebilmesi hastalığın şiddetlenmesinde rol alabileceğinden bu durumun klinik yaklaşımda dikkate alınmasını önermekteyiz.
- H2'de FV Leiden için tanımlı *F5* Arg534Gln mutasyonu ve H4'te FMF için tanımlı *MEFV* Met694Val mutasyonu saptanmıştır. FV Leiden gibi C1INH'nin kontrolü altındaki koagülasyon sistemi bozuklukları ve HAÖ ile ortak semptomatik özelliklerden dolayı yanlış tanıya yol açan FMF hastalıklarının HAÖ ile birlikte görülmesi hem tanı hem de tedavi yönetimi açısından önem arz etmektedir. Daha verimli bir klinik yaklaşımın sağlanmasına yönelik HAÖ hastalarında bu hastalıklar için genetik tanı yapılmasını önermekteyiz.
- H1, H3 ve H5'te *SERPING1* gen varyasyonu saptanmamıştır. Bunun bir nedeni olarak tüm ekzom dizilemenin derin intronik alanları hedeflememesi ve böylece bu alanlardaki olası patojenik varyasyonların kaçırılmış olmasından kaynaklı olabilir. *SERPING1* gen hedefli derin intronik bölgelerin dizileme çalışması ile taranması önermekteyiz.
- *SERPING1* gen mutasyonu olmayan HAÖ durumlarında, C1INH eksikliğinin genetik bir mutasyon kaynaklı olabilmesinin yanı sıra bu eksikliğin epigenetik mekanizmalarla da ortaya çıkmış ve kalıtılmış olabileceğini düşünmekteyiz. *SERPING1* gen mutasyonu olmayan HAÖ'nün moleküler patolojisinde yer alan epigenetik değişimlerin saptanabilmesi için transkriptomik analizlerinin ve C1INH'nin RNA molekülleri ya da diğer proteinlerle olası etkileşimlerinden kaynaklanan fonksiyonel epigenetik etkenlerin ortaya çıkarılması için ileri epigenetik çalışmaların yapılmasını önermekteyiz.
- H5'te C1INH'nin hedef moleküllerinden biri olan MASP1 proteini kodlayan gende varyasyon saptanmıştır. MASP1, kontakt sistemden bağımsız olarak bradikinin oluşumuna yol açabilmesi ile HAÖ patolojisinde etkin olabileceği

için bu gendeki olası aktivasyon arttırıcı varyasyonlar önemlidir. Ayrıca varyasyonun proteindeki proteaz aktivitesinde C1INH ile etkileşimi sırasında C1INH'nin kesimine yol açabilecek bir özellik kazandırmış olabileceğini düşünmekteyiz. MASP1 geninde saptanan varyasyonun valide edilmesini ve ileri fonksiyonel analizlerle mutant MASP1-C1INH etkileşim etkilerinin ortaya çıkarılmasını önermekteyiz.

- H5 ve H1'de, sırasıyla, steroid dirençli nefrotik sendrom ve fokal segmental glomerüloskleroz 2 olmak üzere renal sistem bozuklukları ile ilgili gen varyasyonları saptanmıştır. HAÖ ile renal sistem bozukluklarının bir arada görülmesi özellikle tedavi yönetiminde önem kazanmaktadır. HAÖ hastalarında renal sistem bozukluklarını görülmesi C1INH eksikliğinin nefrotik sistem hasarı kaynaklı protein kaçıışı nedeniyle ortaya çıkmış olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle özellikle *SERPING1* gen mutasyonu olmayan HAÖ hastalarında üriner analizlerle C1INH düzeylerine bakılmasını önermekteyiz.
- H3'te, *NCOA5* ve *LITAF* genlerinde saptanan varyasyonlar nedeniyle C1INH üretiminde bir problemin ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz. Bu varyasyonların valide edilmesini ve ileri moleküler analizlerle C1INH üretimindeki olası etkilerinin ortaya çıkarılmasını önermekteyiz.

Kaynaklar

- Aabom, A., Andersen, K. E., Fagerberg, C., Fisker, N., Jakobsen, M. A., ve Bygum, A. (2017). Clinical characteristics and real-life diagnostic approaches in all Danish children with hereditary angioedema. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1), 4–13. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0604-6>
- Albagoush, S. A., Koya, S., Chakraborty, R. K., ve Schmidt, A. E. (2021). Factor V Leiden Mutation. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). Tarihinde adresinden erişildi <http://europepmc.org/books/NBK534802>
- Ariano, A., D'Apolito, M., Bova, M., Bellanti, F., Loffredo, S., D'Andrea, G., ... Margaglione, M. (2020). A myoferlin gain-of-function variant associates with a new type of hereditary angioedema. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 75(11), 2989–2992. <https://doi.org/10.1111/all.14454>
- Bafunno, V., Firinu, D., D'Apolito, M., Cordisco, G., Loffredo, S., Leccese, A., ... Margaglione, M. (2018). Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(3), 1009–1017. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.020>
- Bahceci, S. E., Genel, F., Gulez, N., ve Nacaroglu, H. T. (2015). Coexistence of hereditary angioedema in a case of familial Mediterranean fever with partial response to colchicine. *Central European Journal of Immunology*, 40(1), 115–116. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.50843>
- Banday, A. Z., Kaur, A., Jindal, A. K., Rawat, A., ve Singh, S. (2020). An update on the genetics and pathogenesis of hereditary angioedema. *Genes and Diseases*, 7(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.07.002>
- Bautista-Llácer, R., Alberola, T. M., Vendrell, X., Fernández, E., ve Pérez-Alonso, M. (2010). Case report: First successful application of preimplantation genetic diagnosis for hereditary angioedema. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(5), 658–662. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.016>
- Bernatchez, P. N., Acevedo, L., Fernandez-Hernando, C., Murata, T., Chalouni, C., Kim, J., ... Sessa, W. C. (2007). Myoferlin regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 stability and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30745–30753. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704798200>
- Binkley, K. E., ve Davis III, A. (2000). Clinical, biochemical, and genetic

- characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *Journal of allergy and clinical immunology*, 106(3), 546–550.
- Bjorkqvist, J., de Maat, S., Lewandrowski, U., Di Gennaro, A., Oschatz, C., Schonig, K., ... Renne, T. (2015). Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(8), 3132–3146. <https://doi.org/10.1172/JCI77139>
- Blomme, A., Costanza, B., de Tullio, P., Thiry, M., Van Simaey, G., Boutry, S., ... Turtoi, A. (2017). Myoferlin regulates cellular lipid metabolism and promotes metastases in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 36(15), 2116–2130. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.369>
- Bock, S. C., Skriver, K., Nielsen, E., Thøgersen, H. C., Wiman, B., Donaldson, V. H., ... Huber, R. (1986). Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry*, 25(15), 4292–4301.
- Bork, K., Wulff, K., Steinmüller-Magin, L., Brænne, I., Staubach-Renz, P., Witzke, G., ve Hardt, J. (2018). Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73(2), 442–450. <https://doi.org/10.1111/all.13270>
- Bork, K., Wulff, K., Witzke, G., ve Hardt, J. (2015). Hereditary angioedema with normal C1-INH with versus without specific F12 gene mutations. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(8), 1004–1012. <https://doi.org/10.1111/all.12648>
- Bork, Konrad, Anderson, J. T., Caballero, T., Craig, T., Johnston, D. T., Li, H. H., ... Riedl, M. A. (2021). Assessment and management of disease burden and quality of life in patients with hereditary angioedema: a consensus report. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13223-021-00537-2>
- Bork, Konrad, Barnstedt, S.-E., Koch, P., ve Traupe, H. (2000). Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *The Lancet*, 356(9225), 213–217.
- Bork, Konrad, Meng, G., Staubach, P., ve Hardt, J. (2006). Hereditary angioedema: New findings concerning symptoms, affected organs, and course. *American Journal of Medicine*, 119(3), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.09.064>

- Bork, Konrad, Wulff, K., Meinke, P., Wagner, N., Hardt, J., ve Witzke, G. (2011). A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 141(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.07.002>
- Bork, Konrad, Wulff, K., Möhl, B. S., Steinmüller-Magin, L., Witzke, G., Hardt, J., ve Meinke, P. (2021). Novel hereditary angioedema linked with a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 6 gene mutation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 148(4), 1041–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.01.011>
- Bork, Konrad, Wulff, K., Rossmann, H., Steinmüller-Magin, L., Brænne, I., Witzke, G., ve Hardt, J. (2019). Hereditary angioedema cosegregating with a novel kininogen 1 gene mutation changing the N-terminal cleavage site of bradykinin. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 74(12), 2479–2481. <https://doi.org/10.1111/all.13869>
- Bork, Konrad, Zibat, A., Ferrari, D. M., Wollnik, B., Schön, M. P., Wulff, K., ve Lippert, U. (2020). Hereditary angioedema in a single family with specific mutations in both plasminogen and SERPING1 genes. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 18(3), 215–223. <https://doi.org/10.1111/ddg.14036>
- Bouchireb, K., Boyer, O., Gribouval, O., Nevo, F., Huynh-Cong, E., Morinière, V., ... Antignac, C. (2014). NPHS2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome: A mutation update and the associated phenotypic spectrum. *Human Mutation*, 35(2), 178–186. <https://doi.org/10.1002/humu.22485>
- Boute, N. (2000). Erratum: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome (Nature Genetics (2000) 24 (349-354)). *Nature Genetics*, 25(1), 125. <https://doi.org/10.1038/75532>
- Busse, P. J., Christiansen, S. C., Riedl, M. A., Banerji, A., Bernstein, J. A., Castaldo, A. J., ... Zuraw, B. L. (2021). US HAEA Medical Advisory Board 2020 Guidelines for the Management of Hereditary Angioedema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(1), 132-150.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.08.046>
- Bygum, A., Fagerberg, C. R., Ponard, D., Monnier, N., Lunardi, J., ve Drouet, C. (2011). Mutational spectrum and phenotypes in Danish families with hereditary

- angioedema because of C1 inhibitor deficiency. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 66(1), 76–84. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02456.x>
- Caccia, S., Suffritti, C., Carzaniga, T., Berardelli, R., Berra, S., Martorana, V., ... Cicardi, M. (2018). Intermittent C1-Inhibitor Deficiency Associated with Recessive Inheritance: Functional and Structural Insight. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16667-w>
- Cagini, N., Veronez, C. L., Azevedo, B. F., Constantino-Silva, R. N., Martin, R. P., da Silva, J., ... Pesquero, J. B. (2018). In silico Analysis Of Alterations In ANGPT1 Gene Supports A New Pathway Responsible To Mediate Hereditary Angioedema In Brazilian Patients With No Mutations In SERPING1 And F12 Genes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(2), AB46. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.150>
- Caridi, G., Perfumo, F., ve Ghiggeri, G. M. (2005). NPHS2 (Podocin) Mutations in Nephrotic Syndrome. Clinical Spectrum and Fine Mechanisms. *Pediatric Research*, 57(5), 54R-61R. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000160446.01907.B1>
- Celikel, S., Buyukasik, Y., Karakaya, G., ve Kalyoncu, A. F. (2007). Hereditary angioedema associated with heterozygous factor V Leiden mutation in a patient with purpura fulminans. *International Archives of Allergy and Immunology*, 142(2), 175–178. <https://doi.org/10.1159/000096611>
- Charles, E., Dumont, B. L., Bonneau, S., Neagoe, P.-E., Villeneuve, L., Räkel, A., ... Sirois, M. G. (2021). Angiopoietin 1 release from human neutrophils is independent from neutrophil extracellular traps (NETs). *BMC Immunology*, 22(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12865-021-00442-8>
- Christen, M. T., Frank, P., Schaller, J., ve Llinás, M. (2010). Human plasminogen kringle 3: solution structure, functional insights, phylogenetic landscape. *Biochemistry*, 49(33), 7131–7150. <https://doi.org/10.1021/bi100687f>
- Cicardi, M., Aberer, W., Banerji, A., Bas, M., Bernstein, J. A., Bork, K., ... Zuraw, B. (2014). Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: Consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69(5), 602–616. <https://doi.org/10.1111/all.12380>

- Conboy, J. G. (2021). Unannotated splicing regulatory elements in deep intron space. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 12(5), 1–19. <https://doi.org/10.1002/wrna.1656>
- Crowder, J. R., ve Crowder, T. R. (1917). Five generations of angioneurotic edema. *Archives of Internal Medicine*, 20(6), 840–852.
- Csuka D, Szilágyi Á, F. H. (2015). Hereditary Angioedema Due to C1-Inhibitor Deficiency – From a Genetic Point of View. *Hereditary Genetics*, 04(01), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2161-1041.1000e112>
- Csuka, D., Veszeli, N., Varga, L., Prohászka, Z., ve Farkas, H. (2017). The role of the complement system in hereditary angioedema. *Molecular Immunology*, 89(June), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.020>
- De Maat, S., Hofman, Z. L. M., ve Maas, C. (2018). Hereditary angioedema: the plasma contact system out of control. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16(9), 1674–1685. <https://doi.org/10.1111/jth.14209>
- de Maat, Steven, Björkqvist, J., Suffritti, C., Wiesenekker, C. P., Nagtegaal, W., Koekman, A., ... Maas, C. (2016). Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(5), 1414-1423.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.021>
- Dewald, G. (2018). A missense mutation in the plasminogen gene, within the plasminogen kringle 3 domain, in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(1), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.060>
- Dewald, G., ve Bork, K. (2006). Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(4), 1286–1289. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.092>
- Dobó, J., Major, B., Kékesi, K. A., Szabó, I., Megyeri, M., Hajela, K., ... Gál, P. (2011). Cleavage of Kininogen and subsequent Bradykinin release by the complement component: Mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. *PLoS ONE*, 6(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020036>
- Donaldson, V. H., ve Evans, R. R. (1963). A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C' 1-esterase. *The American*

journal of medicine, 35(1), 37–44.

- Donaldson, V. H., ve Rosen, F. S. (1964). Action of complement in hereditary angioneurotic edema: the role of C' 1-esterase. *The Journal of clinical investigation*, 43(11), 2204–2213.
- Eyal, O., Shinar, Y., Pras, M., ve Pras, E. (2020). Familial Mediterranean fever: Penetrance of the p.[Met694Val];[Glu148Gln] and p.[Met694Val];[=] genotypes. *Human Mutation*, 41(11), 1866–1870. <https://doi.org/10.1002/humu.24090>
- Fijen, L. M., Bork, K., ve Cohn, D. M. (2021). Current and Prospective Targets of Pharmacologic Treatment of Hereditary Angioedema Types 1 and 2. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 61(1), 66–76. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08832-x>
- Franchini, M., ve Lippi, G. (2010). Factor V Leiden and hemophilia. *Thrombosis Research*, 125(2), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.11.003>
- Fu, L. W., Freedman-Kalchman, T., Betschel, S., ve Sussman, G. (2016). Review of hereditary angioedema. *LymphoSign Journal*, 3(2), 47–53. <https://doi.org/10.14785/lymphosign-2016-0001>
- Germenis, A. E., Rijavec, M., ve Veronez, C. L. (2021). Leveraging Genetics for Hereditary Angioedema: A Road Map to Precision Medicine. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 60(3), 416–428. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08836-7>
- Germenis, A. E., Vatsiou, S., Csuka, D., Zamanakou, M., ve Farkas, H. (2021). Deep Intronic SERPING1 Gene Variants: Ending One Odyssey and Starting Another? *Journal of Clinical Immunology*, 41(1), 248–250. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00887-3>
- Ghannam, A., Sellier, P., Fain, O., Martin, L., Ponard, D., ve Drouet, C. (2016). C1 Inhibitor as a glycoprotein: The influence of polysaccharides on its function and autoantibody target. *Molecular Immunology*, 71, 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.02.007>
- Grumach, A. S., Veronez, C. L., Csuka, D., ve Farkas, H. (2021). Angioedema Without Wheals: Challenges in Laboratorial Diagnosis. *Frontiers in Immunology*, 12(December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.785736>
- Gülbahar, O., ve E Germenis, A. (2021). Rediscovery of a forgotten disease: Hereditary Angioedema. *Balkan Medical Journal*, 38(2), 68–72.

<https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2021.20030>

- Hafrén, L., Kentala, E., Einarsdottir, E., Kere, J., ve Mattila, P. S. (2012). Current Knowledge of the Genetics of Otitis Media. *Current Allergy and Asthma Reports*, 12(6), 582–589. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0292-1>
- Hamid, S., Rhaleb, I. A., Kassem, K. M., ve Rhaleb, N.-E. (2020). Role of Kinins in Hypertension and Heart Failure. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(11), 347. <https://doi.org/10.3390/ph13110347>
- Henao, M. P., Kraschnewski, J. L., Kelbel, T., ve Craig, T. J. (2016). Diagnosis and screening of patients with hereditary angioedema in primary care. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 12, 701–711. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S86293>
- Hofman, Z., de Maat, S., Hack, C. E., ve Maas, C. (2016). Bradykinin: Inflammatory Product of the Coagulation System. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 51(2), 152–161. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8540-0>
- Hsu, Y. J., Hoenderop, J. G. J., ve Bindels, R. J. M. (2007). TRP channels in kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772(8), 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.02.001>
- Hujová, P., Souček, P., Grodecká, L., Grombíříková, H., Ravčuková, B., Kuklínek, P., ... Freiburger, T. (2020). Deep Intronic Mutation in SERPING1 Caused Hereditary Angioedema Through Pseudoexon Activation. *Journal of Clinical Immunology*, 40(3), 435–446. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00753-2>
- Johnsrud, I., Kulseth, M. A., Rødningen, O. K., Landrø, L., Helsing, P., Nielsen, E. W., ve Heimdal, K. (2015). A nationwide study of Norwegian patients with hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency identified six novel mutations in SERPING1. *PLoS ONE*, 10(7), 4–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131637>
- Julian, B. A., Suzuki, H., Suzuki, Y., Tomino, Y., Spasovski, G., ve Novak, J. (2009). Sources of urinary proteins and their analysis by urinary proteomics for the detection of biomarkers of disease. *Proteomics - Clinical Applications*, 3(9), 1029–1043. <https://doi.org/10.1002/prca.200800243>
- Kalmár, L., Bors, A., Farkas, H., Vas, S., Fandl, B., Varga, L., ... Tordai, A. (2003). Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Human Mutation*, 22(6), 498–498.

<https://doi.org/10.1002/humu.9202>

- Kang, H. R., Yim, E. Y., Oh, S. Y., Chang, Y. S., Kim, Y. K., Cho, S. H., ... Kim, Y. Y. (2006). Normal C1 inhibitor mRNA expression level in type I hereditary angioedema patients: Newly found C1 inhibitor gene mutations. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 61(2), 260–264. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01010.x>
- Kaplan, A. P. (2008). Angioedema, (June), 103–113. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e31817aecbe>
- Kaplan, A. P., ve Ghebrehiwet, B. (2010). The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Molecular Immunology*, 47(13), 2161–2169. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.05.010>
- Kaplan, A. P., ve Joseph, K. (2017). Pathogenesis of Hereditary Angioedema: The Role of the Bradykinin-Forming Cascade. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 37(3), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2017.04.001>
- Kaplan, A. P., ve Maas, C. (2017). The Search for Biomarkers in Hereditary Angioedema. *Frontiers in Medicine*, 4, 206. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00206>
- Kaufman, N., Page, J. D., Pixley, R. A., Schein, R., Schmaier, A. H., ve Colman, R. W. (1991). Alpha 2-macroglobulin-kallikrein complexes detect contact system activation in hereditary angioedema and human sepsis. *Blood*, 77(12), 2660–2667.
- Kiss, N., Barabás, E., Várnai, K., Halász, A., Varga, L. Á., Prohászka, Z., ... Szilágyi, Á. (2013). Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 149(1), 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.08.001>
- Landerman, N. S., Webster, M. E., Becker, E. L., ve Ratcliffe, H. E. (1962). Hereditary angioneurotic edema: II. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. *Journal of Allergy*, 33(4), 330–341.
- Levi, M., Cohn, D. M., ve Zeerleder, S. (2019). Hereditary angioedema: Linking complement regulation to the coagulation system. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 3(1), 38–43. <https://doi.org/10.1002/rth2.12175>
- López Lera, A. (2021). Pathophysiology and underlying mechanisms in hereditary angioedema. *Balkan Medical Journal*, 38(2), 82–88.

<https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.10.166>

- Loverde, D., Files, D. C., ve Krishnaswamy, G. (2017). Angioedema. *Critical Care Medicine*, 45(4), 725–735. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002281>
- Maas, C. (2019). Plasminflammation—An emerging pathway to bradykinin production. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02046>
- Majoni, S. W., ve Smith, S. R. (2008). Membranous nephropathy in a patient with hereditary angioedema: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, 2(May). <https://doi.org/10.1186/1752-1947-2-328>
- Manning, M. E. (2020). Hereditary angioedema: Differential diagnosis, diagnostic tests, and family screening. *Allergy and Asthma Proceedings*, 41(6), S22–S25. <https://doi.org/10.2500/AAP.2020.41.200062>
- Márkus, B., Veszeli, N., Temesszentandrás, G., Farkas, H., ve Kalabay, L. (2019). Serum fetuin-A, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein concentrations in patients with hereditary angioedema with C1-inhibitor deficiency. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-0995-7>
- Maurer, M., Magerl, M., Ansotegui, I., Aygören-Pürsün, E., Betschel, S., Bork, K., ... Craig, T. (2018). The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema—The 2017 revision and update. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73(8), 1575–1596. <https://doi.org/10.1111/all.13384>
- Mete Gökmen, N., Gülbahar, O., Onay, H., Peker Koc, Z., Özgül, S., Köse, T., ... Sin, A. Z. (2018). Deletions in <i>SERPING1</i> Lead to Lower C1 Inhibitor Function: Lower C1 Inhibitor Function Can Predict Disease Severity. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1–10. <https://doi.org/10.1159/000492583>
- Misra, L., Khurmi, N., ve Trentman, T. L. (2016). Angioedema: Classification, management and emerging therapies for the perioperative physician. *Indian Journal of Anaesthesia*, 60(8), 534–541. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.187776>
- Myokai, F., Takashiba, S., Lebo, R., ve Amar, S. (1999). A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene

- expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4518–4523. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4518>
- Obtułowicz, K. (2016). Bradykinin-mediated angioedema, 126.
- Osler, W. (1888). Hereditary angio-neurotic oedema. 1. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*, 95(4), 362.
- Pappalardo, E., Caccia, S., Suffritti, C., Tordai, A., Zingale, L. C., ve Cicardi, M. (2008). Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: Functional and structural correlates. *Molecular Immunology*, 45(13), 3536–3544. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.05.007>
- Patel, G., ve Pongracic, J. A. (2019). Hereditary and acquired angioedema. *Allergy and Asthma Proceedings*, 40(6), 441–445. <https://doi.org/10.2500/aap.2019.40.4267>
- Ponard, D., Gaboriaud, C., Charignon, D., Lera, A. L., Drouet, C., Trascasa, M. L., ve Tosi, M. (2020). SERPING1 mutation update : Mutation spectrum and C1 Inhibitor phenotypes, (September 2019), 38–57. <https://doi.org/10.1002/humu.23917>
- Prada, A. E., Zahedi, K., ve Davis, A. E. (1998). Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immunobiology*, 199(2), 377–388. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(98\)80042-9](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(98)80042-9)
- Quincke, H. I. (1882). Über akutes umschriebenes Hautödem [About an acute described skin edema]. *Monatshe Prakt Dermatol*, 1, 129–131.
- Rabbani, B., Tekin, M., ve Mahdieh, N. (2014). The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of Human Genetics*, 59(1), 5–15. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.114>
- Reshef, A., Kidon, M., ve Leibovich, I. (2016). The Story of Angioedema: from Quincke to Bradykinin. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 51(2), 121–139. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8553-8>
- Rosen, F. S., Charache, P., Pensky, J., ve Donaldson, V. (1965). Hereditary angioneurotic edema: two genetic variants. *Science*, 148(3672), 957–958.
- Santacroce, R., D'andrea, G., Maffione, A. B., Margaglione, M., ve D'Apolito, M. (2021). The genetics of hereditary angioedema: A review. *Journal of Clinical Medicine*, 10(9), 1–9. <https://doi.org/10.3390/jcm10092023>

- Sauvé, F., McBroom, L. D. B., Gallant, J., Moraitis, A. N., Labrie, F., ve Giguère, V. (2001). CIA, a Novel Estrogen Receptor Coactivator with a Bifunctional Nuclear Receptor Interacting Determinant. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), 343–353. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.343-353.2001>
- Schmaier, A. H. (2016). The contact activation and kallikrein/kinin systems: Pathophysiologic and physiologic activities. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(1), 28–39. <https://doi.org/10.1111/jth.13194>
- Schmaier, Alvin H., ve McCrae, K. R. (2007). The plasma kallikrein-kinin system: Its evolution from contact activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(12), 2323–2329. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02770.x>
- Seaby, E. G., Pengelly, R. J., ve Ennis, S. (2016). Exome sequencing explained: A practical guide to its clinical application. *Briefings in Functional Genomics*, 15(5), 374–384. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elv054>
- Sharma, J., Jindal, A. K., Banday, A. Z., Kaur, A., Rawat, A., Singh, S., ve Longhurst, H. (2021). Pathophysiology of Hereditary Angioedema (HAE) Beyond the SERPING1 Gene. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 60(3), 305–315. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08835-8>
- Soyak Aytakin, E., Çağdaş, D., Tan, C., ve Tezcan. (2021). Characteristics of patients with c1 esterase inhibitor deficiency: A single center study. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 53(2), 75–79. <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.146>
- Speletas, M., Szilagyi, A., Psarros, F., Moldovan, D., Magerl, M., Kompoti, M., ... Germenis, A. E. (2015). Hereditary angioedema: Molecular and clinical differences among European populations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(2), 570–573. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.007>
- Srinivasan, J., ve Beck, P. (1993). IgA nephropathy in Hereditary angioedema. *Postgraduate Medical Journal*, 69(808), 95–99. <https://doi.org/10.1136/pgmj.69.808.95>
- Strubing, P. (1885). Uber acutes (angioneurotisches) Oedem. *Z. klin. Med.*, 9, 381–396.
- Stucchi, A., Reed, K., O'Brien, M., Cerda, S., Andrews, C., Gower, A., ... Becker, J. (2006). A new transcription factor that regulates TNF- α gene expression, LITAF, is increased in intestinal tissues from patients with CD and UC. *Inflammatory*

- Bowel Diseases, 12(7), 581–587.
<https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000225338.14356.d5>
- Tomilin, V., Mamenko, M., Zaika, O., ve Pochynyuk, O. (2016). Role of renal TRP channels in physiology and pathology. *Seminars in Immunopathology*, 38(3), 371–383. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0527-z>
- Varghese, S. A., Powell, T. B., Budisavljevic, M. N., Oates, J. C., Raymond, J. R., Almeida, J. S., ve Arthur, J. M. (2007). Urine Biomarkers Predict the Cause of Glomerular Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(3), 913–922. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006070767>
- Vatsiou, S., Zamanakou, M., Loules, G., Psarros, F., Parsopoulou, F., Csuka, D., ... Germenis, A. E. (2020). A novel deep intronic SERPING1 variant as a cause of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergology International*, 69(3), 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.12.009>
- Vaz-Drago, R., Custódio, N., ve Carmo-Fonseca, M. (2017). Deep intronic mutations and human disease. *Human Genetics*, 136(9), 1093–1111. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1809-4>
- Venkatachalam, K., ve Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual review of biochemistry*, 76, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Veronez, C. L., Aabom, A., Martin, R. P., Filippelli-Silva, R., Gonçalves, R. F., Nicolicht, P., ... Pesquero, J. B. (2019). Genetic variation of Kallikrein-Kinin system and related genes in patients with hereditary angioedema. *Frontiers in Medicine*, 6(FEB), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00028>
- Visser, M., van Oerle, R., Ten Cate, H., Laux, V., Mackman, N., Heitmeier, S., ve Spronk, H. M. H. (2020). Plasma Kallikrein Contributes to Coagulation in the Absence of Factor XI by Activating Factor IX. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(1), 103–111. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313503>
- Walford, H. H., ve Zuraw, B. L. (2014). Current update on cellular and molecular mechanisms of hereditary angioedema. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 112(5), 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.12.023>
- Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D., ve Liu, J. (2005). Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the

- entry of herpes simplex virus type 1. *The Biochemical Journal*, 385(Pt 2), 451–459. <https://doi.org/10.1042/BJ20040908>
- Zeerleder, S., ve Levi, M. (2016). Hereditary and acquired C1-inhibitor-dependent angioedema: From pathophysiology to treatment. *Annals of Medicine*, 48(4), 256–267. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1162909>
- Zhou, B. O., Ding, L., ve Morrison, S. J. (2015). Hematopoietic stem and progenitor cells regulate the regeneration of their niche by secreting Angiopoietin-1. *ELife*, 4, e05521. <https://doi.org/10.7554/eLife.05521>
- Zuraw, B. L. (2008). Hereditary Angioedema. *New England Journal of Medicine*, 359(10), 1027–1036. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp0803977>
- Zuraw, B. L., ve Christiansen, S. C. (2016). HAE Pathophysiology and Underlying Mechanisms. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 51(2), 216–229. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8561-8>

Ekler

Ek 1. Etik kurul onay belgesi (EÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu; 31.10.2018 tarihli 18-10.2T/34 sayılı karar)



EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel: 0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Serping1 Mutasyonu Olmayan Hereditör Anjiyodem Hastalarının Moleküler Patogeneğinde Genetik, Epigenetik Faktörlerin Araştırılması.			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Emine Nihal METE GÖKMEN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Allerji Ve İmmünoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Allerji Ve İmmünoloji Bilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	TÜBİTAK			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	Prof. Dr. Emine Nihal METE GÖKMEN			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐	FAZ 2 ☐	FAZ 3 ☐	FAZ 4 ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Gözlemsel İlaç Çalışması	☐			Tıbbi Cihaz Klinik Araştırması ☐
	İn Vitro Tıbbi Tanı Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları	☐			İlaç Dışı Klinik Araştırma ☒
	Diğer ise belirtiniz				
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐
	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	21.09.2018	-	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	21.09.2018	-	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
SİGORTA	☐				
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒ imza tarihi : 21.09.2018				
Diğer	☐				
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 18-10.2T/34	Tarih: 31.10.2018			
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU					
ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Kabılım (**) İmza
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Başkan	Halk Sağlığı AD	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Doç.Dr. Şafak DAĞHAN Başkan Yardımcısı	Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Sadık AKŞİT Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi		Sayfa		1/2



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Serping1 Mutasyonu Olmayan Hereditör Anjiyodem Hastalarının Moleküler Patogenezinde Genetik, Epigenetik Faktörlerin Araştırılması.
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 18-10.2T/34				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dali	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayhan DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Murat ULUKUŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	
Prof. Dr. Özen Önen SERTÖZ Raportör Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	
Prof. Dr. Günay Yetik ANACAK Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	
Prof. Dr. H. Oya TÜRKÖĞLÜ ÇAKAL Üye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	
Doç. Dr. Recı MESERİ Üye	Beslenme ve Diyetetik AD	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma



Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu	Rev. Tarihi/ No.su:	Sayfa
		22	28.09.2011/05	2/2

Ek 2. Etik kurul onay belgesi (EÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu; 15.05.2020 tarihli 20-5T/58 sayılı karar)



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel : 0 232 390 2134 e-mail: tibbietik@yahoo.com.
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

Microsoft Teams Programı ile Teletoplantı gerçekleştirilmiştir.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Serping1 Mutasyonu Olmayan Hereditör Anjiyoderm Hastalarının Moleküler Patogeneğinde Genetik, Epigenetik Faktörlerin Araştırılması.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Arş. Gör. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Prof. Dr. Okan GÜLBAHAR, Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ, Prof. Dr. Talat YALÇIN, Doç. Dr. Çiğir BİRAY AVCI, Arş. Gör. Aycan AŞIK, Prof. Dr. Emine Nihal METE GÖKMEN
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırmalar Proje Fonu (OAP)

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	-
	BİLGİLENDİRME FORMU	-
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒
	DİĞER	☐
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 20-5T/58	Tarih: 15.05.2020
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Başkan	Halk Sağlığı AD	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Şafak DAĞHAN Başkan Yardımcısı	Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Zeliha KERRY Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Eyüp Sabri ERCAN Üye	Çocuk Ruh Sağlığı	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Güzide AKSU Üye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU	İMZA	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi		Sayfa
				1/2



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel: 0 232 390 2134 e-mail: tibbietik@yahoo.com.
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Serping1 Mutasyonu Olmayan Hereditör Anjiödem Hastalarının Moleküler Patogenezinde Genetik, Epigenetik Faktörlerin Araştırılması.
-----------------------	---

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu: 20-5T/58				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Kabılın (**)	İmza
Prof. Dr. Ayhan DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Murat ULUKUŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Ceyda KABAROĞLU Üye	Klinik Biyokimya	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D. Klinik Biyokimya B.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Özen Önen SERTÖZ Raportör Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. H. Oya TÜRKOĞLU Üye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Meltem SEZİŞ DEMİRCİ Üye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Doç. Dr. Ahmet ÖZGÜRYENİEL Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Doç. Dr. Recı MESERİ Üye	Beslenme ve Diyetetik AD	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Doç. Dr. Tahir ATİK Üye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları A.D. Çocuk Genetik BD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Doç. Dr. Tolga AKŞİT Üye	Antrenörlük Eğitimi - Hareket ve Antrenman Bilimleri	Ege Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Hareket ve Antrenman Bilimleri AD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Alire	İMZA	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 2/2
--	------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------

Ek 3. Bilgilendirilmiş gönüllü onam formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU
LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ! Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.
Bu çalışmanın adı ne? “SERPING1 Mutasyonu Olmayan Herediter Anjioödem Hastalarının Moleküler Patogenezinde Genetik, Epigenetik Faktörlerin Araştırılması”
Bu çalışmanın amacı ne? SERPING1 gen mutasyonu bulunmayan Tip 1 herediter anjioödem (HAÖ,) klasik Tip 1 HAÖ ve Tip2 HAÖ’den farklı kılan moleküler nedenlerin araştırılmasıdır.
Size nasıl bir uygulama yapılacaktır? Bu çalışmayı yapabilmek için kolunuzdan 8 ml (2 tüp) kadar kan almamız gerekmektedir. Bunun dışında size herhangi bir uygulama yapılmayacaktır.
Farklı tedaviler için araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı nedir? Çalışmada randomizasyon yöntemi uygulanmayacaktır.
Ne kadar zamanınızı alacaktır? Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 1 gündür.
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı kaçtır? Doksan beş (95)
Sizden alınacak biyolojik materyallere ne olacak ve analizler nerede yapılacaktır? (Analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması) Sizden alınacak olan kandan moleküler analizlerin gerçekleştirilmesi için DNA, RNA ve protein elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.
Sizden beklenen nedir? Sizin sorumluluklarınız nelerdir? Araştırma ile ilgili olarak hiçbir sorumluluğunuz bulunmamaktadır.
Çalışmaya katılmak size ne yarar sağlayacaktır? Bu araştırma sizin için tıbbi olarak doğrudan bir yarar oluşturmaz. Ancak bu çalışmadan çıkarılan sonuçlar ile herediter anjioödem hastalığının nedeninin anlaşılmasına yardımcı olacak ve başka insanların yararına kullanılabilecek yeni ilaçların ve tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.
Araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar nelerdir? Onayınızı geri çektiğiniz takdirde araştırma dışı bırakılabilirsiniz.
Çalışmaya katılmak size herhangi bir zarar verebilir mi? Bu çalışmada herhangi bir tedavi yöntemi ya da cerrahi müdahale girişimi gerçekleştirilmeyeceği nedeniyle herhangi bir zarar söz konusu değildir.
Eğer katılmak istemezseniz ne olur? Çalışmaya katılma zorunluluğunuz yoktur. Çalışmaya katılım, gönüllülük esasına dayanmaktadır.
Size uygulanabilecek olan alternatif yöntemler nelerdir? Herhangi bir alternatif yöntem uygulaması yoktur.

Bu çalışmaya katıldığım için bana herhangi bir ücret ödenecek mi?													
Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.													
Bu çalışmaya katıldığım için ben herhangi bir ücret ödeyecek miyim?													
Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.													
Bilgilerin gizliliği: Tüm kişisel ve tıbbi bilgileriniz gizli kalacak, sadece bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.													
Bu çalışmanın sorumlusunun iletişim bilgileri													
1- Adı, soyadı: Prof. Dr. [REDACTED] 2- Ulaşılabilir telefon numarası: 0 [REDACTED] 3- Görev yeri: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı													
Çalışmaya Katılma Onayı:													
Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanıdı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum. Bilgilendirilmiş gönüllü olurumun imzalı ve tarihli bir kopyasının bana verileceğini biliyorum.													
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">GÖNÜLLÜNÜN</th> <th>İMZASI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ADI & SOYADI</td> <td></td> <td rowspan="4"></td> </tr> <tr> <td>ADRESİ</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TELEFONU</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TARİH</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ		TELEFONU		TARİH	
GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI											
ADI & SOYADI													
ADRESİ													
TELEFONU													
TARİH													
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin</th> <th>İMZASI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ADI & SOYADI</td> <td></td> <td rowspan="4"></td> </tr> <tr> <td>ADRESİ</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TELEFONU</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TARİH</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ		TELEFONU		TARİH	
Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI											
ADI & SOYADI													
ADRESİ													
TELEFONU													
TARİH													
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının</th> <th>İMZASI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ADI & SOYADI</td> <td></td> <td rowspan="4"></td> </tr> <tr> <td>ADRESİ</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TELEFONU</td> <td></td> </tr> <tr> <td>TARİH</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının		İMZASI	ADI & SOYADI			ADRESİ		TELEFONU		TARİH	
Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının		İMZASI											
ADI & SOYADI													
ADRESİ													
TELEFONU													
TARİH													

Teşekkür

Her daim hayranlık uyandıracak merak duygusu ile güncel bilgileri irdeleyip öğrenmekten keyif alan ve bunu büyük bir tevazu içerisinde biz öğrencileri ile birlikte tartışarak, araştırarak gerçekleştirmekten de çekinmeyen, akademik paylaşımın yanı sıra paylaştığımız muhabbetler ve yolculuklar sonunda yeri doldurulamayacak anıların kazanımı ile büyük bir ailenin parçası olduğumuzu hissettiren, doktora eğitimim boyunca bilgi ve öğretileriyle benden desteğini ve sabrını eksik etmeyen, bana rehberlik eden, öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e

İlgili ve duyarlı yaklaşımı ile hem akademik hem sosyal hayatta desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen, imrendiren enerjisi ve üretkenliği ile bizleri de motive eden ve bana her daim gösterdiği dostça yaklaşımı ile kendimi ayrıca değerli hissettiren Sayın Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya,

Deneyimlerinden her zaman faydalandığım sayın hocalarım Doç. Dr. Zuhale EROĞLU'na, Doç. Dr. Buket KOSOVA'ya, Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a, Doç. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ'a, Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI'ya, Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER'e, Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'e,

Tez kapsamında araştırılan nadir olgu grubu ile tanışmamı, olguların kliniği ile ilgili bilgi edinmemi sağlayan Ege Üniversitesi İç hastalıkları Anabilim Dalı Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı'ndan sayın hocalarım; çalışmanın tüm aşamalarında her gereksinim olduğunda ilgili olgu grubuyla ve ihtiyaç duyduğumda fikir danışabilmem için yurt dışından hereditör anjioödem ile çalışan yetkin kişilerle iletişim kurabilmemi sağlayarak gösterdiği değerli katkıları ile Prof. Dr. E. Nihal METE GÖKMEN'e ve proje oluşum aşamasındaki katkıları ile Prof. Dr. Okan GÜLBAHAR'a,

Tez izleme komitemde yer alan ve bilgi paylaşımını esirgemeyen Ege Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Prof. Dr. Haluk AKIN'a,

Tez jürimde yer alarak zaman ayıran ve emek veren Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ'ye ve Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu'ndan sayın hocam Doç. Dr. TUĞÇE BALCI OKCANOĞLU'na,

Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığımız sayın araştırma görevlisi Arş. Gör. Dr. Duygu AYGÜNEŞ JAFARI'ye,

Hem asistanlık ve öğrencilik süreçlerini birlikte yürüttüğümüz yorucu akademik hayatımızda hem de sosyal hayatımda ihtiyacım olduğu her an, her koşulda sonsuz destekleri ile beni hiç yalnız bırakmayan, ellerinden geleni fazlasıyla yapan, bu tezi bitirebilmemde de büyük payları olan, muhteşem anılar biriktirdiğim, çalışkanlıkları, emeğe olan saygıları, etik duruşları, mevcut ve gelecek başarıları ile gurur kaynaklarım olan, iyilik temennilerimin baş aktörlerinden, haklarını asla ödeyemeyeceğim, içten, gönlü zengin can bağından kardeşlerim, ömürlük dostlarım olan; imrendiren çalışma azmi, duyarlılığı ve eşsiz neşesi ile Arş. Gör. Dr. Bakiye GÖKER BAĞCA'ya ve gıpta ettiğim yetenekleri ve her koşulda biz arkadaşlarına da büyük dayanak oluşturan güçlü ve pozitif duruşu ile Arş. Gör. Dr. Neslihan Pınar ÖZATEŞ'e,

Doktora eğitim sürecinde tanıma fırsatı bulduğum, derin dostluklarını kazandığım, iyi kilerim arasında yer alan, önlerinin her daim açık olacağına inandığım, canlarım; ekip arkadaşım olmasından dolayı da ayrıca şanslı olduğumu hissettiren doktora öğrencisi sevgili Röya GASIMLI,'ya ve canım İstanbul'da doktora eğitimini sürdüren kendini her daim özleten sevgili Alican KUŞOĞLU'na,

Derin sohbetleri sayesinde entelektüel ve akademik bilgi ve bakış açısından faydalandığım, desteğini eksik etmeyen, Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde öğretim üyesi olan değerli dostum Dr. Öğr. Üyesi Hasan Onur ÇAĞLAR'a

Asistanlık dönemlerinde birlikte çalışmış olmaktan keyif aldığım, başarılarının daim olmasını temenni ettiğim değerli arkadaşlarım, Giresun Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya DÜZGÜN'e ve Harran Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Hale GÜLER KARA'ya

Doktoraya başladığım günden bu yana kıdemli ekip arkadaşım olarak paylaşımcı ve yardımsever kişiliği ile desteklerini esirgemeyen, yüzümüzü güldüren neşeli kişiliğinin daim olmasını dilediğim, gösterdiği özveri ve çalışkanlığı nedeniyle hak ettiği gibi akademik hayatta çok başarılı olacağına inandığım Dr. Çağla KAYABAŞI'na

Aynı ekipte çalışmış olmaktan keyif aldığım sevgili arkadaşlarım; başta Bakırçay Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında öğretim üyesi olan Dr. Öğr. Üyesi Besra ÖZMEN YELKEN'e ve anabilim dalımızdaki doktora öğrencisi Çağlar ÇELEBİ ile yüksek lisans öğrencisi Zeynep ÜLGER'e

Doktora eğitimim sürecinde desteklerini esirgemeyen, anabilim dalımızdan mezun olmuş ve halen anabilim dalımızda eğitimini sürdüren sevgili doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Bilim insanı olma çabasıyla çıktığım bu yolda çıraklık dönemimin başı olarak saydığım, resmi olarak tamamlayamadığım ilk yüksek lisans deneyimin bana kazandırdığı, sayelerinde birçok bilgi, deneyim ve pratik kazandığım, dostluklarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tez sürecindeki motive edici desteği ile beni yalnız bırakmayan kıdemli ve kıymetli dostum Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK başta olmak üzere, 2010-2013 dönemimdeki, hocasından öğrencisine tüm Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvar ekibine,

Selçuk üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda tamamladığım yüksek lisans eğitimim süresince birlikte gösterdiğimiz çabanın kıymeti ve getirisini halen hissettiğim, doktora süresince de motive edici desteği ile beni yalnız bırakmayan kıymetli dostum Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Ebru GÜÇLÜ'ye

Elimize oyuncak olarak kalem kağıt tutuşturan, okuma yazmayı ilk öğreten, adaletli yüreği ile haksızlığa tahammülü olmayan, her zaman dirayetli ve dik duruşu ile bizlere güç veren ve bu güzel özelliklerinin biz çocuklarına da sirayet ettiğini umduğum, gururum, bizi biz yapan, varlığına minnet duyduğum, güzel kadın canım anneme; hayatımız boyunca bilginin ve öğrenmenin ne kadar kıymetli olduğunu bizlere aktaran, imkanları dahilinde bu yolda önümüzü açan, akademik yolculuğum süresince farklı şehirlerdeki yaşamımın başlangıcında beni yalnız bırakmayan, birlikte gezmekten, keşfetmekten, farklı konuları münazara etmekten büyük keyif aldığım, gerektiğinde en yakın arkadaşım olan canım babama; okuma yazma bilmediği halde benimle birlikte yüksek lisans, doktora nedir' i tanıyan, anlayan ve "bir kurtarsan" diyerek hasretle mezun olmamı bekleyen ve savunma tarihinden tam bir yıl önce aynı gün kaybettiğimiz, üzerimizdeki emeğin haddi hesabı olmayan canım babaanneme;

hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, zayıf hissettiğim her an ellerimden tutan, varlıklarına şükrettiğim, büyük şanslarım olan iki ablama; bana olan desteklerini ve inançlarını eksik etmeyen bütün aile büyüklerim ile öz kardeş gibi büyüdüğümüz kuzenlerim, ağabeylerim ve kardeşlerime, ayrıca beni her daim öz kardeşi gibi koruyup kollayan, ablamın sevgili eşi Mehmet ağabeyime; onların sayesinde hayatıma dahil olan, insanın sahip olduğu önceliklerinin nasıl değişebileceğini, yaptığınız her hareketin nasıl örnek teşkil edebileceğini somut olarak görmemi sağlayan, hayranlıkla büyümelerini izlediğim biricik yeğenlerime,

Tez çalışmasını, TOA-2020-21840 numaralı öncelikli alanlar projesi ile destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne

Sonsuz teşekkürler...

İzmir, 04.01.2022

Aycan AŞIK

Özgeçmiş

■■■■■ doğdu. İlköğretimi Ümraniye İstiklal İlköğretimi Okulu'nda, orta öğretimini Ümraniye Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 2009 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olarak tamamladı. 2013 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında Muğla Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. Aynı yıl yüksek lisans eğitimi için Selçuk Üniversitesi'ne araştırma görevlisi olarak görevlendirildi ve Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda 2015 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Yine aynı yıl içerisinde doktora eğitimi için Ege Üniversitesi'ne araştırma görevlisi olarak görevlendirildi ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda 2015 yılında başladığı doktora eğitimini halen sürdürmektedir.

İletişim bilgileri: ■■■■■