

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LDLR GENİ MUTASYONU BULUNAN TÜRK AİLESEL
HİPERKOLESTEROLEMİ HASTALARINDA, PCSK9 VE APOB GEN
MUTASYONU VARLIĞI**

Müge BİLGİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LDLR GENİ MUTASYONU BULUNAN TÜRK AİLESEL HİPERKOLESTEROLEMİ HASTALARINDA, PCSK9 VE APOB GEN MUTASYONU VARLIĞI

Müge BİLGİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İrfan KANDEMİR

Sık görülen tek gen hastalığı olarak ailesel hiperkolesterolemi, toplum sağlığı açısından oldukça önemlidir. Ailesel hiperkolesterolemiye neden olan başlıca üç genin araştırılması amacı ile Türkiye'nin yedi coğrafik bölgesinden hasta toplanmıştır. Hastalara TÜBİTAK destekli “213S147” numaralı proje aracılığı ile ulaşılmıştır. Bu hastalar için dahil olma kriteri LDL düzeylerine göre belirlenmiştir. Hastaların periferik kan örneklerinden DNA izole edilmiştir. Bu DNA'lar ilk etapta LDLR geni primerleri ile PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. LDLR geni tüm gen dizi analizi sonrası mutasyon tespit edilen hastalar arasından seçilen 52 hastada, APOB ve PCSK9 genleri aynı yöntemle çalışılmış, tüm gen dizi analizleri sağlanmıştır. Bu analizler sonucu LDLR geninde mutasyon tespit edilen hastalarda, APOB geni mutasyonu görülme sıklığı %5,76, PCSK9 mutasyonu görülme sıklığı %1,92 olarak saptanmıştır.

Şubat 2020, 68 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ailesel hiperkolesterolemi, LDLR geni, APOB geni, PCSK9 geni, Mutasyon birlikteliği, Çifte heterezigotluk

ABSTRACT

M.Sc.Thesis

PRESENCE OF PCSK9 OR APOB GENE MUTATION OF LDLR GENE MUTATION POSITIVE TURKISH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA PATIENTS

Müge BİLGİN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. İrfan KANDEMİR

Familial hypercholesterolaemia is a common monogenic disease and it is very important for public health. Patients are collected from seven regions of Turkey for investigating three main causative genes of familial hypercholesterolemia. The patients were obtained by TÜBİTAK supported project “213S147”. Inclusion criteria for these patients were determined according to average LDL levels. DNA was isolated from peripheral blood samples. Firstly, these DNAs of patients were amplified by PCR with the primers of the LDLR gene. After analysis of LDLR gene sequence, 52 patients who had mutation were selected to study. In 52 patients, APOB and PCSK9 genes were studied by the same method and all gene sequence analyzes were provided. The result of these analyzes, from the patients who had LDLR gene mutations, carrying both incidence of APOB gene mutation was 5.76% and PCSK9 gene mutation was 1.92%.

February 2020, 68 pages

Key Words Familial hypercholesterolemia, LDLR gene, APOB gene, PCSK9 gene, Mutation association, Double heterozygous

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik katkıları yanı sıra fikirleriyle gelişmeye yön veren danışman hocam sayın Prof. Dr. İrfan KANDEMİR'e, çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen İNTERGEN Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinde bulunan hocalarım ve tüm çalışma arkadaşlarıma, bilgi ve önerileriyle büyük destek sağlayarak süreci kolaylaştıran Prof. Dr. Davut GÜL'e, çalışmalarım süresince birçok fedakarlıklar göstererek beni desteklemekten hiç bıkmayan annem Gülizar BİLGİN ve babam Hasan BİLGİN'e en derin ve içten duygularla teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmama 213S147 numaralı proje ile kaynak sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Müge BİLGİN

Ankara, 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Hastalıkta Tanı ve Tedavi	2
1.2 Hastalığın Genetiği.....	6
2. KURAMSAL TEMELLER.....	11
2.1 Dünyada Ailesel Hiperkolesterolemi	11
2.2 Türkiye’de Ailesel Hiperkolesterolemi.....	16
2.3 Literatürde Bulunan Benzeri Çalışmalar	17
3. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ.....	19
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
4.1 Örnek Toplama	21
4.2 DNA İzolasyonu.....	22
4.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	24
4.4 Yeni Nesil Sekans İçin Örnek Hazırlama	35
4.5 DNA Dizi Analizi.....	43
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
5.1. Demografik bulgular.....	48
5.2 Genetik Bulgular	51
5.2.1 LDLR sonuçları.....	51
5.2.2 APOB sonuçları.....	56
5.2.3 PCSK9 sonuçları	56
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
6.1 Öneriler	61
KAYNAKLAR	63
EK 1 ETİK KURUL KARARI	67
ÖZGEÇMİŞ.....	68

SİMGELER DİZİNİ

+	Artı
>	Büyüktür , cDNA pozisyon değişimi
-	Eksi
<	Küçüktür
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
A	Adenin, Alanin
bp	Baz çifti
C	Sitozin, Sistein
D	Aspartik asit
dl	Desilitre
E	Glutamik asit
F	Fenilalanin
G	Guanin, Glisin
gr	Gram
H	Histidin
I	Isolösün
K	Lisin
kb	Kilobaz
L	Lösün
M	Metiyonin
mg	Miligram
ml	Mililitre
N	Asparajin
P	Prolin
pmol	Pikomol
Q	Glutamin
R	Arjinin
S	Serin
T	Timin, Trionin
V	Valin, Volt

W	Triptofan
Y	Tirozin

Kısaltmalar

ACMG	American College of Medical Genetics
AH	Ailesel Hiperkoelsterolemi
APOA2	Apolipoprotein A2
APOB	Apolipoprotein B
APOCII	Apolipoprotein CII
cDNA	Tamamlayıcı (komplementer) DNA
Del	Delesyon
Dk	Dakika
DLCN	Dutch Lipid Clinici Network
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dup	Duplikasyon
E	Erkek
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	Etidyum Bromür
Ex	Ekzon
F	Forward (İleri) sekans
GHR	Büyüme hormonu reseptörü
GOF	İşlev kazancı (Gain of Function)
IDL	Ara yoğunluklu lipoprotein
IGV	Integrated Genome Browser
İnt	İntron
ITIH4	Inter alfa tripsin inhibitor
IVS	İntronik bölge
K	Kadın
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LDL-K	Düşük dansiteli lipoprotein Kolesterol
LDLR	Düşük dansiteli lipoprotein reseptörü
LDLRAP1	Düşük dansiteli lipoprotein reseptör adaptorü protein 1

LOF	İşlev kaybı (Loss of Function)
LPL	Lipoprotein lipaz
MEDPED	Erken Ölümleri Önlemek için Erken Teşhis (Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths)
NCEP	Uluslararası Kolesterol Eğitim Programı
PCSK9	Proprotein konvertaz subtilisin / kexin tip 9
PPP1R17	Protein fosfataz 1 düzenleyici alt birim 17
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Reverse (Geri) Sekans
Sn	Saniye
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borate/EDTA
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UV	Ultraviyole ışın
VLDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Aterosklerozun şematik gösterimi	1
Şekil 1.2 Ailesel hiperkolesterolemiye dair fiziksel bulgular (A. Ksantalesma, B. ArkusKornea, C-G Ksantoma).....	4
Şekil 1.3 İlk pazarlanan statin olan Lovastatin molekülü	5
Şekil 1.4 Plazmaferaz yönteminin şematik gösterimi	6
Şekil 1.5 Otozomal dominant kalıtmıli AH'ye örnek bir aile.....	7
Şekil 1.6 Ailesel hiperkolesterolemiye neden olan başlıca üç genin görülme sıklığı oranları	8
Şekil 1.7 AH'den etkilenmemiş, heterozigot etkilenmiş ve homozigot etkilenmiş bireylerde LDL Reseptörü işlevini gösteren şematik çizim.....	9
Şekil 2.1 Ülkelere göre AH hastalarına tanı koyma yüzdeleri.....	11
Şekil 2.2 Ülkelere göre beklenen AH vaka haritası	13
Şekil 2.3 Ülkelere göre AH hastalarına tanı koyma oranları	14
Şekil 2.4 Fransa AH çalışması LDLR, APOB, PCSK9 genlerine göre mutasyon oranları	15
Şekil 3.1 LDLR geninde görülen değişimin ekzonlara göre şematik gösterimi	20
Şekil 4.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların coğrafi bölgelere göre dağılımı.....	22
Şekil 4.2 Total nükleik asit izolasyonunda kullanılan izolasyon cihazı.....	23
Şekil 4.3 Total nükleik asit izolasyonunda kullanılan Magnesia markasının ticari kiti	23
Şekil 4.4 Magnesia markasının nükleik asit izolasyonu için kullanılan 102 kodlu kitinin görünümü.....	24
Şekil 4.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının yapıldığı Thermal Cycler cihazı	27
Şekil 4.6 Jel Elektroforez seti.....	28
Şekil 4.7 Jel görüntüleme sistemi.....	29
Şekil 4.8 LDLR gen bölgesine ait jel görüntüsü	29
Şekil 4.9 PCSK9 geni bölgesine ait jel görüntüsü	35
Şekil 4.10 APOB geni bölgesine ait jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.11 Tüm gen dizi analizinin gerçekleştiği Illumina firmasının Miseq cihazı	36
Şekil 4.12 Flowcell üzerindeki şeritlerin görünümü	37
Şekil 4.13 Fragmentteki adaptor bölgesi ile flowcell yüzeyindeki oligonun eşleşmesi	37
Şekil 4.14 İki iplikli yapının denatürasyonu	38

Şekil 4.15 Tekli ipliğin köprü amplifikasyonu	38
Şekil 4.16 Köprü amplifikasyonunda komplementer iplik oluşumu	38
Şekil 4.17 Çiftli ipliğin denatürasyonu	39
Şekil 4.18 Tekrarlanan köprü amplifikasyonu	39
Şekil 4.19 Simültane tekrar eden köprü amplifikasyonları	39
Şekil 4.20 Çift ipliklerin denatürasyonu	40
Şekil 4.21 Geri ipliklerin uzaklaştırılması	40
Şekil 4.22 İlk okumanın başlanması	41
Şekil 4.23 Doğru bazın eşleşmesi ile sinyal oluşması.....	41
Şekil 4.24 İkinci indeks okuması için köprü.....	42
Şekil 4.25 Çift iplikli köprü amplifikasyonu oluşumu.....	42
Şekil 4.26 İki iplikli yapının denature edilip, ileri ipliğin uzaklaştırılması	42
Şekil 4.27 Tekrarlanan okuma sonrası verilerin elde edilmesi	43
Şekil 4.28 LDLR geninin IGV görüntüsü	44
Şekil 4.29 LDLR genindeki W577R mutasyonunun IGV görüntüsü	44
Şekil 4.30 W577R mutasyonunun VARSOME veritabanında araştırılması	45
Şekil 4.31 W577R mutasyonunun ClinVar veritabanında araştırılması	45
Şekil 4.32 PCSK9 geninin IGV görüntüsü	46
Şekil 4.33 APOB geninin IGV görüntüsü.....	46
Şekil 5.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet oranları	50
Şekil 5.2 Hastaların yaşa ve cinsiyete göre mg/dl cinsinden LDL-Kolesterol düzeyi ortalamaları.....	51
Şekil 5.3 LDLR geninde bulunan varyantların bulunduğu bölgelere göre dağılımı.....	53
Şekil 5.4 LDLR geninde bulunan 41 farklı varyantın değişim türü oranları	54
Şekil 5.5 LDLR geninde tespit edilen değişimlerin bulunduğu ekzonlar, değişim türlerini ve patojenitelerine dair şematik gösterim	55
Şekil 6.1 LDLR geninde görülen değişimlerin ekzonlara dağılımının yüzde cinsinden karşılaştırılması.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Primer lipid bozuklukları için Fredrickson Sınıflaması.....	2
Çizelge 1.2 NCEP LDL-Kolesterol düzeyleri.....	3
Çizelge 2.1 Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) kriterlerine göre skorlama	12
Çizelge 2.2 DLCN skoruna göre hastanın yorumlanması.....	13
Çizelge 4.1 LDLR geni için PZR’de kullanılan primerlerin amplikon büyüklükleri	25
Çizelge 4.2 LDLR geni ileri ve geri primerlerin baz dizilimleri.....	26
Çizelge 4.3 LDLR geni için tüm ekzonlarda uygulanan PZR protokolü	27
Çizelge 4.4 PCSK9 geni için PZR’de kullanılan primerlerin amplikon büyüklükleri	30
Çizelge 4.5 APOB geni için PZR’de kullanılan primerlerin amplikon büyüklükleri	31
Çizelge 4.6 PCSK9geni ileri ve geri primerlerin baz dizilimleri	32
Çizelge 4.7 APOB geni ileri ve geri primerlerin baz dizilimleri	33
Çizelge 4.8 PCSK9 geni tüm ekzonları, APOB geni 27-29. ekzonlar hariç tüm ekzonlar için kullanılan PZR protokolü	34
Çizelge 4.9 APOB geni 27-29. Ekzonlar için kullanılan PZR protokolü	34
Çizelge 4.10 ACMG varyant sınıflandırması.....	47
Çizelge 5.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet, nüfusa kayıtlı oldukları il ve LDL-Kolesterol seviyeleri	48
Çizelge 5.2 Cinsiyetine göre hastaların yaş gruplaması.....	50
Çizelge 5.3 LDLR geninde tespit edilen varyantların adı, değişim türü, hasarlayıcı etkisi ve bulunduğu bölgeler	52
Çizelge 5.4 LDLR geninde birleşik heterozigot olan hastaların değişimleri	54
Çizelge 5.5 LDLR geninde mutasyon taşıyan hastalarda bulunan APOB değişimlerinin adı, bölgesi, değişim türü ve hasarlayıcı etkisi	56
Çizelge 6.1 Benzeri çalışmalar ile çift heterozigotluk oranlarının karşılaştırılması	58
Çizelge 6.2 LDLR geninde tespit edilen varyantların karşılaştırılması	60

1. GİRİŞ

Ailesel hiperkolesterolemi (AH), düşük yoğunluklu (dansiteli) lipoprotein kolesterol seviyesinde (LDL-Kolesterol) yükselmeye sebep olan otozomal dominant kalıtlımlı genetik bir metabolik hastalıktır (Coker 2014). Düşük dansiteli kolesterol, halk arasında “kötü kolesterol” olarak da bilinir. Ailesel hiperkolesterolemiden etkilenen hastalarda, LDL reseptörlerinin işlev kaybı sonucu, kolesterol kandan temizlenemez. Ailesel hiperkolesteroleminin görülme sıklığı yüksek olsa da tanı alma oranı düşüktür. Amerika Birleşik Devletinde hastaların yalnızca %10’unun tanı aldığı tahmin edilmektedir (Wand vd. 2019). Tanı konulmayan AH olgularında ilerleyen dönemde, ateroskleroza bağlı koroner kalp hastalığı ve kardiyak mortalite riski artmaktadır (Sağ vd. 2016) (Şekil 1.1). Prevalansın, heterozigot olgularda 1:200 ile 1:500 arasında olduğu, homozigotlarda 1:160,000 ile 1:1,000,000 arasında olduğu düşünülmektedir (Singh ve Bittner 2015).

Hastaların çoğu ilk kardiyovasküler olay gelişene kadar tanı alamamaktadır (Sağ 2016). Çünkü, tek gen hastalıkları ile multifaktöryel geçiş gösterenler benzer kolesterol düzeylerine sahiptir. Genellikle kesin tanı koymada fiziksel bulgular ortaya çıkana kadar beklenildiği için geç kalınmaktadır. Bu sebeple kesin tanı için genetik test önemlidir (Fouchier vd. 2011). Kardiyovasküler hastalık riski bu hastalarda 20 kat daha yüksektir (Sinan ve Sansoy 2014). Erken tanının konulması ve uygun tedavi ile AH hastalarında yaşam beklentisi artmaktadır (Sağ 2016).



Şekil 1.1 Aterosklerozun şematik gösterimi (<https://www.endocrinologyadvisor.com> 2019)

1.1 Hastalıkta Tanı ve Tedavi

Uygun tedavi yönetimi ve genetik danışmanlık sağlamak için fenotipik olarak benzer bozuklukları ayırt etmek önemlidir (Sag 2016). Etiyolojik olarak dislipidemiye primer ve sekonder lipid mekanizması bozuklukları olarak iki grupta incelemek mümkündür. Primer dislipidemiler, lipid mekanizmasında rolü olan genlerdeki bozukluklar sebebiyle görülürken, sekonder dislipidemiler arka planda bulunan başka sebeplere dayalı lipid profili bozukluklarıdır (Bozkırlı 2018). Primer hiperlipidemiler, Fredrickson sınıflandırması olarak bilinen, hastalardaki plazmanın lipoprotein seviyelerine göre 5 gruba ayrılırlar; tip I, IIa, IIb, III, IV ve V (Çizelge 1.1). Ailesel hiperkolesterolemi tip IIa ve tip IIb dislipidemileri kapsar (İncecik vd. 2006).

Çizelge 1.1 Primer lipid bozuklukları için Fredrickson Sınıflaması

Tip	Diğer isimleri	Kusur	Artan lipoprotein
Tip Ia	Ailesel Şilomikronemi	LPL aktivitesinde azalma	Şilomikronlar
Tip Ib	Ailesel Apoprotein CII eksikliği	ApoCII bozukluğu	
Tip Ic		Kanda LPL inhibitörü varlığı	
Tip IIa	Ailesel Hiperkolesterolemi	LDL Reseptör eksikliği	LDL
Tip IIb	Ailesel Kombine Dislipidemi	Azalmış LDL reseptörü, artmış ApoB	LDL, VLDL
Tip III	Ailesel Disbetalipoproteinemi	ApoE2 sentez kusuru	IDL
Tip IV	Ailesel Hipertrigliseridemi	Artmış VLDL üretimi ve azalmış yıkımı	VLDL
Tip V		Artmış VLDL üretimi ve azalmış LPL aktivitesi	VLDL, Şilomikronlar

Sekonder dislipideminin nedenleri; yanlış beslenme, alkol ve sigara tüketimi, sedanter yaşam, hipotiroidi, tip 2 diyabet, kronik böbrek hastalıkları, siroz ve karaciğer hastalıkları ve bazı ilaçlar gibi birçok nedene bağlı olabilir. Primer lipideminin nedeni ise genetikdir ve bu nedenlerden bağımsızdır. Primer veya sekonder dislipideminin teşhisi, asıl nedenin tespiti ve tedavisi açısından önemlidir. Hastalık tanısı almış olguların %80 kadarı otozomal dominant kalıtmımlı ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkilendirilmiş üç gene ait patojenik varyant taşımaktadır (Singh ve Bittner 2015).

Ailesel hiperkolesterolemi hastalarına tanı, ilk olarak; kandaki LDL-Kolesterol düzeyindeki yükselmeye bağlı olarak konulabilir. Ailesel hiperkolesteroleminin tanısı için geliştirilen bir kaç kriterleme sistemi mevcuttur. Dutch Lipid Clinic Network, MEDPED, Simon-Broome skorum sistemi bunlardan birkaçıdır. Bu kriterleme sistemlerinden en yaygın olanı Dutch Lipid Clinic Network “DLCN” sistemidir. Bu sistemden ileriki başlıklarda detaylı olarak bahsedilecektir.

Uluslararası Kolesterol Eğitim Programınca (NCEP) kan plazmasındaki lipoprotein düzeyleri sınırları, hiperkolesteroleminin tanı ve tedavisinin kolaylaştırılması amacıyla yayınlanmıştır. LDL-Kolesterol için normal düzey 129 mg/dl ve aşağısı olarak belirlenmiştir. 130-159 mg/dl LDL-Kolesterol sınırda yüksek, 160-189 mg/dl yüksek, 190 mg/dl ve üzeri LDL-Kolesterol çok yüksek sınırlar olarak belirlenmiştir (American Medical Association, 2001) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 NCEP LDL-Kolesterol düzeyleri (American Medical Association 2001)

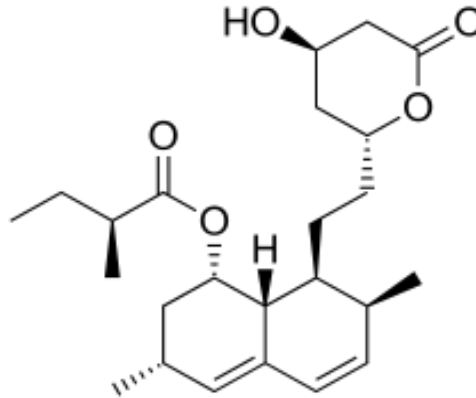
	LDL-Kolesterol düzeyi (mg/dl)
Optimal	<100
Normal	100-129
Yüksek	130-159
Sınırda Yüksek	160-189
Çok Yüksek	≥190

Ailesel hiperkolesterolemi hastalarında LDL kolesterol düzeyinin yükselmesine bağlı olarak damarlarda biriken yağ ile ortaya çıkan sorunlar dışında, birtakım fiziksel bulgular da ortaya çıkabilir (Şekil 1.2). AH sonucu çoğunlukla, lipit birikimi nedenli cilt üzerinde ksantomlar ve göz kapağı çevresinde ksantelemalar oluşur. Lipit birikimi, korneada da erken başlangıçlı “arkus kornea” olarak görülebilir. Bu fiziksel bulgular, AH için patognomoniktir (tanı koydurucu bir bulgudur) ve kardiyovasküler hastalık riskini üç dört kez arttırmaktadır (Sinan ve Sansoy 2014)



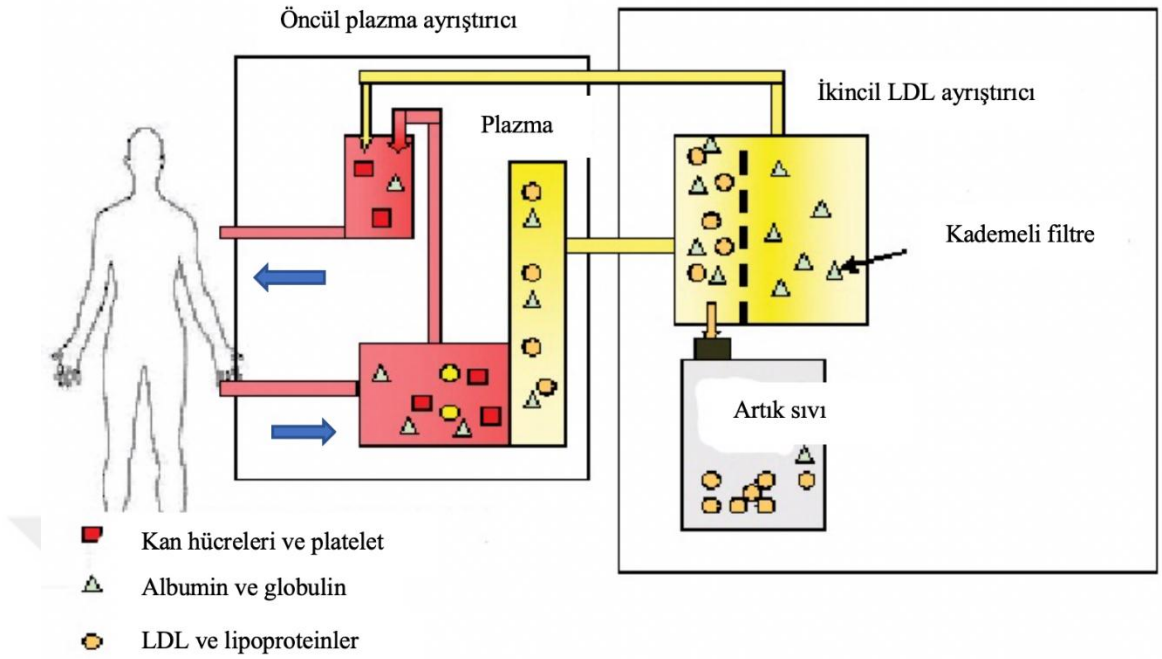
Şekil 1.2 Ailesel hiperkolesterolemiye dair fiziksel bulgular (A. Ksantalesma, B. ArkusKornea, C-G Ksantoma) (www.prezi.com. 2015)

Ailesel hiperkolesterolemi hastalarına öncelikle egzersiz ve diyet programları uygulanır. Bunların yeterli olmadığı hastalarda lipid düşürücü ilaçlar (statinler) ile LDL kolesterol düzeyi normal düzeye indirilmesi hedeflenir (Altay vd. 2018). Statinler plazmadaki LDL-Kolesterol düzeyini %30-55 oranında düşürebilen lipid düşürücü ilaçlardır. Kolesterol sentezi yolağında görev alan HMG-KoA redüktaz adlı enzimini yarışmalı olarak engellerler (*competitive inhibition*). Statinler sayesinde LDL-Kolesterol seviyesinin hücre içinde azalması ile karaciğer hücrelerinde LDL-Reseptör sentezi artar (Anonim 2018). Statin ilk olarak 1980 yılında lovastatinin kullanıma ile hayatımıza girmiştir. İlk piyasaya sürülen statin *Aspergillus terreus*'tan elde edilen Lovastatin'dir (Şekil 1.3). Daha efektif olması için molekülün değiştirilmesi ile daha güçlü türevleri ortaya çıkmıştır. Lovastatin, simvastatin ve pravastatin doğal yollarla funguslardan elde edilirken, fluvastatin, atorvastatin, serivastatin ve rosuvastatin sentetik yollarla elde edilmektedir (Anonim 2018).



Şekil 1.3 İlk pazarlanan statin olan Lovastatin molekülü (<https://tr.wikipedia.org> 2018)

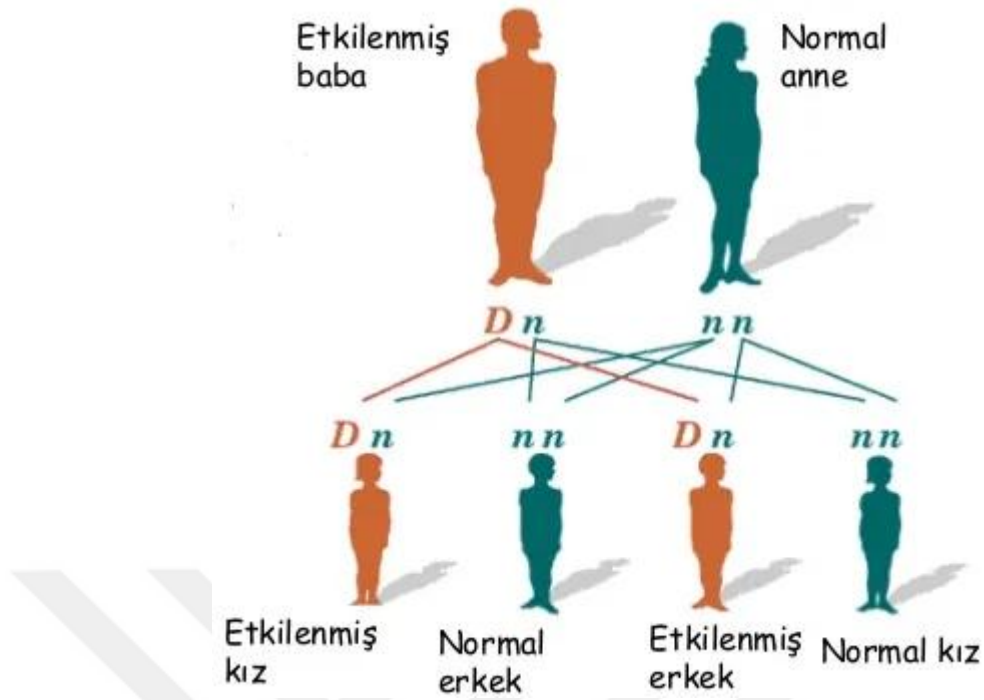
Statin tedavisi ile kontrol altına alınamayan ağır vakalarda aferez uygulaması ile kan, kolesterolden temizlenerek, hastanın kardiyo vasküler sağlığı korunmuş olunur (Anonim 2018). Plazmaferez yönteminin temel prensibi, dış ortama kanın venöz kanül veya arteriovenöz fistül veya santral venöz kateter yolu ile alınması sağlanarak, LDL-Kolesterol ve Apo B içeren lipoproteinlerden temizlenmesidir (Şekil 1.4). Yaklaşık 2-4 saat süren aferez işlemi hastanın plazma lipid düzeylerine göre sıklığı belirlenerek tekrarlanır (Çoker 2014) .



Şekil 1.4 Plazmaferez yönteminin şematik gösterimi (Kardaş vd. 2012)

1.2 Hastalığın Genetiği

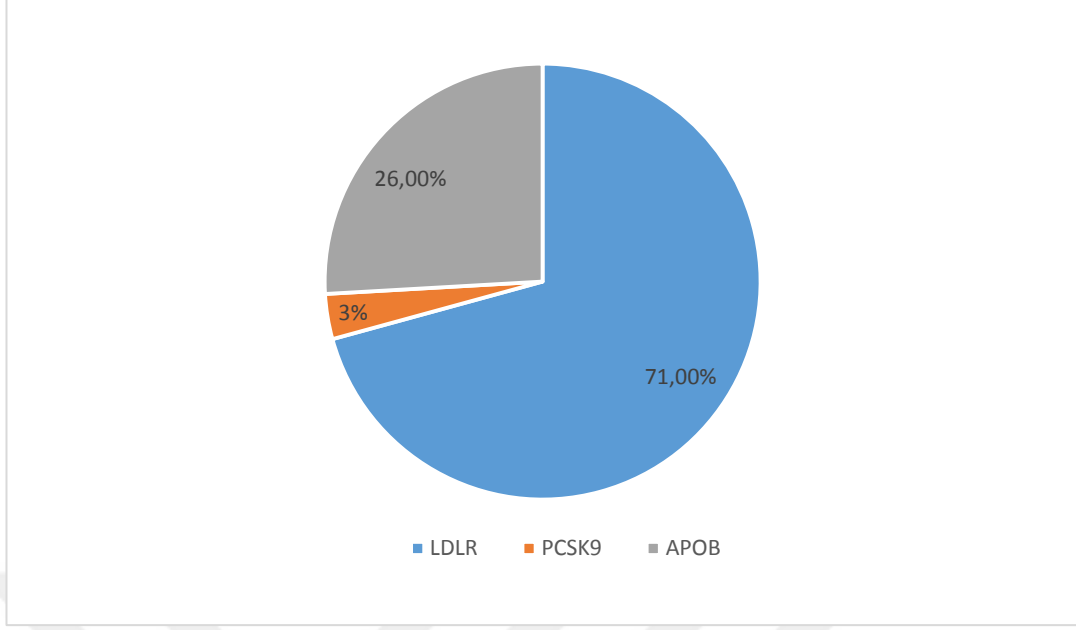
Ailesel hiperkolesterolemiyi anlamak için genetiğini anlamak gereklidir. AH tam penetrans özelliği gösteren bir hastalıktır. Hastalığın tam penetrans özelliği göstermesi; mutant gene sahip bireyin bu fenotipi kesinlikle göstereceği anlamına gelmektedir. Otozomal dominant kalıtım gösteren AH, bu şekilde her kuşakta kendini gösterir. Heterozigot hasta bireyin çocuklarında aynı hastalığın ortaya çıkma riski %50'dir. Hastalık eşeye bağlı değildir, her iki cinsiyette de görülebilir. Belli bir cinsiyette yığılma görülmesi söz konusu değildir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Otozomal dominant kalıtmı AH'ye örnek bir aile (www.labakademi.com 2019)

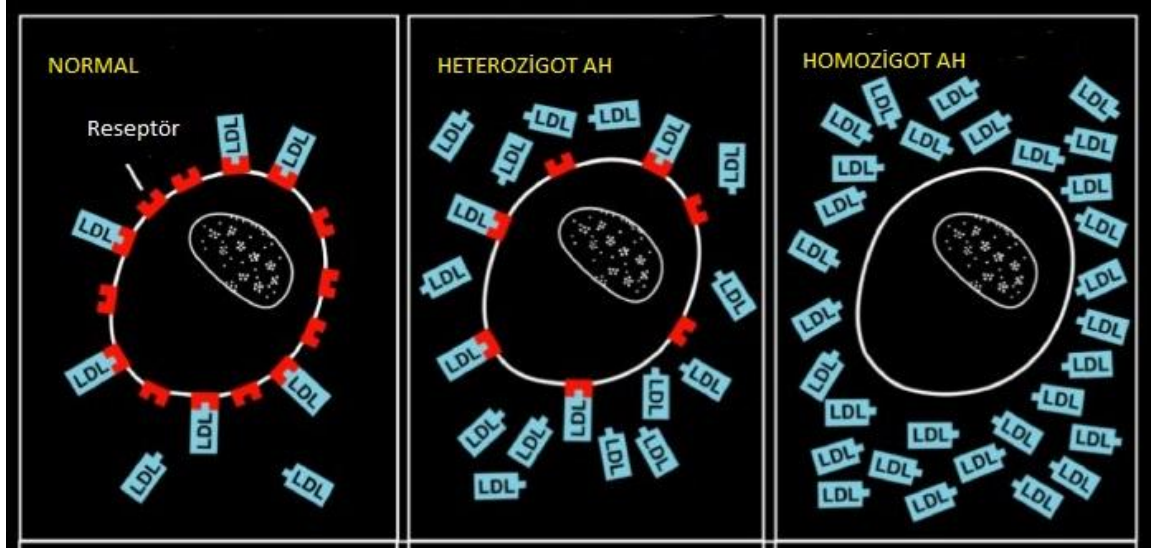
Hastalığın fenotipinin görülmesi için etkilenmiş alelden bir tane taşınması yani heterozigot olması yeterlidir. Hastanın iki ayrı alelde de hastalığı bulundurması halinde homozigotluk söz konusudur. Heterozigot ve homozigot ailesel hiperkolesterolemi hastaları, çoğunlukla farklı şiddette klinik gösterirler. Beklendiği üzere homozigot AH hastalarında, LDL kolesterol düzeyi daha fazla artış gösterebilir. Birleşik heterozigotluğun (compound heterozigot) olduğu durumlarda hastaların homozigot ailesel hiperkolesterolemi hastaları ile benzer klinik gösterdiği raporlanmıştır (Shirahama vd. 2018).

AH'ye yol açan mutasyonların gözlendiği başlıca üç gen LDLR, APOB ve PCSK9 genleridir. Bunların arasında mutasyon görülme sıklığı en yüksek olan ise %70-90 oran ile LDLR genidir (Sun vd. 2018, France vd. 2016) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Ailesel hiperkolesterolemiye neden olan başlıca üç genin görülme sıklığı oranları (Sun vd. 2018)

LDLR genindeki bozukluk sonucu, LDL reseptörü etkilenir ve lipid metabolizması bozulur (Şekil 1.7). Hepatosit yüzeyinde bulunan LDL-Reseptör, LDL partikülleri üzerinde yer alan APOB-100 proteinine bağlanarak; LDL-ligandreseptör kompleksini oluşturan glikoproteindir. Bozukluk sonucu, LDL-R aktivitesi düşer ve kolesterol düzeyi yükselir (Soutar ve Noumova 2007).



Şekil 1.7 AH'den etkilenmemiş, heterozigot etkilenmiş ve homozigot etkilenmiş bireylerde LDL Reseptörü işlevini gösteren şematik çizim (Goldstein ve Brown 1975)

APOB mutasyonuna bağlı hiperkolesterolemi, diğer mutasyonlar arasında şiddeti en az olanıdır. Ailevi Defektif APOB olarak isimlendirilen, APOB mutasyonuna bağlı hiperkolesterolemide LDL-Reseptör, LDL partiküllerine bağlanamaz ve plazmada LDL-K düzeyleri yükselir. PCSK9 geninde fonksiyon değişimine neden olan mutasyonlarda ise hücre içine alınan LDL-Reseptörün hücre yüzeyine dönmesi engellenir. Sonucunda kandaki LDL-Kolesterol yükselir (Kayıkçıoğlu 2014).

Ailesel hiperolesterolemiye neden olan mutasyonlardan en yaygın olanı yanlış anlamlı (missense) değişim olarak saptanmıştır. Yanlış anlamlı değişimlerde, DNA üçlü kodonunda bir baz değişimi ardından, kodondan sentezlenen aminoasit değişir. LDLR geninde bu değişimden sonra en sık görülen mutasyon türü çerçeve kayması (frameshift) değişimleridir. Çerçeve kayması değişimleri bir veya farklı sayıda nükleotidin eklenmesi (insersiyon) ya da silinmesi (delesyon) ile üçlü kodların kayması sonucu olur. Bir diğer sık görülen mutasyon çeşiti de; diziye eklenen ve ya silinen baz sonucu zincirin erken sonlanmasıyla, olması gerekenden daha kısa bir protein oluşturan anlamsız (nonsense) değişimlerdir (Marduel vd 2010) (Nussbaum ve McInnes 2005).

Bu genler dışında son zamanda yapılan farklı çalışmalarda ailesel hiperkolesterolemiye sebep olarak; LDLRAP1, GHR, PPP1R17, ITIH4, LIPA ve APOA2 genlerindeki mutasyonların varlığı ortaya konmuştur (Anonymous 2019).

AH görülme sıklığının 1/200 olduğu göz önüne alındığında hastalığın, en sık görülen tek gen hastalığı olduğu söylenebilir (Singh ve Bittner 2015).



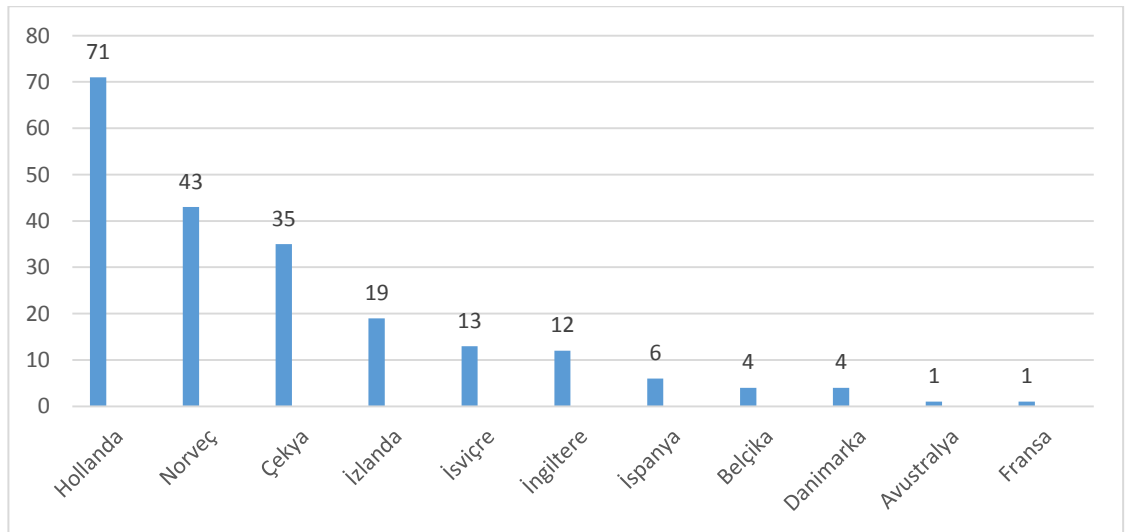
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Dünyada Ailesel Hiperkolesterolemi

İlk olarak hastalığın genetiğinden 1938’de Norveçli Doktor Carl Müller bahsetmiştir. Hastalığın otozomal dominant geçiş gösterdiğini ortaya koymuş ve fenotipik bulgulara göre hastalığı homozigot ve heterozigot olarak iki sınıfa ayırmıştır (Muller 1938).

1976 yılında kandaki LDL partiküllerinin hücre içerisine, yüzeyde yer alan reseptörler aracılığıyla alındığı keşfedilmiş ve bu reseptörlere LDL reseptörü (LDL-R) adı verilmiştir. LDL reseptörü genindeki mutasyon ile meydana gelen işlevsel bozukluğun hastalığa neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu keşif Brown ve Goldstein’a nobel ödülü kazandırmıştır (Brown ve Goldstein 1975).

Bu gelişmelerin ardından dünya genelinde AH, tedavi edildiği takdirde inme, kalp krizi ve ateroskleroza bağlı ölümlere engel olunabileceği için önem görmeye başladı. Bu sebeple günümüzde çoğu ülkede tarama yapılarak hastalara ve aile üyelerine ulaşılmaktadır. Bu ülkelerin bazıları; Hollanda, Norveç, İzlanda, İsviçre, İngiltere, Avustralya, Çek Cumhuriyeti, İspanya, Belçika, Fransa ’dır (Tichy vd. 2017) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Ülkelere göre AH hastalarına tanı koyma yüzdeleri (Tichy vd. 2017)

Dünya çapında 15 milyon AH hastası olduğu, bunlardan yalnızca %10'una tanı konduğu ve %5'inin tedavi aldığı sanılmaktadır (Watts vd. 2014). Şüphesiz ki sistematik biçimde en fazla hastaya ulaşan Hollanda'dır. Hollanda'da her yıl 4.500–6.000 yeni vakaya tanı konulduğu bilinmektedir. Öyle ki, hastalığın tanısında kullanılan en yaygın skorlama sistemi Hollandalı bilim adamlarının oluşturduğu Dutch Lipid Clinic Network (DLCN)'dir. DLCN adı verilen ve tüm dünyaca en sık kullanılan bu skorlama sisteminde; kişinin aile öyküsü, klinik bulguları, LDL kolesterol düzeyi ve mevcutsa mutasyon analizi esas alınır. Kişi 8 puan ve üstü skor almışsa, “kesin ailesel hiperkolesterolemi” hastası olarak yorum yapılır (Çizelge 2.1 - 2.2.).

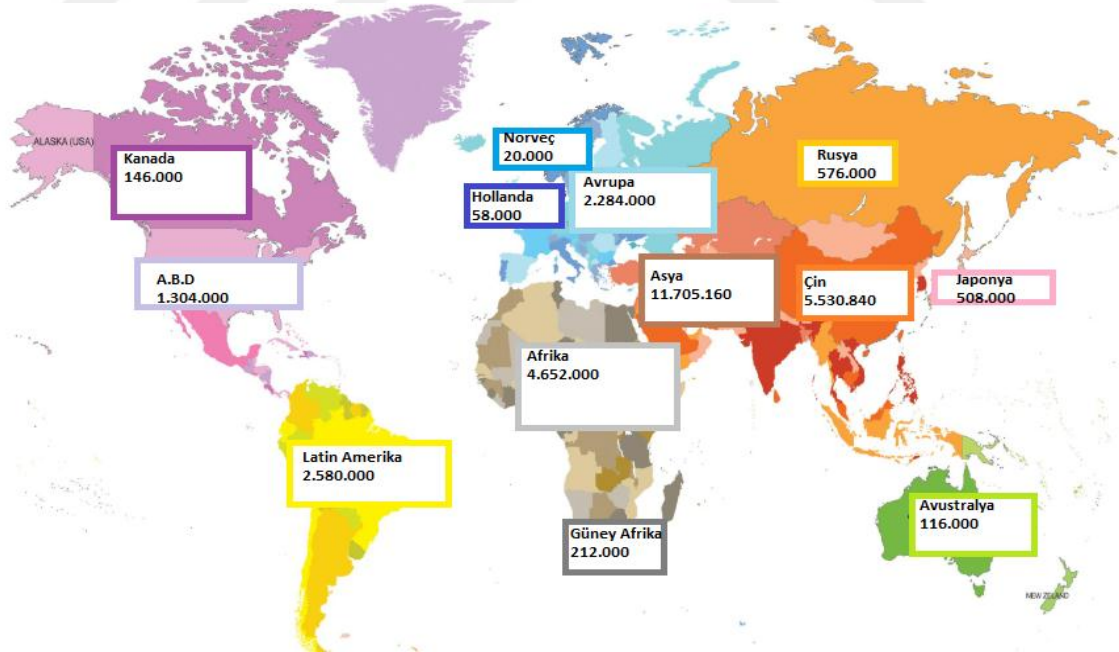
Çizelge 2.1 Dutch Lipid Clinic Network (DLCN) kriterlerine göre skorlama

Aile Öyküsü	
Birinci derece akrabalarda prematür kronik ve vasküler hastalığın olması (erkeklerde 55 yaş, kadınlarda 60 yaş altında olması) ya da Birinci derece akrabalarda LDL kolesterol düzeyinin 95 persentilin üstünde olması	1
Birinci derece akrabalarda tendon ksantoma ve/veya arkus kornea bulunması ya da 18 yaş altı çocuklarda LDL kolesterol düzeyinin 95 persentilin üzerinde olması (yaş ve cinsiyete göre)	2
Klinik Öyküsü	
Kişide prematüre arter hastalık olması	2
Kişide prematür serebral ya da vasküler hastalık olması	1
Fiziksel Muayene	
Tendon Ksantoma	6
Arkus Kornea (45 yaş altı bireyde)	4
LDL-Kolesterol	
LDL-K. düzeyi 328 mg/dl'den büyük	8
LDL-K. düzeyi 251-324 mg/dl arasında	5
LDL-K. düzeyi 193-247 mg/dl arasında	3
LDL-K düzeyi 193 mg/dl'den küçük	1
Genetik Tanı	
Mutasyon analizi- LDLR, ApoB, PCSK9 Geni	8

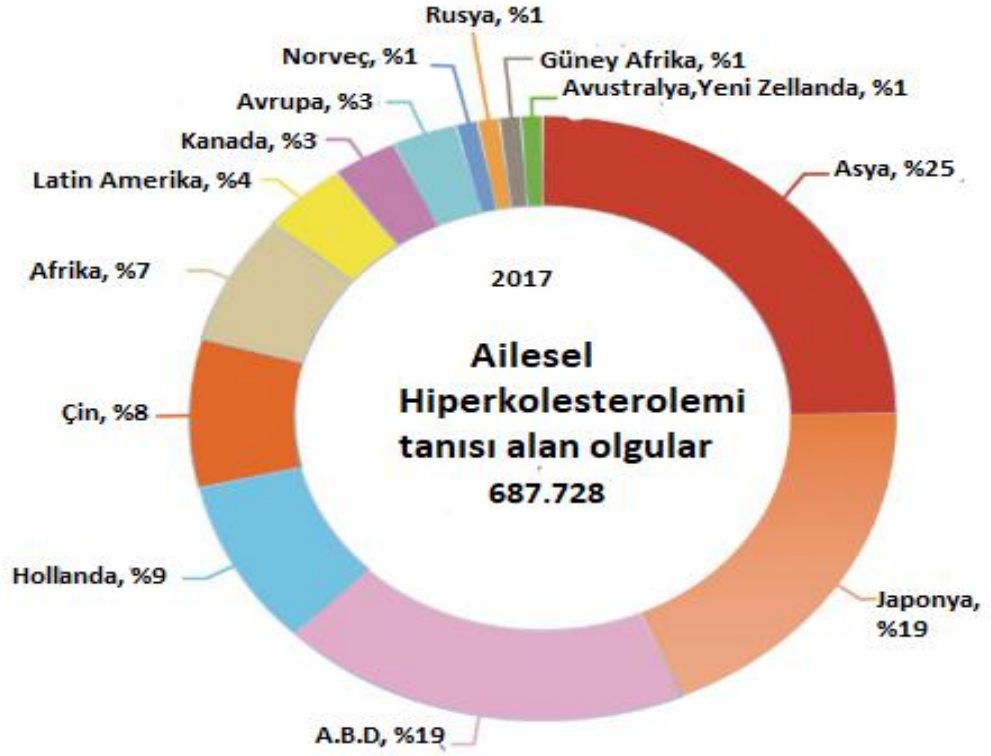
Çizelge 2.2 DLCN skoruna göre hastanın yorumlanması

Toplam Skor	
Kesin AH	≥ 8
Muhtemel AH	6-7
Mümkün AH	3-5
Olası olmayan AH	< 3

Ailesel hiperkolesterolemi hastalığında tanı ve teşhisin önemi her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır. Avrupa Kardiyoloji Derneği tarafından yayınlanan bir araştırmada, 2017 yılına dair ülkelere göre AH tanı oranları ortaya konmuştur (Şekil 2.2). 2017 yılında, dünya genelinde 687.728 AH hastasına tanı konulduğu kayıtlara geçmiştir. 1:250 oranında olması beklenen AH hasta sayıları ülkelere göre haritalanmıştır (Şekil 2.3). %86 tanı oranı ile Hollanda açık ara öndedir (Nordestgaard ve Benn. 2017, Sun vd. 2018). Elde edilen bu veriler de Hollanda'nın bir geliştirmiş olduğu skarlama sisteminin ve aile üyelerine ulaşmadaki başarısının bir kanıtı olarak görülebilir.

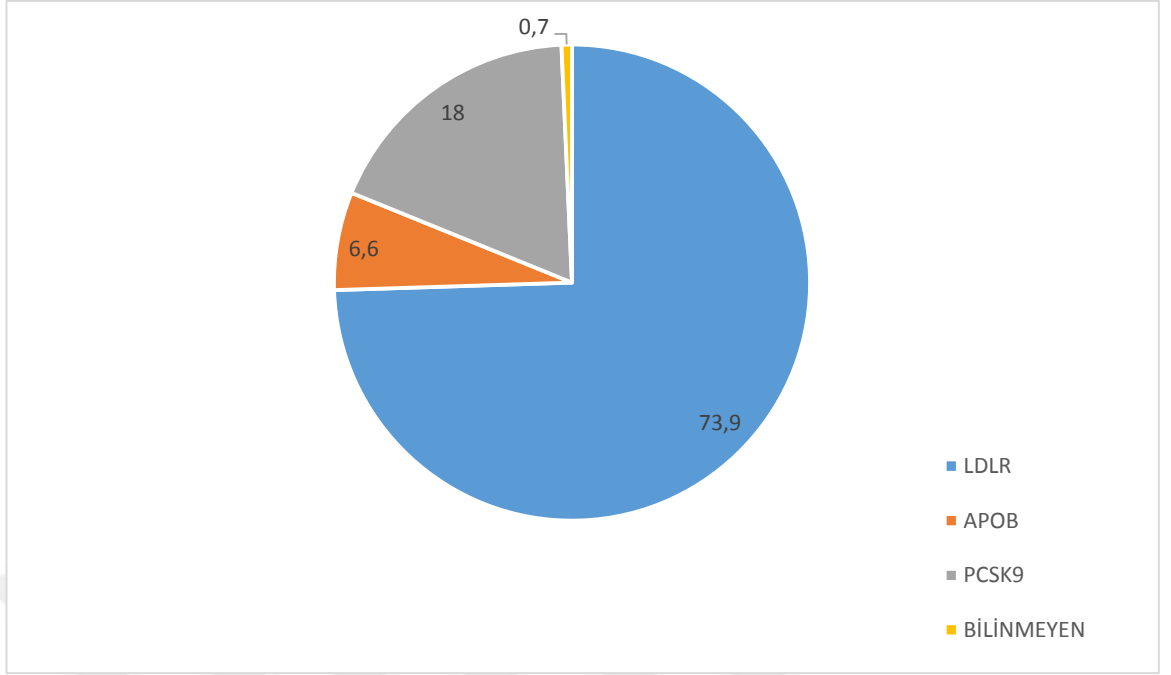


Şekil 2.2 Ünelere göre beklenen AH vaka haritası (Nordestgaard ve Benn 2017)



Şekil 2.3 Ülkelere göre AH hastalarına tanı koyma oranları (Nordestgaard ve Benn. 2017)

AH alanında genetik araştırmalara önem veren bir çalışma Fransız bilim insanları tarafından 2010 yılında yapılmıştır. 1358 hastada yapılan çalışmada, mutasyonların görüldüğü genlerin oranları raporlanmıştır. Olguların; %73.9 oranında LDLR geni, %18 oranında PCSK9 geni ve %6.6 oranında APOB geninde mutasyonu saptanmıştır. %0.7 gibi bir oranla hastaların hangi gene ait mutasyonu taşıdığı bulunamamıştır. Aynı zamanda bu çalışmada LDLR geninde tespit edilen mutasyonların türleri de tespit edilmiştir (Marduel vd 2010) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Fransa AH çalışması LDLR, APOB, PCSK9 genlerine göre mutasyon oranları (Marduel vd. 2010)

AH hastalarına tanı koymada önde gelen ülkelerden Çekya’da, klinik bulguları ailesel hiperkolesterolemi ile uyumlu 3914 vaka ile çalışılmıştır. Bu hastaların %33’ünde (n=1296) mutasyon saptanmıştır. Hastaların %22’sinde LDLR mutasyonu, %11’inde APOB mutasyonu saptanmıştır. LDLR geninde değişimi bulunan 864 hastada toplam 182 farklı varyant bulunmuştur. Bu çalışmada APOB genine ait sadece bir varyant saptanmıştır (Tichy vd. 2017).

2925 hastanın dahil edildiği bir çalışmada; 1707 farklı LDLR varyantı saptanmış ve bu değişimlerin türleri raporlanmıştır. Çalışmaya göre 795 yanlış anlamlı değişim, 337 çerçeve kayması, 129 anlamsız değişim, 181 intronik bölge değişimi, 118 geniş bölge değişimi bulunmaktadır (Leigh vd. 2016).

1996 yılından 2015 yılına kadar 16751 hastaya ulaşan diğer bir çalışmada ise toplam 97 homozigot hasta tespit edilmiştir. Homozigot hastaların 47’sinin gerçek homozigot, 45’inin LDLR geninde birleşik heterozigot değişim taşıdığı saptanmıştır. Birleşik heterozigot değişime sahip hastaların homozigot AH hastalarına göre daha şiddetli fenotip gösterdiği raporlanmıştır. (Hernandez vd. 2016).

2.2 Türkiye’de Ailesel Hiperkolesterolemi

Dünya’da olduğu kadar önem görmeyen ailesel hiperkolesterolemiye dair ülkemizde geniş kitleleri kapsayan genetik çalışma bulunmamaktadır. 1:200 ile 1:500 oranı arasında görülebilecek olduğunu düşündüğümüz AH, ülkemizde nüfusa oranladığımızda en iyi ihtimalle 156.000 kişiyi etkilediği varsayılmaktadır. Akraba evliliklerinin ve kapalı toplulukların fazla olduğu göz önünde bulundurulursa homozigot formlu ailesel hiperkolesterolemi hastalarının sayıca diğer toplumlardan fazla olacağı düşünülmektedir.

2004 yılında 36 çocuk hastanın LDLR genlerine bakılmış, hastaların 14’ünün homozigot, 2’sinin birleşik heterozigot ve 6’sının heterozigot olduğu saptanmıştır. En çok görülen mutasyon W556R değişimi olarak rapor edilmiştir (Sozen vd. 2004).

AH hastalığına etken bir diğer gen olan PCSK9 geni ile 80 hastalık bir çalışma yapılmıştır. Hastalık yapıcı etkisi bilinen iki değişim (R496W ve D374Y) yönünden hastalar taranmış, 11 hastanın bu değişimlerden birini taşıdığı tespit edilmiştir (Kaya vd. 2017).

Haymana vd. (2017) gerçekleştirdikleri bir çalışmada LDL kolesterol düzeyi 250 mg/dL üzerinde olan 297 hastaya ulde aşmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre Türkiye’de hastaların büyük çoğunluğunun yüksek kolesterol düzeyine rağmen herhangi bir tedavi almadığı sonucuna varılmıştır. Bu durum ülkemizde kolesterol yüksekliği ve sonuçları hakkında bilgi azlığını, bu konuda eğitim ve taramanın eksikliğini gözler önüne koymuştur.

Ülkemizde henüz geniş hasta kitlesine ulaşan bir çalışma yoktur. 1000 hastaya ulaşılması hedeflenen bir çalışma için Türk Kardiyoloji Derneği ve 30 klinik destek vermekte ve çalışma halen devam etmektedir.

2.3 Literatürde Bulunan Benzeri Çalışmalar

Ailesel hiperkolesterolemi ile ilgili LDLR, APOB, PCSK9 genlerindeki mutasyonların yaşa, cinsiyete, mutasyon tiplerine göre istatistiklerine ulaşabileceğimiz pek çok yayın mevcuttur. Fakat ailesel hiperkolesterolemiye etken başlıca üç gende, çifte heterozigotluğa dair yayın sayısı fazla değildir.

2018 yılında yapılan bir yayında LDLR ve APOB genlerinde çifte heterozigot mutasyon taşıyan bir hastanın homozigot fenotipi gösterdiği raporlanmıştır (Shirahama 2018).

2009'da Lübnan'da yapılan bir araştırmada yetişkin hastalar için LDL Kolesterol düzeyi 220 mg/dl üstü, 20 yaş altı hastalar içinse 200 mg/dl üstü kriteri şart koşulmuştur. Buna göre seçilen 61 vaka ile çalışılmış ve 51'inde LDLR mutasyonu saptanmıştır. LDLR geninde mutasyon saptanan hastaların yaklaşık %30' unda PCSK9 mutasyonu görülmüştür. Bu çalışmada PCSK9 geninin AH hastalığı için düzenleyici (modifier) gen olabileceği üzerine durulmuştur. (Abidafel vd. 2009). Düzenleyici (modifier) gen, farklı bir genin fenotipik etkisini değiştiren genlerdir (Ozkul 2007). PCSK9 genindeki bir kısım değişimlerin işlev kaybına sebep olurken (LOF varyant), bir kısım değişimle sonucu işlev kazancı (GOF varyant) olduğu görülmüştür. PCSK9 genindeki işlev kaybı değişimleri plazmadaki LDL-Kolesterol düzeyinin düşmesi ile sonuçlanır. (Abidafel vd. 2009).

Daha önce bahsedilen 16751 hastalık çalışmada (Hernandez vd 2016), 5 hastada çifte heterozigotluk (iki farklı lokusun her birinde heterozigot mutasyon bulunması) söz konusudur. 5 çifte heterozigot hastanın 3'ü LDLR ve PCSK9 genlerinde, 2'si LDLR ve PCSK9 genlerinde heterozigot mutasyon taşımaktadır (Hernandez vd. 2016).

Homozigot fenotipine sahip 52 hasta ile İtalya'da çalışılmış, hastaların birinde LDLR ve PCSK9 genlerinde çifte heterozigotluk saptanmıştır (Bertoloini vd. 2013).

Hiperkolesterolemi hakkında en kapsamlı araştırmaların yapıldığı Hollanda'da (Sjouke vd. 2015, Sjouke vd. 2016, Hartgers vd. 2017) ifte heterozigotluğa dair araştırmalara rastlamak mümkündür. LDLR geninde mutasyon bulunan 45 hastanın 28'inde ifte heterozigotluk durumu saptanmıştır (Sjouke vd. 2016).

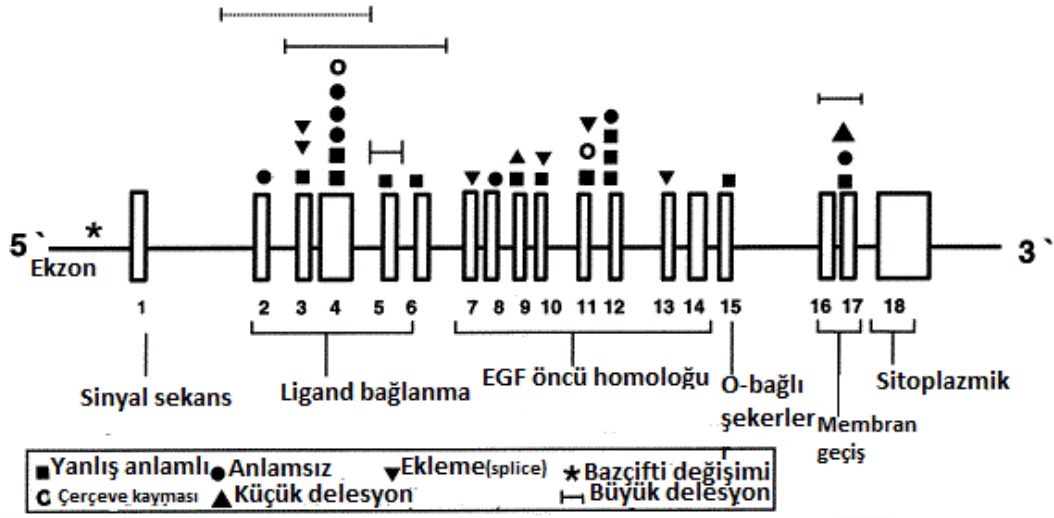
AH kliniği gösteren ve aralarında kan bağı bulunmayan Arjantinli 33 hastada (Banares vd. 2017) ifte heterozigotluğa dair bulgular raporlanmıştır.



3. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ

Önleyici tıbbın önemi ülkemizde yeterince anlaşılmamış olsa da, ileride aferez veya ameliyat olması gereken ya da ölüm riski bulunan bireye erken yaşlarda tanı koyabilmek, toplumu sosyoekonomik açıdan düşünüldüğünden fazla etkiler. Dislipidemik bir hastaya kesin tanı koymak için genetik tanı esastır. Sadece lipid profile ve fiziksel bulgularla konulan tanıda %18 yalancı negatif /pozitif çıkması yüzünden yanlışma payı olduğundan genetik testin önemi büyüktür. Fakat ne yazık ki ülkemizde ailesel hiperkolesterolemi genetiğine dair fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu durum, yalnızca klinik olarak değil bilimsel olarak da önem taşımaktadır. Ailesel hiperkolesterolemi hastalarına ulaşmak için kademeli tarama yöntemini geliştiren Hollanda'da konu ile ilgili bir çok bilimsel veriye ulaşmak mümkündür. Kademeli tarama yönteminde fiziksel, biyokimyasal bulgular ve aile öyküsünden yola çıkılarak indeks hastaya ulaşmak, ardından hastanın birinci dereceden akrabalarına ulaşmak ve yeni hastalara tanı koymak amaçlanmaktadır. 2004-2009 yılları arasında 44.000 kişiye ulaşılan Hollanda çalışmasında, ulaşılanların %36'sının ailesel hiperkolesterolemi hastası olduğu görülmüştür (Defesche 2010). Genetik test ile indeks bir hasta tespit edildiği takdirde bu yöntem ile yeni hastalara ulaşmak da mümkündür.

Literatürde konu ile ilgili derlenen bilgiler bulunmaktadır. Hastalığa sebep olan başlıca genlerde değişimlerin görülme sıklıkları, değişim çeşitleri, ekzonlara göre değişim görülme sıklığı (Şekil 3.1) bunlardandır.



Şekil 3.1 LDLR geninde görülen değişimin ekzonlara göre şematik gösterimi (Jensen vd. 1999)

Yurdumuzda bulunan kapalı toplumlar, akraba evlilikleri ve farklı etnik kültürler sebebiyle Dünya literatüründen farklı sonuçlar bulunabileceği varyant çeşitliliğinin ve homozigot vakaların sayıca yüksek olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada bulunması amaçlanan çifte heterozigotluk durumuna dair ülkemizde de dünya literatüründe de yeterli sayıda bilimsel araştırma yoktur. İki farklı heterozigot değişime sahip hastanın homozigot AH benzeri klinik gösterdiği düşünülünce; ülkemiz için görülme sıklığının ve bulunacak olan değişimlerin fikir oluşturması açısından benzeri bir çalışmanın öncü olabileceği son derece açıktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Örnek Toplama

Türkiye'nin farklı bölgelerinden, 18 yaş üstü olgular için LDL kolesterol düzeyi 200 mg/dl, 18 yaş altı olgular için 160 mg/dl ve üzeri değerlere sahip hastalara hedeflenmiştir. Bu değerler DLCN kriterleri ve Türkiye'ye ait LDL kolesterol seviyesi istatistiklerine göre belirlenmiştir. Hastalara, TÜBİTAK'ın 213S147 numaralı projesi aracılığıyla ulaşılmıştır. LDLR mutasyonu saptanmış olan hastalar arasından 52 hasta seçilmiştir. Hasta seçiminde ülkemizin tüm bölgelerinden olmasına özen gösterilmiştir. Hastaların dağılımı, olabildiğince nüfus oranları esas alınarak belirlenmiştir. Yedi coğrafik bölgeden örneklem yapılan hastalar hem çocuk hem de erişkin yaş grubuna aittir. Bunların 26'sı yetişkin, 26'sı 18 yaş altı çocuk hastalardır. Hastalardan alınan 2 ml periferik kan EDTA'lı tüplerde muhafaza edilmiştir. Hastaların kan alımında açlık/tokluk durumuna önem verilmemiş, transport sırasında soğuk zincire gerek duyulmamıştır.

Çalışmaya; Marmara Bölgesinden 7, Ege Bölgesinden 9, İç Anadolu Bölgesinden 12, Akdeniz Bölgesinden 9, Doğu Anadolu Bölgesinden 6, Karadeniz Bölgesinden 5, Güneydoğu Anadolu Bölgesinden 4 hasta alınmıştır (Şekil 4.1).

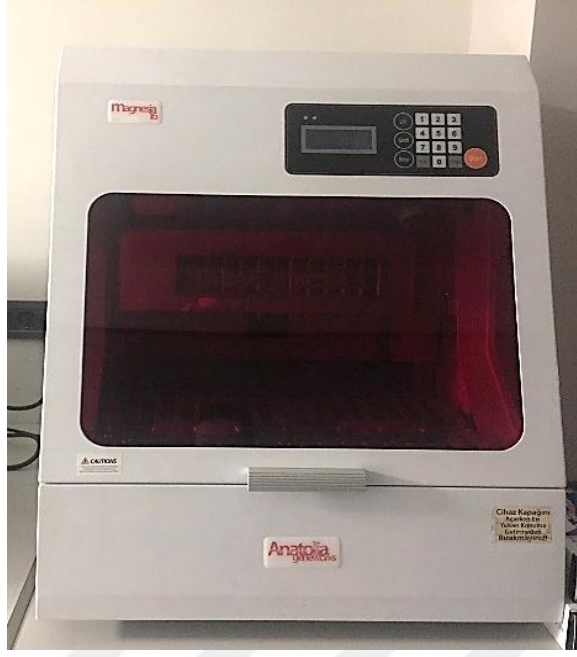
Çalışmaya Türkiye'de yaşayan yabancı uyruklular dahil edilmemiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalar arasında akrabalık yoktur.



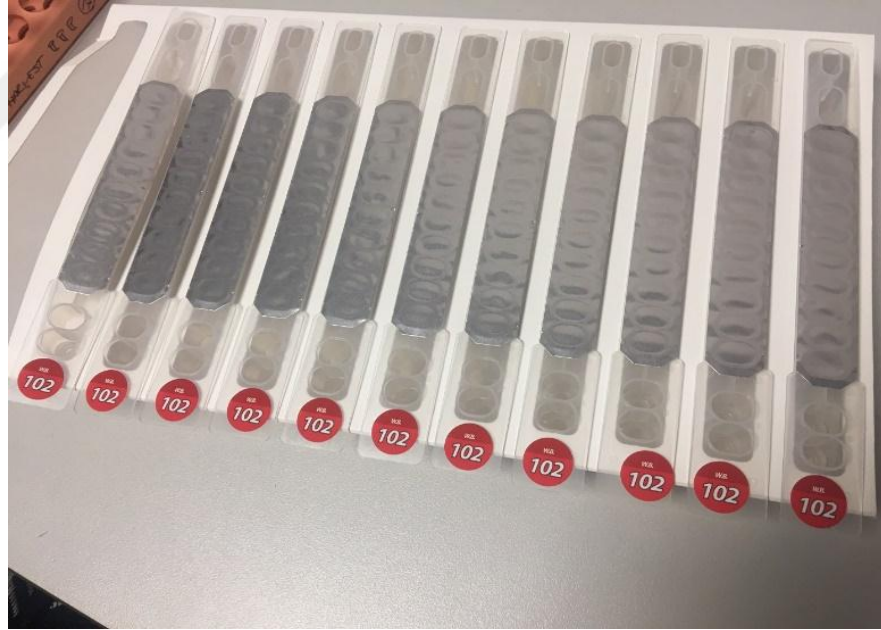
Şekil 4.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların coğrafi bölgelere göre dağılımı

4.2 DNA İzolasyonu

Toplanılan periferik kanlardan total nükleik asit izolasyonu, manyetik boncuk metodunu kullanan 16 örneklik otomatik DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) izolasyon cihazı (*Magnesia MagCore HF16*) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). 200 mikrolitre (μ l) kanın ve 50 mikrolitre Proteinaz-K enziminin ilave edilmesi ardından aynı firmanın “Genomic DNA extra pure whole blood (kod:102)” kiti kullanılmıştır (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). 45 dakikalık prosedür ardından 150 μ l DNA çözeltisi elde edilmiştir. Kitin içeriğinde hücreleri lizisi etmek ve protein degradasyonu için kaotropik tuz bulunmaktadır. DNA bağlanması, sellüloz kaplı manyetik boncuklar ile gerçekleşmektedir. Kontaminantların yıkanmasının ardından düşük tuzlu elüsyon buffer yardımı ile polimeraz zincir reaksiyona (PZR) uygun 25-30 kilobaz (kb) uzunluğunda DNA çözeltisi elde edilmektedir.



Şekil 4.2 Total nükleik asit izolasyonunda kullanılan izolasyon cihazı



Şekil 4.3 Total nükleik asit izolasyonunda kullanılan Magnesia markasının ticari kiti



Şekil 4.4 Magnesia markasının nükleik asit izolasyonu için kullanılan 102 kodlu kitinin görünümü

4.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İzole edilen DNA örneklerinde öncelikle LDLR geni çalışılmıştır. Çalışmada Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) tekniği uygulanmıştır.

Thermo Fisher Scientific şirketinin *Phire Hot Start II* DNA Polimeraz karışımı ve ampikon uzunlukları belirtilen primerler kullanılmıştır (Çizelge 4.1). Her bir ampikon için, 21 μ l polimeraz enzim karışımı, 2'şer μ l 10 pikomolluk (pmol) ileri ve geri primer, 2 μ l hastaya ait DNA çözeltisi eklenmiştir. İleri ve geri primerlerin baz dizilemleri çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 4.2).

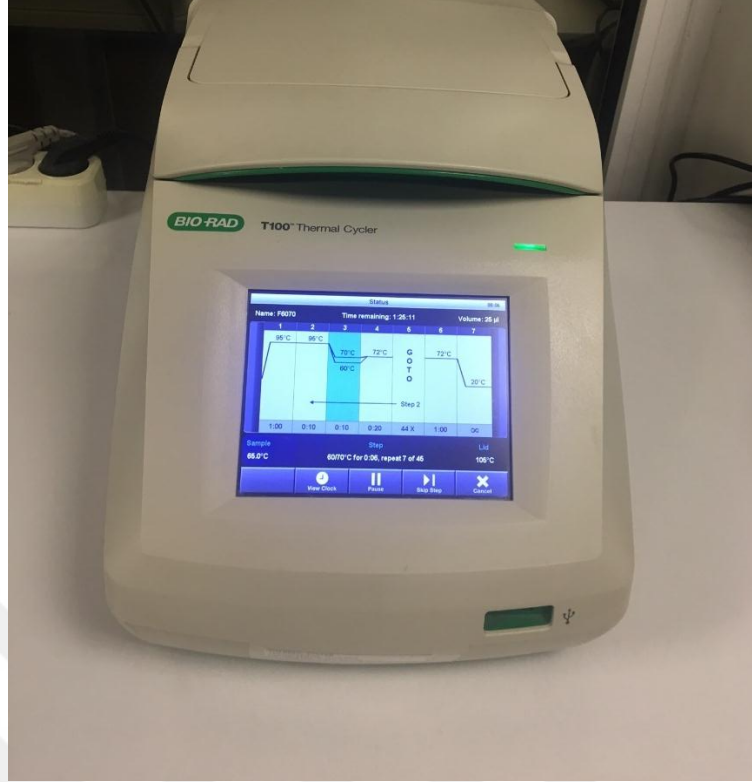
Çizelge 4.1 LDLR geni için PZR’de kullanılan primerlerin amplikon büyüklükleri

Primer	Ekzon	bp
LDLR_1F	1	398
LDLR_1R		
LDLR_2F	2	496
LDLR_2R		
LDLR_3F	3	528
LDLR_3R		
LDLR_4F	4	739
LDLR_4R		
LDLR_5F	5	325
LDLR_5R		
LDLR_6F	6	312
LDLR_6R		
LDLR_7F	7-8	1635
LDLR_8R		
LDLR_9F	9-10	1114
LDLR_10R		
LDLR_11F	11-12	1095
LDLR_12R		
LDLR_13F	13-14	689
LDLR_14R		
LDLR_15F	15	383
LDLR_15R		
LDLR_16F	16	375
LDLR_16R		
LDLR_17F	17	387
LDLR_17R		
LDLR_18F	18	736
LDLR_18R		

Çizelge 4.2 LDLR geni ileri ve geri primerlerin baz dizilimleri

Primer	İleri sekans	Primer	Geri Sekans
Ekzon 1 F	ACATCGGCCGTTTCGAAACT	Ekzon 1 R	GTGCCATTACCCCACAAGTC
Ekzon 2 F	CTCCACTGAATTTTGGGGTTCAT	Ekzon 2 R	GCCATCATCAAAAAGGGGTAAAG
Ekzon 3 F	CGCCACCACACCCAATAAT	Ekzon 3 R	AAGAGGTAGCACCATCCCCA
Ekzon 4 F	CAGCTTTACACCTATTAGCGCA	Ekzon 4 R	GGAATACTTTCTTGGCATGTTGTTG
Ekzon 5 F	TTTTCTCTGGTTGTCTCTTCTTGAG	Ekzon 5 R	GTGAGGCTCTGAGAAGTCAAGT
Ekzon 6 F	CCATTTGCATGCGTTCTTATGTG	Ekzon 6 R	CCCCAAACCCTACAGCACTCA
Ekzon 7-8 F	ATTTCACTGAGCCAAGTGCG	Ekzon 7-8 R	AAGCCCAAGTCCTAACAGGG
Ekzon 9-10 F	GCAGGATGACACAAGGGGAT	Ekzon 9-10 R	CTCACGTGCTTAGGTAGCAGA
Ekzon 11-12 F	GGGTTCACAGCAGGACTATT	Ekzon 11-12 R	CTAAGACCTCCTCCTAGTCACA
Ekzon 13-14 F	CCTGTGTCTCATCCCAGTGT	Ekzon 13-14 R	TGATGCCTGGTTTCCTCTTTC
Ekzon 15 F	TTCGTCATTAGGCGCACACC	Ekzon 15 R	ACACGGCCCAAGTGAGAGAA
Ekzon 16 F	TCACAAATAAGCCCGTGTGGC	Ekzon 16 R	TGGGGGTGATAAAGGACACCA
Ekzon 17 F	TTATGGTACGATGCCCCGTG	Ekzon 17 R	CGCACAGAAGCATTACCTA
Ekzon 18 F	AATCCGGTACTCACCCTCTC	Ekzon 18 R	ACCCACCTCGAAAGACACTG
Ekzon 1 F	ACATCGGCCGTTTCGAAACT	Ekzon 1 R	GTGCCATTACCCCACAAGTC
Ekzon 2 F	CTCCACTGAATTTTGGGGTTCAT	Ekzon 2 R	GCCATCATCAAAAAGGGGTAAAG
Ekzon 3 F	CGCCACCACACCCAATAAT	Ekzon 3 R	AAGAGGTAGCACCATCCCCA
Ekzon 4 F	CAGCTTTACACCTATTAGCGCA	Ekzon 4 R	GGAATACTTTCTTGGCATGTTGTTG
Ekzon 5 F	TTTTCTCTGGTTGTCTCTTCTTGAG	Ekzon 5 R	GTGAGGCTCTGAGAAGTCAAGT
Ekzon 6 F	CCATTTGCATGCGTTCTTATGTG	Ekzon 6 R	CCCCAAACCCTACAGCACTCA
Ekzon 7-8 F	ATTTCACTGAGCCAAGTGCG	Ekzon 7-8 R	AAGCCCAAGTCCTAACAGGG
Ekzon 9-10 F	GCAGGATGACACAAGGGGAT	Ekzon 9-10 R	CTCACGTGCTTAGGTAGCAGA
Ekzon 11-12 F	GGGTTCACAGCAGGACTATT	Ekzon 11-12 R	CTAAGACCTCCTCCTAGTCACA
Ekzon 13-14 F	CCTGTGTCTCATCCCAGTGT	Ekzon 13-14 R	TGATGCCTGGTTTCCTCTTTC
Ekzon 15 F	TTCGTCATTAGGCGCACACC	Ekzon 15 R	ACACGGCCCAAGTGAGAGAA

Hazırlanan reaksiyonlarla *Thermal Cycler (BIORAD T100)* cihazında belirtilen protokol sayesinde (Çizelge 4.3) DNA'nın istenilen bölgeleri çoğaltılmıştır (Şekil 4.5).



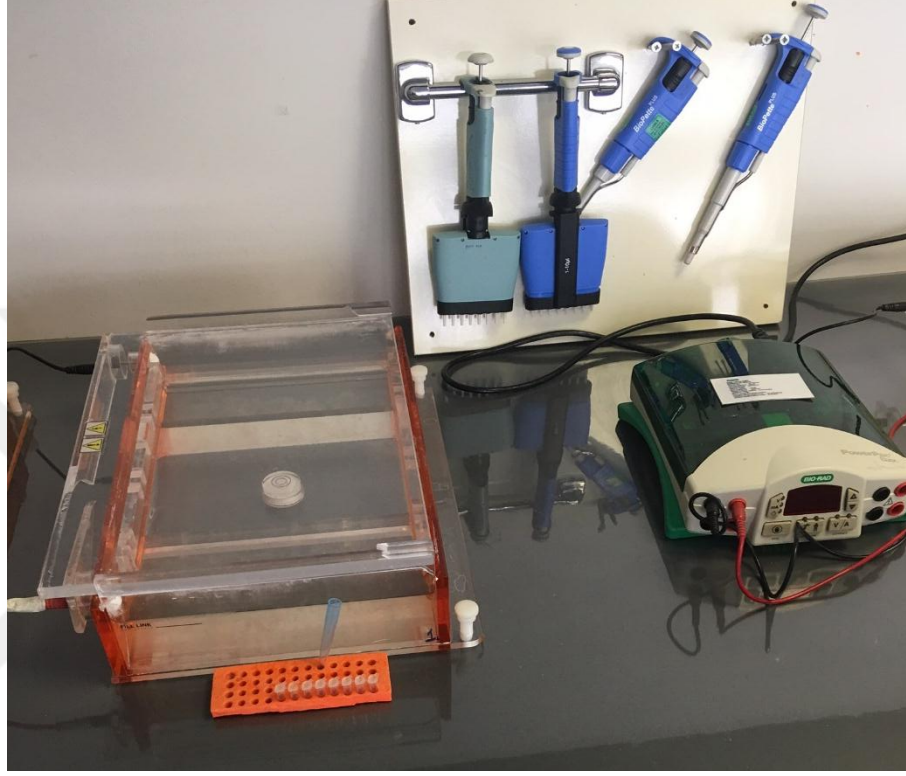
Şekil 4.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının yapıldığı Thermal Cycler cihazı

Çizelge 4.3 LDLR geni için tüm ekzonlarda uygulanan PZR protokolü

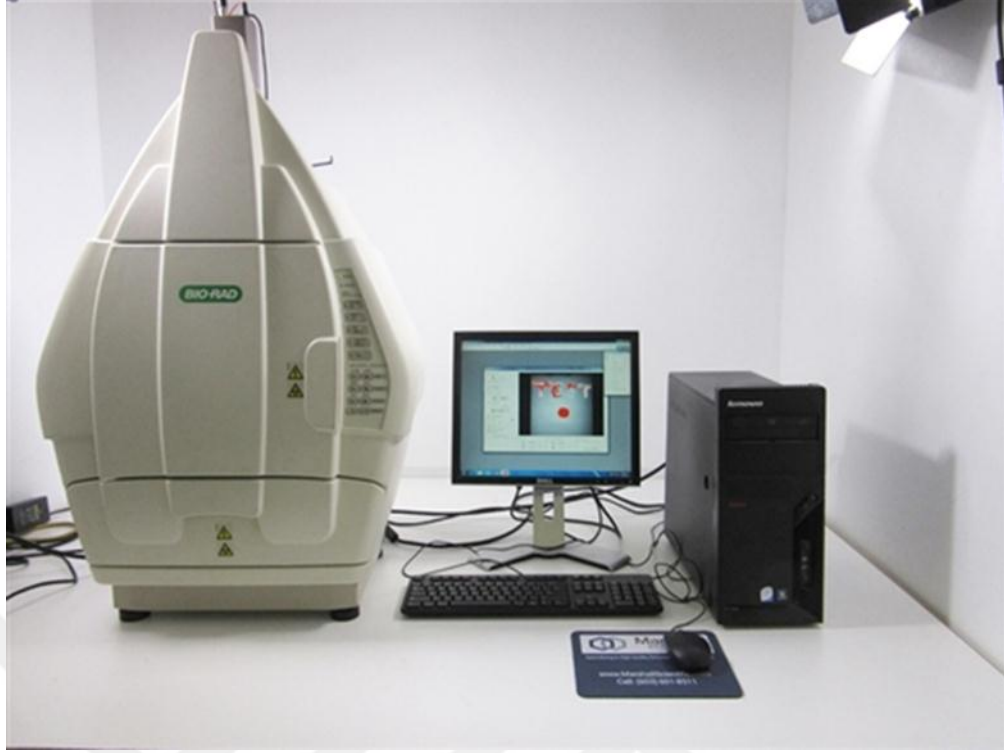
Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	1 dk	
95°C (Denatürasyon)	10 sn	45
60°C (Bağlanma)	10 sn	
72°C (Uzama)	10 sn	
72°C	1 dk	
12°C	5 dk	
Bitiş		

45 dakika süren protokol ardından, kurulan reaksiyonların kontrolü jel elektroforez görüntüleme tekniği ile sağlanmıştır. PZR ampikonları; 300 mililitre (ml) %10 seyreltilmiş Tris-Borat-Edta (TBE) çözeltisi ve 6 gram (gr) agaroz ile hazırlanan 15 µl %0.5'lik etidyum bromür (EtBr) ilaveli %2'lik agaroz jele, *Thermo Fisher Scientific* firmasının bromofenil mavisi ve ksilen siyenol FF içeren yükleme boyası kullanılarak

yüklenmiştir. *BİORAD Power-Pac* elektroforez seti (Şekil 4.6) ile 175 Volt akımda 20 dakika kadar yürütülmüştür. *BİORAD* görüntüleme cihazında (Şekil 4.7) UV ışık altında çekilen görüntüler kaydedilmiştir (Şekil 4.8).

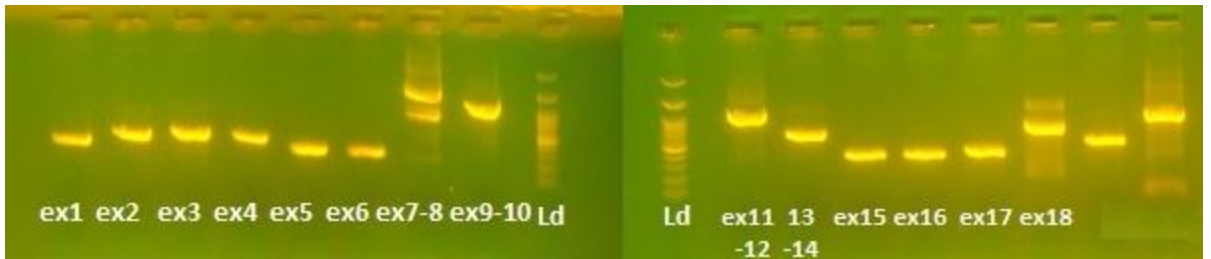


Şekil 4.6 Jel Elektroforez seti



Şekil 4.7 Jel görüntüleme sistemi (<https://www.indiamart.com> 2019)

Her hastaya ait PZR ampliconları uygun oranlarda bir tüp içerisinde birleştirilmiştir. Bu oranlar jel görüntüsüne göre belirlenmektedir. Reaksiyonun iyi çalıştığı ampliconlardan 3 μ l, jel görüntüsü silik görünen ampliconlardan 6-9 μ l alınarak her hastanın LDLR geni tek bir tüpte toplanmıştır. Tüm gen dizi analizi sonucu değişim saptanan hastalardan 52 hasta seçilmiş ve bu hastalar PCSK9 ve APOB genleri çalışması için gruplara bölünmüştür.



Şekil 4.8 LDLR gen bölgesine ait jel görüntüsü

Seçilen 52 hasta; rastgele 6 gruba bölünmüş ve uygun miktarlarda (10-20 μ l arası) birleştirilerek poolar oluşturulmuştur. Her hastadan havuza ilave edilecek uygun miktar,

hastaya ait nükleik asit çözeltisinin yoğunluğunun, spektrofotomere yardımıyla ölçümü sonrası belirlenmiştir.

52 hastanın 6'lı-10'lu gruplar halinde birleştirildiği 6 havuz için, APOB ve PCSK9 genleri polimeraz zincir reaksiyona sokulmuştur. Bu yöntemi seçmedeki amaç, her hasta için iki genin tüm gen çalışmaları yerine, tezin amacı olan PCSK9 ve APOB genlerindeki değişim varlığını en pratik yolla ve en az maliyetle bulmaktır.

ApoB ve PCSK9 genleri için tasarlanan primerlerin ampikon uzunlukları ile ileri ve geri primerlerin baz dizilimleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.4 - 4.7).

Çizelge 4.4 PCSK9 geni için PZR'de kullanılan primerlerin ampikon büyüklükleri

Primer	Ekzon	bp
PCSK9_1F	1	709
PCSK9_1R		
PCSK9_2F	2	356
PCSK9_2R		
PCSK9_3F	3	275
PCSK9_3R		
PCSK9_4-5F	4-5	706
PCSK9_4-5R		
PCSK9_6F	6	446
PCSK9_6R		
PCSK9_7F	7	416
PCSK9_7R		
PCSK9_8F	8	347
PCSK9_8R		
PCSK9_9F	9	378
PCSK9_9R		
PCSK9_10F	10	376
PCSK9_10R		
PCSK9_11F	11	382
PCSK9_11R		
PCSK9_12F	12	498
PCSK9_12R		

Çizelge 4.5 APOB geni için PZR’de kullanılan primerlerin ampikon büyüklükleri

Primer	Ekzon	bp
APOB_1F	1-2	707
APOB_2R		
APOB_3F.2	3	228
APOB_3R		
APOB_4F	4	333
APOB_4R		
APOB_5-6F	5-6	1429
APOB_5-6R		
APOB_7-8F	7-8	1271
APOB_7-8R		
APOB_9-10F	9-10	1360
APOB_9-10R		
APOB_11-12F	11-12	993
APOB_11-12R		
APOB_13F	13-14	975
APOB_14R		
APOB_15F	15	605
APOB_15R		
APOB_16F	16	538
APOB_16R		
APOB_17-18F	17-18	1125
APOB_17-18R		
APOB_19-20F	19-20	1257
APOB_19-20R		
APOB_21F.2	21	379
APOB_21R		
APOB_22F	22-23	690
APOB_23R		
APOB_24F	24	439
APOB_24R		
APOB_25F	25	814
APOB_25R		
APOB_26F	26 (1.parça)	2121
APOB_26.1R-2		
APOB_26.2F	26 (2.parça)	2168
APOB_26.2R-2		
APOB_26.3F	26 (3.parça)	2115
APOB_26.3R-2		
APOB_26.4F	26 (4.parça)	2052
APOB_26.4R		
APOB_27F	27-29	3820
APOB_29R		

Çizelge 4.6 PCSK9geni ileri ve geri primerlerin baz dizilimleri

Primer	İleri sekans	Primer	Geri sekans
Ekzon 1 F	AGTCCGGGGGTTCGGT TAAT	Ekzon 1 R	CACTTCCTCTCTTACATGGGGG
Ekzon 2 F	AAGTACACCTAGGGTT TGCTGG	Ekzon 2 R	CCTTCTGATTTTCAGCAATGGG C
Ekzon 3 F	TGGGATGTGGGGACA GGTTT	Ekzon 3 R	GGATTCAGCTCAGATGGGGT
Ekzon 4-5 F	GTGCTCTGTAGTTTCT GTGTGT	Ekzon 4-5 R	TGCCACAGCATTCTTGGTAG
Ekzon 6 F	TCTCCCAAGGGGTGA CCTT	Ekzon 6 R	GCGATGATGGAGGTTTCGAGC
Ekzon 7 F	GTATAGCAGTTGTCCA GCCCCA	Ekzon 7 R	GAAGGCACCATCAGGCCTACT T
Ekzon 8 F	CATCACCATCTTTCAC CATTACC	Ekzon 8 R	CAGAGCCCCATTCTCATTTAAT CC
Ekzon 9 F	TTAAGCCCTCCTCTCT CCTACCA	Ekzon 9 R	TTACAGAAGAGCTGGAGTCTG GAG
Ekzon 10 F	TCCTGTCTAGTCCCTTT CTGTG	Ekzon 10 R	AGTATGGAAGTCAAGTCAGG C
Ekzon 11 F	TTCTAGGTTTCCTAGC TCTTGCC	Ekzon 11 R	TGGTGGTGGCACAACTGAC
Ekzon 12 F	TTTGGTCAGCCATGGT GCAG	Ekzon 12 R	GAGAGAGGGACAAGTCGGAAC

Çizelge 4.7 APOB geni ileri ve geri primerlerin baz dizilimleri

Primer	İleri sekans	Primer	Geri sekans
Ekzon 1-2 F	GGCTTCCTATAAAATGGGG TGCG	Ekzon 1-2 R	ACACCACGATGCCATCTCAG
Ekzon 3 F	GCCCAGAATTGGCTGTCC TT	Ekzon 3 R	GAAAGCTGTGGGCTCTAGGT
Ekzon 4 F	GCCACCTCTCATTTCTTGA TAGAC	Ekzon 4 R	CAGTAATTCCCTGATCCACG ATG
Ekzon 5-6 F	AAAAGAAACTTCAGTGC CACCC	Ekzon 5-6 R	ATCCATCCCCGGAACCTTCT
Ekzon 7-8 F	AGGACTCCTGCTCCCTTC TA	Ekzon 7-8 R	ATCACAGGATGGGTGATGTC AG
Ekzon 9-10 F	CCCTGTGCTGATACTCCA CAA	Ekzon 9-10 R	TGAAAGTGGAAGGAGGGGT TC
Ekzon 11-12 F	ACTGGGGTTACCAAGTC CTGA	Ekzon 11-12 R	GCATGTTGACATAGCAGCAA AG
Ekzon 13-14 F	AGTGCTCTAGGAAACAC TGGC	Ekzon 13-14 R	AGTTTTCCTCTGGGTAGCTC CT
Ekzon 15 F	TGTCCTATCTGAACCTTA GCTGC	Ekzon 15 R	TGAGTCTGGTTTCTGGGCAC
Ekzon 16 F	AATAGGGACCCCTCCTCT CA	Ekzon 16 R	TAAGGGAGTCTGGGCGATCT
Ekzon 17-18 F	TCCTGATTCACTGAAAAC GGT	Ekzon 17-18 R	GGCAAATTCTGCAGGTACA T
Ekzon 19-20 F	GTGTGGACTGAGGGAAG ACA	Ekzon 19-20 R	AACTTCCATGAAGGCAGAGA CT
Ekzon 21 F	GCTTCTTACCACACATCT CTTG	Ekzon 21 R	CTCTGCCACTCTGATTGTAG AC
Ekzon 22-23 F	CTGTGGCTGTTTCTCTGA ACC	Ekzon 22-23 R	TTTGGAACCTTCCTGCACC T
Ekzon 24 F	TCTTTCCTAGTGGTATC AAAGGA	Ekzon 24 R	CATGGTTCAAGAAGCCTTGC
Ekzon 25 F	CCATGGAGACATCAACA AATGAGAA	Ekzon 25 R	AGCCAAAGTCCTTTCCTCCC T
Ekzon 26.1 F	AGTCTATTGCACAATTGG CCC	Ekzon 26.1 R	AATGGGAGGTTAATGGAGTG AACA
Ekzon 26.2 F	ACTTTTACTCAGTGAGCC CATCA	Ekzon 26.2 R	TTGTGTGTGAGATGTGGGGA
Ekzon 26.3 F	GCAGTGGCCCGTTCCAG ATA	Ekzon 26.3 R	CTTGTCAATCTTGTGGTGCC C
Ekzon 26.4 F	ATCTCAAGCTTTCTCTTC CAGAT	Ekzon 26.4 R	AGCTGTTTGTCTTGAATGAC ACT
Ekzon 27-29 F	ACTCTCCCGTGTATAATG CCAC	Ekzon 27-29 R	AATGCCCTCGTTTCACTGTCT

6 havuz için, 12 ekzonluk PCSK9 ve 29 ekzonluk APOB genleri için PZR'ler kurulmuştur. APOB 27-29. ekzonlar hariç *BIOLINE* firmasının *MyTaq* DNA polimerazı kullanılmıştır. Her ampikon için 21 µl *MyTaq* DNA polimeraz karışımı, 2'şer µl 10 pmol ileri ve geri primerler kullanılmış, üzerine 2 µl havuz DNAsından eklenmiştir. *BİORAD* T100 Thermal Cycler cihazında aşağıdaki protokol izlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 PCSK9 geni tüm ekzonları, APOB geni 27-29. ekzonlar hariç tüm ekzonlar için kullanılan PZR protokolü

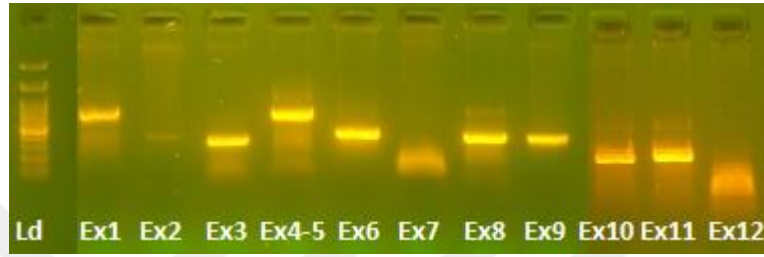
Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	10 dk	
95°C (Denatürasyon)	45 sn	45
60°C (Bağlanma)	45 sn	
72°C (Uzama)	45 sn	
72°C	10 dk	
12°C	5 dk	
Bitiş		

APOB geni 27-29. ekzonlar primer tasarımı gereği farklı bir protokol ile çalışılmıştır. 3820 bazçifti (bp) olan 27-29. ekzonları içeren bu reaksiyon için *Thermo Fisher Scientific* firmasının Long DNA polimeraz enzimi ile *BİORAD T100 Thermal Cycler* cihazında aşağıdaki protokol kullanılmıştır. (Çizelge 4.9).

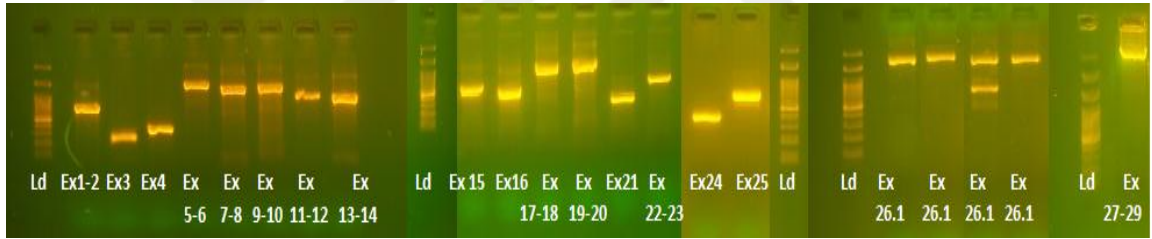
Çizelge 4.9 APOB geni 27-29. Ekzonlar için kullanılan PZR protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	1 dk	
95°C (Denatürasyon)	10 sn	45
60°C (Bağlanma)	1 dk	
72°C (Uzama)	2 dk	
72°C	5 dk	
12°C	5 dk	
Bitiş		

PZR sonunda amplikonlar, 300 ml %10 seyreltilmiş TBE çözeltisi ve 6 gr agaroz ile hazırlanan 15 µl %0.5'lik 15 µl EtBr ilaveli %2'lik agaroz jele, *Thermo Fisher Scientific* firmasının bromofenil mavisi ve ksilen siyenol FF içeren yükleme boyası kullanılarak yüklenmiştir. *BİORAD Power-Pac* elektroforez seti ile 175 V akımda 20 dk kadar yürütülmüştür. *BİORAD* görüntüleme cihazında UV ışık altında çekilen görüntüler kaydedilmiştir (Şekil 4.9 - 4.10).



Şekil 4.9 PCSK9 geni bölgesine ait jel görüntüsü



Şekil 4.10 APOB geni bölgesine ait jel görüntüsü

Görüntüleme sonrası jeldeki görüntüden yola çıkılarak PCSK9 ve APOB genlerinin dizilenme için uygun miktarlar belirlenmiş ve her havuz tek bir tüpte birleştirilmiştir. Reaksiyonun iyi çalıştığı amplikonlardan 3 µl, jel görüntüsü silik olan amplikonlardan 6-9 µl alınacak şekilde bu miktarlar belirlenmiştir.

4.4 Yeni Nesil Sekans İçin Örnek Hazırlama

NucleoFast 96 PZR kiti (*MACHAREY-NAGEL GmbH* kiti) yardımıyla örnekler saflaştırılmıştır. Pürifiye edilen örneğin kantitasyonu spektrofotometre ile yapılmıştır. DNA miktarı 0.2 ng/ul olarak standartize edilmiştir. Standartize edilen örnek, *İllumina*

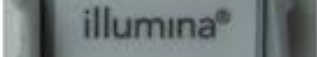
firmasının *Nextera XT* örnek hazırlama kiti kullanılarak yeni nesil sekansa hazır hale getirilmiştir.

Yeni nesil sekansa alınan örneklerin kütüphane hazırlığı uzun bir protokolü içerir. Örnekler sırasıyla tagmentasyon, indeksleme, nötralizasyon, pürifikasyon işlemlerinden geçirilerek *Illumina* firmasının Miseq cihazına yüklenmek üzere hazırlanır.

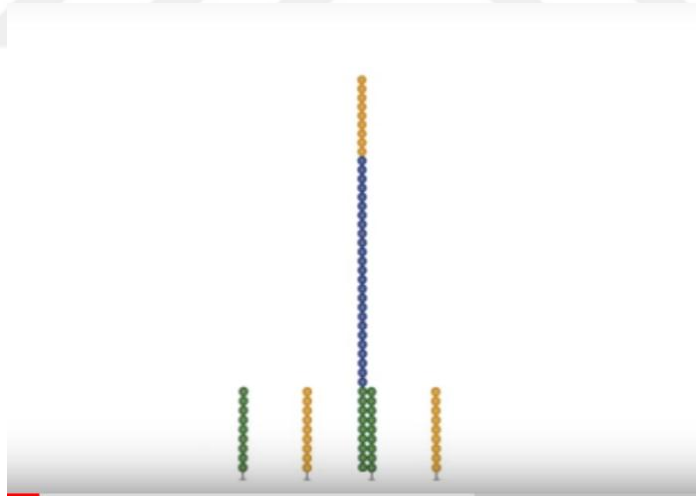


Şekil 4.11 Tüm gen dizi analizinin gerçekleştiği Illumina firmasının Miseq cihazı (<https://emea.illumina.com>.2020)

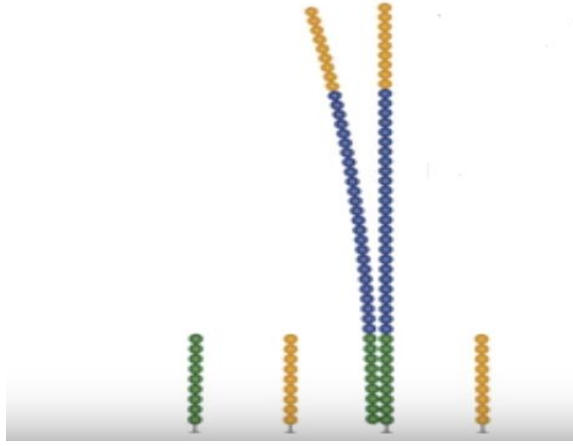
Miseq cihazı teknolojisi bir Yeni Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing) yöntemidir. İlk olarak tagmantasyon aşamasında; transpozomlar ile simültane olarak DNA fragmente edilir, adaptor ve barkodlar eklenir. Bu adaptörler kullanılan çip (flowcell) içerisindeki şeritlerde bulunan iki çeşit oligonun komplementeridir (Şekil 4.12). Fragmentteki adaptor bölgesi ile flowcelldeki şeritçiklerin yüzeyindeki oligonun eşleşmesi sonrası, polimeraz yardımı ile fragmentin komplementeri hybridize edilir



Şekil 4.12 Flowcell üzerindeki şeritlerin görünümü (www.ensembl.org)

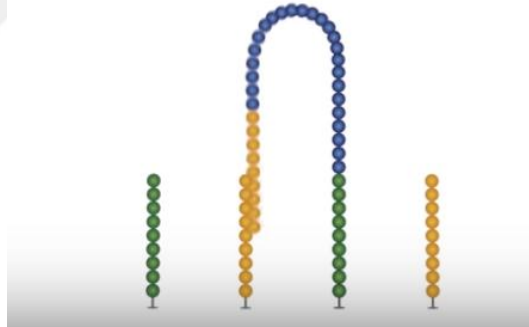


Şekil 4.13 Fragmentteki adaptor bölgesi ile flowcell yüzeyindeki oligonun eşleşmesi (www.emea.illumina.com 2016)

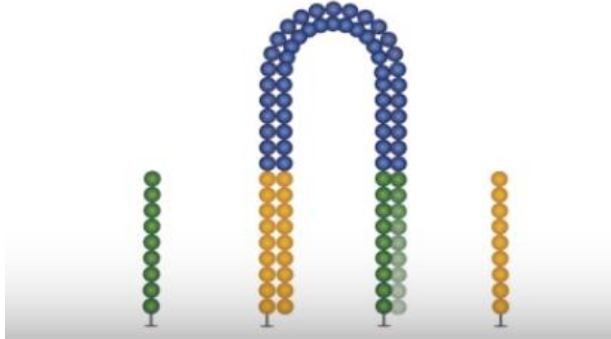


Şekil 4.14 İki iplikli yapının denatürasyonu (www.emea.illumina.com 2016)

Tek kalan iplik klonal olarak köprü şeklinde amplifiye olur. Bu süreçte iplik katlanır ve ikinci tip oligo ile adaptor bölgesi hibridize olur (Şekil 4.15) Polimeraz yardımı ile komplementer iplik oluşturulur (Şekil 4.16).

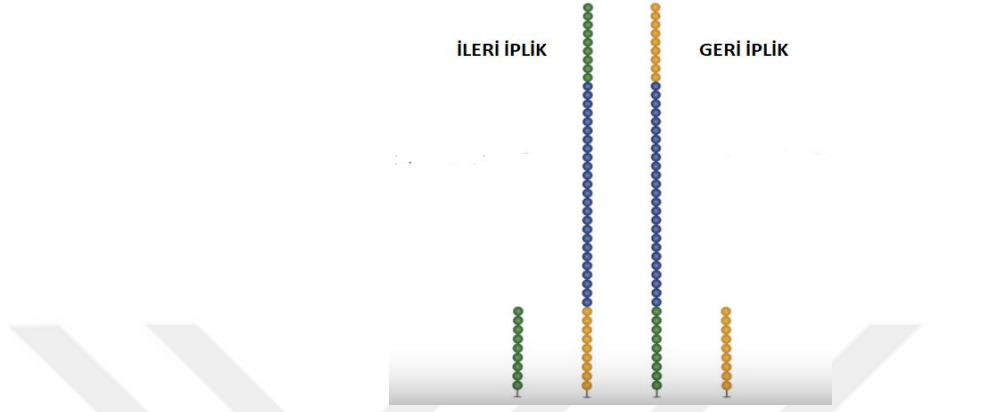


Şekil 4.15 Tekli ipliğin köprü amplifikasyonu (www.emea.illumina.com 2016)

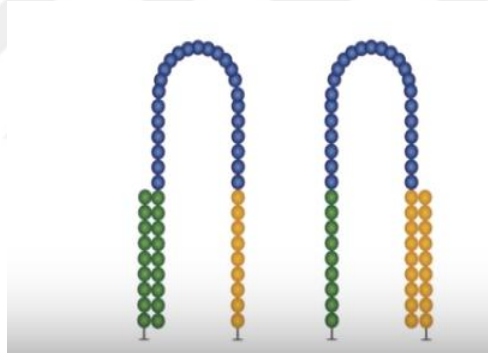


Şekil 4.16 Köprü amplifikasyonunda komplementer iplik oluşumu (www.emea.illumina.com 2016)

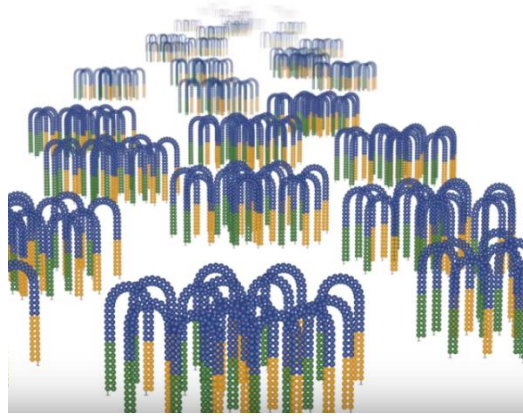
Çift halindeki iplik tekrar denature edilir, böylelikle iki tekli iplik oluşur (Şekil 4.17). Köprü amplifikasyonu tekrarlanır (Şekil 4.18). Fragmentlerin simultane olarak milyonlarca bu şekilde klonal amplifikasyonu oluşur (Şekil 4.19).



Şekil 4.17 Çiftli ipliğin denatürasyonu (www.emea.illumina.com 2016)

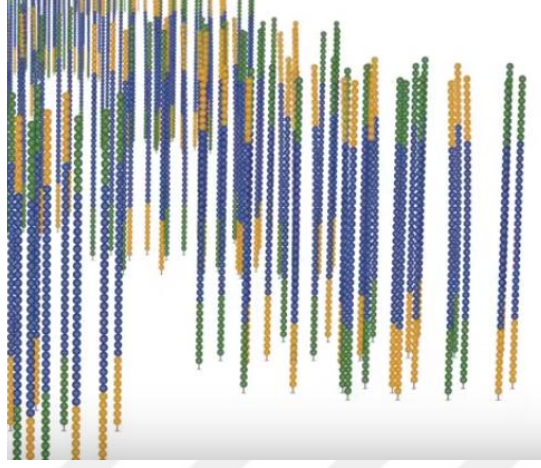


Şekil 4.18 Tekrarlanan köprü amplifikasyonu (www.emea.illumina.com 2016)

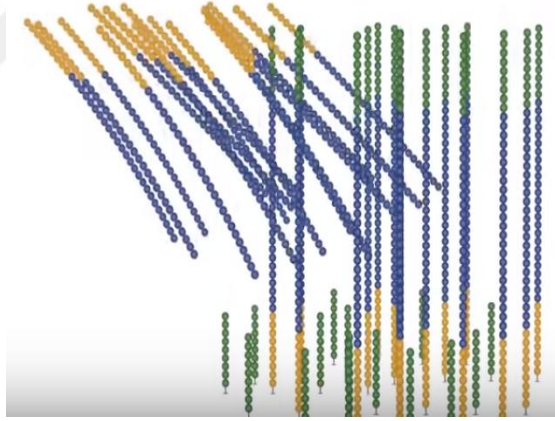


Şekil 4.19 Simültane tekrar eden köprü amplifikasyonları (www.emea.illumina.com 2016)

Köprü amplifikasyonundan sonra çiftli yapılar denature edilip geri iplikler temizlenip uzaklaştırılır. Geriye ileri iplikler kalır (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).

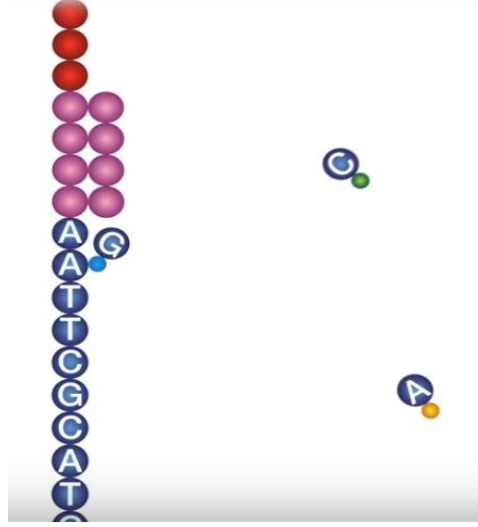


Şekil 4.20 Çift ipliklerin denatürasyonu (www.emea.illumina.com 2016)

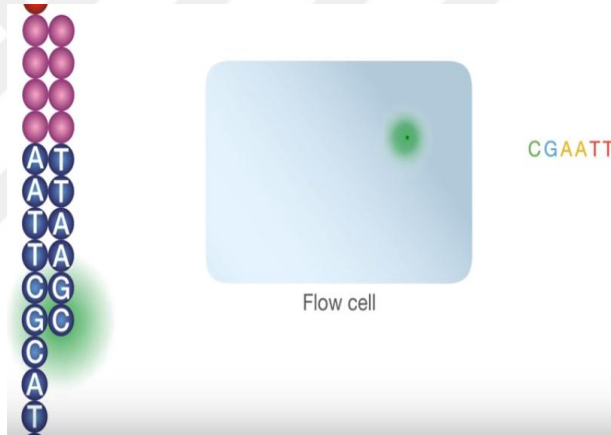


Şekil 4.21 Geri ipliklerin uzaklaştırılması (www.emea.illumina.com 2016)

Sekans primerinin uzaması ile ilk okuma başlar (Şekil 4.22). Zincire eklenen her doğru baz ile karakteristik floresan sinyal sağlanır (Şekil 4.23). Buna sentez ile sekanslama teknolojisi denir. İlk okuma sonrası okuma ürünü yıkanarak uzaklaştırılır.

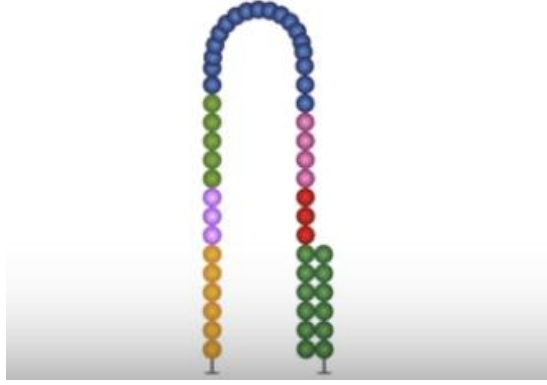


Şekil 4.22 İlk okumanın başlanması (www.emea.illumina.com 2016)

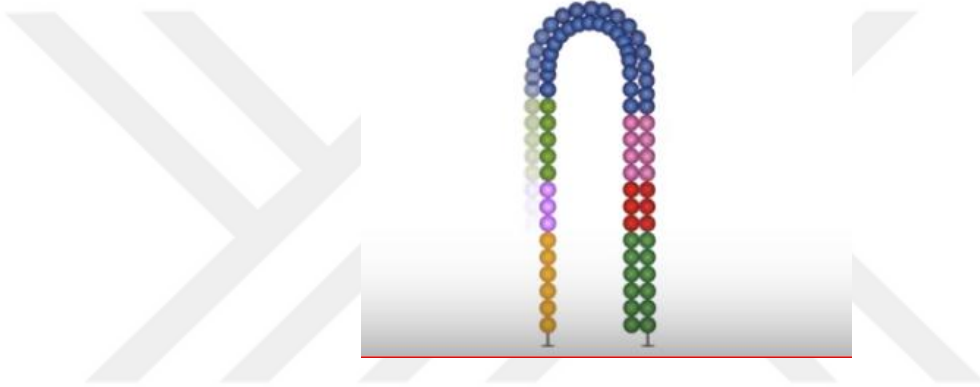


Şekil 4.23 Doğru bazın eşleşmesi ile sinyal oluşması (www.emea.illumina.com 2016)

Birinci okuma ürünü yıkarak uzaklaştırıldıktan sonra iplik ile hibridize olan birinci indeks dizisi için benzer okuma tekrarlanır. İndeks dizileri barkod olarak kullanılmakta ve gen havuzlarını ayırt etmede rol oynamakta olan kısa dizilerdir. Birinci indeks okuma ürünü de yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, iplik ikinci oligo ile eşleşerek köprü oluşturur (Şekil 4.24). İkinci indeks okumasının ardından yapılan yıkama sonrası ikinci indeks primeri de uzaklaştırılır. Polimeraz ile ikinci oligonun uzaması sağlanarak çift iplikli köprü ampflifikasyonu gerçekleştirilir (Şekil 4.25).

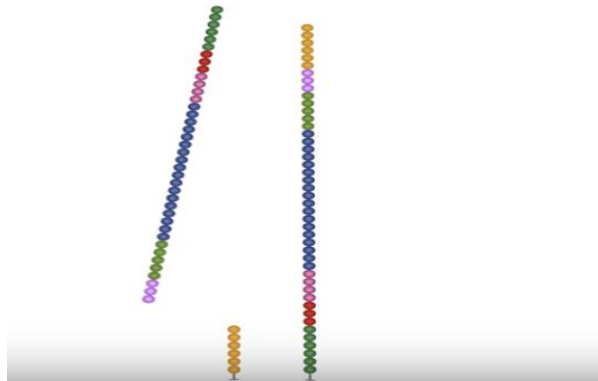


Şekil 4.24 İkinci indeks okuması için köprü (www.emea.illumina.com 2016)



Şekil 4.25 Çift iplikli köprü amplifikasyonu oluşumu (www.emea.illumina.com 2016)

İki iplikli DNA açılıp, ileri iplik uzaklaştırılır ve ikinci okuma tekrar sekans primeri ile başlar (Şekil 4.26). Bu şekilde ardarda okumalar ile veriler elde edilmiş olur (Şekil 4.27).



Şekil 4.26 İki iplikli yapının denature edilip, ileri ipliğin uzaklaştırılması (www.emea.illumina.com 2016)



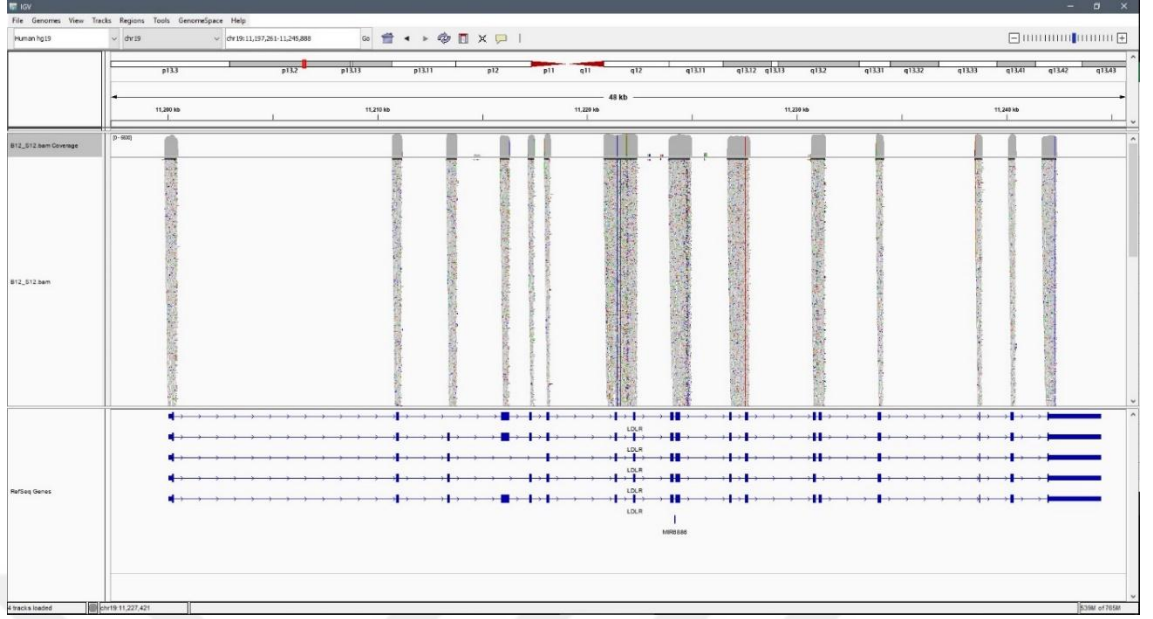
AGAAACAAAAG GCTAAGG
TCCTTCTTATT TCAGCAGT
AACAAA TGGCTAAGGCTT
TTGACAAAC GCCGTACTA
CTTATTCTT GCAGTAGTAA
AGAAACAAA TGGCTAAGG
TCCTTACTACCTCAGCAGT
AACAAAA GGCTAAGGCTT
TTGA CTTACGCCGTACTA
CTTATTCT AGCAGTAGTAA
AGAAA TCAATGGCTAAGG
TCCTTCTTACCTCAGCAGT
AACAAAAGG CTAAGGCTT

Şekil 4.27 Tekrarlanan okuma sonrası verilerin elde edilmesi (www.emea.illumina.com 2016)

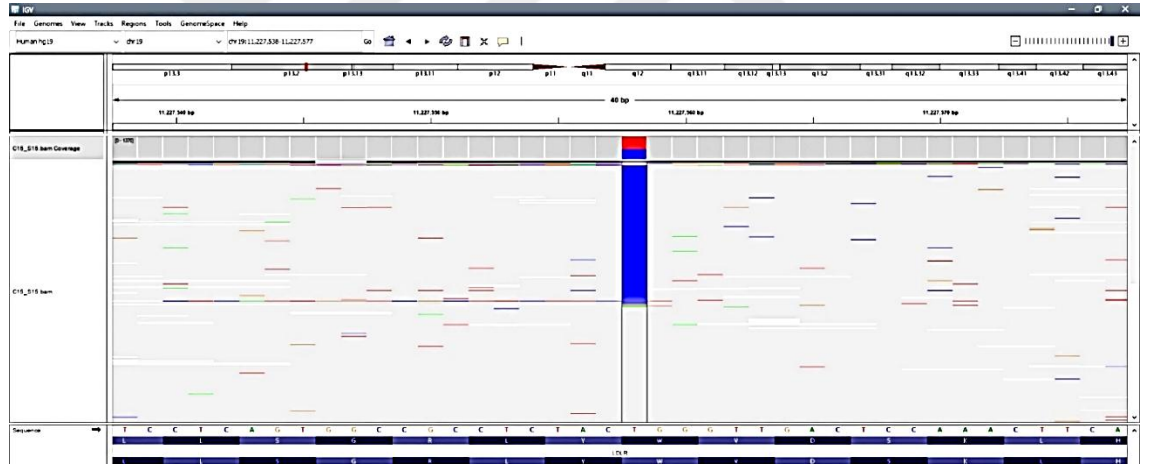
4.5 DNA Dizi Analizi

Illumina firmasının *Miseq* cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kütüphane cihaza yüklendikten yaklaşık bir buçuk gün sonra okuma tamamlanmış, datalar bam. dosyası olarak çevrilmiştir. Dizi analizi, Broad Institute tarafınca geliştirilen IGV 2.3 yazılımı kullanılmıştır. Bu yazılım bam. ve bam.bai dosyalarını kullanır (Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31).

Saptanan değişimler protein ve cDNA pozisyonları ile VARSOME ve ClinVar veritabanlarına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33). Bulunan değişimlerin hasarlayıcı etki sınıflandırması ACMG kılavuzunca yapılmıştır (Çizelge 4.10).



Şekil 4.28 LDLR geninin IGV görüntüsü



Şekil 4.29 LDLR genindeki W577R mutasyonunun IGV görüntüsü

varsome LDLR W577R Search

chr19-11227558-T-C chr19-11227558-T-A

Link a publication Classify Community contributions Favorites

Chromosome: chr19 Position: 11227558 REF Sequence: T ALT Sequence: C Variant type: SNV Cytoband: 19p13.2 HGVS: NM_000527.4:c.1729T>C (p.Trp577Arg) RS ID: rs879255000 | dbSNP

UCSC genome browser Mastermind TrAP Score

Gene symbol: LDLR

This variant has been viewed 60 times on VarSome.

Connect with past and future viewers of this variant...

ACMG Classification - Educational use only Version: 8.0.4 Terms of use Documentation Options

Verdict: Likely Pathogenic

Transcript: NM_000527.4, canonical, protein length 861, gene LDLR, missense variant

Rules:

PVS1 ✓	PS1 ✓	PS2 ✓	PS3 ✓	PS4	PM1 ✓	PM2 ✓	PM3
PM4 ✓	PM5 ✓	PM6 ✓	PP1 ✓	PP2 ✓	PP3 ✓	PP4	PP5 ✓
BS1 ✓	BS2 ✓	BS3 ✓	BS4 ✓	BS5	BS6	BS7	BS8

https://varsome.com/variant/hq19/LDLR W577R#transcripts

Şekil 4.30 W577R mutasyonunun VARSOME veritabanında aratılması

ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/252001/ ClinVar Genomic variation as it relates to human health Search ClinVar

Advanced search

About Access Submit Stats FTP Help Was this helpful? Print Download

NM_000527.4(LDLR):c.1729T>C (p.Trp577Arg) Cite this record

Interpretation: Pathogenic/Likely pathogenic

Review status: ★★☆☆ criteria provided, multiple submitters, no conflicts

Submissions: 7 (Most recent: Mar 28, 2019)

Last evaluated: Aug 20, 2018

Accession: VCV000252001.2

Variation ID: 252001

Description: single nucleotide variant

Variant details

Conditions

Gene(s)

NM_000527.4(LDLR):c.1729T>C (p.Trp577Arg)

Allele ID: 246301

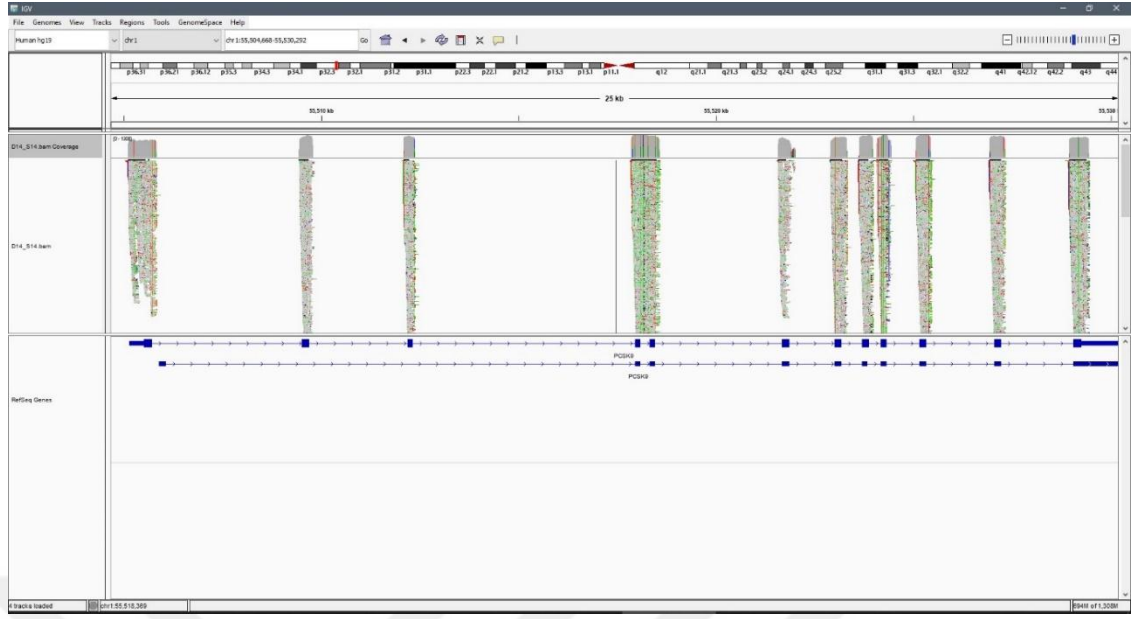
Variant type: single nucleotide variant

Variant length: 1 bp

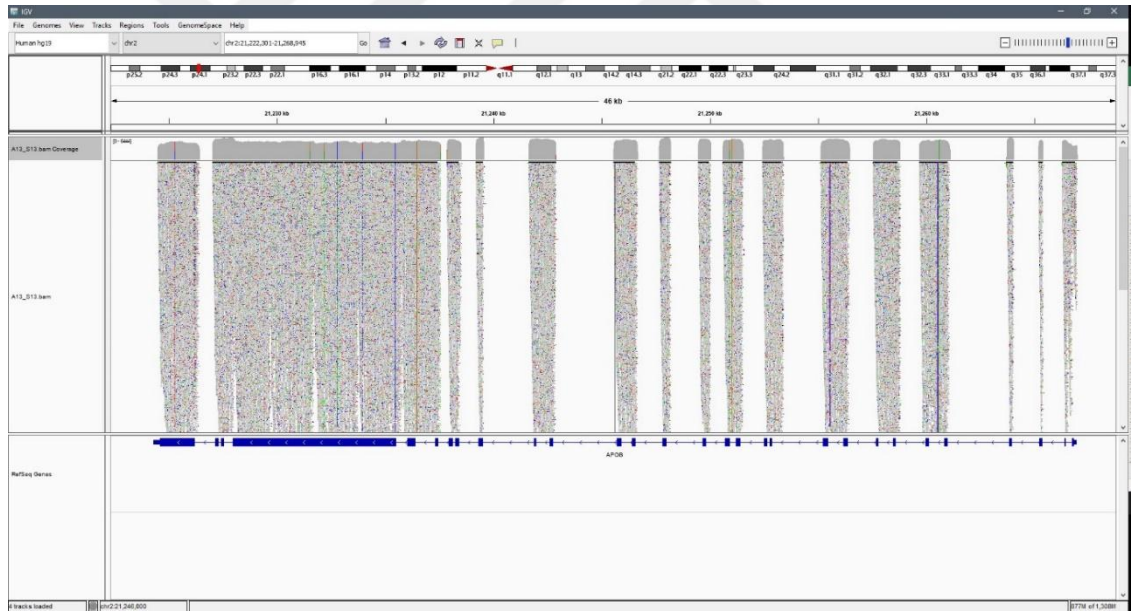
Cytogenetic location: 19p13.2

Genomic location: 19: 11116882 (GRCh38) GRCh38 UCSC

Şekil 4.31 W577R mutasyonunun ClinVar veritabanında aratılması



Şekil 4.32 PCSK9 geninin IGV görüntüsü



Şekil 4.33 APOB geninin IGV görüntüsü

Çizelge 4.10 ACMG varyant sınıflandırması

Sınıf	Hasarlayıcı Etki	Patojenite Olasılığı	Açıklama
1	Patojenik	>%99	Hastalık yapıcı etkisi yeterli verilerle gösterilmiş değişiklikler.
2	Olası patojenik	%99-95	Hastalık yapıcı etkisinin olduğu yönünde güçlü veriler bulunan değişiklikler.
3	Hasarlayıcı etkisi bilinmeyen varyant	%5-95	Hastalık yapıcı etkisi tartışmalı olan değişiklikler.
4	Olası hastalık yapıcı etkisi bulunmayan (Olası benin)	%1-5	Hastalık yapıcı etkisinin olmadığı yönünde güçlü veriler bulunan değişiklikler.
5	Hastalık yapıcı etkisi bulunmayan (Benin)	<%1	Hastalık yapıcı etkisinin olmadığı yeterli verilerle gösterilmiş değişiklikler.

Saptanan değişimlerin ekzonlara dağılımına, hasarlayıcı etkilerine ve mutasyon birliteliği bulunan hastaların bulunmayan hastalara göre oranına bakılmıştır.

Çalışmalar, İNTERGEN Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi moleküler genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Demografik bulgular

213S147 numaralı TÜBİTAK projesince çalışmaya katılan hastalardan yetişkin ve çocuk olguların eşitliği gözetlenerek, tüm coğrafi bölgelere ait 52 tane LDLR geni değişimi taşıyan hastanın örneği tez kapsamında çalışılmıştır. Herhangi bir yaş aralığı ve cinsiyet kriteri olmaksızın LDL kolesterolü yüksekliği şikayeti bulunan hastalardan elde edilen örneklerde, LDL kolesterol düzeyi erişkin hastalar için 200mg/dl ve üstü ,18 yaş altı hastalar için LDL kolesterol düzeyi 160 mg/dl ve üstü olması şart aranmıştır. Türkiye’de yaşayan yabancı uyruklu vatandaşlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

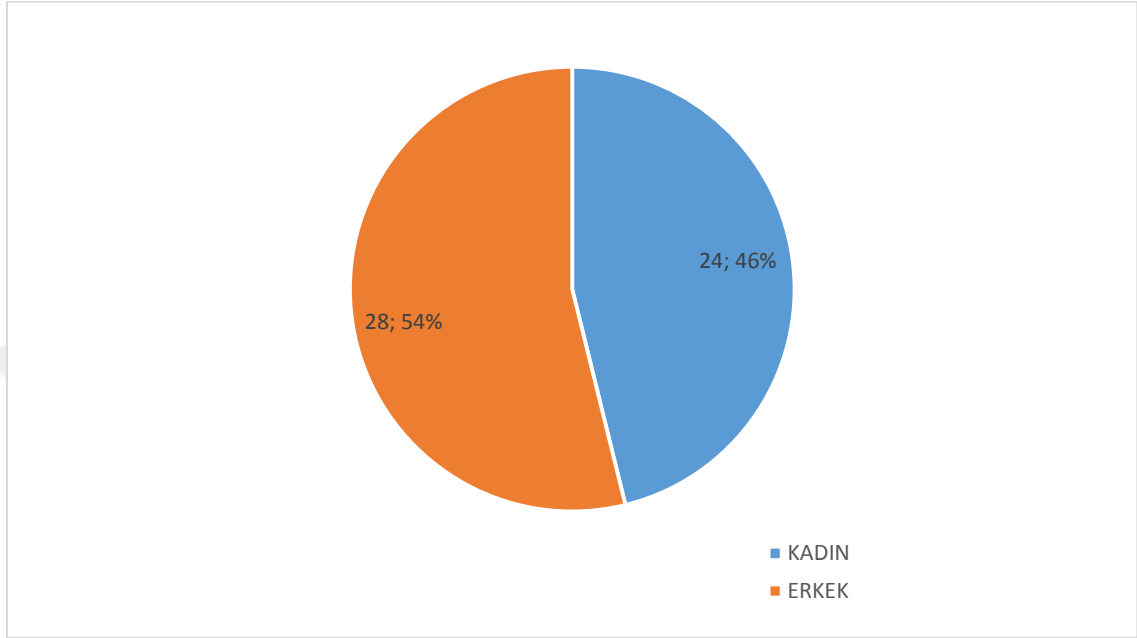
Çizelge 5.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet, nüfusa kayıtlı oldukları il ve LDL-Kolesterol seviyeleri

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Nüfusa Kayıt	LDL-K Düzeyi (mg/dl)
1	61	E	Çorum	278
2	43	E	Sivas	290
3	58	K	Çanakkale	286
4	13	E	Artvin	165
5	12	K	Kastamonu	276
6	13	E	Kastamonu	191
7	8	E	Kars	227
8	8	K	Siirt	180
9	6	K	İstanbul	205
10	52	E	Kayseri	368
11	65	E	Batman	290
12	44	E	Kahramanmaraş	243
13	46	K	Adana	290
14	54	E	Adana	290
15	17	K	Muğla	215
16	52	K	Adana	200
17	39	E	Kayseri	329
18	12	K	Adana	264
19	4	E	Hatay	579
20	45	E	Bursa	290
21	37	E	Aydın	298

Çizelge 5.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş, cinsiyet, nüfusa kayıtlı oldukları il ve LDL-Kolesterol seviyeleri (devam)

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Nüfusa Kayıt	LDL-K Düzeyi (mg/dl)
22	25	K	Karaman	551
23	36	E	Balıkesir	290
24	31	K	Bursa	290
25	42	E	Konya	269
26	34	K	Konya	433
27	47	E	Konya	321
28	10	K	Yozgat	274
29	8	E	Ankara	245
30	19	K	Yozgat	202
31	8	K	İzmir	284
32	16	K	İzmir	297
33	10	K	Yozgat	273
34	10	E	Manisa	291
35	3	E	Muğla	680
36	9	K	Ankara	232
37	16	E	İzmir	196
38	57	E	Balıkesir	265
39	7	E	İzmir	391
40	12	K	Bitlis	205
41	16	K	Manisa	497
42	9	K	Ankara	153
43	16	E	Ardahan	232
44	18	K	Manisa	259
45	14	K	Balıkesir	214
46	31	K	Van	229
47	38	E	Bitlis	238
48	44	E	İçel	277
49	17	E	Gaziantep	361
50	4	E	İzmir	315
51	40	K	Urfa	308
52	49	E	Van	330

52 hastanın cinsiyet dağılımı; 28 (%54) kadın, 24 (%46) erkek hasta şeklindedir. Çalışılan erkek hastaların yaş ortalaması 31.1 iken, kadın hastaların yaş ortalaması 21.4'tür (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyet oranları

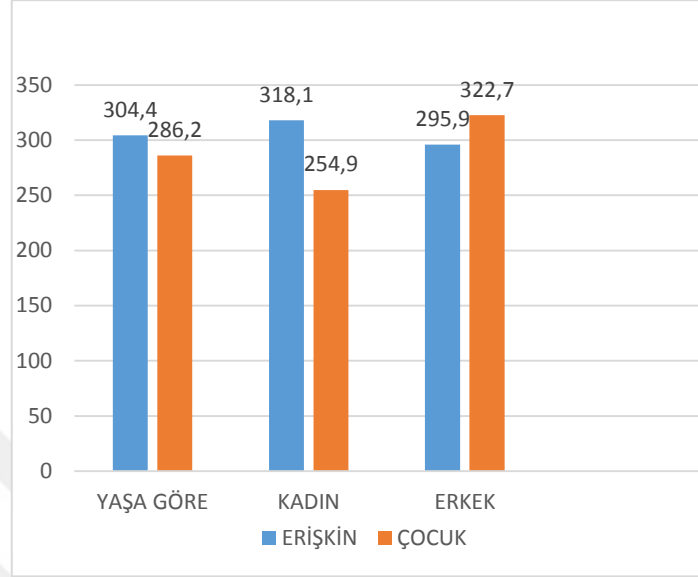
Erişkin ve çocuk hasta sayısı (n=26) eşit olup, çalışılan hastaların yaş ortalaması yaş ortalaması 26,6'dır. 16 yetişkin erkek, 10 yetişkin kadın ve 12 erkek çocuk, 14 kız çocuk hasta çalışılmıştır (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2 Cinsiyetine göre hastaların yaş gruplaması

52 HASTA	Erkek	Kadın
Yetişkin	16	10
Çocuk	12	14
Yaş Ortalaması	31.1	21.4

Erişkin hastalar için LDL kolesterol düzeyinde ortalama 304,4 mg/dl, çocuklar için 286.2 mg/dl olarak bulunmuştur. Erkek erişkin hastalarda LDL Kolesterol ortalaması

295,9 mg/dl, çocuklarda 322,7 mg/dl olarak; kadın erişkin hastalarda ortalama 318,1, çocuklarda 254,9 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.2 Hastaların yaşa ve cinsiyete göre mg/dl cinsinden LDL-Kolesterol düzeyi ortalamaları

5.2 Genetik Bulgular

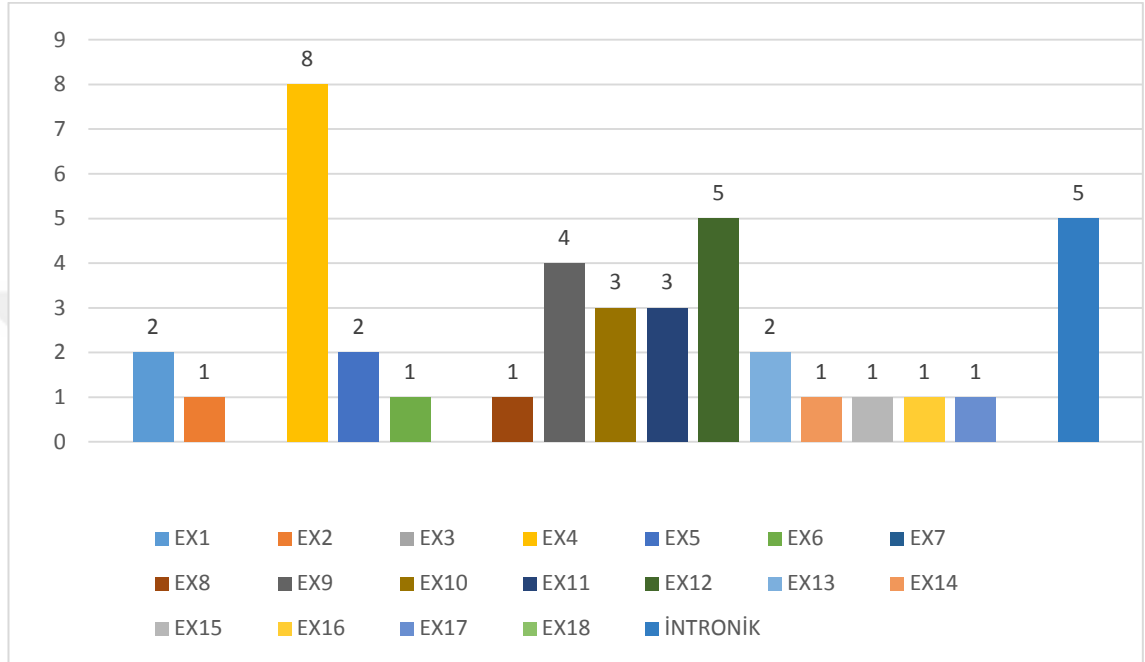
5.2.1 LDLR sonuçları

LDLR tüm gen dizi analizi yapılan ve değişim saptanan 52 hastada, 41 farklı varyant saptanmıştır. 5(%9,6) hastada 577nci kodonda değişim saptanmıştır. Bunlardan 2(%5,77) olgu W577R, 1 olgu W577G, 1 olgu W577C varyantlarıdır. 3(%5,77) hastada V429M, 3(%5,77) hastada c.1476_1477delCT, 3(5,77) hastada IVS11-10G>A varyantları saptanmıştır. G20R, C63G, D139N, D354G, I506F, IVS14+5G>A, Q739X, IVS16+5G>T varyantlarından 2'şer (%3,8) hastada belirlenmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3 LDLR geninde tespit edilen varyantların adı, değişim türü, hasarlayıcı etkisi ve bulunduğu bölgeler

Değişim	Değişim türü	Hasarlayıcı Etki	Bölge
c.40dupT	Çerçeve kayması	Patojenik	Ekzon 1
G20R	Yanlış anlamlı	Belirsiz öneme sahip varyant	Ekzon 1
C63G	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 2
C222R	Yanlış anlamlı	Patojenik	Ekzon 4
S177P	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 4
E140K	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 4
E179K	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 4
c.502delG	Çerçeve kayması	Olası patojenik	Ekzon 4
D139N	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 4
c.725delC	Çerçeve kayması	Olası patojenik	Ekzon 4
C167R	Yanlış anlamlı	Belirsiz öneme sahip varyant	Ekzon 4
Q254P	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 5
R257W	Yanlış anlamlı	Belirsiz öneme sahip varyant	Ekzon 5
F282L	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 6
D354G	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 8
R416W	Yanlış anlamlı	Patojenik	Ekzon 9
V429M	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 9
F403L	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 9
Y442H	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 9
D492N	Yanlış anlamlı	Patojenik	Ekzon 10
I488T	Yanlış anlamlı	Patojenik	Ekzon 10
c.1476-1477delCT	Çerçeve kayması	Patojenik	Ekzon 10
G549D	Yanlış anlamlı	Patojenik	Ekzon 11
I560F	Yanlış anlamlı	Patojenik	Ekzon 11
T534N	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 11
W577R	Yanlış anlamlı	Patojenik	Ekzon 12
W577C	Yanlış anlamlı	Patojenik	Ekzon 12
K603X	Anlamsız	Patojenik	Ekzon 12
W577G	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 12
p.579_582dupDSKL	Çerçeve kayması	Olası patojenik	Ekzon 12
D622Y	Yanlış anlamlı	Belirsiz öneme sahip varyant	Ekzon 13
P649L	Yanlış anlamlı	Belirsiz öneme sahip varyant	Ekzon 13
c.2119_2140+2del24bp	Splice bölgesi kaybı	Patojenik	Ekzon 14
Q739X	Anlamsız	Olası patojenik	Ekzon 15
I796S	Yanlış anlamlı	Olası patojenik	Ekzon 16
c.2416dupG	Çerçeve kayması	Patojenik	Ekzon 17
IVS5-1G>A	İntronik	Olası patojenik	İntron 4
IVS11-10C>A	İntronik	Belirsiz öneme sahip varyant	İntron 10
IVS15-3C>A	İntronik	Belirsiz öneme sahip varyant	İntron 14
IVS14+5G>A	İntronik	Olası hastalık yapıcı etkisi bulunmayan	İntron 14
IVS16+5G>T	İntronik	Olası hastalık yapıcı etkisi bulunmayan	İntron 16

4. ekzonda 8 değişim saptanarak en fazla mutasyon görülen ekzon olmuştur. 3, 7 ve 18. ekzonda mutasyon varlığı tespit edilmemiştir. 12. ekzonda 5, 9. ekzonda 4, 10. ve 11. ekzonda 3,1.,5., ve 13. ekzonlarda 2 ,6,8,14,15,16,17. ekzonlarda 1 farklı varyant tespit edilmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3 LDLR geninde bulunan varyantların bulunduğu bölgelere göre dağılımı

Hastalardan 39'u heterozigot, 8'i homozigot, 5'i birleşik heterozigot (compound heterozigot) mutasyon taşımaktadır.

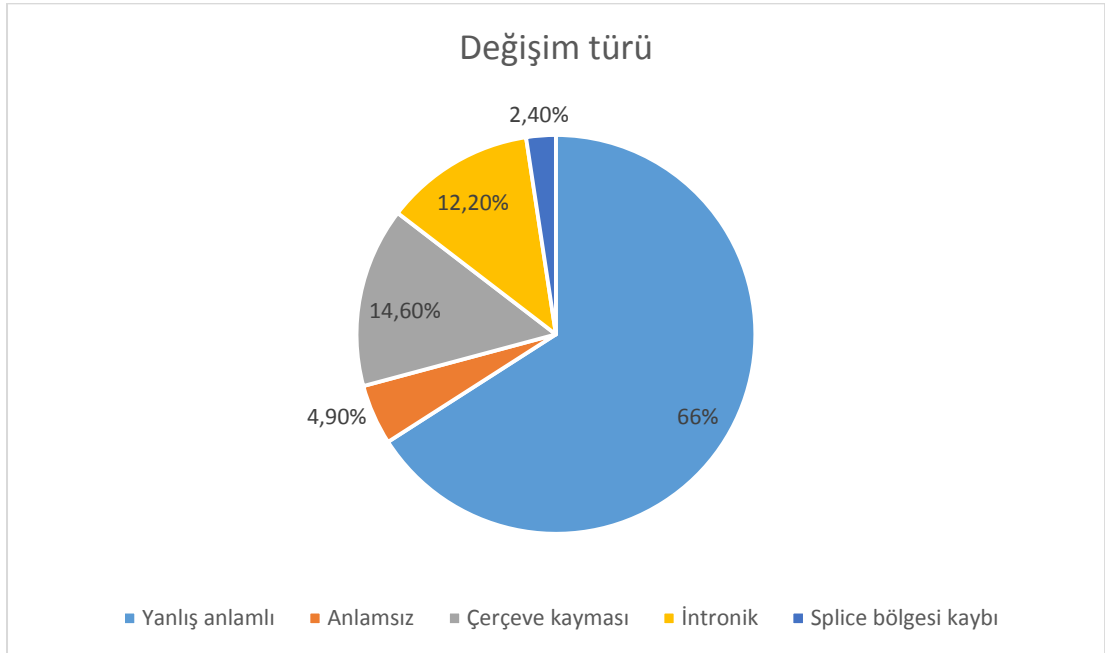
Birleşik heterozigot olan 5 hastadan, 4ünün mutasyonlarından biri intronik mutasyondur. Bunlardan 2si IVS14+5G>A, 2si IVS11-10G>A değişimidir. 1 hastanın her iki mutasyonu da ekzon bölgesindedir (Çizelge 5.4).

Çizelge 5.4 LDLR geninde birleşik heterozigot olan hastaların değişimleri

1. Heterozigot Değişim	2. Heterozigot Değişim
D622Y	IVS14+5G>A
V429M	IVS11-10G>A
c.2119_2140+2del24bp	IVS11-10G>A
C167R	IVS14+5G>A
G20R	p.579_582dupDSKL

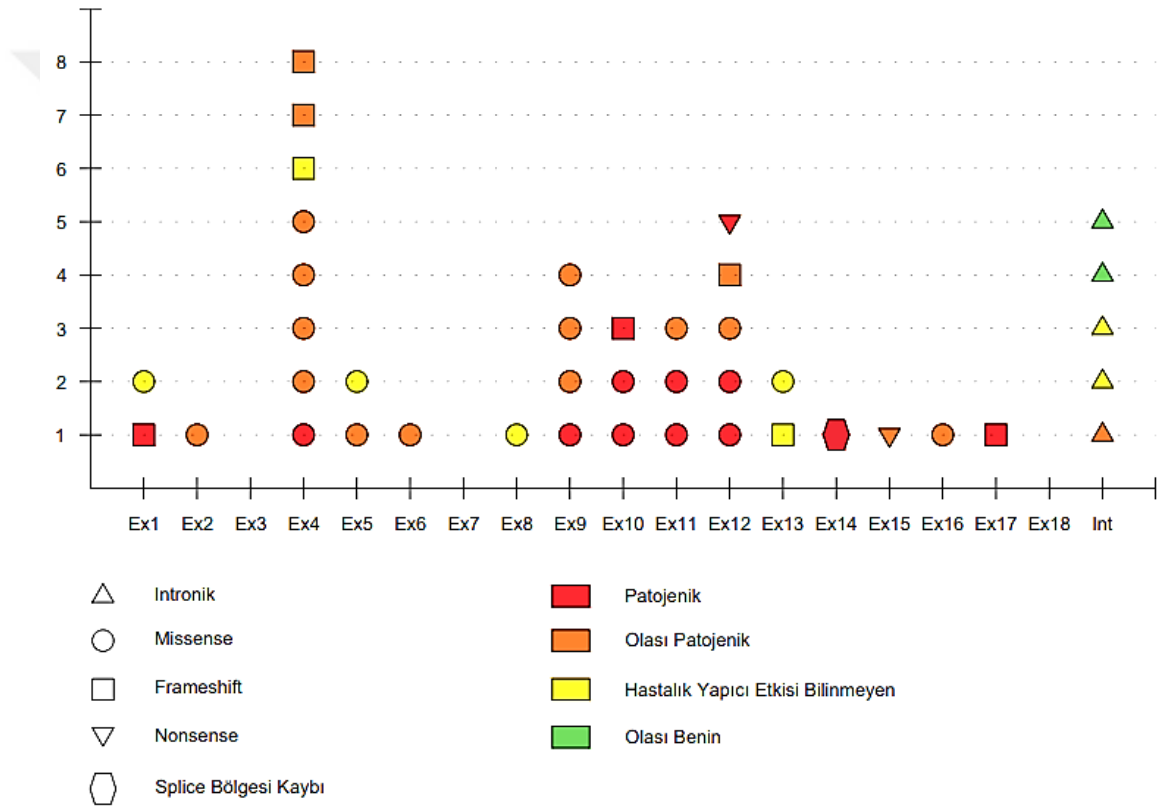
41 değişimin 32'si ACMG kılavuzu değerlendirmesine göre hastalık yapıcı etkiye sahip (Sınıf 1 ve 2) iken, 7 'si hasarlayıcı etkisi henüz bilinmeyen sınıfa dahil olan (Sınıf 3), kalan 2' si hasarlayıcı olmayan değişimlerdir (Çizelge 5.3).

41 varyantın %66 'sı (n=27) yanlış anlamlı (missense) değişim , %14,6'sı (n=6) çerçeve kayması değişimi, %12,2'si (n=5) intronik, %4,9'u (n=2) anlamsız (nonsense) değişim, %2,4'ü (n=1) splice bölgesinin kaybına neden olan değişimdir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4 LDLR geninde bulunan 41 farklı varyantın değişim türü oranları

Missense değişimlerin 8'i patojenik, 14' üolası patojenik, 5i hasarlayıcı etkisi henüz bilinmeyen değişimdir. Frameshift değişimlerin 3ü patojenik, 3ü olası patojenik olarak sınıflandırılmıştır. 2 nonsense değişimin biri patojen, biri olası patojendir. İntronik değişimlerden yalnızca biri olası patojenik iken, 2si etkisi henüz bilinmeyen, 2' si olası benin olarak sınıflandırılmıştır. Splice bölgesinde kayba sebep olan mutasyon ise patojeniktir. Hastalığa sebep olma olasılığı yüksek değişimlerin en çok görüldüğü ekzonla 9-12 ekzon aralığıdır. Patojenitesi en düşük değişimler ise intronik bölgedeki değişimlerdir (Şekil 5.5)



Şekil 5.5 LDLR geninde tespit edilen değişimlerin bulunduğu ekzonlar, değişim türlerini ve patojenitelerine dair şematik gösterim

5.2.2 APOB sonuçları

LDLR geninde değişim tespit edilen bu 52 hastanın 3'ünde, aynı zamanda APOB değişimi görülmüştür. Bu değişimlerin üçü de farklı değişimler olup; 2'si ekzonda, 1'i intronik bölgededir. R3527Q ve V4265A değişimleri anlamlı anlamlı değişim, IVS14-5T>A değişimi intronik değişimdir. Yalnızca R3527Q değişiminin patojenik etkisi bilinmektedir (Çizelge 5.5). Bu değişimin frekansı 3634 alelde 1'dir. Hastalık yapıcı etkisi belirsiz olan intronik değişimin frekansı veri tabanlarında 1389:1 olarak yer almaktayken, V4265A değişimin frekansı 195:1'dir. (Çizelge 5.5).

Çizelge 5.5 LDLR geninde mutasyon taşıyan hastalarda bulunan APOB değişimlerinin adı, bölgesi, değişim türü ve hasarlayıcı etkisi

Değişim	Bölge	Zigotite	Değişim Türü	Hasarlayıcı Etki
p.V4265A	Ekzon 29	Heterozigot	Yanlış anlamlı	Olası hastalık yapıcı etkisi bulunmayan
IVS14-5T>A	İntron13	Heterozigot	İntronik	Belirsiz öneme sahip varyant
p.R3527Q	Ekzon 25	Heterozigot	Yanlış anlamlı	Patojenik

5.2.3 PCSK9 sonuçları

LDLR geninde değişim tespit edilen 52 hastanın yalnızca birinde PCSK9 değişimi saptanmıştır. Bu değişim ekzon 10'da yer alan p.A522T değişimidir ve hastalık yapıcı etkisi düşük, sınıf 4 olarak sınıflandırılmıştır. Veri tabanlarına göre alel frekansının 33310:1 olması görülme sıklığının düşüklüğünü göstermektedir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ailesel hiperkolesterolemi hastalığı otozomal dominant geçişli tek gen hastalığıdır. Olguların %85'i LDLR genindeki değişim sonucu meydana gelmektedir. Ailesel hiperkolesterolemiye neden olan başlıca diğer genler APOB ve PCSK9 genleridir. Ailesel hiperkolesteroleminin, homozigot ve heterozigot olmak üzere iki formu vardır. Alellerden ikisinin de etkilenmiş olduğu homozigot formu, heterozigot formuna sahip olgulara göre daha şiddetli klinik göstermektedir. Tez çalışmasındaki amaç mutasyonun en yaygın görüldüğü gen olan LDLR genindeki değişimlere; PCSK9 ve APOB genlerinde herhangi bir değişimin eşlik durumunun araştırılmasıdır. Bu duruma çifte (double) heterozigot adı verilmektedir.

Daha önce literatürde yer alan bir çalışmada (France vd 2016), hastaların %91' inin LDLR, %8' inin APOB, %1' inin PCSK9 geninde bulunan değişiklik sonucu AH hastası olduğu raporlanmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak homozigot ,birleşik heterozigot ve double heterozigot değişimlerin frekansı hakkında sayısal tahminler; %90 LDLR geninde birleşik heterozigot ve homozigot, %8 APOB ve LDLR genlerinde çifte heterozigot , %1 LDLR ve PCSK9 genlerinde çifte heterozigot, %1 APOB ve PCSK9 genlerinde çifte heterozigot, %0,7 APOB geninde homozigot ve %0,01 PCSK9 geninde homozigot mutasyon bulunduğu yönündedir.

Tez çalışmasının benzeri bir çalışma Hollanda'da 45 hasta ile yapılmıştır. LDLR geninde mutasyonu bulunan 45 hastadan, 23' ünün APOB, 5'inin PCSK9 geninde olmak üzere toplam 28 hastanın çifte heterozigot mutasyon taşıdığı raporlanmıştır. Bu çalışmada hastalar aile üyeleridir. Bu sebeple tez çalışmasına dair veriler ile arasında farklılık bulunmaktadır (Sjouke vd 2016).

AH kliniği gösteren ve aralarında kan bağı bulunmayan 33 hasta ile yapılan benzeri çalışmada; bir hastada çifte heterozigotluk saptanmıştır. Hastalarda 20 farklı LDLR varyantı, bir APOB varyantının (R3527Q) bulunduğu gözlenmiştir (Banares vd 2017).

Türkiye'nin yedi coğrafik bölgesinden ulaşılan ve akrabalık bağları bulunmayan ve LDLR geninde mutasyon taşıyan 52 hastadan; 39'unun (%75) heterozigot AH, 8'inin (%15,4) homozigot AH, 5'inin (%9,6) birleşik heterozigot (compound heterozigot) AH hastası olduğu saptanmıştır. 52 hastadan 4'ü (%7,7) çifte heterozigottur. Hastaların 3'ü (%5,7) LDLR ve APOB geninde, biri (%1,9) LDLR ve PCSK9 geninde çifte heterozigottur (Çizelge 6.1).

Çizelge 6.1 Benzeri çalışmalar ile çifte heterozigotluk oranlarının karşılaştırılması

	LDLR ve APOB Genlerinde Çifte Heterozigotluk	LDLR ve PCSK9 Genlerinde Çifte Heterozigotluk
İstatistiklere dayalı tahmini oranlar (France vd 2017)	%8	%1
LDLR geninde mutasyon taşıyan 33 indeks hastalık çalışmaya ait oranlar (Banares vd 2017)	%3	0
LDLR geninde mutasyon taşıyan 45 aile üyesini kapsayan çalışmaya ait oranlar (Sjouke vd 2016)	%51	%11
LDLR geninde mutasyon taşıyan 52 indeks hastalık çalışmaya ait sonuçlar	%5,7	%1,9

Hiperkolesterolemi ile ilgili genetik çalışmalara önem veren Hollandalı bilim insanları, 104 682 hasta taramış, 24 homozigot (20 LDLR, 4 APOB geninde), 25 LDLR geninde birleşik heterozigot, 25 LDLR ve APOB genlerinde mutasyon taşıyan çifte heterozigot vaka saptanmıştır (Sjouke vd 2015). Hollanda'da 1191 hasta grubu ile yapılan bir diğer çalışmada, 7 hastada çifte heterozigotluk saptanmıştır. Bu hastaların 6'sı LDLR ve APOB geninde, 1'i LDLR ve PCSK9 geninde çift heterozigot mutasyona sahiptir (Hartgers vd 2018).

İspanya hiperkolesterolemi çalışmalarına önem veren bir diğer ülkedir. 1996 yılından 2015 yılına kadar toplam 16 751 hastanın dahil edildiği bir çalışmada; 5 çifte heterozigot

(3 hastada LDLR ve PCSK9 genlerinde, 2 hastada LDLR ve APOB genlerinde) hastaya ulaşmıştır (Hernandez vd 2016).

Çalışmaya dail edilen 52 hasta LDLR geninde mutasyon olduğu bilinen hastalar arasından seçildiği için verileri, mutasyon varlığı bilinmeyen hastalar ile kıyaslamak yanıltıcı olabilir. Bu durum göz önünde bulundurularak düşünüldüğü takdirde, çifte heterozigotluk oranının diğer çalışmalara oranla yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen bir diğer veri de LDLR genine ait değişimlerin türleri, ekzonları ve variant sayısıdır. Literatürde yer alan önceki çalışmalardan; LDLR geninde mutasyon türlerini araştıran bir çalışmada; 2925 vakada, 1707 farklı varyant saptanmıştır. Bunların 129'u (%7,5) anlamsız değişim, 337'si (%19,7) çerçeve kayması, 118'i (%6,9) büyük bölge değişimi, 181'i (%10,6) intronik ve 795'inin (%46) yanlış anlamlı değişim olduğu raporlanmıştır (Leigh vd 2016).

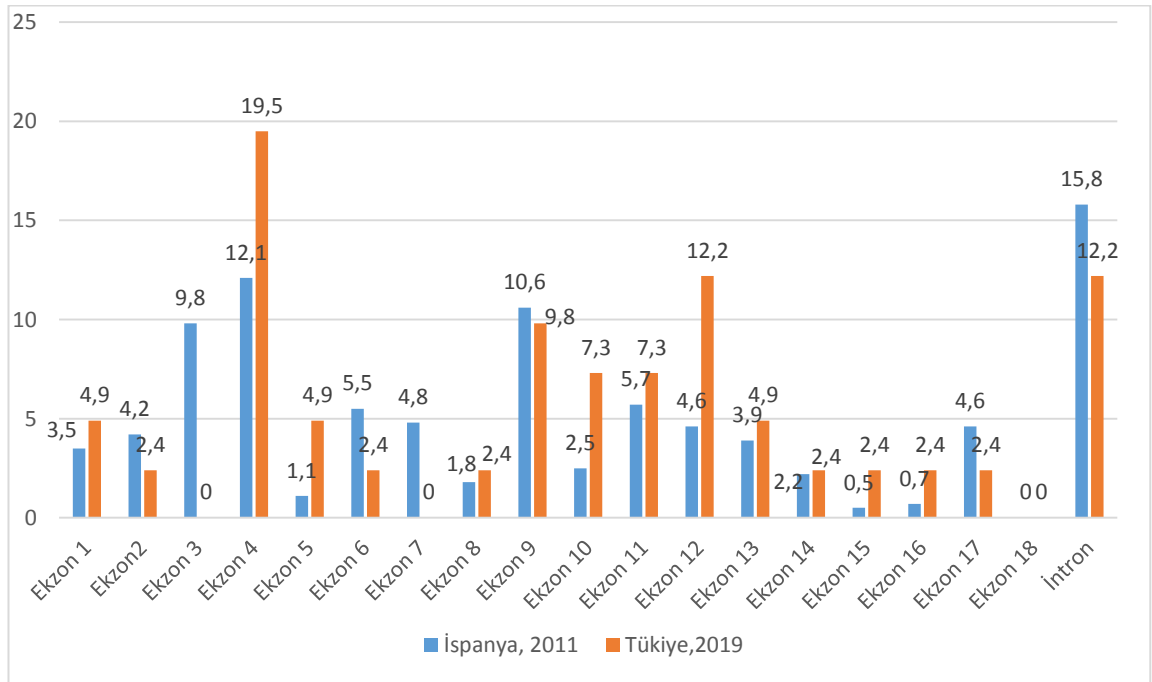
1018 hastalık konuyla ilgili bir diğer çalışma sonucunda LDLR geninde 237 varyant tespit edilmiştir. Bunların %50'si yanlış anlamlı değişim, %11,4'ü anlamsız değişim, %17,3'ü çerçeve kayması, %11' intronik değişim, %10,5'i büyük bölge değişimleridir (Bertoloini vd 2013).

Bu çalışmadan elde edilen veriler önceden literatürde yer alan verilerle benzerlik göstermektedir (Çizelge 6.2.). LDLR geninde değişim bulunan 52 hastada, 41 farklı varyan tespit edilmiştir. Varyantların 27'si (%66) yanlış anlamlı değişim, 6'sı (%14,6) çerçeve kayması, 5'i (%12,2) intronik değişim , 2'si (%4,9) anlamsız değişim, 1'i (%2,4) splice bölgesinin kaybına neden olan değişimdir.

Çizelge 6.2 LDLR geninde tespit edilen varyantların karşılaştırılması

Hasta Sayısı	Varyant Sayısı	Yanlış anlamlı Değişim	Anlamsız Değişim	Çerçeve Kayması	Büyük Bölge Değişimleri	İntronik Değişimler
2925 Hasta (Leigh vd 2016)	1707	%46	%7,5	%19,5	%6,7	%10,6
1018 Hasta (Bertoloini vd. 2013)	237	%50	%11,4	%17,3	%10,5	%11
52 Hasta	41	%66	%4,9	%14,6	%2,4	%12,2

İspanya’da LDLR genindeki mutasyonların ekzonlara dağılımını ele alan 5430 hastalık bir çalışmada, hastaların %16’ya yakınının intronik mutasyon taşıdığı saptanmıştır. En çok mutasyon görülen ekzonlar, ekzon 4 (%12) ve ekzon 9’dur (%10,6). 18nci ekzonda hiç mutasyon saptanmamıştır (Palacios vd 2011). LDLR genine ait mutasyon dağılımına baktığımızda benzer sonuçları görmekteyiz. 4ncü ekzonun, 8 değişimin saptandığı en fazla mutasyon görülen ekzon olduğu tespit edilmiştir. 18nci ekzon yanı sıra, 3 ve 7nci ekzonda mutasyon varlığı tespit edilmemiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1 LDLR geninde görülen değişimlerin ekzonlara dağılımının yüzde cinsinden karşılaştırılması (Palacios vd 2011)

İntronik değişimlerin patojenitesi en az değişimler olduğu tespit edilmiştir. Patojenitesi en yüksek olan mutasyonların 9 ile 12. Ekzonlar arasında bulunduğu saptanmıştır (şekil 5.5).

Hastalardan yalnızca birinde saptanan PCSK9 değişimi p.A522T değişimidir. Hastalık yapıcı etkisi düşük, sınıf 4 olarak sınıflandırılmıştır. Veri tabanlarına göre görölme sıklığının düşüktür. Bu varyantın bir işlev kaybına sebep (LOF) varyant olabileceği düşünölmektedir. PCSK9 geninin düzenleyici etkisi düşünöldüğünde, LDLR mutasyonu bulunan hastadaki LDL-Kolesterol düzeyinin aynı zamanda bu değişimi taşıması sayesinde azalması mümkündür.

6.1 Öneriler

Hiperkolesterolemi tedavisinde, altta yatan nedenden bağımsız olarak benzer tedavi yöntemlerinin uygulanması sebebiyle genetik tanının üzerine gidilmemektedir. Hastalığın fiziksel bulguları ortaya çıkmadan önlem almak adına genetik tanı önemlidir. Farklı formların, farklı mutasyonların ve mutasyon birlikteliklerinin hastalığın fenotipini etkilediği bilinmektedir. Bu sebeple genetik tanı üzerine gidilmeli, gerekirse aile taraması yapılmalıdır.

LDLR geninde mutasyon taşıyan olguların, APOB ve/ve ya PCSK9 genlerinde de aynı zamanda değişim bulundurup bulundurmadığı amacıyla yapılan bu çalışmada, bir ileriki adım olarak değişim birlikteliği ile fenotipik ilişki kurulması mümkün olabilir. Değişim birlikteliklerinin LDL-Kolesterol düzeyine etkileri klinik olarak faydalı bir çalışma olacaktır.

52 olguluk çalışmada hastalar, her ne kadar ülkenin tüm coğrafik bölgelerinden seçilmiş olsa da, ülkeye dair kesin ve açık olarak mutasyon spektrumunun oluşturulması açısından yetersizdir. Çalışma ne kadar geniş çapta yapılırsa güvenilirlik o kadar artacaktır.

Her toplumun LDL-Kolesterol düzeyinde farklılıklar bulundurabileceği düşünülürse, Türk toplumu için farklı toplumların skortama sistemleri yerine kendimize özgü bir skortama sistmi geliştirmek gereklidir. Bunun için de toplum LDL-Kolesterolle dair istatistiki çalışmalar yapılabilir. Şüphesiz ki daha evvel bahsedilmiş olan kademeli tarama yöntemi, toplumda hiperkolesterolemi stratejisi olarak belirlenmelidir. Kademeli tarama yöntemi ile ulaşılan hasta bireyin sağlıklı yakınları kontrol grubu olarak düşünülürse, hastalıkla ilişkili olan ve olmayan klinik bulgular gözden geçirilebilir.

PCSK9 geninin düzenleyici (modifier) gen etkisinin daha açık anlaşılabilmesi için de, LDLR geni ile PCSK9 geninde çift heterozigotluk durumunun daha çeşitli varyantları ve LDL-Kolesterol düzey bilgilerini kapsayarak araştırılması mümkündür.

KAYNAKLAR

- Abifadel, M., Rabès, J.P., Jambart, S., Halaby, G., Gannagé-Yared, M.H., Sarkis, A., Beaino, G., Varret, M., Salem, N., Corbani, S., Aydénian, H., Junien, C., Munnich, A., Boileau, C. 2009. The Molecular Basis of Familial Hypercholesterolemia in Lebanon: Spectrum of LDLR Mutations and Role of PCSK9 as a Modifier Gene. *Human Mutation* 30:E682-E691
- Altay, M., Aslan İ., Aydoğdu, A., Bayram, F., Bozkırlı, E., Can, S., Cesur, M.F., Çarlıoğlu, A., Demirci, İ., Ünal, D., Eren, M.A., Ersoy, C., Ezgü, F.S., Güldiken, S., Haymana, C., Gözü, H.I., Torun, A.İ., Kıyıcı, S., Örük, G., Yetkin D.Ö., Özkaya, M., Sabuncu, T., Soyaltın, U.E., Sönmez, A., Şimsir, I.Y., Üçler, R. 2018. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Dislipidem Tanı ve Tedavi Kılavuzu.
- American Medical Association. 2001. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the NCEP Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel 3). *JAMA* 2001; 285:2486-97.
- Anne K Soutar, A.K., Naoumova, R.P. 2007. Mechanisms of Disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2007(4),4; 214-225
- Anonim, 2018. Web Sitesi: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Statinler> Erişim Tarihi: 01.02.2020
- Anonim, 2019. Web Sitesi: <https://labakademi.com/tek-gen-hastaliklari-ve-karyomapping-yontemi/> Erişim Tarihi: 01.08.2019
- Anonymous, 2015. Web Sitesi : <https://prezi.com/arqbiap5akth/familial-hypercholesterolemia> Erişim Tarihi: 07.11.2019
- Anonymous, 2019. Web Sitesi : <https://www.endocrinologyadvisor.com/home/topics/cardiovascular-and-metabolic-disorders/ldl-and-dlcnc-score-may-identify-familial-hypercholesterolemia/> Erişim Tarihi: 08.12.2019
- Anonymous, 2019. Web Sitesi : <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/familial-hypercholesterolemia> Erişim Tarihi: 08.12.2019
- Anonymous. 2019. Web Sitesi: <https://www.indiamart.com/proddetail/gel-documentation-system-21395745488.html> Erişim Tarihi:01.09.2019
- Anonymous. 2019. Web Sitesi: https://www.malacards.org/card/familial_hypercholesterolemia?search=familial%20hypercholesterolemia Erişim Tarihi:10.12.2019
- Anonymous, 2020. Web Sitesi: <https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/images/techniques/techniques-fpo.jpg> Erişim Tarihi: 01.02.2020
- Anonymous, 2020. Web Sitesi: <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html> Erişim Tarihi: 01.02.2020

- Anonymous. 2020. Web Sitesi: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html> Erişim Tarihi: 01.02.2020
- Anonymous. 2020. Web Sitesi: <http://enseqlopedia.com/2011/06/miseq-vs-hiseq-flowcell/> Erişim Tarihi: 01.02.2020
- Bañares, V. G., Corral, P., Medeiros, A. M., Araujo, M. B., Lozada, A., Bustamante, J., Cerretini, R., López, G., Bourbon, M., Schreier, L. E. 201). Preliminary spectrum of genetic variants in familial hypercholesterolemia in Argentina. *Journal of Clinical Lipidology* 11(2), 524–531
- Bertolini, S., Pisciotta, L., Rabacchi, C., Cefalù, A. B., Noto, D., Fasano, T., Signori, A., Fresa, R., Aversa, M., Calandra, S. 2013. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis*, 227(2), 342–348
- Bozkirli, E. 2018. Dyslipidemia; Definition, Etiology and Classification. *Türkiye Klinikleri J Endocrin-Special Topics*. 2018;11(1):6-9
- Coker, M. 2014. Ailevi hiperkolesterolemi tedavisinde LDL aferezi. *Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol* 2014;42 Suppl 2:32-46
- Chen, P., Chen, X., & Zhang, S. 2019. Current Status of Familial Hypercholesterolemia in China: A Need for Patient FH Registry Systems. *Frontiers in Physiology*, 10.
- Defesche, J. C. 2010. Defining the challenges of FH Screening for familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology* 4(5), 338–341.
- Fouchier, S.W., Hutten, B.A., Defesche, J.C. 2015. Current novel-gene-finding strategy for autosomal dominant hypercholesterolaemia needs refinement. *J Med Genet* 2015;52:80–84.
- France, M., Rees, A., Datta, D., Thompson, G., Capps, N., Ferns, G., Ramaswami, U., Seed, M., Neely, D., Cramb, R., Shoulders, C., Barbir, M., Pottle, A., Eatough, R., Martin, S., Bayly, G., Simpson, B., Halcox, J., Edwards, R., Main, L., Payne, J., Soran, H. 2016. HEART UK statement on the management of homozygous familial hypercholesterolaemia in the United Kingdom. *Atherosclerosis* 255 (2016) 128-139
- Goldstein, J.L., Brown, M.S. 1975. Familial Hypercholesterolemia: A Genetic Regulatory Defect in Cholesterol Metabolism. *The American Journal of Medicine* 1975;58(2):147-150
- Hartgers, M. L., Defesche, J.C., Langslet, G., Hopkins, P.N., Kastelein, J.J.P., Baccara-Dinet, M.T., Seiz, W., Hamon, S., Banerjee, P., Stefanutti, C. 2018. Alirocumab efficacy in patients with double heterozygous, compound heterozygous, or homozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology* 12(2), 390–396
- Haymana, C., Berlik, H., Güneş, Y., Tunçez, O.E., Aytekin, C., Tapıkara, Z., Güzel, H., Öztürk, Ö., Barçın, C., Özgürtaş, T., Azal, Ö., Sönmez, A. 2017. Identifying undiagnosed or undertreated patients with familial hypercholesterolemia from the laboratory records of a tertiary medical center. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2017;45(8):731-738

- Incecik, F., Sangün, Ö., Akçalı, C., Güzelmansur, İ. 2006. Ailesel Hiperkolesterolemi. Göztepe Tıp Dergisi 21(4):210-212, 2006
- Jensen, H. , Jensen, L., Meinertz, H., Hansen, P., Gregersen, N., Færgeman, O. 1999. Spectrum of LDL receptor gene mutations in Denmark: implications for molecular diagnostic strategy in heterozygous familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis, 146(2), 337–344.
- Kardas, F., Cetin, A., Solmaz, M., Buyukoglan, R., Kaynar, L., Kendirci, M., Eser, B., Unal, A. Successful Treatment Of Homozygous Familial Hypercholesterolemia Using Cascade Filtration Plasmapheresis. Turk J Hematol 2012; 29: 334-341
- Kaya, E., Kayıkçıoğlu, M., Vardarlı, A.T., Eroğlu, Z., Payzın, S., Can, L. 2017. PCSK 9 gain-of-function mutations (R496W and D374Y) and clinical cardiovascular characteristics in a cohort of Turkish patients with familial hypercholesterolemia. Anatol J Cardiol. 2017 Oct; 18(4): 266–272.
- Kayıkçıoğlu, M. 2014. Homozygous familial hypercholesterolemia. Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol 2014;42 Suppl 2:19-31
- Leigh, S., Futema, M., Whittall, R., Taylor-Beadling, A., Williams, M., den Dunnen, J.T., Humphries, S.E. 2017. The UCL low-density lipoprotein receptor gene variant database: pathogenicity update . J Med Genet 2017;54:217–223
- Marduel M., Carrié, A., Sassolas, A., Devillers, M., Carreau, V., Di Filippo, M., Erlich, D., Abifadel, M., Marques-Pinheiro, A., Arnold Munnich, A., Junien, C., The French ADH Research Network, Catherine Boileau, C., Varret, M., and Rabès, J.P. 2010. Molecular Spectrum of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia in France. Human Mutation Mutation in Brief 31: E1811-E1824 (2010)
- Muller, C. 1938. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. Acta med. Scandinava 89 (supp.): 75
- Nordestgaard, B. G., & Benn, M. 2017. Genetic testing for familial hypercholesterolaemia is essential in individuals with high LDL cholesterol: who does it in the world? European Heart Journal, 38(20), 1580–1583.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R. 2005. Thompson&Thompson Tıbbi Genetik. 6. Baskı. Güneş Kitabevi.
- Ozkul, Y. 2007. Moleküler Hematoloji Sözlüğü. VI. Hematoloji İlk Basamak Kursu. 16 Ekim 2007.
- Palacios, L., Grandoso, L., Cuevas, N., Olano-Martín, E., Martinez, A., Tejedor, D., & Stef, M. 2012. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. Atherosclerosis 221(1), 137–142.
- Rosa M. Sánchez-Hernández, R.M., Civeira, F., Stef, M., Perez-Calahorra, S., RD, Almagro, F., MD, Plana, N., Novoa, F.J., Sáenz-Aranzúbia, P., Mosquera, D., Soler, C., Fuentes, F.J., MD, Brito-Casillas, Y., Real, J.T., Blanco-Vaca, F., Ascaso, J.F., Pocovi, M. 2016. Homozygous Familial Hypercholesterolemia in Spain: Prevalence and Phenotype-Genotype Relationship.
- Sag, S., Sag, S.Ö., Güllülü S. 2016. Familial Hypercholesterolemia: Clinical and Genetic Characteristics. Türkiye Klinikleri J Med Genet-Special Topics. 2016;1(1):93-100

- Shirahama, R., Ono, T., Nagamatsu, S., Sueta, D., Takashio, S., Chitose, T., Fujisue, K., Sakamoto, K., Yamamoto, E., Izumiya, Y., Kaikita, K., Hokimoto, S., Hori, M., Harada-Shiba, M., Kajiwar, I., Hisao Ogawa, H., Tsujita, K. 2018. Coronary Artery Plaque Regression by a PCSK9 Antibody and Rosuvastatin in Double-heterozygous Familial Hypercholesterolemia with an LDL Receptor Mutation and a PCSK9 V4I Mutation. *Intern Med* 57: 3551-3557, 2018
- Sinan, U.Y., Sansoy, V. 2014. Familial hypercholesterolemia: epidemiology, genetics, diagnosis, and screening. *Arch Turk Soc Cardiol* 2014;42 Suppl 2:1-9
- Singh, S., Bittner, V. 2015. Familial Hypercholesterolemia—Epidemiology, Diagnosis, and Screening. *Curr Atheroscler Rep* (2015) 17:3
- Sjouke, B., Kusters, D. M., Kindt, I., Besseling, J., Defesche, J. C., Sijbrands, E. J. G., van Lennep, J.E.R, Stalenhoef, A.F.H., Wiegman, A., de Graaf, J., Fouchier, S.W., Kastelein, J.J.P., Hovingh, G. K. 2014. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolaemia in the Netherlands: prevalence, genotype–phenotype relationship, and clinical outcome. *European Heart Journal* 36(9), 560–565.
- Sjouke, B., Defesche, J.C., Hartgers, M.L., Wiegman, A., Roeters van Lennep, J.E., Kastelein, J.J., & Hovingh, G.K. 2016. Double-heterozygous autosomal dominant hypercholesterolemia: Clinical characterization of an underreported disease. *Journal of Clinical Lipidology* 10(6), 1462–1469.
- Sozen, M.M., Whittall, R., Oner, C., Tokatlı, A., Kalkanoglu, H.S., Dursun, A., Coskun, T., Oner, R., Humphries, S.E. 2004. The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis* 180 (2005) 63–71
- Sun, D., Zhou, B.-Y., Li, S., Sun, N.-L., Hua, Q., Wu, S.-L., Cao, Y.-S , Guo1, Y.-L., Wu1, N.-Q., Zhu1, C.-G, Gao1, Y. , Cui1, C.-J., Liu1, G., Li, J.-J., (2018). Genetic basis of index patients with familial hypercholesterolemia in Chinese population: mutation spectrum and genotype-phenotype correlation. *Lipids in Health and Disease*, 17(1).
- Tichy, L., Fajkusova, L., Zapletalove, P., Schwarzova, L., Vrablik, M., Freiburger, T. 2017. Molecular Genetic Background of an Autosomal Dominant Hypercholesterolemia in the Czech Republic. *Physiol. Res.* 66 (Suppl. 1): S47-S54
- Wand, H., Sturm, A.C., Erby, L., Kindt, I., Klein, W.M.P. 2019. Genetic testing preferences and intentions in patients with clinically diagnosed. *J Genet Couns.* 2019;00:1–9.
- Watts, G. F., Gidding, S., Wierzbicki, A. S., Toth, P. P., Alonso, R., Brown, W. V., et al. (2014). Integrated guidance on the care of familial hypercholesterolaemia from the International FH Foundation. *Int. J. Cardiol.* 171, 309–325.

EK 1 ETİK KURUL KARARI

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
ETİK KURUL TOPLANTI RAPORU

OTURUM NO : 29
OTURUM TARİHİ : 16 Aralık 2013
OTURUM BAŞKANI : Prof.Dış Tbp.Alb.Yaşar Meriç TUNCA
OTURUM SEKRETERİ : Doç.Tbp.Alb.Muharrem UÇAR

GATA Etik Kurulu'nun 16 Aralık 2013 günü yapılan 29'ncü oturumunda, İntergen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Limited Şirketi'nde görevli Yüksek Moleküler Biyolog Haldun DOĞAN'ın sorumlu araştırmacılığını yaptığı "Ülkemizde Familial Hiperkolesterolemiye Yol Açan Sık Görülen Tek Gen Hastalıklarının Dağılımı, Sık ve Nadir Görülen Mutasyonların Belirlenmesi, Tanı ve Toplum Taramasına Yönelik Genetik Test Kiti Geliştirilmesi" başlıklı çok merkezli, tanı/tanı kiti geliştirme çalışması olan araştırma dosyası değerlendirildi.

Araştırma dosyasının amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere UYGUN olduğuna karar verildi.

BAŞKAN


Y. Meriç TUNCA
Prof.Dış Tbp.Alb.

ÜYE


Ayhan KUBAR
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE


Mahir GÜLEÇ
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE


Cengiz BAŞOĞLU
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE

TOPLANTIYA KATILMADI
Cemil YILDIZ
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE


Semih GÖRGÜLÜ
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE


Ergun TOZKOPARAN
Prof.Tbp.Alb.

ÜYE


Muharrem UÇAR
Doç.Tbp.Alb.

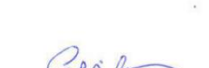
ÜYE


Emine YIGUN
Doç.Dr.Hv.Sağ.Alb.

ÜYE


Harun TUĞCU
Doç.Tbp.Alb.

ÜYE


Cengiz Han AÇIKEL
Doç.Tbp.Alb.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Müge BİLGİN

Doğum Yeri : Çankaya

Doğum Tarihi : 09.11.1991

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu

Lise : Çankaya Anadolu Lisesi (2009)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü (2013)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(Mart 2020)